مقاله پژوهشی

بررسی اثر آلفاتوکوفرول (ویتامین E) بر اسپرماتوزوئیدهای مایع سمینال موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی (رات) بعد از فرآیند انجماد و ذوب

علی سلیمان‌زاده[۱]، عادل صابری‌وند*[۲]، عباس احمدی[۳]

تاریخ دریافت ۱۳۹۳/۰٤/۱۸ تاریخ پذیرش ۱۳۹۳/۰٦/۲۸

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS)، ناشی از فرآیند انجماد، می‌تواند موجب آسیب اسپرم پستانداران شود. آلفاتوکوفرول به‌عنوان آنتی‌اکسیدان مؤثر در برابر استرس اکسیداتیو شناخته شده است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی آلفاتوکوفرول بر شمارش اسپرم، تحرک، قابلیت زنده ماندن، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و تمامیت DNA اسپرم رات در طی فرآیند انجماد اسپرم می‌باشد.

مواد و روش‌ها: اسپرم جمع‌آوری‌شده از ۱۰ رات بالغ به سه گروه تقسیم شدند: اسپرم تازه، کنترل و ۲۰۰ µM آلفاتوکوفرول. بعد از انجماد، تعداد، تحرک، میزان زنده ماندن و میزان آنتی‌اکسیدان اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان یکپارچگی DNA به‌وسیله رنگ‌آمیزی DNA با روش آکریدین اورنج صورت گرفت.

یافته‌ها: بعد از فرآیند ذوب و انجماد، افزایش قابل‌توجهی در میزان تحرک، قابلیت زنده ماندن، تمامیت DNA و قدرت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC) در گروه آلفاتوکوفرول نسبت به شاهد مشاهده شد ($p<0.05$). پس از انجماد، در بررسی ریخت‌شناسی و شمارش اسپرم در بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری دیده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که افزودن آلفاتوکوفرول به‌عنوان آنتی‌اکسیدان قوی در طی انجماد منجر به اثرات مثبت بر پارامترهای اسپرم پس از ذوب در رات بالغ می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آلفاتوکوفرول، پارامترهای اسپرم، تمامیت DNA، ذوب، انجماد، رات

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و پنجم، شماره نهم، ص ۸۳٤-۸۲٦، آذر ۱۳۹۳

آدرس مکاتبه: تبریز، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز، ایران، صندوق پستی: ۵۱۶۶۶۱۶۴۷۱، تلفن: ۳۶۳۷۸۷۳۴-۰۴۱

Email: adelsaberivand@yahoo.ca

مقدمه

طی حفاظت انجمادی مایع سمینال در معرض شوک سرمایی و فشار اسمزی قرار می‌گیرد و در نتیجه میزان اکسیداسیون غشا به‌واسطه درصد بیشتر واکنش‌های اکسیداتیو افزایش می‌یابد که این امر نهایتاً زنده ماندن و عمر اسپرم را کاهش می‌دهد (۱). تحقیقات نشان می‌دهد که میزان لقاح پس از حفاظت انجمادی اسپرم به‌واسطه عملکرد نامناسب غشاء آن به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد (۲). همچنین رادیکال‌های آزاد (ROS) تولیدشده در مراحل انجماد حفاظتی می‌توانند موجب تغییرات اسکلت سلولی اسپرم، مهار اتصال اسپرم به تخمک و تخریب آکسونم اسپرم شوند (۳). سلول‌های اسپرم برعلیه تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن به سیستم دفاع قوی آنتی‌اکسیدانی تجهیز شده است، اما یک عدم تعادل مابین تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و دفاع آنتی‌اکسیدانی موجب استرس اکسیداتیو در اسپرم می‌شود (۴). انواع مختلفی از آنتی‌اکسیدان‌ها جهت مبارزه با رادیکال‌های آزاد اکسیژن در پستانداران مورد آزمایش قرار گرفته‌اند (۳).

آنتی‌اکسیدان‌ها خط مقدم مبارزه برعلیه رادیکال‌های آزاد اکسیژن هستند (۵).

---

[۱] استادیار مامایی و بیماری‌های تولیدمثل دام، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی

[۲] دانشیار مامایی و بیماری‌های تولیدمثل دام، دانشگاه تبریز، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی (نویسنده مسئول)

[۳] استادیار علوم تشریح، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-07-15]

ویتامین E یکی از اجزاء اصلی سیستم آنتی‌اکسیدانی اسپرماتوزوآ بوده و یکی از اصلی‌ترین محافظ‌های غشاء در برابر حملات رادیکال‌های آزاد اکسیژن و پراکسیداسیون چربی‌ها می‌باشد (۶). آلفاتوکوفرول فراوان‌ترین و فعال‌ترین عضو خانواده ویتامین E و یک آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی قوی شکننده زنجیر بوده که از پیشروی واکنش‌های رادیکال‌های آزاد اکسیژن جلوگیری می‌کند (۷). در حفاظت انجمادی، افزودن ویتامین E موجب اثرات مثبت روی تحرک اسپرم و پتانسیل غشاء میتوکندری و نیز یکپارچگی غشاء می‌شود (۸).

در مطالعات مختلفی، نقش آنتی‌اکسیدانی این ویتامین در مهار نمودن اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد در بیضه و اسپرم گزارش شده است (۹). علاوه بر این، ویتامینE با قابلیت ذکرشده قادر است سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی سلول‌های بیضه و اسپرم را تقویت نماید (۱۰).

هدف از این مطالعه بررسی اثر آلفاتوکوفرول (ویتامین E) بر تحرک اسپرم، شمارش اسپرم، قابلیت زنده ماندن و قدرت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC) مایع سمینال و تمامیت DNA اسپرم رات در طی فرآیند ذوب- انجماد می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از ۱۰ رات نر بالغ آلبینو از نژاد ویستار (۴ ماهه با وزن ۲۳۰-۲۰۰ گرم) که از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه‌شده بود استفاده شد. حیوانات در شرایط محیطی فاقد پاتوژن و تحت شرایط استاندارد دمایی (۲۲ ± ۲ °C) و رطوبت (۵۰ ٪ ±۱۰) و با سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با دسترسی کامل به آب و غذای کافی نگهداری شدند. در این مطالعه تمام اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید.

جمع‌آوری اسپرم‌ها: جهت جمع‌آوری اسپرم، با ایجاد برش در ناحیه شکم، دم اپی‌دیدیم از بیضه جدا کرد گردیده و به ۵ ml محیط HTF (Human Tubal Fluid) (sigma, USA)، حاوی BSA (Bovine Serum Albumen) (sigma, USA)، انتقال یافت و بعد از ایجاد چند برش در دم اپی‌دیدیم برای خروج اسپرم‌ها در داخل انکوباتور CO2 ۵درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. بعد از ۰/۵ ساعت اسپرم‌ها خارج و در محیط پخش شدند.

درنهایت بعد از جمع‌آوری اسپرم، برای هر گروه از ۱۴ µL سوسپانسیون اسپرم استفاده شد. مقدار ۲۰۰ µM آلفاتوکوفرول (Sigma, Germany) (۱۱) استفاده گردید. اسپرم جمع‌آوری‌شده به سه گروه تقسیم شدند: اسپرم تازه، کنترل (حاوی اسپرم در محیط انجماد استاندارد بدون آنتی‌اکسیدان) و ۲۰۰ µM آلفاتوکوفرول (ویتامین E).

بعد از اعمال زمان تعادل به مدت ۳ ساعت در گروه‌های درمان، نمونه‌های منی رقیق شده با مکیدن آن‌ها در پایت‌های ۰/۵ میلی‌لیتری پر شدند. پایت‌های بسته‌بندی‌شده بر روی تانک انجماد چیده شده و برای انجماد آماده شدند. در زمان انجماد پایت‌ها، در داخل تانک ازت در تماس با بخار ازت مایع ۳ سانتی‌متر بالاتر از سطح ازت مایع قرار داده شدند. بعد از سپری شدن ۱۵ – ۱۰ دقیقه و رسیدن دمای تانک به ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد پایت‌ها در گابلت جمع‌آوری‌شده و در ازت مایع غوطه‌ور شدند (۱۲).

اسپرم‌های منجمد جهت یخ گشایی در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه قرار داده شدند و سپس پارامترهای منی ارزیابی شدند (۱۳).

ارزیابی تحرک اسپرم‌ها: برای این منظور نمونه‌ی اسپرم مطابق با روش بالا استحصال شدند و متعاقب رقیق‌سازی اسپرم‌ها برای هر موش در هر گروه ۱۰ قطره جهت ارزیابی تحرک اسپرم‌ها مورداستفاده قرار گرفت. برای تعیین درصد تحرک، ۱۰۰ خانه از ۲۵ میدان میکروسکوپی که به شکل تصادفی انتخاب‌شده بودند ارزیابی شدند و سپس میانگین آن‌ها بر اساس درصد تحرک ثبت گردید (۱۴).

شمارش اسپرم‌ها: برای شمارش اسپرم‌ها از روش استاندارد لام هموسایتومتری استفاده شد که برای هر موش در هر گروه ۲۰ قطره مورداستفاده قرار گرفت (۱۵).

قابلیت زنده ماندن اسپرم‌ها: برای بررسی میزان زنده‌بودن اسپرم از رنگ‌آمیزی ائوزین- نگروزین استفاده شد. به این صورت که یک قطره ائوزین ۱درصد و به دنبال آن یک قطره نگروزین ۵درصد روی لام گرم شده بر روی صفحه میکروسکوپ که در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تنظیم‌شده بود، قرار داده شد و سپس به‌آرامی یک قطره از نمونه منی به رنگ‌ها اضافه گردید. پس از مخلوط کردن منی با رنگ‌های فوق از هر نمونه ۴ گسترش تهیه شد (۱۵). پس از خشک شدن گسترش‌ها در هوا، با استفاده از میکروسکوپ بررسی گردیدند. در رنگ‌آمیزی ائوزین- نگروزین اسپرم‌های مرده به رنگ صورتی یا قرمز درآمده و اسپرم‌های زنده به علت جذب نکردن رنگ، سفیدرنگ دیده می‌شوند. حداقل ۱۵۰ اسپرم از هر اسلاید (حداقل ۶۰۰ اسپرم از هر نمونه منی) به‌وسیله میکروسکوپ نوری مدل OLYMPUS BX41 (Olympus Optical Co., Japan) ارزیابی شدند و با تفکیک اسپرم‌های مرده از کل اسپرم‌های شمارش‌شده هر نمونه منی، درصد اسپرم‌های زنده تعیین گردید.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-07-15]

ریخت‌شناسی اسپرم: برای ارزیابی مروفولوژیک اسپرم‌ها از رنگ‌آمیزی پاپانیکولا استفاده شد. به این شکل که اسپرم‌هایی که دارای ظاهر غیرطبیعی بودند، شمارش شدند و نتایج بر اساس درصد بیان شد (۱۶).

میزان آسیب به DNA اسپرم: میزان اسپرم‌های با DNA آسیب‌دیده با استفاده از فن رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج طبق روش کاتایوز و همکاران تعیین گردید (۱۷). به‌طور خلاصه این روش به شرح روبرو است. ابتدا از نمونه‌های منی گسترش تهیه شد و این گسترش‌ها در معرض هوا خشک شدند. سپس، گسترش‌های خشک‌شده به مدت ۲ ساعت در محلول اسید- الکل (methyl alcohol-glacial acetic acid 3:1, vol/vol) قرار گرفتند. سپس، تقریباً یک میلی‌لیتر از محلول رنگ‌آمیزی[1] تهیه‌شده حاوی ۰/۰۱۹ درصد آکریدین اورنج (3, 6-bis [dimethylamino] acridine, hemi [zinc chloride] salt, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.) روی هر لام به مدت ۵ دقیقه، در دمای اتاق، قرار گرفته و سپس نمونه‌ها با آب مقطر شسته شدند. در انتها، نمونه‌ها توسط میکروسکوپ اپی فلورسنس (Model GS7, Nikon Co., Japan) با طول‌موج ۴۹۰-۴۵۰ نانومتر ارزیابی و تعداد ۱۰۰ تا ۲۰۰ اسپرم از هر اسلاید برای تعیین میزان اسپرم‌های با DNA آسیب‌دیده شمارش شد. در این رنگ‌آمیزی، اسپرم‌ها بر اساس رنگ فلوروسنت ساطع‌شده از آن‌ها در زیر میکروسکوپ به دودسته اصلی سبز و قرمز تقسیم‌بندی می‌شوند. در زمان ارزیابی، اسپرم‌های طبیعی به رنگ سبز و اسپرم‌های دارای DNA آسیب‌دیده به رنگ قرمز دیده می‌شوند.

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی: به‌منظور ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، از آزمایش کاهش قدرت احیاء کنندگی فریک یا FRAP تست استفاده شد. به‌طور خلاصه در PH پایین که توسط استات بافر ایجاد شده بود اثر احیاء شوندگی کمپلکس Fe III- TPTZ به فرم فروس مورد ارزیابی قرار گرفت به این صورت که این کمپلکس در مجاورت استات بافر رنگ آبی ایجاد می‌کند و در نتیجه می‌توان آن را در ۵۹۳ nm اندازه‌گیری کرد. محلول آبکی FeII و غلظت مناسبی از محلول تازه تهیه شده‌ی اسکوربیک اسید به ترتیب در قالب بلانک و محلول استاندارد مورد استفاده قرار گرفتند (۱۸).

آنالیز داده‌های پارامترهای اسپرم: داده‌های حاصل از نمونه‌های موردمطالعه، با کمک برنامه آماری SPSS نسخه ۱۷ تحت ویندوز (Inc., Chicago, IL, USA) مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند. برای بررسی داده‌ها ابتدا میانگین و خطای استاندارد (S.E.M) تمامی پارامترهای موردنظر با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (one way ANOVA) محاسبه شد. سپس بررسی ارتباط بین پارامترهای استفاده شد و چگونگی همبستگی آن‌ها و معنی‌دار بودن شمارش اسپرم، تحرک اسپرم، میزان قابلیت زنده ماندن اسپرم، ریخت‌شناسی اسپرم و تمامیت DNA نسبت به گروه کنترل در کل نمونه‌ها با استفاده از تست LSD با $P \leq 0.05$ محاسبه گردید.

یافته‌ها

بررسی شمارش اسپرم: بررسی آماری نتایج حاصل از شمارش اسپرم‌ها در گروه اسپرم تازه، آلفاتوکوفرول و کنترل بین گروه‌های مختلف آزمایشی و گروه کنترل نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین شمارش اسپرم در گروه اسپرم تازه و آلفاتوکوفرول نسبت به گروه کنترل وجود نداشت (جدول ۱-۴، شکل ۱-۴).

وضعیت تحرک اسپرم: درصد اسپرم‌های غیر متحرک توسط میکروسکوپ نوری بررسی شد و بررسی آماری نتایج حاصل از بررسی تحرک اسپرم در گروه اسپرم تازه، آلفاتوکوفرول و کنترل نشان داد که افزایش معنی‌داری ($P<0.05$) بین درصد تحرک اسپرم در گروه آلفاتوکوفرول نسبت گروه کنترل دیده شد. همچنین بین درصد تحرک اسپرم در گروه اسپرم تازه با گروه آلفاتوکوفرول تفاوت معنی‌داری ($P<0.05$) وجود داشت (جدول ۱-۴، شکل ۲-۴).

بررسی میزان قابلیت زنده ماندن اسپرم: رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین برای بررسی درصد اسپرم‌هایی مرده و یا زنده مورد استفاده قرار گرفت و اسپرم‌های مرده و زنده شمارش و درصد آن‌ها به دست آمد، نتایج حاصل از این رنگ‌آمیزی گویای این واقعیت بود که افزایش معنی‌داری ($P<0.05$) بین درصد زنده ماندن اسپرم در گروه آلفاتوکوفرول نسبت گروه کنترل دیده شد همچنین بین درصد زنده ماندن اسپرم در گروه اسپرم تازه با گروه آلفاتوکوفرول تفاوت معنی‌داری ($P<0.05$) وجود داشت (جدول ۱، شکل ۳-۴، ۴-۴ و ۵-۴).

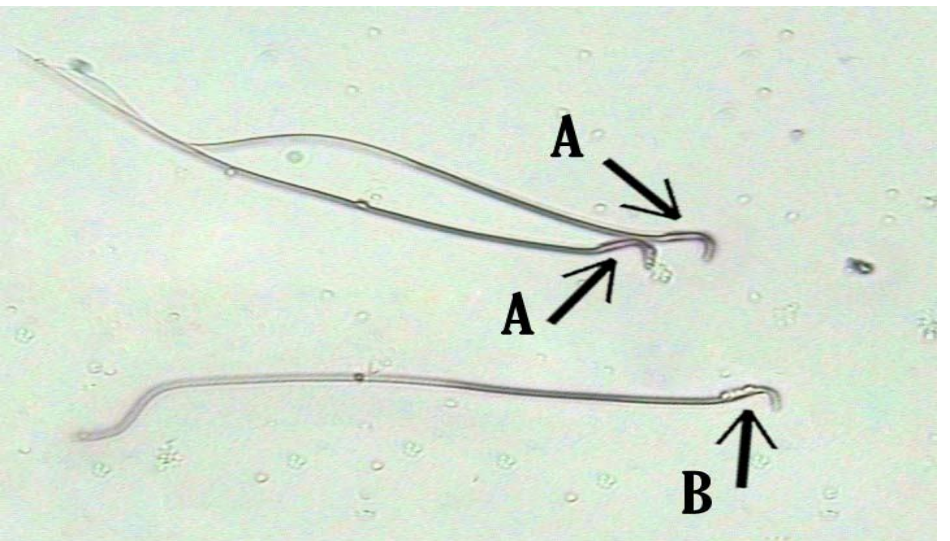
بررسی ریخت‌شناسی اسپرم: اسپرم‌هایی با ریخت‌شناسی غیرطبیعی به‌طور درصد بیان شد. بررسی آماری نتایج حاصل از بررسی تحرک اسپرم در گروه اسپرم تازه، آلفاتوکوفرول و کنترل نشان داد که افزایش آلفاتوکوفرول به اسپرم هیچ اثر معنی‌داری در میزان اسپرم‌هایی با ریخت‌شناسی غیرطبیعی نسبت گروه کنترل نداشت همچنین بین گروه آلفاتوکوفرول با گروه اسپرم تازه تفاوت معنی‌داری وجود نداشت اما بین گروه اسپرم تازه با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری ($P<0.05$) وجود داشت (شکل ۶-۴، شکل ۷-۴).

[1]. working solution

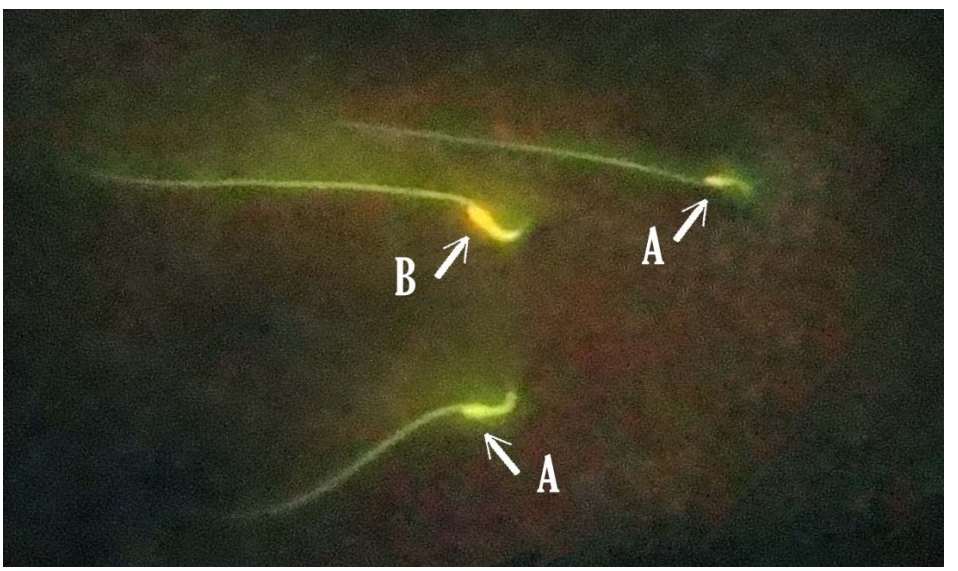
[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-07-15]

بررسی تمامیت DNA: رنگ‌آمیزی اسپرم‌های ذوب‌شده با AO و ارزیابی آن‌ها با میکروسکوپ فلوئورسنت نشان داد که در گروه آلفاتوکوفرول در سطح معنی‌داری درصد اسپرم‌هایی که DNA دو رشته‌ای ناپیوسته داشتند، نسبت به گروه کنترل پایین‌تر بود ($P<0.05$)، همچنین بین اسپرم تازه با گروه کنترل نیز اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P<0.05$) (جدول ۱-۴، شکل ۸-۴، ۹-۴ و ۱۰-۴).

بررسی قدرت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC): بررسی آماری نتایج حاصل از شمارش اسپرم‌ها در گروه اسپرم تازه، آلفاتوکوفرول و کنترل نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین قدرت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC) در تمامی گروه‌ها نسبت به هم وجود دارد ($P<0.05$) (جدول ۱-۴، شکل ۱۱-۴).



شکل (۱): ارزیابی قابلیت زنده ماندن در اسپرم‌های منجمد-ذوب‌شده رات A) اسپرم‌های قرمزرنگ نشان‌دهنده اسپرم‌های مرده می‌باشد. B) اسپرم‌های بی‌رنگ نشان‌دهنده اسپرم‌های زنده می‌باشد. رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین. بزرگنمایی X ۱۰۰۰.



شکل (۲): ارزیابی تمامیت DNA در اسپرم‌های منجمد-ذوب‌شده رات A) اسپرم‌های با سر سبزرنگ نشان‌دهنده DNA طبیعی و دست‌نخورده می‌باشد. B) اسپرم‌های با سر نارنجی نشان‌دهنده DNA دناتوره شده می‌باشد. رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج. بزرگنمایی X ۱۰۰۰.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-07-15]

جدول (۱): شمارش اسپرم، تحرک، قابلیت زنده ماندن، مورفولوژی، قدرت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC) و تمامیت DNA در مایع سمینال رات بعد از ذوب

پارامترهای اسپرم	کنترل	آلفاتوکوفرول
شمارش اسپرم (۱۰۶)	۲۰/۹۲ ±۰/ ۱۴a	۲۰/۹۲ ±۰/ ۳۳ a
تحرک اسپرم (٪)	۶۷/۵۸ ±۰/۳۴ a	۷۴/۲۱ ±۰/۴۵ b
قابلیت زنده ماندن اسپرم (٪)	۶۶/۰۷ ±۰/۵۱ a	۷۲/۵۱ ±۰/۲۳ b
مورفولوژی اسپرم (٪)	۱/۲۱ ±۰/ ۰۱ a	۱/۲۰ ±۰/ ۰۱ a
تمامیت DNA (٪)	۸۰/۰۸ ±۰/۲۷ a	۹۹/۰۸ ±۰/۲۵ b
قدرت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC) اسپرم	۶۲/۳۲ ±۰/۱۷ a	۷۰/۲۵ ±۰/۱۶ b

*حروف مختلف نشانگر اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها می‌باشد. ($P<0.05$). (Mean±SD)

بحث و نتیجه‌گیری

آماده‌سازی اسپرم و نگهداری آن در حالت انجماد موجب کاهش تحرک و باروری اسپرم (۱۹) و همچنین باعث کاهش توانایی دفاع آنتی‌اکسیدانی منی می‌شود (۲۰). افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها، با کاهش تولید رادیکال‌های آزاد و کاهش اثرات منفی شوک اکسیداتیو موجب بهبود پارامترهای اسپرم در طی انجماد حفاظتی می‌شوند (۲۱). اضافه نمودن آنتی‌اکسیدان به رقیق‌کننده طی مدت نگهداری منی به‌صورت تازه یا نگهداری آن در حالت انجماد در پستانداران گزارش شده است (۲۲). در مطالعه‌ای، نشان دادند که افزودن آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر ویتامین C و E به محیط نگهداری منی می‌تواند کیفیت اسپرم سرد شده در منی قوچ را بهبود بخشد (۲۳). پرومال (۲۰۱۴) نشان داد که افزودن سوپراکسید دیسموتاز به مایع منی، سبب بهبود پارامترهای منی گاو می‌گردد (۲۴). همچنین پرومال و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که افزودن تائورین به محیط نگهداری منی گاو می‌تواند سبب بهبود پارامترهای منی شود (۲۵).

آلفاتوکوفرول به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی شناخته شده است (۲۱). در مطالعه‌ای نشان دادند که افزودن ویتامین E به مایع منی در حین انجماد سبب بهبود کیفیت اسپرم گاومیش شده است (۲۶). امین پور و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که افزودن ویتامین E به مایع منی در گوسفند نژاد قزل سبب بهبود پارامترهای تحرک و قابلیت زنده ماندن اسپرم‌ها بعد از فرایند ذوب- انجماد می‌گردد (۲۷). در مطالعه‌ای دیگر نشان دادند که دوزهای ۱، ۲، mM۲/۵ از ویتامین E سبب بهبود پارامترهای اسپرم گاو و کاهش LPO می‌شود (۲۸). مطالعه حاضر به‌منظور بررسی اثرات مثبت آلفاتوکوفرول بر شمارش، تحرک، قابلیت زنده ماندن، ریخت‌شناسی، قدرت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC) و تمامیت DNA اسپرم منجمد- ذوب‌شده رات می‌باشد.

قابلیت تحرک و زنده ماندن اسپرم به‌عنوان مهم‌ترین پارامترهای اسپرم برای سنجش توانایی لقاح و همچنین تمامیت غشاء اسپرم محسوب می‌شوند. غشاهای اسپرم پستانداران حاوی مقادیر زیادی اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشند که نسبت به پراکسیداسیون لیپیدی حاصل از استرس اکسیداتیو (که موجب از دست رفتن سریع ATP داخل سلولی و درنهایت کاهش تحرک و قابلیت حیات اسپرم می‌شود) حساس می‌باشند (۲۸). در طی فرآیند انجماد حفاظتی قابلیت تحرک و زنده ماندن اسپرم کاهش می‌یابد. این کاهش به علت تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن بوده که موجب کاهش میزان باروری می‌شود (۲۹). بر اساس نتایج این بررسی، افزودن آلفاتوکوفرول به مایع سمینال منجمد و ذوب‌شده، اثر مثبتی روی تحرک و زنده ماندن اسپرم دارد. این اثر آلفاتوکوفرول ممکن است ناشی از نقش آنتی‌اکسیدانی آن باشد. بنابراین این احتمال وجود دارد که این ویتامین با ارتقاء فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی اسپرم[1] شامل سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز موجب افزایش تحرک و حیات اسپرم می‌شود (۳۰). این نتایج مؤید گزارشات قبلی است که نشان می‌دهد ویتامین E موجب افزایش معنی‌دار تحرک اسپرم گراز شده و از صدمات ناشی از انجماد اسپرم جلوگیری می‌کند (۲۱ و ۱۱). در تحقیقی دیگر با افزودن ویتامین E به منی قوچ قبل از انجماد نشان دادند که ویتامین E تأثیر نگه‌دارنده در میزان قدرت تحرک، کیفیت اسپرم و سلامتی غشاء اسپرم داشت (۳۱). در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شده است که ویتامین E (۱۰۰mmol/l) و رباميپايد[2] (۳۰۰mmol/l) باعث کاهش صدمات انجماد در طول عمل انجماد-گرم شدن شده و باعث بهبود تحرک بعد از ذوب شدن می‌شود (۳۲).

تمامیت DNA یک فاکتور مهم برای میزان موفقیت باروری می‌باشد (۳۳). مطالعات زیادی در مورد اثرات تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و استرس اکسیداتیو در طی انجماد حفاظتی بر صدمات DNA صورت گرفته است (۳۴). برخی از محققین اعتقاد

[1] rebamipide
[2] sperm defense antioxidant system

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-07-15]

دارند که به دلیل اختلال در بسته‌بندی DNA، دو رشته‌ی DNAی اسپرم‌ها دچار آسیب و اختلال می‌شوند که می‌تواند سبب آپوپتوز در اسپرم‌ها شود (۳۵). هاگز و همکاران نشان داده‌اند که آلفاتوکوفرول سبب کاهش قطعه‌قطعه شدن DNA حاصل از استرس اکسیداتیو می‌شوند. آن‌ها نشان دادند که اضافه کردن ویتامین C و E در طول آماده‌سازی اسپرم از صدمات DNA اسپرم محافظت می‌کند (۳۶). در مطالعه حاضر افزایش معنی‌داری در میزان تمامیت DNA اسپرم بعد از انجماد در گروه آلفاتوکوفرول نسبت به کنترل دیده شد که احتمالاً این افزایش به علت افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن می‌باشد.

میزان TAC پلاسمای مایع سمینال یک محیط مناسب برای تحرک اسپرم را فراهم می‌کند. بنابراین کاهش میزان TAC در پلاسمای مایع سمینال می‌تواند یکی از دلایل ناباروری باشد (۳۷). کنتری و همکاران (۲۰۰۱) وجود یک ارتباط مثبت بین پارامترهای اسپرم و ظرفیت TAC در پلاسمای مایع سمینال را نشان داده‌اند (۳۸). انجماد حفاظتی موجب کاهش ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌شود. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه افزودن آلفاتوکوفرول بر اسپرم رات قبل از انجماد موجب افزایش معنی‌دار ($P<0.05$) سطح TAC در پلاسمای مایع سمینال ذوب‌شده می‌شود.

در مطالعه حاضر افزودن آلفاتوکوفرول به محیط انجماد موجب بهبود پارامترهای منی شد که این نتایج با نتایج حاصل از مطالعات دیگر مبنی بر افزودن ویتامین E به مایع منی در سایر گونه‌ها مثل بز (۳۹)، قوچ (۴۰) و گوزن (۴۱) مغایر بود.

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که افزودن آلفاتوکوفرول به اسپرم در طی فرآیند انجماد اثرات مثبتی بر میزان تحرک، قابلیت زنده ماندن اسپرم، تمامیت DNA و سطح TAC مایع سمینال بعد از ذوب دارد. این داده‌ها می‌تواند در بهبود فن‌های ذخیره‌سازی و جابه‌جایی مایع سمینال کمک‌کننده باشد. مطالعات دیگری در آینده نیاز است که مکانیزم مولکولی اثرات حفاظتی آلفاتوکوفرول را در اسپرم رات موردبررسی قرار دهد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بدین‌وسیله از جناب آقای مهندس علی‌یاری که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند و معاونت محترم تحصیلات تکمیلی دانشگاه ارومیه به دلیل حمایت مالی مراتب تشکر و قدردانی را اعلام می‌دارد.

References:

1. Yue HX, Li P, Jiang M, Lin L, Xu KH. Influence of cryopreservation with glycerol and freezing-thawing procdures on the motility of human sperm. Zhonghua Nan Ke Xue 2005; 11: 204-6.
2. Hsieh YY, Sun YL, Chang CC. Superoxide dismutase activities of spermatozoa and seminal plasma are not correlated with male infertility. J Clin Lab Anal 2002; 16: 127-31.
3. Aitken RA. Free radical theory of maile infertility. Reprod Fertil Dev 1994; 6: 19-23.
4. Sikka SC. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. Front Biosci 1996; 1: 78-86.
5. Osawa T, Kato Y. Protective role of antioxidative food factors in oxidative stress caused by hyperglycemia. Ann N Y Acad Sci 2005; 1043: 440-51.
6. 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: 99-111.
7. Mardones P, Strobel P, Miranda S, Leighton F, Quinones V, Amigo L, et al. α-Tocopherol metabolism is abnormal in scavenger receptor class B type I (SR-BI)-deficient mice. J Nutr 2002; 132: 443-9.
8. Pena FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez Martinez H. Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from different fractions of the ejaculate improves cryopreservation: changes in sperm membrane lipid architecture. Zygote 2004; 12: 117-24.
9. Chandra AK, Chatterjee A, Ghosh R, Sarkar M. Vitamin E-supplementation protect chromium (VI)-induced spermatogenic and steroidogenic

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-07-15]

disorders in testicular tissues of rats. Food Chem Toxicol 2010; 48: 972-9.

10. Yue D, Yan L, Luo H, Xu X, Jin X. Effect of Vitamin E supplementation on semen quality and the testicular cell membranal and mitochondrial antioxidant abilities in Aohan fine-wool sheep. Anim Reprod Sci 2010; 218: 222-17.
11. Jeong YJ, Kim MK, Song HJ, Kang EJ, Ock SA, Kumar BM, et al. Effect of alpha-tocopherol ssupplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. Cryobiology 2009; 58: 181-9.
12. Sukhato P, Thongsodseang AU, Songsasen N. Effect of cooling and warming conditions on post-thawed motility and fertility of cryopreseved buffalo spermatozoa. Anim Reprod Sci 2001;67(1-2): 69-77.
13. Nebel RL. Techniques for artificial insemination of cattle with frozen-thawed semen. In: Youngquist, R. S., Threlfall, W. R., (eds). Current therapy in large animal Theriogenology. 4th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007.P. 255.
14. Suzuki N, Sofikitis N. Protective effects of topical antioxidants on testicular functions of varicocelized Rats. Yonago Acta Med 1999; 42: 87-94.
15. Wyrobek AJ, Gordon LA, Burkhart JG, Francis MW., Kapp RWJr, Letz G, et al. An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm tests in nonhuman mammals. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutat Res 1983; 115(1): 1-72.
16. Najafi G, Razi M, Hoshyar A, Shahmohamadloo S, Feyzi S. The Effect of Chronic Exposure with Imidacloprid Insecticide on Fertility in Mature Male Rats. Int J Fertil Steril 2010; 4(1): 9-16.
17. Katayose H, Yanagida K, Hashimoto S, Yamada H, Sato A. Use of diamide-acridine orange fluorecence staining to detect aberrant protamination of human– jaculated sperm nuclei. Fertil Steril 2003; 79 (1): 670-6.
18. Malekinejad H, Mirzakhani N, Razi M, Cheraghi H, Alizadeh A, Dardmeh F. Protective effects of melatonin and Glycyrrhiza glabra extract on ochratoxin A--induced damages on testes in mature rats. Hum Exp Toxicol 2011; 30(2): 110-23.
19. Wathes DC, Abayasekara DR, Aitken RJ. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. Biol Reprod 2007; 77(2):190-201.
20. Kadirvel G, Kumar S, Kumaresan A. Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potentialand DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. Anim Reprod Sci 2009; 114: 125–34.
21. Breininger E, Beorlegui NB, O'Flaherty CM, Beconi MT. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. Theriogenology 2005;63(8):2126–35.
22. Funahashi H, Sano T. Select antioxidants improve the function of extender boar semen at 10 ◦C. Theriogenol 2005; 63: 1605–16.
23. Azawi OI, Hussein EK. Effect of vitamins C or E supplementation to Tris diluent on the semen quality of Awassi rams preserved at 5 ˚C. Vet Res Forum 2013; 4 (3): 157–60.
24. Perumal P. Effect of Superoxide Dismutase on Semen Parameters and Antioxidant Enzyme Activities of Liquid Stored (5°C) Mithun (Bos frontalis) Semen. J Animals 2014;2014:e821954.
25. Perumal P, Vupru K, Rajkhowa C. Effect of Addition of Taurine on the Liquid Storage (5°C) of Mithun (Bos frontalis) Semen. Vet Med Int 2013;2013.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-07-15]

26. Beheshti R, Asadi A, Maheri-Sis N. The effect of vitamin E on post-thawed buffalo bull sperm parameters. J Am Sci 2011; 7(7):227-31.
27. Amini Pour H, Tahmasbi AM, Naserain AA. The influence of vitamin E on semen characteristics of ghezel rams in during cooling and frozen process. Euro J Zool Res 2013; 2 (5):94-9.
28. Bansal AK, Bilaspuri GS. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. Veterinary Medicine International 2010;2011:e686137.
29. Marcus-Braun N, Braun G, Potashnik G, Har-Vardi I. Effect of cryopreservation on quality and fertilization capacity of human sperm. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2004; 116:63-66.
30. Momeni HR, Daneshpajoh F. Protective Effect of Vitamin E on Sperm Parameters in Adult Rat Treated with Para-nonylphenol. J Cell & Tissue (JCT) 2012; 2(4): 415-24. (Persian)
31. Mohit A, Mohammadi M, Shahbazi M, 2011. Effect of different levels of vitaminse and c on quality of diluted sperm of taleshi ram during storage at 5oc. J Vet Res 66(2): 161-4. (Persian)
32. Park NC, Park HJ, Lee KM, Shin DG. Free radical scavenger effect of rebamipide in sperm processing and cryopreservation. Asian J Androl 2003;5(3):195–201.
33. Zhu P, Ma Y, Huang Y. Role of sperm DNA integrity in male infertility. Zhonghua Nan Ke Xue 2004; 10(3):222-6.
34. Waterhouse KE, Gjeldnes A, Tverdal A, De Angelis PM, Farstad W, Håård M, et al. Alterations of sperm DNA integrity during cryopreservation procedure and in vitro incubation of bull semen. Anim Reprod Sci 2010; 117(1-2): 34-42.
35. Liang R, Senturker S, Shi X, Bal W, Dizdarogluand M, Kasprzak KS. Effects of Ni(II) and Cu(II) on DNA interaction with the N-terminal sequence of human protamine P2: enhancement of binding and mediation of oxidative DNA strand scission and base damage. Carcinogenesis 1999; 20(5): 893-8.
36. Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. Hum Reprod 1998;13(5):1240–7.
37. Shi YC, Shang XJ, Wang XL, Huang YF. Correlation of total antioxidant capacity in seminal plasma with sperm motility of infertile men. Zhonghua Nan Ke Xue 2006; 12(8): 703-5.
38. Contri A, De Amicis I, Molinari A, Faustini M, Gramenzi A, Robbe D, et al. Effect of dietary antioxidant supplementation on fresh semen quality in stallion. Theriogenology 2001; 75(7): 1319-26.
39. Penitente-Filho JM, Torres CAA, Santos MCR, Dias JCO, Oliveira GD, Guimarães JD, et al. Vitamin E on cryopreservation of goat semen. In Proceedings of the 19th Brazilian Congress of Animal Reproduction. Brazil: Belo Horizonte, CBRA; 2011.
40. Upreti GC, Jensen K, Oliver JE, Duganzich DM, Munday R, Smith JF. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-deined diluent containing antioxidants. Anim Reprod Sci 1997; 48(2–4):269–78.
41. Fernandezsantos MR, Martinezpastor F, Garciamacias V, Esteso M.C, Soler A.J, Pas P, et al. 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 2007; 28:294-305.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-07-15]

Original Article

EFFECT OF A-TOCOPHEROL ON SPERMATOZOA OF RAT SEMEN AFTER THE FREEZE-THAWING PROCESS

Ali Soleimanzadeh[1], Adel Saberivand[2], Abbas Ahmadi[3]*

Received: 9 Jul, 2014; Accepted: 20 Sep, 2014

Abstract

Background & Aims: Reactive oxygen species (ROS) generation, induced by the cryopreservation process, can be responsible for mammalian sperm damage. α-tocopherol is known as an effective antioxidant against oxidative stress. The aim of this study was to evaluate the antioxidant effects of α-tocopherol on count, motility, viability, TAC capacity, and DNA integrity rat spermatozoa during semen freezing process.

***Materials & Methods*:** Collected sperm from 10 adult rats were divided into 3 groups: fresh sperm, control and α-tocopherol (200 μM). After freezing-thawing, the number of spermatozoa, motility, viability, TAC capacity of the sperm was analyzed. DNA integrity was assessed by nuclear staining using acridine orange.

***Results*:** After freezing-thawing, there was a significant increase in the motility, viability and sperm DNA integrity in α-tocopherol group compared to the control ($p<0.05$). Following cryopreservation, no significant differences were found in morphology and sperm count between groups.

***Conclusion*:** Based on our results, it is concluded that addition of α-tocopherol during freezing resulted in positive effects on sperm parameters after thawing in adult rats.

***Keywords*:** α-tocopherol, Sperm parameters, DNA integrity, Freeze, Thawing, Rat

Address: Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz University, Tabriz, Iran
Tel: +98 4136378743
E-***mail***: adelsaberivand@yahoo.ca

SOURCE: URMIA MED J 2014: 25(9): 834 ISSN: 1027-3727

[1] *Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran*
[2] *Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz University, Tabriz, Iran (Corresponding Author)*
[3] *Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran*

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-07-15]