نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 8، شماره 3، پاییز 1395، ص. 540-530

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 8, No. 3, Fall 2016, p. 530-540

# تأثیر افزودن آسکوربیک‌اسید بر کیفیت اسپرم، پراکسیداسیون لیپید و سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی پلاسمای منی قوچ در خارج فصل تولیدمثلی

سمیرا رضویان[1]- حسین دقیق‌کیا[2*]- غلامعلی مقدم[3]- صادق علیجانی[2]

تاریخ دریافت: 1395/05/10
تاریخ پذیرش: 1395/06/31

## چکیده

آسکوربیک‌اسید عمده‌ترین آنتی‌اکسیدانت محلول در آب است که بعنوان جاروب‌کننده برای طیف وسیعی از رادیکال‌های آزاد عمل می‌کند. پژوهش حاضر بمنظور مطالعه تأثیر افزودن آسکوربیک‌اسید بر کیفیت اسپرم، پراکسیداسیون لیپید و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی پلاسمای منی قوچ قزل پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی انجام شد. نمونه‌های منی از پنج رأس قوچ نژاد قزل هر سه روز یکبار و توسط واژن مصنوعی اخذ گردید. بمنظور حذف اثرات فردی، نمونه‌های منی با هم مخلوط شدند. سطوح مختلف آسکوربیک‌اسید (صفر، 0/5، یک، 1/5 و 2میلی‌گرم بر میلی لیتر) به نمونه‌های منی رقیق‌شده با تریس-زرده تخم‌مرغ رقیق اضافه گردید. بعد از فرآوری و انجماد نمونه‌ها تا زمان ارزیابی در ازت مایع نگهداری شدند. پس از یخ‌گشایی نمونه‌های منی، فراسنجه‌های جنبایی اسپرم، زنده‌مانی، یکپارچگی غشاء، ناهنجاری مورفولوژیکی، پراکسیداسیون لیپید، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی و ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانتی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج ارزیابی نمونه‌ها نشان‌داد که افزودن یک و 1/5میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آسکوربیک‌اسید باعث بهبود معنی‌دار فراسنجه‌های تحرک، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی در مقایسه با گروه شاهد شد. درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی در رقیق‌کننده با 1/5میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آسکوربیک‌اسید، نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری یافت (P<0/05). میزان مالون‌دی‌آلدهید تولیدی در تیمار 1/5میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آسکوربیک‌اسید، کاهش نشان‌داد. میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون‌پراکسیداز و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانتی در سطوح یک و 1/5میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آسکوربیک‌اسید و مقدار آنزیم سوپراُکسیددیسموتاز در سطوح 0/5 و 1/5میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آسکوربیک بهبود معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل داشت. بطورکلی، بهترین نتایج در فراسنجه‌های مورد ارزیابی پس از انجماد-یخ‌گشایی در منی رقیق‌شده حاوی 1/5میلی‌گرم در میلی‌لیتر آسکوربیک‌اسید به‌دست آمد.

**واژه‌های کلیدی:** آسکوربیک‌اسید، انجماد-یخ‌گشایی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی، قوچ.

## مقدمه

استرس اکسیداتیو ناشی از عدم متعادل بین پراکسیداسیون و آنتی‌اکسیدانت‌های هر سیستم می‌باشد. در کنار تنش‌های اسمزی و مکانیکی وارد بر اسپرم تنش اکسیداتیو بیش‌ترین اثر را بر کیفیت اسپرم دارد (12). فقدان محتوای آنتی‌اکسیدانتی سیتوپلاسمی و مقدار بالای اسیدهای چرب غیراشباع در غشاء، سلول اسپرم را بسیار مستعد پراکسیداسیون لیپید توسط رادیکال‌های آزادی همانند پراکسید هیدروژن، آنیون سوپراکسید و رادیکال هیدروکسیل می‌کند که سبب آسیب ساختاری غشای اسپرم در طول ذخیره‌سازی هوازی اسپرم می‌شود (7). فرآیند سردسازی و انجماد، استرس‌های فیزیکی و شیمیایی به غشای اسپرم وارد می‌کند که به‌ترتیب زنده‌مانی و توانایی باروری آن را کاهش می‌دهد. استرس سرمایی وارده به اسپرم در طول فرآیند سردسازی با استرس اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد ارتباط دارد (36). رادیکال‌های آزاد در پی آزادسازی الکترون‌های اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و پروتئین‌ها منجر به آسیب‌های برگشت‌ناپذیر به سلول می‌شوند (37). رادیکال‌های آزاد عمدتاً توسط سیستم آنتی‌اکسیدانتی حذف می‌شوند. آنتی‌اکسیدانت‌ها نقش مهمی در مهار رادیکال‌های آزاد دارند. در صورت آسیب یا فقدان این سیستم، پراکسیداسیون لیپیدی غشای پلاسمایی اسپرم منجر به آسیب‌های ساختاری و عملکردی به سلول می‌شود (8). سیستم آنتی‌اکسیدانتی در

1- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز،
2- دانشیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز،
3- استاد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.
(*- نویسنده مسئول: (Email: daghighkia@tabrizu.ac.ir
DOI: 10.22067/ijasr.v0i0.57874

مقابل آسیب‌های اکسیداتیوی، دارای یک منبع غنی از آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی از قبیل سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون‌پراکسیداز و آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی از قبیل ویتامین E، ویتامین C، پیروات، گلوتاتیون، کارنیتین، توکوفرول، تورین و هیپوتورین تحت عنوان کلی ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانتی (TAC) می‌باشد که هریک با مکانیسم‌های خاصی نقش اساسی در حفظ اسپرم در برابر حملات ROS و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد دارند (24). امروزه روش‌های مختلفی برای حفاظت انجمادی اسپرم مطرح و مورد استفاده قرار می‌گیرد، ولی هم‌چنان راهکار استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها روش شناخته شده خوبی برای بهبود زنده‌مانی و تحرک سلول‌های اسپرم منجمد شده است (26). ویتامین C (آسکوربیک‌اسید) یک آنتی‌اکسیدانت غیرآنزیمی و محلول در آب می‌باشد (5). به‌نظر می‌رسد مهم‌ترین آنتی‌اکسیدانتت در مایع منی ویتامین C است که غلظت آن در پلاسمای منی 10برابر بیشتر از پلاسمای خون است که عمدتاً از وزیکول سمینال ترشح می‌شود (23). آسکوربیک‌اسید به‌عنوان یک الکترون‌دهنده قوی عمل می‌کند که با رادیکال‌های سوپراکسید، پراکسید و هیدروکسیل به شکل دهیدروآسکوربیک‌اسید واکنش نشان‌داده، هم‌چنین ویتامینE را دوباره به جریان می‌اندازد. آسکوربیک‌اسید اسپرم‌ها را در برابر آسیب‌های DNA ایجاد شده توسط رادیکال $H_2O_2$ محافظت کرده و نیتریت را کاهش می‌دهد (18). اگرچه مطالعات زیادی افزودن این آنتی اکسیدانت را در گاو و اسب موردمطالعه قرار داده‌اند؛ اطلاعات در موردِ استفاده از این آنتی‌اکسیدانت در قوچ قزل و در خارج فصل تولیدمثلی اندک است. هدف از این پژوهش استفاده از سطوح مختلف آسکوربیک‌اسید به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت غیرآنزیمی جهت بهبود کیفیت منی و عملکرد اسپرم قوچ قزل طی فرآیند انجماد-یخ‌گشایی بود.

## مواد و روش‌ها

### تهیه نمونه منی و فرآوری آن

این پژوهش در ایستگاه خلعت‌پوشان دانشگاه تبریز واقع در استان آذربایجان شرقی انجام گرفت. جمع‌آوری منی از پنج رأس قوچ قزل با شرایط تغذیه‌ای و محیطی یکسان، با استفاده از واژن مصنوعی و دوبار در هفته انجام گرفت. نمونه‌های منی هر یک از قوچ‌ها از نظر حجم، رنگ، غلظت اولیه، تحرک، عدم آلودگی به ادرار و خون و میزان اسپرم با موفولوژی طبیعی بررسی و سپس نمونه‌های منی با رنگ کرمی، غلظت بیشتر از یک میلیارد اسپرم در هر میلی‌لیتر، تحرک بیشتر از 70 درصد و مورفولوژی کمتر از 10درصد اسپرم غیرطبیعی به‌عنوان منی نرمال در نظرگرفته شدند؛ در غیر این‌صورت، نمونه حذف گردید. برای از بین بردن اثرات فردی و احتمالاً اثرات متقابل بین نمونه‌ها، نمونه‌های نرمال در مقادیر مساوی از هر قوچ با هم مخلوط شدند. در این تحقیق از رقیق‌کننده بر پایه تریس-زرده تخم‌مرغ (31) به‌همراه سطوح مختلف آسکوربیک‌اسید استفاده شد. آسکوربیک‌اسید با نسبت‌های مختلف ($2\ mg\ mL^{-1}$، 1/5، 1، 0/5، 0) به محیط حاوی بافر، زرده تخم‌مرغ و گلیسرول افزوده شدند. دو ساعت پس از سپری شدن مرحله سردسازی و تعادل، نمونه‌های منی در پایوت‌های 0/25میلی‌لیتری پر شدند. پایوت‌ها بعد از انجماد تا زمان ارزیابی در ازت مایع (196°C-) نگه‌داری شدند.

### یخ‌گشایی و ارزیابی فراسنجه‌های اسپرم

پایوت‌های حاوی منی منجمد از تانک ازت خارج، سپس در داخل حمام آب گرم با دمای37°C به‌مدت 30ثانیه یخ‌گشایی شدند. منی یخ‌گشایی شده در درون یک میکروتیوب 1/5میلی‌لیتری شماره‌گذاری شده تخلیه و سپس جهت تطابق پذیری به‌مدت پنج دقیقه در حمام آب گرم قرار داده شد.

### تحرک اسپرم

به‌منظور ارزیابی پارامترهای تحرک اسپرم، بعد از یخ‌گشایی فراسنجه‌های تحرک کل، تحرک پیش‌رونده و ویژگی‌های کنتیک حرکتی شامل میانگین سرعت در مسیر، سرعت در مسیر منحنی، سرعت در مسیر مستقیم، جنبایی عرضی سر، خطی بودن جنبایی، راستی مسیر طی شده و تناوب عرضی زنش توسط سیستم آنالیز رایانه‌ای (CASA)[1] مدل VT SPERM 3.1 ارزیابی گردید.

### زنده‌مانی اسپرم

وضعیت زنده‌مانی اسپرم با استفاده از روش رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین (1/67گرم رنگ ائوزینY، 10گرم رنگ نگروزین، 2/9گرم سیترات سدیم در 100میلی لیتر آب مقطر) ارزیابی شد. پس از یخ‌گشایی اسپرم، 10میکرولیتر از نمونه منی با پنج میکرولیتر از رنگ، روی یک لام گرم قرار داده و به‌آرامی مخلوط سپس با یک لام دیگر گسترش تهیه شد. گسترش تهیه شده در دمای 37°C قرار گرفته و پس از خشک شدن تعداد 200اسپرم با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگنمایی 40× مورد بررسی قرار گرفت. اسپرم‌هایی که به‌طور جزئی یا کامل رنگ بنفش به‌خود گرفته بودند، اسپرم مرده و اسپرم‌هایی که از ورود رنگ به‌داخل خود ممانعت کرده بودند، به‌عنوان اسپرم زنده محسوب شدند (13).

### یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم

برای بررسی یکپارچگی غشای پلاسمایی سلول اسپرم از تست

1- Computer Assisted Sperm Analyzer

تورم اسپرم در محیط هیپواسموتیک (HOST)[1] براساس روش ریوال و مرود (32) استفاده شد. اسپرم‌های با دُم تاب‌خورده و متورم به‌عنوان اسپرم‌های با غشای پلاسمایی سالم در نظر گرفته شده و اسپرم‌های با دُم صاف به‌عنوان اسپرم با غشای آسیب دیده تعیین شدند.

### مورفولوژی اسپرم

برای ارزیابی مورفولوژی اسپرم از محلول هانکوک استفاده شد (16). 10میکرولیتر از هر نمونه منی یخ‌گشایی شده به میکروتیوب‌های حاوی 150میکرولیتر از محلول هانکوک افزوده شد. سپس یک قطره از این مخلوط روی لام قرار گرفته و توسط یک لامل پوشانده شد. با شمارش حداقل 200اسپرم زیر میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگ‌نمایی 40× درصد اسپرم‌های طبیعی و غیرطبیعی شامل غیرطبیعی بودن آکروزوم، سرهای چسبیده، بخش میانی غیرطبیعی و آسیب‌های دُم محاسبه شدند.

### ارزیابی میزان پراکسیداسیون لیپید

غلظت مالون‌دی‌آلدهید به‌عنوان شاخص لیپید پراکسیداسیون در نمونه‌های منی با استفاده از واکنش تیوباربیتوریتیک اسید اندازه‌گیری شد. در دمای95°C و شرایط اسیدییک مولکول MDA با دو مولکول تیوباربیتوریتیک اسید (TBA)[2] واکنش داده و کمپلکس صورتی رنگی را بوجود می‌آورد. برای اندازه‌گیری غلظت MDA مقدار یک میلی‌لیتر از هر نمونه با 2میلی‌لیتر محلول حاوی 20درصد تری کلرواستیک اسید، 1mL بوتیلتید هیدروکسی‌تولوئن و یک میلی‌لیتر EDTA به‌منظور جداسازی پروتئین‌ها اضافه شده و به‌مدت 15دقیقه (1200g) سانتریفیوژ شدند. سپس یک میلی‌لیتر از محلول رویی با یک میلی‌لیتر از محلول حاوی 0/67درصد تیوباربیتوریتیک اسید به‌مدت20دقیقه در دمای95°C حرارت داده شدند. بعد از سردشدن نمونه‌ها در داخل یخ در مدت 30دقیقه، عدد جذب MDA محلول رویی در طول موج nm 532 به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. در پایان غلظت مالون‌دی‌آلدهید محاسبه شد (14).

### میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز

نمونه‌های اسپرم پس از یخ‌گشایی به‌مدت 15 دقیقه در 3000g (دور در دقیقه) سانتریفیوژ شدند. مایع رویی جمع‌آوری شده و به هر کدام از نمونه‌ها 500 میکرولیتر تریتون100-X اضافه گردید. از مایع رویی برای اندازه‌گیری فعالیت‌های آنزیمی اسپرم استفاده شد. برای اندازه‌گیری از کیت Ransod شرکت رندوکس ( RANDOX Laboratories Ltd.,UK) استفاده شد. اساس این آزمایش تسریع دیسموتاسیون رادیکال $O_2$ و تبدیل آن به $O_2$ و $H_2O_2$ توسط آنزیم SOD است.

### اندازه‌گیری آنزیم گلوتاتیون‌پراکسیداز

برای اندازه‌گیری مقدار آنزیم از کیت Ransel شرکت رندوکس (RANDOX Laboratories Ltd.,UK) استفاده شد.

### ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی تام پلاسمای منی

میزان TAC براساس رنگ‌سنجی و با استفاده از کیت رندوکس (RANDOX Laboratories Ltd., UK) ارزیابی گردید. بدین‌منظور مایع منی منجمد شده به آرامی در حمام آب‌گرم 37°C به‌مدت 30ثانیه یخ‌گشایی شده و فوراً ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی آن ارزیابی شد. اندازه‌گیری مقادیر آنتی‌اکسیدانت تام پلاسمای منی بر اساس روش TEAC[3] انجام شد. این روش بر اساس مهارکنندگی با آنتی‌اکسیدانت‌های جاذب رادیکال کاتیون ABTS[4] انجام می‌شود. در این روش ABTS با پراکسیداز و $H_2O_2$ جهت تولید کاتیون ABTS انکوبه شده و رنگ پایدار آبی-سبز که حداکثر جذب نوری آن 600نانومتر است، تولید می‌شود که به‌وسیله اسپکتروفتومتری قابل‌اندازه‌گیری است (27).

### آنالیزآماری

این تحقیق با پنج تیمار و هرکدام در پنج تکرار انجام گردید. داده‌های به‌دست آمده در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS (9.1.3) و با کمک رویه GLM آنالیز شدند. برای تعیین معنی‌داری اثرات آنتی‌اکسیدانت از آزمون مقایسه‌ای توکی استفاده شد و اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد گزارش شد. اثر تیمار به‌عنوان اثر ثابت در نظر گرفته شد.

## نتایج

نتایج حاصل از ارزیابی پارامترهای تحرک در جدول 1 نمایش داده شده است. افزودن یک و 1/5میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسید آسکوربیک به رقیق‌کننده به‌طور معنی‌داری صفات تحرک کل (TM)، تحرک پیش‌رونده (PM)، سرعت در مسیر منحنی (VCL) و تحرک عرضی سر (ALH) را نسبت به گروه شاهد بهبود بخشید ($P<0/05$). اختلاف سایر سطوح تیماری نسبت به شاهد معنی‌دار نبود. نتایج مطالعه حاضر بیان‌گر آن است که برای پارامتر میانگین سرعت در مسیر (VAP) و سرعت در مسیر مستقیم (VSL) بهترین عملکرد در

1- Hypo Osmotic Swelling Test
2- Tiobarbitoretic Acid
3- Trolox equivalent antioxidant capacity
4- 2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]

گروه تیماری 1/5میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافته بود (P<0/05). اما صفات درصد خطی بودن تحرک (LIN)، راستی مسیر طی شده (STR) و تناوب عرضی زنش (BCF) نسبت به گروه شاهد معنی‌دار نبود. نتایج حاکی از آن است که افزودن 1/5میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آسکوربیک‌اسید اثر بالقوه‌ای روی پارامترهای تحرک اسپرم‌ها ایجاد کرد که می‌توان به اثر آنتی‌اکسیدانتی آن پی برد.

**جدول1-** تأثیر سطوح مختلف آسکوربیک‌اسید بر فراسنجه‌های تحرک اسپرم پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی[1]

**Table 1**-The effect of different levels of Ascorbic acid on sperm motility parameters after freezing-thawing process[1]

| فراسنجه های تحرک اسپرم | تیمارهای‌آزمایشی (Antioxidants) (mg ml$^{-1}$) | | | | | SEM | P-Value |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Sperm motility parameters | Control | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 | | |
| تحرک کل TM (%) | 44/60$^{c}$ | 46/20$^{bc}$ | 49/60$^{b}$ | 60/20$^{a}$ | 40$^{d}$ | 1/574 | 0/0001 |
| تحرک پیشرونده PM (%) | 27/73$^{bc}$ | 27/20$^{bc}$ | 29/80$^{b}$ | 35/43$^{a}$ | 24/85$^{c}$ | 1/241 | 0/0001 |
| میانگین سرعت در مسیر VAP(μm s$^{-1}$) | 20/82$^{b}$ | 23/02$^{b}$ | 26/65$^{ab}$ | 31/76$^{a}$ | 25/05$^{ab}$ | 2/656 | 0/0382 |
| سرعت در مسیر مستقیم VSL (μm s$^{-1}$) | 17/82$^{b}$ | 19$^{b}$ | 21/06$^{b}$ | 25/69$^{a}$ | 21/17$^{ab}$ | 2/454 | 0/01433 |
| سرعت در مسیر منحنی VCL (μm s$^{-1}$) | 50/91$^{c}$ | 55/12$^{c}$ | 65/63$^{b}$ | 75/09$^{a}$ | 52/68$^{c}$ | 2/755 | 0/0001 |
| راستی مسیر طی شده STR (%) | 70/93 | 70/45 | 68/50 | 72/37 | 72/22 | 0/022 | 0/6663 |
| تحرک عرضی سر ALH (μm) | 1/21$^{c}$ | 1/53$^{abc}$ | 1/82$^{ab}$ | 1/98$^{a}$ | 1/27$^{bc}$ | 0/218 | 0/0504 |
| درصد خطی بودن تحرک LIN (%) | 26/46 | 29/51 | 25/51 | 30/77 | 29/20 | 0/023 | 0/7006 |
| تناوب عرضی زنش BCF (Hz) | 15/08 | 12/78 | 15 | 15/47 | 13/44 | 1/722 | 0/6877 |

[1] میانگین‌های با حروف غیر مشابه در هر ردیف دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P <0/05).

[1] Mean with different alphabets are statistically different (P< 0.05).

نتایج حاصل از تأثیر سطوح مختلف آسکوربیک‌اسید بر فراسنجه‌های زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی، مورفولوژی و میزان پراکسیداسیون لیپید اسپرم در جدول 2 نشان‌داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که افزودن یک و 1/5میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آسکوربیک‌اسیدبه رقیق‌کننده به‌طور معنی‌داری باعث بهبود زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و کاهش معنی‌دار میزان اسپرم غیرطبیعی بعد از یخ‌گشایی نسبت به گروه شاهد و سایر گروه‌های تیماری شد (P<0/05). تعداد اسپرم‌هایی که دُم‌های متورم و پیچ خورده داشتند در این سطوح بیشتر بود. بدین‌معنی که غشای اسپرم‌ها در برابر صدمات ناشی از انجماد به‌خوبی حفظ شدند. سطوح بالاتر اسکوربیک‌اسید اثر منفی روی این صفات داشتند. میزان پراکسیداسیون لیپید اسپرم‌های تیمار شده با آسکوربیک‌اسید در سطح 1/5میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تمایل به کاهش داشت. به‌طوریکه میزان کاهش در حدود 19/85 (mol ml$^{-1}$) بود. جالب توجه آن‌که غلظت‌های بیشتر آسکوربیک‌اسید نه تنها موجب کاهش روند پراکسیداسیون لیپید نگردید، بلکه موجب افزایش غلظت MDA شد به‌طوریکه این افزایش نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود (P<0/05)؛ این امر می‌تواند ناشی از کاهشpH محیط به‌دلیل اسیدی بودن آسکوربیک‌اسید باشد.

بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی پلاسمای منی در شکل‌های 2 ،3 و 4 نشان‌داده شده است. میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در سطوح یک و 1/5میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آسکوربیک‌اسید نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشت (P<0/05). ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانتی نیز در سطوح 0/5 و 1/5میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آسکوربیک‌اسید بهبود معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل داشتند (P<0/05).

## بحث

در مطالعات مختلف آسکوربیک‌اسید به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت

مورد استفاده قرار گرفته ولی سازوکارهای تأثیر آن هنوز هم شناخته نشده است. در این مطالعات نشان‌داده شده است که آسکوربیک‌اسید می‌تواند مانع از پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی گردد. مطالعاتی در خصوص تأثیر ویتامین C بر منی قوچ آتابای (30)، بهبود پارامترهای اسپرم موش (25)، سمینال پلاسمای انسان (12) و اسپرم بز مرخز (15) انجام گرفته است. تخریب غشای پلاسمایی اسپرم یکی از دلایل کاهش باروری و جنبایی سلول‌های اسپرم در طول فرآیند حفاظت انجمادی می‌باشد. حفاظت انجمادی می‌تواند منجر به تغییراتی در DNA، سیتواسکلت اسپرم، مهار اتصال اسپرم به تخمک و تخریب آکسونم اسپرم شود که نهایتاً منجر به کاهش تحرک آن می‌گردد (8). آسکوربیک‌اسید به‌عنوان اولین خط دفاعی آنتی‌اکسیدانتی در خون و مایع پلاسمایی اسپرم مطرح است که می‌تواند موجب مهار روند اکسیداسیون لیپوپروتئین‌ها شود (2). آسکوربیک‌اسید با کاهش آسیب سلولی از طریق جذب رادیکال‌های آزاد می‌تواند باعث بهبود عملکرد اسپرم در رقیق‌کننده شود. هم‌چنین از فعالیت رادیکال‌های پراکسیل جلوگیری می‌کند که با این کار DNA اسپرم از آسیب محافظت می‌شود. سمیت پایین و حلالیت خوب آسکوربیک‌اسید در آب موجب شده است تا از آن به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت استفاده شود (40).

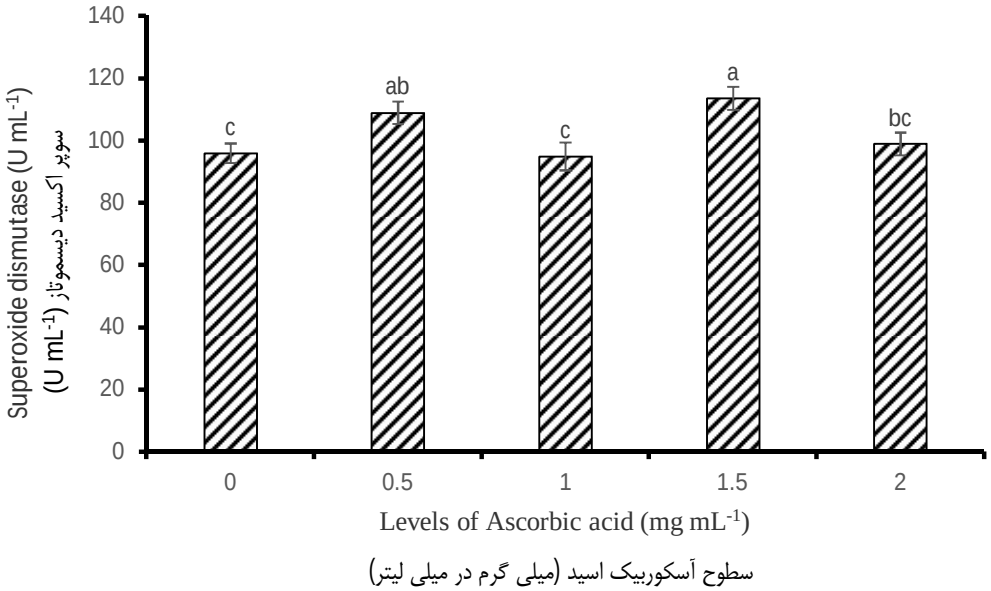
**جدول2-** تأثیر سطوح مختلف آسکوربیک‌اسید بر صفات ارزیابی اسپرم پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی[1]

**Table 1**-The effect of different levels of Ascorbic acid on sperm assessment parameters after freezing-thawing process[1]

| صفات ارزیابی اسپرم<br>Sperm assessment parameters | تیمارهای آزمایشی (Antioxidants) (mg ml$^{-1}$) Control | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 | SEM | P-value |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| زنده مانی (%)<br>Viability (%) | 49/14$^{cd}$ | 51/21$^{bc}$ | 54/50$^{b}$ | 64/28$^{a}$ | 44/74$^{d}$ | 1/675 | 0/0001 |
| یکپارچگی غشای پلاسمایی (%)<br>Plasma membrane integrity (%) | 39/68$^{c}$ | 40/02$^{c}$ | 44/50$^{b}$ | 54/70$^{a}$ | 34/28$^{d}$ | 1/462 | 0/0001 |
| اسپرم غیرطبیعی (%)<br>Sperm abnormalities (%) | 17/81$^{b}$ | 17/76$^{b}$ | 16/46$^{ab}$ | 14/04$^{a}$ | 19/18$^{b}$ | 1/191 | 0/0456 |
| غلظت مالون‌دی‌آلدهید<br>MDA (moL mL$^{-1}$) | 23/59$^{ab}$ | 23/73$^{bc}$ | 22/11$^{ab}$ | 19/85$^{a}$ | 34/07$^{c}$ | 1/648 | 0/0004 |

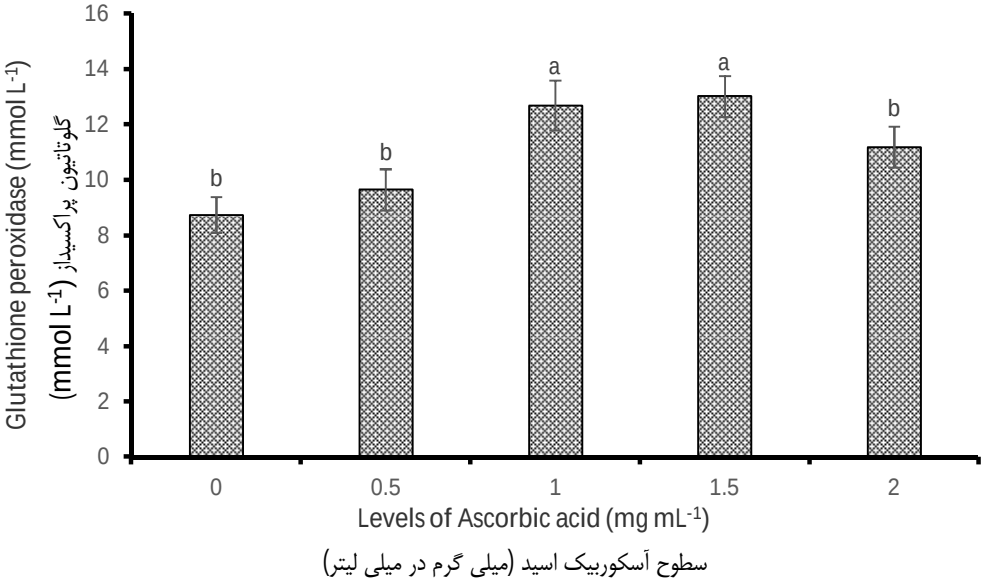
[1] میانگین‌های با حروف غیر مشابه در هر ردیف دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P <0/05).

[1] Mean with different alphabets are statistically different (P< 0.05).



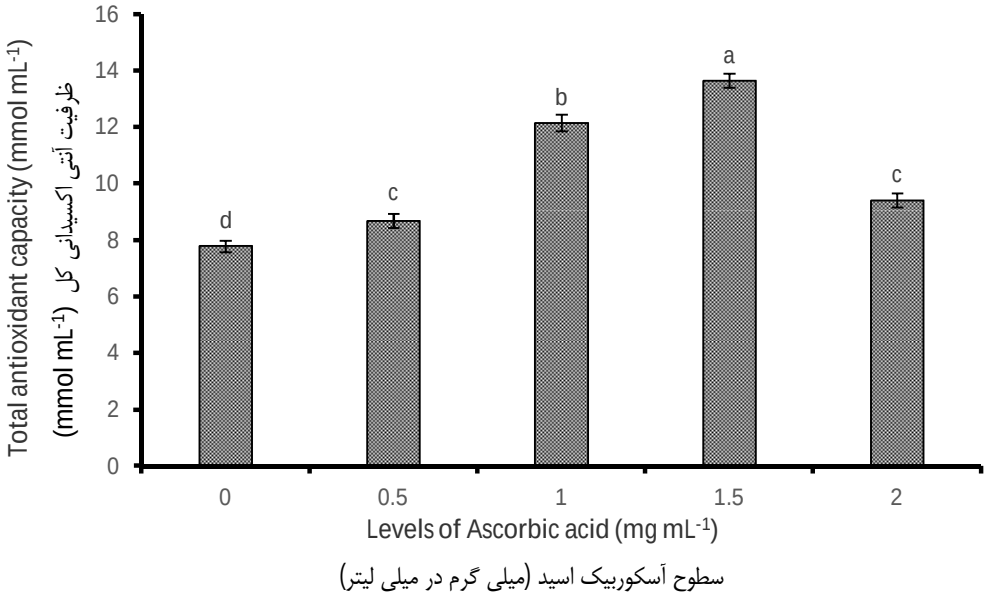

**شکل 1-** مقایسه میانگین مقادیر سوپراُکسیددیسموتاز با استفاده از سطوح مختلف تیماری آسکوربیک‌اسید

**Figure 1**- Comparing the mean Superoxide dismutase parameter using different levels of Ascorbic acid




**شکل 2-** مقایسه میانگین مقادیر گلوتاتیون‌پراکسیداز با استفاده از سطوح مختلف تیماری آسکوربیک‌اسید

**Figure 2-**Comparing the mean Glutathione peroxidase parameter using different levels of Ascorbic acid




**شکل 3-** مقایسه میانگین مقادیر ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانتی با استفاده از سطوح مختلف تیماری آسکوربیک‌اسید

**Figure 2-**Comparing the mean Total antioxidant capacity using different levels of Ascorbic acid

نتایج حاصل از این بررسی نشان‌داد که افزودن 1/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آسکوربیک‌اسید در رقیق کننده انجماد قوچ می‌تواند به‌طور معنی‌داری باعث بهبود کیفیت اسپرم بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی گردد. نتایج این آزمایش با گزارش علوی و همکاران (2) مطابقت دارد که در آن استفاده از سطوح 4/5 و 6/5 میلی‌گرم از آسکوربیک‌اسید باعث بهبود میزان تحرک پیش‌رونده اسپرم بُز شد. هم‌چنین با نتایج آزمایش بکونی و همکاران (9) و میر زویان و همکاران (28) مطابقت دارد که در آن‌ها افزودن آسکوربیک‌اسید به رقیق‌کننده باعث کاهش تولید رادیکال‌های آزاد شد. در مطالعه حاضر بالاترین غلظت آسکوربیک‌اسید به‌طور معنی‌داری فراسنجه تحرک کل را کاهش داد که بر این اساس می‌توان استنباط کرد که افزودن بیش از اندازه آسکوربیک‌اسید همانند دیگر آنتی‌اکسیدانت‌ها باعث تغییر خصوصیات

غشای پلاسمایی می‌شود که امکان پراکسیداسیون لیپید را فراهم می‌کند. غلظت بالا ممکن است در سیالیت غشاء اثر گذاشته و باعث برهم خوردن تعادل غشایی رادیکال‌های آزاد شود (29). هم‌چنین به‌دلیل خاصیت اسیدی آسکوربیک‌اسید می تواند با تغییرات pHمحیط بر فراسنجه‌های مورد ارزیابی تأثیر بگذارد. در بررسی حاضر سطوح یک و 1/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آسکوربیک‌اسید به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد باعث افزایش زنده‌مانی اسپرم شد؛ ولی با افزودن 2میلی‌گرم بر میلی‌لیتر زنده‌مانی کاهش یافت که نشان‌دهنده آن است که آنتی‌اکسیدانت تا دامنه خاصی می‌تواند برای اسپرم مفید باشد و اگر از مقداری بیشتر شود خواص معکوسی خواهد داشت. این نتایج ممکن است بر اساس این واقعیت باشد که آسکوربیک‌اسید می‌تواند دفاع مؤثری را علیه رادیکال پرواکسیل ایجاد کرده و بدین‌ترتیب از آسیب اکسیداتیو جلوگیری کند. هم‌چنین قادر است تحمل اسپرم قوچ را به شوک سرمایی افزایش داده و سرانجام بقای انجمادی اسپرم را افزایش دهد (28). عملکرد مثبت آسکوربیک‌اسید محدود به تحرک نبوده و سبب افزایش درصد زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم بعد از فرآیند انجماد و یخ‌گشایی در مقایسه با گروه شاهد شد. در تیمارهای یک و 1/5میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آسکوربیک‌اسید بیش‌ترین زنده‌مانی و یکپارچگی غشاء حاصل شد که در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌دار بود. می‌توان بیان کرد که آسکوربیک‌اسید با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانتی قوی حفاظت غشایی مطلوبی را ایجاد کرده و عملکرد خوبی داشته است. نتایج این بررسی نشان‌داد که افزودن یک و 1/5میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آسکوربیک‌اسید به رقیق‌کننده منی باعث کاهش معنی‌دار تعداد اسپرم‌های با موروفولوژی غیرطبیعی شد که نشان‌دهنده عملکرد مثبت این آنتی‌اکسیدانت در منی می‌باشد. تولید رادیکال‌های آزاد در طی فرآیند انجماد منجر به پراکسیداسیون لیپیدی غشای اسپرم می‌شود (10). اسپرم‌های منجمد شده با 1/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از آسکوربیک‌اسید سطح پراکسیداسیون را کاهش داد اما این کاهش معنی‌دار نبود. در این سطح، غشای پلاسمایی سلول‌های اسپرم در برابر آسیب‌های ناشی از انجماد توسط آسکوربیک‌اسید به خوبی محافظت شدند. استفاده از این سطح تأثیر مثبتی در سیستم دفاعی داخل سلولی داشته و با حفظ عملکرد و یکپارچگی غشای پلاسمایی موجب ادامه حیات سلول اسپرم می‌شود. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانتی پلاسمای منی و آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در سطوح یک و 1/5میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آسکوربیک‌اسید نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشته است. افزایش سطح TAC ممکن است نقش معنی‌داری در تحرک اسپرم داشته باشد. زیرا بازدارنده‌های مختلفی شامل SOD، GPXوCAT در اسپرم و پلاسمای منی وجود دارد که با حذف رادیکال‌های آلوکسیل و پروکسیل سبب حفظ اسپرم در برابر آسیب اکسیداتیو می‌شود. در این مطالعه میزان فعالیت SOD در گروه تیمار شده با 0/5 و یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آسکوربیک‌اسید نسبت به گروه شاهد بهبود معنی‌داری یافت. سیستم‌های دفاع آنزیمی آنتی‌اکسیدانت سلول اسپرم می‌تواند زنده‌مانی بعد از یخ‌گشایی را فراهم کند. طی مطالعه‌ای که به‌منظور مقایسه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی SOD و GPX طراحی شد مشاهده گردید که فعالیت SOD نسبت به GPX در اسپرم خرگوش قوی‌تر است (6). مطالعات بسیاری نشان‌دادند که آنتی‌اکسیدانت‌هایی از قبیل ویتامین C، ویتامین E، آنزیم سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز از کاهش تحرک اسپرم جلوگیری می‌کنند. با توجه به‌این‌که آسکوربیک‌اسید یکی از فراوان‌ترین آنتی‌اکسیدانت‌های بدن می‌باشد پلاسمای منی به کاهش ویتامین C در بدن بسیار حساس است (11). علاوه بر ارزیابی دو آنزیم GPX و SOD ارزیابی ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانتی نیز می‌تواند شاخص مناسبی برای ارزیابی وضعیت سلول باشد. در این مطالعه مقدار TAC در گروه‌های تیمار شده با آسکوربیک‌اسید مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس نتایج این مطالعه میانگین TAC در همه سطوح آسکوربیک‌اسید، میزان فعالیت این آنزیم افزایش یافت. شی و همکاران (33) یک ارتباط مثبت بینTAC پلاسمای منی و تحرک اسپرم مشاهده کردند. بنابر این هر چه ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانتی افزایش یابد میزان تحرک نیز بهبود خواهد یافت. ارتباط TAC با درصد تحرک پیش‌رونده اسپرم نشان‌دهنده وجود یک هم‌بستگی مثبت بین TAC و تحرک اسپرم است (20).

در مطالعه‌ای که توسط سونمز و همکاران (34) انجام گرفت، آسکوربیک‌اسید در نسبت‌های مختلف 0/5، 1 و 2 mg/mL به رقیق‌کننده منی گوسفند آکارامان افزوده شد، نتایج این آزمایش ثابت کرد که افزودن آسکوربیک‌اسید به منی رقیق شده هیچ تغییری در خصوصیات اسپرم ایجاد نکرد. مطالعه انجام شده توسط آزاوی و همکاران (7) بر روی اسپرم گوسفند آواسی نشان‌داد که افزودن ویتامین C در رقیق کننده بر پایه تریس-گلوکز-زرده تخم‌مرغ به میزان 0/9 mg/mL در اسپرم‌هایی که سردسازی شده بودند، سبب افزایش میزان زنده‌مانی اسپرم، حفظ و بهبود طول عمر و کیفیت اسپرم، کاهش ناهنجاری و نقص آکروزومی شد بطوریکه میزان ناهنجاری در گروه حاوی آسکوربیک‌اسید 18/8درصد ناهنجاری اسپرمی در مقایسه با گروه کنترل (37/6 درصد) مشاهده شد.

## نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج حاصل از مطالعات پیشین و این مطالعه می‌توان گفت که ویتامین C سبب حفظ زنده‌مانی، یکپارچگی غشای آکروزوم و بهبود دیگر پارامترهای اسپرم می‌شود. آسکوربیک‌اسید قابلیت خنثی‌سازی هیدروژن پراکسید تولید شده در محیط را دارد. بنابر این می‌توان نتیجه گرفت که افزودن یک و 1/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر

آنتی‌اکسیدانت‌هایی همانند ویتامین C به محیط منی سبب حفظ طول عمر و کیفیت اسپرم انجماد-یخ‌گشایی شده در منی قوچ قزل می‌شود.

## منابع


1- Agarwal, A. and R. A. Saleh. 2002. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. Urologic Clinics of North America, 29(4): 817-827.
2- Alavi, S. M. J., H. Kohram, S. Zeinoaldini and H. R. Naijian. 2014. The effects of different concentrations of ascorbic acid on freezability of Kordi goat spermatozoa. Iranian Veterinary Journal, 10(3): 75-82. (In Persian).
3- Alvarez J. G. and Storey B. T. 1992. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. Journal of Andrology, 13(3): 232-241.
4- Aitken, R. J., H. M. Fisher, N. Fulton, E. Gomez, W. Knox, B. Lewis and S. Irvine. 1997. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. Molecular reproduction and development, 47(4): 468-482.
5- Al-Gubory, K. H., P. A. Fowler and C. Garrel. 2010. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. The international journal of biochemistry & cell biology, 42(10): 1634-1650.
6- Alvarez, J. G., J. C. Touchstone, L. Blasco and B. T. Storey. 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. Journal of Andrology, 8(5): 338-348.
7- Azawi, O. I. and E. K. Hussein. 2013. Effect of vitamins C or E supplementation to Tris diluent on the semen quality of Awassi rams preserved at 5°C. Veterinary Research Forum, 4(3): 157-160.
8- Baumber, J. U., B. A. Ball, C. G. Gravance, V. I. Medina and M. C. Davies-Morel. 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(6): 895-902.
9- Beconi, M. T., C. R. Francia, N. G. Mora and M. A. Affranchino. 1993. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. Theriogenology, 40(4): 841-851.
10- Chatterjee, S. and C. Gagnon. 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. Molecular Reproduction and Development, 59(4): 451-458.
11- Chinoy, N. J., R. R. Mehta, L. Seethalakshmi, J. D. Sharma and M. R. Chinoy. 1986. Effects of vitamin C deficiency on physiology of male reproductive organs of guinea pigs. International Journal of Fertility, 31(3): 232-239.
12- Das, P., A. R. Choudhari, A. Dhawan and R. Singh. 2009. Role of ascorbic acid in human seminal plasma against the oxidative damage to the sperms. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 24(3): 312-315.
13- De Graaf, S. P., G. Evans, L. Gillan, M. M. Guerra, W. M. Maxwell and J. K. O'Brien. 2007. The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. Theriogenology, 67(2): 217-227.
14- Esterbauer, H. and K. H. Cheeseman. 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods in Enzymology, 186: 407-421.
15- Fazeli, P., M. J. Zamiri, A. Farshad and B. Khalili. 2010. Effects of vitamin C on testicular and seminal characteristics of Markhoz goats. Iranian Journal of Veterinary Research, 11(3): 267-272.
16- Hancock, J. L. 1956. The morphology of boar spermatozoa. Journal of the Royal Microscopical Society, 76: 84-97.
17- Holt W. 1996. Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. Reproduction, fertility, and development, 9(3): 309-319.
18- Hughes, C. M., S. E. Lewis, V. J. McKelvey-Martin and W. Thompson. 1998. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. Human Reproduction, 13(5): 1240-1247.
19- Isachenko E., V. Isachenko, I. I. Katkov, S. Dessole and F. Nawroth 2003. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. Reproductive Biomedicine online, 6(2): 191-200.
20- Khosrowbeygi, A. and N. Zarghami. 2007. Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of oxidative stress biomarkers in sub fertile males. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 77(2): 117-121.
21- Khosrowbeygi, A., N. Zarghami and Y. Deldar. 2012. Correlation between sperm quality parameters and seminal plasma antioxidants status. International Journal of Reproductive BioMedicine, 22: 58-64.
22- Lasso, J. L., Noiles, E. E., Alvarez, J. G. and Storey, B. T. 1994. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. Journal of Andrology, 15(3): 255-255.

23- Lewis, S. E., E. S. Sterling, I. S. Young and W. Thompson. 1997. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. Fertility and Sterility, 67(1): 142-147.
24- Maneesh, M. and H. Jayalekshmi. 2006. Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 21(2): 80-89.
25- Mangoli, E., M. Pourentezari, M. Anvari, A. R. Talebi and H. Nahangi. 2012. The improvement of sperm parameters and chromatin quality by vitamin C. Researcher, 4(11): 43-49.
26- Maxwell, W. M. and T. Stojanov. 1996. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. Reproduction, Fertility and Development, 8(6): 1013-1020.
27- Miller, N. J. and C. A. Rice-Evans. 1997. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS•+ radical cation assay. Free Radical Research, 26(3): 195-199.
28- Mirzoyan, A. V., N. A. Nebesikhina, N. V. Voynova and V. A. Chistyakov. 2006. Preliminary results on ascorbic acid and lysine suppression of clastogenic effect of deep-frozen sperm of the Russian sturgeon (Acipenser gueldenstaedti). International Journal of Refrigeration, 29(3): 374-378.
29- Naijian, H. R., H. Kohram, A. Z. Shahneh and M. Sharafi. 2013. Effects of various concentrations of BSA on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi goat semen following the freeze–thaw process. Small Ruminant Research, 113(2): 371-375.
30- Parizadian Kavan, B., Y. Jafari Ahangari and S. Zerehdaran. 2008. The effects of various levels of Vitamins E and C in milk and tris extenders on characteristics of Atabay ram semen in liquid condition, Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources, 15(5): 123-131. (In Persian).
31- Purdy, P. H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. Small Ruminant Research, 63(3): 215-225.
32- Revell, S. G. and R. A. Mrode. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. Animal Reproduction Science, 36(1): 77-86.
33- Shi, Y. C., Shang, X. J., Wang, X. L. and Y. F. Huang. 2006. Correlation of total antioxidant capacity in seminal plasma with sperm motility of infertile men. Zhonghua nan ke xue= National Journal of Andrology, 12(8): 703-705.
34- Sönmez, M., G. Türk and A. Yüce. 2005. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. Theriogenology, 63(7): 2063-2072.
35- Tavilani, H., M. T. Goodarzi, A. Vaisi-Raygani, S. Salimi, and T. Hassanzadeh. 2008. Activity of antioxidant enzymes in seminal plasma and their relationship with lipid peroxidation of spermatozoa. International Braz Journal Urology, 34(4): 485-491.
36- Thuwanut, P., K. Chatdarong, A. S. Bergqvist, L. Söderquist, K. Thiangtum, D. Tongthainan and E. Axnér. 2011. The effects of antioxidants on semen traits and in vitro fertilizing ability of sperm from the flat-headed cat (Prionailurus planiceps). Theriogenology, 76(1): 115-125.
37- Wang, Y., Sharma, R. and Agarwal, A. 1997. Effect of cryopreservation and sperm concentration on lipid peroxidation in human semen. Urology, 50, 409-413.
38- Woolliams, J. A., G. Wiener, P. H. Anderson and C. H. McMurray. 1983. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. Research in Veterinary Science, 34(3): 253-256.
39- Yue, D., L. Yan, H. Luo, X. Xu and X. Jin. 2010. Effect of Vitamin E supplementation on semen quality and the testicular cell membranal and mitochondrial antioxidant abilities in Aohan fine-wool sheep. Animal Reproduction Science, 118(2): 217-222.
40- Yousef, M. I., G. A. Abdallah and K. I. Kamel. 2003. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. Animal reproduction science, 76(1): 99-111.
41- Zalata, A., T. Hafez, and F. Comhaire. 1995. Evaluation of the role of reactive oxygen species in male infertility. Human Reproduction, 10(6): 1444-1451.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 8, No. 3, Fall 2016, p. 530-540

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 8، شماره 3، پاییز 1395، ص. 540-530

# The effect of adding Ascorbic acid on sperm quality, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of ram seminal plasma in outside of breeding season

**S. Razavian[1]- H. Daghigh Kia[2*]- Gh. Moghaddam[3]- S. Alijani[2]**

Received: 31-07-2016
Accepted: 21-09-2016

**Introduction** The cryopreservation of spermatozoa has provided special opportunities for the preservation of genetic resources and improving breed programs by the artificial insemination technique (Holt, 1996). Sperm cryopreservation stimulates intracellular ice crystals formation, increasing osmotic and chilling injury that causes sperm cell damage (Isachenko et al. 2003). Freezing and thawing processes impose physical and chemical insults on the sperm membrane that decrease sperm viability and fertilizing ability (Alvarez and Storey, 1992). Both damages are associated with excessive generation of reactive oxygen species (ROS) and peroxidation of the phospholipids in the membrane (Wang et al. 1997; Lasso et al. 1994). High concentrations of ROS have a negative effect on sperm quality and increased degradation of DNA, lipid peroxidation and oxidative stress which inhibits sperm motility and changes the structure of sperm and finally the reduces the fertility (Aitken et al., 1997; Agarwal and Saleh, 2002; Khosrowbeygi and Zarghami, 2007; Zalata et al., 1995). Seminal plasma contains enzymes such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) and catalase (CAT) which have an important role in the inhibition of the deleterious effects of ROS. Lipid peroxidation may be done due to lack of coordination between SOD, GPX, and CAT in seminal plasma or deficiency of total antioxidant capacity of the cell (Tavilani et al., 2008). Ascorbic acid is the main water-soluble antioxidant which acts as a scavenger for a whole range of reactive oxygen species. Ascorbic acid acts as a strong electron donor reacts with superoxide, peroxide and hydroxyl to form dehydroascorbic acid. Ascorbic acid protects sperm DNA against damage caused by H2O2 radical and reduces the amount of nitrite. This study was conducted to study the effects of adding ascorbic acid on sperm quality, plasma lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of ram semen after freeze- thawing process.

**Material and Methods** Five sexually mature *Ghezel* rams (3 to 4 years of age) were used. Semen samples were collected every three days using an artificial vagina. In order to eliminate the individual differences, ejaculates containing sperm with >80% progressive motility, volume of 0.75 to 2 mL, sperm concentrations greater than 3 × 109 sperm/mL and sperm abnormalities of less than 10%, were pooled. Different levels of Ascorbic acid (0, 0.5, 1, 1.5 and 2 mg $mL^{-1}$) were added in tris-egg yolk based diluent. After processing and freezing, the samples were stored in liquid nitrogen until the time of evaluation. After thawing of semen samples, Sperm motility characteristics were analyzed using computer-assisted sperm analysis. The sperm viability was determined by means of the nigrosin–eosin staining method. The hypo-osmotic swelling test (HOS-test) was used to evaluate functional sperm plasma membrane integrity after freeze-thawing. Sperm abnormalities were assessed using Hancock solution. Lipid peroxidation was measured with determining malondialdehyde and the seminal plasma antioxidant enzymes of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and total antioxidant capacity using the RANDOX Laboratories kit. Statistical analyses were performed using SAS software (9.1.3) software using GLM procedures. The least square means were calculated to determine the differences between the experimental treatments for the post-thaw evaluation times.

**Results and Discussion** The results showed that the 1 and 1.5 mg/mL ascorbic acid significantly improved the total motility (TM), progressive motility (PM), curvilinear velocity (VCL) compared to the control group ($P< 0.05$). Average path velocity (VAP) and straight line velocity (VSL) in semen samples receiving 1.5 mg $ml^{-1}$ ascorbic acid was increased compared to control group ($P< 0.05$). But the Linearity percentage (LIN) and sperm track straightness (STR) was not significant compared to the control group. Viability and integrity of the plasma membrane parameters were improved in groups receiving 1 and 1.5 mg/ml ascorbic acid compared to the control

1- MSc Graduated, Department of Animal Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran,
2- Associate Professor, Department of Animal Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran,
3- Professor, Department of Animal Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
(*Corresponding Author Email: daghighkia@tabrizu.ac.ir)

group. The percentage of sperm with abnormal morphology in 1.5 mg $mL^{-1}$ Ascorbic acid significantly was decreased than the control group ($P<0.05$). Malondialdehyde production in 1.5 mg $mL^{-1}$ ascorbic acid treatment tended to have decreased ($P<0.05$). Superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzyme activity were significantly increased in treatments with 1 and 1.5 mg/ml ascorbic acid compared to control ($P<0.05$). Total antioxidant capacity in groups receiving 0.5 and 1.5 mg $mL^{-1}$ ascorbic acid showed a significant improvement compared to the control group ($P<0.05$).

**Conclusion** The findings of this study was showed that the diluent contains 1.5 mg/mL ascorbic acid significantly improved sperm parameters compared to other levels, after freezing-thawing process.

**Keywords:** Ascorbic acid, Freeze-thawing, Antioxidant enzymes, Ram.