Iranian Journal of Animal Science
Vol 53, No 1, Spring 2022 (23-32)
DOI: 10.22059/ijas.2021.332280.653851

علوم دامی ایران
دورۀ ۵۳، شمارۀ ۱، بهار ۱۴۰۱ (ص ۳۲-۲۳)

مقاله پژوهشی:

تاثیر اسید وانیلیک در مقایسه با ویتامین‌های C و E برنگهداری کوتاه و بلندمدت اسپرم قوچ

زهرا نجم‌آبادی[۱]، حمید دلدار[۲*]، زربخت انصاری پیرسرایی[۲] و عیسی دیرنده[۲]
۱ و ۲. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۷/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۸/۱۹)

چکیده

در مطالعه‌ی حاضر، تأثیر اسید وانیلیک بر ویژگی‌های منی قوچ نژاد زل برای نگه‌داری کوتاه‌مدت و بلندمدت، مورد مطالعه قرار گرفت. گروه های آزمایشی شامل گروه شاهد، غلظت‌های مختلف اسید وانیلیک (۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، مخلوط آلفاتوکوفرول و اسید آسکوربیک (۵ میلی‌مولار+ ۵ میلی‌مولار) و تیمار دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO، حلال آلفاتوکوفرول-۵ میکرولیتر) بودند. فراسنجه‌های اسپرم در شرایط مایع در زمان‌های صفر، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت پس از نگه‌داری در دمای یخچال و نیز پس از انجماد- یخ‌گشایی بررسی شدند. نتایج نشان دادند که در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید وانیلیک در مقایسه با گروه‌های شاهد و ویتامین E+C، پس از زمان‌های مختلف سردسازی، صفات کیفی اسپرم (جنبایی، درصد اسپرم‌های زنده و یکپارچگی غشا) و فعالیت میتوکندری افزایش معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵). پس از انجماد-یخ‌گشایی نتایج نشان داد که جنبایی کل و درصد اسپرم‌های زنده در غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید وانیلیک نسبت به گروه شاهد و ویتامین E+C بیشتر بود (P<۰/۰۵). یکپارچگی غشاء و مورفولوژی اسپرم در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید وانیلیک نسبت به گروه شاهد بیشتر بود (P<۰/۰۵). غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید وانیلیک نسبت به تیمار ویتامین E+C بیشترین فعالیت میتوکندری را از خود نشان داد (P<۰/۰۵). یافته‌های حاضر نشان داد که افزودن اسید وانیلیک (غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر اسید وانیلیک) به رقیق‌کننده موجب بهتر شدن کیفیت اسپرم در طول زمان نگهداری شد.

واژه‌های کلیدی: اسید وانیلیک، آنتی‌اکسیدان، آنالیز اسپرم، انجماد اسپرم، نگه‌داری مایع.

Effect of vanillic acid in comparison with vitamin E+C on short- and long-term preservation of ram semen

Zahra Najm-Abadi[1], Hamid Deldar[2*], Zarbakht Ansari Pirsaraei[2] and Essa Dirandeh[2]
1, 2. M.Sc. Graduate and Associate Professor, Department of Animal Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
(Received: Oct. 21, 2021 - Accepted: Nov. 10, 2021)

ABSTRACT

In the present study, the effect of vanillic acid in comparison with vitamin E+C on the semen characteristics of Zel's ram under short and long-term preservation, was investigated. The experimental groups consisted of different concentrations of vanillic acid (0, 1, 10 and 100 µg/mL), a mixture of alpha-tocopherol and ascorbic acid (vitamin E+C), and dimethyl sulfoxide (DMSO) (as alpha-tocopherol solvent). The samples were evaluated at 0, 24, 48 and 72 hours after storage at 4 °C and following the freeze-thawing process. During the cold storage, sperm quality traits (motility, viability and membrane integrity) and mitochondrial activity increased significantly (P<0.05) at concentrations of 1 and 10 µg/ml vanillic acid in comparison with control and vitamin E+C groups. Our results revealed that the total motility and percentage of spermatozoids in the concentration of 1 µg/ml of vanillic acid were higher than control and vitamin E+C groups (P<0.05). Also, plasma membrane integrity and morphology of spermatozoid were higher in concentrations of 1 and 10 µg/ml of vanillic acid than control group. Concentration of 1 µg/ml of vanillic acid showed the highest mitochondrial activity than vitamin E+C treatment (P<0.05). Our findings showed that addition of vanillic acid at the concentrations of 1 and 10 µg/mL to the semen extender improved the quality of spermatozoid in the Zel breed sheep.

Keywords: Antioxidant, semen analysis, short-term preservation, semen freezing, vanillic acid.

* Corresponding author E-mail: h.deldar@sanru.ac.ir

مقدمه

فناوری‌های تولیدمثلی (تلقیح مصنوعی (AI)، انتقال جنین (ET)، لقاح آزمایشگاهی (IVF) و انجماد منی) ابزار مهمی برای مدیریت و حفاظت منابع ژنتیکی حیوانات مزرعه‌ای است. باروری در گوسفند بیشتر به تولید اسپرم از گوسفند بستگی دارد؛ یک شرط لازم برای موفقیت آمیزش طبیعی یا تلقیح مصنوعی استفاده از شمار زیادی اسپرم با کیفیت بالا است (Dianat *et al*., 2014). نگهداری اسپرم ها در محیط برون تنی نیازمند کاهش متابولیسم اسپرم از طریق کاهش دما است. استفاده از انجماد منی برای احیای جمعیت گونه‌های در معرض خطر انقراض، تولید نتاج بیشتر، بارور نمودن هم زمان تعداد زیادی ماده با استفاده از اسپرم نرهای با نژاد برتر، از بین رفتن هزینه‌های نگه‌داری نرها، انتقال آسان اسپرم از مراکز تولید به دورترین مناطق و تجاری‌سازی جهانی ژنوتیپ‌های برتر سودمند می‌باشد (Fraser *et al*., 2007).

انجماد- یخ‌گشایی سبب آسیب‌های عملکردی، فراساختاری و بیوشیمیایی اسپرم‌ها می‌شود که در نهایت منجر به کاهش زنده‌مانی، جنبایی و سلامت غشای پلاسمایی و از دست رفتن ظرفیت باروری می‌گردد (Sharma & Agarwal, 1996). تنش اکسیداتیو به‌عنوان عامل مهمی برای ناباروری مردان و کاهش کیفیت اسپرم طی فرایند نگه‌داری محسوب می‌شود. تمامی مولکول های حیاتی سلول نظیر اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و قندها از اهداف تنش اکسیداتیو هستند علاوه بر این، در نتیجه تولید بیش‌ازحد ROS، پراکسیداسیون لیپید، کاهش جنبایی و زنده‌مانی و افزایش نقص‌های ریخت‌شناسی در قطعه میانی اسپرم مشاهده می‌شود. بنابراین، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در رقیق‌کننده می‌تواند یک راه‌حل امیدوارکننده برای جلوگیری از تغییرات مضر در اسپرم در طول فرآیند خنک‌سازی، انجماد و یخ‌گشایی باشد.

آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که اکسیژن واکنش‌گر داخل و خارج سلولی را جمع‌آوری و خنثی می‌کنند (Bucak *et al*., 2009). گروهای هیدروکسیل در آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در اجرای این عملکرد دارند (Fattah *et al*., 2017). اسید وانیلیک (VA)، فرم اکسیدشده وانیلین، یک ترکیب فنلی مشتق شده از گیاهان و مواد خوراکی با نام شیمیایی 4-Hydroxy-3-methoxybenzoic Acid با فرمول $C_8H_8O_4$، است. این ماده به‌طور طبیعی در گیاه وانیل وجود دارد و در ریشه گلپر که گیاه مورد استفاده در پزشکی سنتی چینی است، به‌وفور یافت شده است. اسید وانیلیک، پودر سفید متمایل به زرد روشن است و به‌عنوان یک عامل نگه‌دارنده و ضدعفونی‌کننده در صنایع غذایی، دارویی و لوازم آرایشی کاربرد دارد (Tai *et al*., 2012) خواص ضد باکتری (Dragana *et al*., 2012) ضد میکروبی (Delaquis *et al*., 2005)، ضد درد (Mustafa & Esref, 2004; Najafi *et al*., 2017) و آنتی‌اکسیدانی (Wang *et al*., 2015) و نیز اثربخشی مثبت بر بیماری‌های گوارشی (Leal *et al*, 2011) و کبدی (Lakshmanashetty *et al*., 2010) از دیگر آثار مثبت اسید وانیلیک گزارش شده است. از دیگر سازوکارهای اثرگذاری اسید وانیلیک می‌توان به مهار ساخت یا آزادسازی فاکتور نکروز توموری آلفا (TNF-α)، اینترلوکین-۶ (IL-6) سیکلواکسیژناز -۲ (COX-2) و نیتریک اکسید (NO) اشاره کرد (Leal *et al*., 2011).

استفاده ار مواد آنتی‌اکسیدانی مناسب می‌تواند در پیشبرد برنامه‌های نگه‌داری کوتاه و بلندمدت اسپرم موثر باشد. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که اسید وانیلیک فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی دارد که منجر به حذف رادیکال‌های آزاد شده است. تاکنون گزارشی در رابطه با تاثیر اسید وانیلیک بر بهبود کیفیت اسپرم قوچ وجود ندارد. هدف از پژوهش حاضر، تاثیر غلظت‌های مختلف اسید وانیلیک بر فراسنجه‌های اسپرم قوچ در نگه‌داری کوتاه و بلندمدت است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه فیزیولوژی تولیدمثل دانشکده علوم دامی و شیلات و مزرعه پژوهشی گروه علوم دامی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری از مهرماه تا اواخر اسفندماه ۱۳۹۶ انجام شد. در این پژوهش منی‌گیری به کمک واژن مصنوعی از ۴ رأس قوچ نژاد زل

(۳-۲ ساله با وزن ۲±۴۵ کیلوگرم) با شرایط تغذیه‌ای و محیطی یکسان دو بار در هفته انجام شد.

نمونه‌های جمع‌آوری‌شده بلافاصله با فلاسک آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شدند و پس از بررسی اولیه (حجم منی، غلظت اسپرم و درصد جنبایی) برای از بین بردن اثر فردی و احتمالاً اثر متقابل بین نمونه‌ها، نمونه‌های نرمال در مقادیر مساوی از هر قوچ باهم مخلوط شدند و در نهایت با رقیق‌کننده بر پایه هیپس-زرده‌ی‌تخم مرغ (هیپس ۳۰ گرم در لیتر، آلبومین سرم گاوی ۱۰ گرم در لیتر، گلوکز ۱۰ گرم در لیتر، ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ و ۳ درصد گلیسرول) رقیق‌سازی شد. برای ارزیابی های کوتاه‌مدت از رقیق‌کننده بدون گلیسرول در دمای یخچال استفاده شد. گروه‌های آزمایشی شامل گروه شاهد (بدون افزودنی)، غلظت‌های مختلف اسید وانیلیک (۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، مخلوط آلفاتوکوفرول و اسید آسکوربیک (۵ میلی مولار+۵ میلی‌مولار) و تیمار دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO، حلال آلفاتوکوفرول-۵ میکرولیتر) بودند. ارزیابی به دو صورت کوتاه و بلندمدت صورت گرفت. برای ارزیابی‌های کوتاه‌مدت، منی رقیق شده در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. برای ارزیابی بلندمدت، منی رقیق‌شده به داخل پایوت‌های ۰/۵ میلی لیتر کشیده و برای مدت ۵ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای رسیدن به دمای تعادل قرار گرفت و سپس پایوت‌ها بلافاصله در فاصله‌ی ۱۰ سانتی‌متری بخار نیتروژن مایع به مدت ۱۲ دقیقه قرار گرفت تا منجمد شوند و سپس به داخل نیتروژن مایع با دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد غوطه‌ور و تا زمان یخ‌گشایی در این دما نگهداری شدند. بعد از ده روز ذخیره‌سازی، پایوت‌ها در حمام آب گرم ۳۷ درجه به مدت ۳۰ ثانیه یخ گشایی شدند و سپس ارزیابی ها انجام گرفت. برای هر تیمار پنج تکرار در نظر گرفته شد.

ارزیابی جنبایی اسپرم

به‌منظور بررسی ویژگی‌های جنبایی اسپرم، ۵ میکرولیتر از نمونه منی روی لام با دمای ۳۷ درجه تخلیه شده و یک لامل تمیز روی آن قرار گرفت. ارزیابی نمونه به‌وسیله‌ی میکروسکوپ فازکنتراست (Nikon Eclipse TE 300) با بزرگ‌نمایی ۲۰۰ برابر در ۱۰ میدان دید و به‌صورت تصادفی با روش چشمی انجام شد (Courot, 1979).

ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم

به‌منظور ارزیابی یکپارچگی غشای اسپرم، از آزمون هایپواسموتیک استفاده شد (Salamon & MaxwellW, 1995). برای این منظور ۳۰ میکرولیتر از منی به ۳۰۰ میکرولیتر از محیط هایپو اسموتیک هاست اضافه شد. سپس ۳۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد انکوبه شد. پس از گذشت این زمان و با تهیه حداقل سه قطره (۲۰ میکرولیتر) از نمونه‌ی انکوبه شده، ارزیابی و شمارش اسپرم با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر صورت گرفت. در هر لام حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های با دم گره‌خورده (غشای سالم) نسبت به گره نخورده (غشای آسیب‌دیده) محاسبه شد (Revell & Mrode, 1994).

ارزیابی ناهنجاری‌های مورفولوژی اسپرم

برای بررسی مورفولوژی اسپرم از محلول هانکوک استفاده شد. به این صورت که ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه به ۱۵۰ میکرولیتر محلول هانکوک اضافه شد. سپس سه قطره (۲۰ میکرولیتر) از این محلول روی لام قرارگرفته و به‌وسیله لامل پوشانده شد. ارزیابی و شمارش اسپرم با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر صورت گرفت. در هر لام حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش و به‌صورت درصد کل اسپرم‌های غیر نرمال (آکروزوم غیرطبیعی، سر جدا شده، نقص‌های دم و میانه اسپرم) به‌کل اسپرم شمارش‌شده، گزارش شد (Itoh *et al*., 2009).

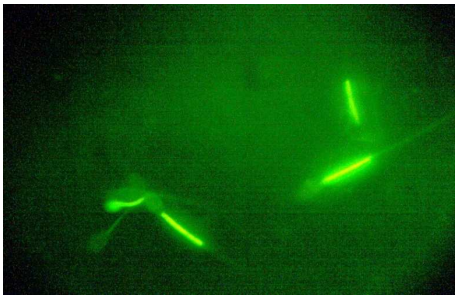
ارزیابی درصد زنده‌مانی اسپرم

نمونه‌های منی از نظر درصد اسپرم‌های زنده و مرده با رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا ۵ میکرولیتر از نمونه منی با ۵ میکرولیتر رنگ روی لام به‌آرامی مخلوط شده و با لام دیگر

گسترش تهیه شد. جهت خشک‌کردن، نمونه گسترش یافته به مدت سه دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. تعداد ۲۰۰ اسپرم به‌وسیله میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر ارزیابی شدند. اسپرم‌هایی که به طورکلی یا جزئی رنگ قرمز مایل به بنفش به خود گرفته بودند، مرده و اسپرم‌هایی که رنگ به خود نگرفته بودند زنده محسوب شدند (Prince *et al*., 2001).

اندازه‌گیری فعالیت میتوکندری

از رودامین ۱۲۳ و پروپیدیم یدید برای ارزیابی فعالیت میتوکندری استفاده شد. ۳۰ میکرولیتر از رنگ رودامین-۱۲۳ (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر DMSO) با ۱۲۰ میکرولیتر DMSO رقیق شد و در مقادیر ۳۰ میکرولیتر تا زمان نیاز ذخیره شد. ۳ میکرولیتر از محلول رودامین-۱۲۳ به ۱۰۰۰ میکرولیتر نمونه رقیق مایع منی (۲۰×۱۰^{۶} اسپرم/ میلی‌لیتر) اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه در تاریکی انکوبه شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر پروپیدیم یدید (۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محلول بافر فسفات (PBS) به آن اضافه کرده و مجدد ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ و در تاریکی انکوبه شدند و در نهایت به مدت سه دقیقه با دور ۵۰۰۰g سانتریفیوژ شدند و پلت اسپرم با ۱۰۰۰ میکرولیتر PBS به حالت معلق درآمد. ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون روی لام قرار گرفت و با لامل پوشانده شد. تعداد ۲۰۰ اسپرم به‌وسیله میکروسکوپ فلورسنت ارزیابی شدند. اسپرم با رنگ سبزرنگ زیر میکروسکوپ فلورسنت به‌عنوان اسپرم با میتوکندری سالم در نظر گرفته شد (Kim *et al*., 2001).



شکل ۱. رنگ‌آمیزی اسپرماتوزوآ با رودامین۱۲۳: اسپرم‌های ساطع کننده رنگ سبز میتوکندری فعال دارند.

Figure 1. Staining of spermatozoa with Rodamin 123. The sperms with green color have active mitochondria.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

داده‌های این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۶ تیمار و ۵ تکرار انجام شد آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار sas انجام شد. برای مقایسه میانگین از آزمون دانکن با سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

$$Y_{ij} = \mu + x_i + e_{ij}$$

Y_{ij}: مقدار عددی هر مشاهده، μ: میانگین مشاهده، e_{ij}: اثر عوامل باقی‌مانده، xi: اثر تیمار iام.

اعداد به‌صورت میانگین و انحراف استاندارد ارائه شده‌اند.

نتایج

نتایج پژوهش در دو مرحله نگه‌داری کوتاه‌مدت و بلندمدت در جدول‌های ۱ تا ۵ نشان داده شدند.

جنبایی اسپرم

در زمان صفر جنبایی اسپرم در غلظت‌های مختلف اسید وانیلیک نسبت به ویتامین E+C تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۱). درحالیکه جنبایی اسپرم در غلظت های ۱ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به گروه شاهد افزایش داشت (P<۰/۰۵). درصد اسپرم‌های جنبا طی مدت نگهداری در تیمار ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید وانیلیک از تمام تیمارها بیشتر بود. در زمان ۲۴ ساعت تیمار ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید وانیلیک نسبت به گروه ویتامین E+C و شاهد افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). در زمان ۲۴ ساعت پس از نگهداری در یخچال، تیمار ۱ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید وانیلیک نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید وانیلیک نسبت به گروه ویتامین E+C افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵)، و نیز غلظت‌های مختلف اسید وانیلیک نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). جنبایی در همه تیمارها با افزایش زمان به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد (P<۰/۰۵)؛ اما این کاهش در غلظت‌های ۱ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید وانیلیک در زمان‌های صفر، ۲۴ و ۴۸ پس از شروع نگه‌داری تفاوت معنی‌داری نداشت.

جدول ۱. تأثیر اسید وانیلیک و ویتامین‌های E+C بر جنبایی اسپرم قوچ در شرایط نگهداری سرد و پس از انجماد-ذوب

Table 1. The effect of vanillic acid and vitamins E+C on the motility of ram spermatozoa during cold storage and after freezing and thawing

Treatment						Hour
DMSO	vitamin E+C	VA100 (µgr/ml)	VA10 (µgr/ml)	VA1 (µgr/ml)	Control	
73.36±1.08^{Abc}	75.82±2.18^{Aabc}	75.84±4.23^{Aabc}	80.01±3.48^{Aa}	78.38±3.90^{Aab}	72.05±2.15^{Ac}	0
70.51± 0.72^{Bc}	73.18± 1.21^{ABb}	73.34± 1.92^{ABbc}	77.82±1.92^{ABa}	75.48±1.97^{ABab}	68.97±1.08^{Bc}	24
67.39± 0.30^{Cc}	70.01± 0.90^{Bbc}	71.07± 2.29^{ABb}	74.49±1.20^{BCa}	73.41± 2.14^{ABa}	66.37± 0.42^{Bc}	48
64.63± 0.60^{Dbc}	66.57± 1.04^{Cbc}	67.96±^{Bab} 2.80	71.90± 0.78^{Ca}	71.50± 1.58^{Ba}	62.25±1.13^{Cc}	72
64.76± 0.59^{Bb}	65.98± 1.03^{Bb}	64.52± 1.10^{Bb}	62.92± 0.61^{Bb}	72.16± 1.65^{Aa}	64.15± 0.88^{Bb}	Post-thaw

a-c: حروف نامشابه در هر ردیف به‌منزله وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

A-C: حروف نامشابه در هر ستون به‌منزله وجود تفاوت معنی‌دار در زمان‌های مختلف است (P<۰/۰۵). DMSO (دی‌متیل‌سولفوکساید)

a-c: Within each row-, means with different superscripts differ significantly (P < 0.05).

A-C: Within each column, means with different superscripts differ significantly (P < 0.05). DMSO: Dimethyl Sulfoxide

درصد جنبایی در گروه ۱ میکروگرم اسید وانیلیک نسبت به سایر گروه‌ها به طور معنی‌داری بالاتر بود. سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. (جدول ۱).

یکپارچگی غشای اسپرم

در زمان صفر، یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم در تیمار ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید وانیلیک نسبت به گروه ویتامین E+C و شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد (جدول ۲؛ P<۰/۰۵). در زمان ۴۸ ساعت تیمار ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید وانیلیک نسبت به گروه ویتامین E+C افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵) و نیز غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید وانیلیک نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). درصد اسپرم های با غشای یکپارچه بین غلظت‌های مختلف اسید وانیلیک با تیمار ویتامین E+C و گروه شاهد در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت تفاوت معنی‌داری نداشتند. میانگین درصد سلامت غشای پلاسمایی اسپرم در همه تیمارها با افزایش زمان به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد (P<۰/۰۵)؛ اما این کاهش در غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید وانیلیک در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از شروع نگه‌داری و نیز غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در زمان‌های صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت تفاوت معنی‌داری نداشتند.

در فرآیند پس از یخ‌گشایی، درصد یکپارچگی غشای اسپرم در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر اسید وانیلیک نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵)، اما نسبت به گروه ویتامین E+C تأثیر معنی‌داری نداشت. تیمار ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید وانیلیک نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری در درصد اسپرم متورم و پیچ خورده داشت (جدول ۲).

مورفولوژی اسپرم

نتایج حاصل از ارزیابی مورفولوژی اسپرم نشان داد که بین غلظت‌های مختلف اسید وانیلیک با تیمار ویتامین E+C و گروه کنترل در زمان‌های مختلف تفاوت معنی داری وجود نداشت (جدول ۳). با افزایش زمان نگهداری در شرایط کوتاه‌مدت، مورفولوژی اسپرم کاهش چشمگیری پیدا نکرده است و این نشان می‌دهد که ترکیبات رقیق‌کننده توانسته همانند زمان اول سنجش، مورفولوژی اسپرم را حفظ کند. پس از فرآیند یخ‌گشایی نتایج مورفولوژی اسپرم نشان داد که تیمار ۱، ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید وانیلیک نسبت به گروه شاهد بیشتر بود (P<۰/۰۵)؛ اما نسبت به ویتامین E+C تأثیر معنی‌داری نشان ندادند. تیمار ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید وانیلیک نسبت به سایر تیمارها بیشترین کاهش در درصد اسپرم طبیعی نشان داد.

زنده‌مانی

درصد زنده مانی اسپرم در زمان صفر غلظت‌های مختلف اسید وانیلیک نسبت به ویتامین E+C تأثیر معنی‌داری نداشت (جدول ۴). درحالی‌که غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید وانیلیک نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵).

جدول ۲. تأثیر اسید وانیلیک و ویتامین های E+C بر یکپارچگی غشای اسپرم قوچ در شرایط نگهداری سرد و پس از انجماد-ذوب

Table 2. The effect of vanillic acid and vitamins E+C on the plasma membrane integrity of ram spermatozoa during cold storage and after freezing and thawing

Treatment						Hour
DMSO	vitamin E+C	VA100 (µgr/ml)	VA10 (µgr/ml)	VA1 (µgr/ml)	Control	
81.87± 0.63^{Ab}	83.08± 0.89^{Ab}	81.89± 2.49^{Ab}	84.20± 1.30^{Aab}	87.26± 0.67^{Aa}	81.22± 0.54^{Ab}	0
78.90± 0.22^{B}	79.38± 0.16^{B}	79.75± 2.38^{AB}	82.05± 0.94^{AB}	82.68± 1.23^{B}	79.03± 0.25^{B}	24
76.80± 0.37^{Cc}	78.08± 0.07^{Cbc}	76.39± 1.55^{ABc}	79.55± 0.28^{BCb}	81.50± 1.26^{Ba}	77.24± 0.54^{Cc}	48
74.06± 0.19^{D}	75± 0.43^{D}	73.39± 1.47^{B}	77.34± 0.71^{C}	80.56± 1.49^{B}	74.05± 0.59^{D}	72
30.89± 0.52^{Ba}	32.90± 0.78^{Ba}	25.06± 0.21^{Bc}	32.82± 1.23^{Ba}	30.91± 0.43^{Ba}	27.05± 0.79^{Bb}	Post-thaw

a-c: حروف نامشابه در هر ردیف به‌منزله وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

A-C: حروف نامشابه در هر ستون به‌منزله وجود تفاوت معنی‌دار در زمان‌های مختلف است (P<۰/۰۵). DMSO (دی‌متیل‌سولفوکساید)

a-c: Within each row-, means with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

A-C: Within each column, means with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$). DMSO: Dimethyl Sulfoxide

جدول ۳. تأثیر اسید وانیلیک و ویتامین های E+C بر مورفولوژی اسپرم قوچ در شرایط نگهداری سرد و پس از انجماد-ذوب

Table 3. The effect of vanillic acid and vitamins E+C on morphology of ram spermatozoa during cold storage and after freezing and thawing

Treatment						Hour
DMSO	vitamin E+C	VA100 (µgr/ml)	VA10 (µgr/ml)	VA1 (µgr/ml)	Control	
89.35±2.76	90.72±2.62	89.89±4.54	91.32±4.43	92.30±2.40	90.15±2.27	0
86.51±3.13	87.86±2.91	88.22±4.55	89.42±4.13	90.74±2.10	87.17±2.02	24
83.99±2.80	85.28±2.66	85.64±4.30	87.48±4.05	88.64±1.91	84.78±1.94	48
81.15±2.76	82.28±2.78	83.52±3.98	87.59±4.69	85.26±2.61	82.68±1.54	72
70.35± 0.96^{bcd}	71.80± 0.75^{abc}	68.39± 0.59^{d}	73.85± 0.81^{a}	72.26± 1.26^{ab}	69.51± 0.33^{cd}	Post-thaw

a-d: حروف نامشابه در هر ردیف به‌منزله وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

a-d: Within each row, means with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

در زمان ۲۴ ساعت تیمار ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید وانیلیک نسبت به گروه ویتامین E+C افزایش معنی داری نشان داد (P<۰/۰۵). و غلظت‌های مختلف اسید وانیلیک نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید وانیلیک نسبت به ویتامین E+C و گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). زنده‌مانی در همه تیمارها با افزایش زمان به‌طور معنی داری کاهش پیدا کرد (P<۰/۰۵)؛ اما این کاهش در غلظت‌های ۱ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید وانیلیک در زمان‌های ۵، ۲۴ و ۴۸ پس از شروع نگه‌داری تفاوت معنی‌داری نداشت.

درصد اسپرم‌های زنده در فرآیند پس از یخ‌گشایی (جدول ۴) در غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید وانیلیک نسبت به گروه شاهد و تیمار ویتامین E+C افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵).

فعالیت میتوکندری

درصد اسپرم های با میتوکندری فعال در زمان صفر غلظت‌های مختلف اسید وانیلیک نسبت به ویتامین E+C تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۵)، درحالی‌که غلظت‌های ۱ و ۱۰ اسید وانیلیک نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). در زمان ۷۲ ساعت غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید وانیلیک نسبت به ویتامین E+C و گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). فعالیت میتوکندری در همه تیمارها با افزایش زمان به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد (P<۰/۰۵)؛ اما این کاهش در غلظت‌های ۱ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید وانیلیک در زمان‌های صفر و ۷۲ پس از شروع نگه‌داری تفاوت معنی‌داری نداشت.

پس از فرآیند یخ گشایی تیمار ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بهترین اثر محافظتی از فعالیت میتوکندری را نسبت به گروه شاهد و تیمار ویتامین E+C داشت (جدول ۵) (P<۰/۰۵). تمام غلظت‌های مختلف اسید وانیلیک نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵).

جدول ۴. تأثیر اسید وانیلیک و ویتامین های E+C بر زنده مانی اسپرم قوچ در شرایط نگهداری سرد و پس از انجماد-ذوب

Table 4. The effect of vanillic acid and vitamins E+C on viability of ram spermatozoa during cold storage and after freezing and thawing

Treatment						Hour
DMSO	vitamin E+C	VA100 (µgr/ml)	VA10 (µgr/ml)	VA1 (µgr/ml)	Control	
75.55± 0.96^{Ab}	80.85± 0.86^{Aab}	81.33± 2.15^{Aab}	85.27± 2.01^{Aa}	83.72± 1.74^{Aa}	76.91± 0.96^{Ab}	0
75.49± 0.77^{Bdc}	77.91± 0.99^{ABbc}	78.33± 1.72^{Abc}	82.77± 2.06^{Aba}	80.14± 1.63^{ABab}	71.94± 0.60^{Bd}	24
72.36± 0.49^{Cbc}	75.12± 0.89^{Bbc}	75.15± 2.32^{ABb}	79.62± 1.45^{BCa}	78.33± 2.39^{Aba}	70.03± 0.53^{Bc}	48
68.89± 0.53^{Db}	70.68± 0.99^{Cb}	68.51± 3.10^{Bb}	76.91± 0.93^{Ca}	75.90± 1.97^{Ba}	66.77± 0.92^{Cb}	72
68.17± 0.64^{Bb}	68.26± 0.80^{Bb}	67.23± 1.33^{Bb}	66.39± 0.85^{Bb}	75.47± 1.6^{Ba}	62.25± 0.90^{Bb}	Post-thaw

a-d: حروف نامشابه در هر ردیف به‌منزله وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

A-D: حروف نامشابه در هر ستون به‌منزله وجود تفاوت معنی‌دار در زمان‌های مختلف است (P<۰/۰۵). DMSO (دی‌متیل‌سولفوکساید)

a-d: Within each row, means with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

A-D: Within each column, means with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$). DMSO: Dimethyl Sulfoxide

جدول ۵. تأثیر اسید وانیلیک و ویتامین های E+C بر فعالیت میتوکندری اسپرم قوچ در شرایط نگهداری سرد و پس از انجماد-ذوب

Table 5. The effect of vanillic acid and vitamins E+C on mitochondrial activity of ram spermatozoa during cold storage and after freezing and thawing

Treatment						Hour
DMSO	vitamin E+C	VA100 (µgr/ml)	VA10 (µgr/ml)	VA1 (µgr/ml)	Control	
0.93^{Abc}± 65.33	1.65^{Aabc}± 67.73	2.58^{Abc}± 67.1	2.28^{Aa}± 73.31	2.19^{Aab}± 70.58	0.60^{Ac}± 62.9	0
1.26^{Bc}± 55.79	1.48^{Bb}± 56.35	2.21^{Ab}± 59.60	1.08^{Ba}± 65.59	2.05^{Aa}± 66.51	1.14^{Bc}± 52.79	72
0.27^{Bb}± 24.63	0.53^{Bb}± 25.96	0.54^{Bc}± 20.15	0.30^{Bb}± 25.69	0.44^{Ba}± 30.57	0.29^{Bd}± 16.59	Post-thaw

a-d: حروف نامشابه در هر ردیف به‌منزله وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

A-D: حروف نامشابه در هر ستون به‌منزله وجود تفاوت معنی‌دار در زمان‌های مختلف است (P<۰/۰۵). DMSO (دی‌متیل‌سولفوکساید)

a-d: Within each row, means with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

A-D: Within each column, means with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$). DMSO: Dimethyl Sulfoxide

بحث

مطالعات مشابهی در مورداستفاده از اسید وانیلیک بر عملکرد اسپرم قوچ وجود ندارد بنابراین ما ناچار شدیم از پژوهش‌های مشابه با تاثیر گذاری ترکیب اسید وانیلیک روی بافت‌ها و سلول‌های متفاوت در گونه‌های مختلف استفاده کنیم (Kim *et al*., 2011; Sindhu *et al*., 2015). در پژوهش حاضر، تاثیر رقیق کننده حاوی غلظت‌های مختلف اسید وانیلیک بر بهبود فراسنجه های اسپرم در نگه‌داری کوتاه و بلندمدت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که در نگه‌داری کوتاه‌مدت غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید وانیلیک توانستند با مهار تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد موجب بهبود جنبایی و فعالیت میتوکندری اسپرم نسبت به تیمار شاهد شدند. چنین تاثیری در تیمار ویتامین E + C هم دیده شد. عملکرد مثبت این آنتی‌اکسیدان محدود به بهبود معنادار فراسنجه‌های جنبایی و فعالیت میتوکندری نبوده و درصد زنده مانی و یکپارچگی غشای اسپرم‌ها، در غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید وانیلیک نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار یافت. همان‌طور که در نتایج اشاره شده است در نگه-داری بلندمدت غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر اسید وانیلیک توانستند باعث بهبود زنده مانی، یکپارچگی غشا و ریخت‌شناسی اسپرم‌ها شدند و نیز غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید وانیلیک سبب افزایش جنبایی و فعالیت میتوکندری نسبت به گروه شاهد شد. اسید وانیلیک یک ترکیب فنلی مشتق شده از گیاهان و مواد خوراکی است. ترکیبات فنولی در گیاهان خوراکی و غیرخوراکی به‌طورمعمول یافت می‌شوند و گزارش شده است که دارای آثار مختلف بیولوژیکی مانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند (Morucci *et al*., 2012).

مکانیسم محافظتی اسیدهای فنولیک در مقابل تنش اکسیداتیو به ساختار شیمیایی آن مربوط می‌شود و به این صورت است که، تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن به وسیله مهار آنزیم‌های تشکیل‌دهنده ROS را کاهش یا سبب پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد به‌وسیله گروه کربوکسیلیک اسید همراه با ساختار کاتکول در حلقه

آروماتیک شوند (Breininger *et al*., 2005). برای مقایسه اثر آنتی‌اکسیدانی اسید وانیلیک نیازمند یک منبع مقایسه بود که در این مطالعه از دو آنتی‌اکسیدان مطرح و قابل‌دسترس ویتامین E+C استفاده شد. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که آنتی‌اکسیدان‌های محلول در چربی مانند ویتامین E و آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب، مانند ویتامین C در کاهش رادیکال‌های آزاد نقش موثری دارند (Calixto *et al*., 2015). ویتامین C دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده و در مایع اپیدیدیم و پلاسماس منی چند گونه حیوانی و ازجمله قوچ وجود دارد و یک نقش محافظتی در برابر رادیکال‌های آزاد داشته و باعث نگه‌داری غشای اسپرم در مقابل اکسید شدن می‌شود (Najafi *et al*., 2014).

عملکرد ویتامین E به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان درون سلولی بیشتر مربوط به جذب گونه‌های اکسیژن واکنشگر و هیدروپروکسیدازهای چربی و تبدیل آن‌ها به اشکال غیرواکنشی می‌باشد (Vinothiya & Ashokkumar, 2017). بنابراین فسفولیپیدهای غشاء را در برابر آسیب‌های ناشی از اکسیده شدن محافظت می‌کند (Singh *et al*., 2015). نتایج ما نشان داد که در نگه‌داری کوتاه‌مدت غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر اسید وانیلیک روی یکپارچگی غشاء و زنده‌مانی تاثیر مثبتی نسبت به ویتامین E+C داشته باشه و فراسنجه های جنبایی و فعالیت میتوکندری در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید وانیلیک بهترین عملکرد را نسبت به ویتامین E+C داشته اند و در نگه‌داری بلندمدت، غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید وانیلیک توانست فراسنجه های جنبایی، زنده‌مانی و فعالیت میتوکندری اسپرم‌ها را نسبت به گروه ویتامین E+C افزایش معنی‌داری دهد. مطالعات فراوان در شرایط آزمایشگاهی نشان داده‌اند که ترکیبات فنولیک می‌توانند به‌طور مستقیم رادیکال های آزاد مانند یون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال هیدروکسیل و پراکسیل را پاک‌سازی و جاروب کنند همچنین با پوشش‌دادن لیپیدها روند پراکسیداسیون لیپیدی را تغییر داده و متوقف کنند به طوری‌که حتی اثر آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات بیشتر از ویتامین‌های C و E و آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک است (Rice *et al*., 1997; Blokhina *et al*., 2003; Salmani *et al*., 2013). در نتیجه می‌توان گفت که اثر آنتی‌اکسیدانی اسید وانیلیک نسبت به ویتامین E+C بیشتر بوده است.

پژوهش ما اولین بررسی در رابطه با تاثیر اسید وانیلیک بر فراسنجه های اسپرم در نگه‌داری کوتاه و بلندمدت است. همان‌طور که قبلا اشاره شد اسید وانیلیک دارای اثر آنتی اکسیدانی قوی بوده و احتمالا این ماده با تقویت سیستم دفاع آنتی اکسیدانی و کاهش تنش اکسیداتیو باعث افزایش کیفیت فراسنجه‌های اسپرم‌ها شده است (Dragana *et al*., 2012). کاهش میزان پراکسیداسیون لیپید سبب افزایش یکپارچگی غشای سلولی شده و همچنین باعث حفظ پیام‌رسان‌های مولکولی می‌گردد که این امر یکی از ضروری‌ترین فراسنجه ها برای افزایش باروری است. احتمالا مکانیسم تاثیر اسید وانیلیک بر پراکسیداسیون لیپید به این صورت است که آسیب‌های ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن را بر غشای پلاسمایی، با دادن الکترون از گروه هیدروسیل خود به رادیکال‌های آزاد کاهش می‌دهد. در نتیجه می‌توان گفت که افزودن اسید وانیلیک سبب افزایش درصد اسپرم‌هایی با غشاء سالم نسبت به گروه شاهد شد که با نتایج یکسری مطالعات مطابقت دارد (Bucak *et al*., 2009).

نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که افزودن اسید وانیلیک باعث کاهش میزان پراکسیداسیون لیپید که این به نوبه‌ی خود سبب افزایش درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها طی نگه‌داری کوتاه و بلندمدت نسبت به گروه شاهد شده است. از آنجایی‌که جنبایی اسپرم در فرآیند سردسازی بسیار تحت تاثیر قرار می‌گیرد، معمولاً به‌عنوان یک فراسنجه قابل اعتماد برای ارزیابی پروتکل سردسازی در نظر گرفته می‌شود. افزایش میزان گونه‌های اکسیژن واکنشگر و پراکسیداسیون لیپید سبب اختلال در غشای میتوکندری، کاهش میزان ATP و آسیب آکسونم اسپرم شده و در نهایت باعث کاهش جنبایی اسپرم خواهد شد و نشان داده شده است که یکپارچگی غشای پلاسمایی با تحرک اسپرم مرتبط است (Sharma & Agarwal, 1996). پس از آنجایی‌که اسید وانیلیک تاثیر مثبتی بر

یکپارچگی غشای اسپرم داشت در نتیجه تاثیر مثبتی روی جنبایی و فعالیت میتوکندری در نگه‌داری کوتاه و بلندمدت نسبت به گروه شاهد دارد.

نتیجه‌گیری

بنابراین ازیافته‌های پژوهش حاضر، می‌توان نتیجه گرفت که افزودن اسید وانیلیک در غلظت ۱ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سبب بهبود فراسنجه‌های جنبایی، زنده‌مانی، افزایش میزان سلامت غشا، فعالیت میتوکندری وکاهش اسپرماتوزئیدهایی با مورفولوژی غیرطبیعی طی نگه‌داری کوتاه و بلندمدت شدند. با این وجود برای بررسی و ارزیابی دقیق‌تر تاثیر آنتی‌اکسیدانی اسید وانیلیک در راستای فرآوری منی نیاز به تحقیقات بیشتری است.

سپاسگزاری

از زحمات‌بی‌دریغ مسئول مزرعه و مسئول آزمایشگاه‌های دانشکده علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

REFERENCES

1. Arora, A., Nair, MG. & Strasburg, GM. (1998). Structure–activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radical Biology and Medicine,* 24(9), 1355-1363.
2. Benavente-García, O., Castillo, J., Marin, FR., Ortuño, A. & Del Río, JA. (1997). Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(12), 4505-4515.
3. Blokhina, O., Virolainen, E. & Fagerstedt, KV. (2003). Antioxidants oxidative damage and oxygen deprivation stress- review. *Annals of Botany,* 91,179-194.
4. Breininger, E., Beorlegui, NB., O'Flaherty, CM. & Beconi, MT. (2005). Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology,* 63(8),2126-2135.
5. Bucak, MN., Tuncer, PB., Sarıozkan, S. & Ulutas, PA. (2009). Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. *Small Ruminant Research,* 81,13-17.
6. Calixto-Campos, C., Carvalho, TT., Hohmann, MS., Pinho-Ribeiro, FA., Fattori, V., Manchope, MF., Zarpelon, AC., Baracat, MM., Georgetti, SR., Casagrande, R. & Verri, Jr WA. (2015). Vanillic acid inhibits inflammatory pain by inhibiting neutrophil recruitment, oxidative stress, cytokine production, and NFκB activation in mice. *Journal of Natural Products,* 78(8),1799-1808.
7. Courot, M. (1976). Semen quality and quantity in the ram. Sheep Breeding: *Studies in the Agricultural and Food Sciences,* 495-504.
8. Delaquis, P., Stanich, K. & Toivonen, P. (2005). Effect of pH on the inhibition of Listeria spp. by vanillin and vanillic acid. *Journal of Food Protection,* 68(7),1472-1476.
9. Dianat, M., Hamzavi, GR., Badavi, M. & Samarbafzadeh, A. (2014). Effects of Losartan and vanillic acid co-administration on ischemia-reperfusion-induced oxidative stress in isolated rat heart. *Iranian Red Crescent Medical Journal,* 16(7).
10. Dragana, M., Stanisavljevic Sasa, S., Stojicevic Sofija, M., Dorcevic Branislav, P., Zlatkovic Dragan, T., Velickovic Ivana, T. & Karabegovic Miodrag, L. (2012). Antioxidant activity, the content of total phenols and flavonoids in the ethanol extracts of mentha longifolia L. Hudson dried by the use of different techniques. *Available on line at Association of the Chemical Engineers of Serbia ACHE*, 23,213-219.
11. Evans, G., Hollinshead, FK. & MaxwellW, MC. (2004). Preservation and artificial insemination of sexed semen in sheep. *Reproduction, Fertility and Development,* 16,455-464.
12. Fattah, A., Sharafi, M., Masoudi, R., Shahverdi, A., Esmaeili, V. & Najafi, A. (2017). l-Carnitine in rooster semen cryopreservation: Flow cytometric, biochemical and motion findings for frozen-thawed sperml. *Cryobiology,* 74,148-153.
13. Fraser, L., Dziekońska, A., Strzeżek, R. & Strzeżek, J. (2007). Dialysis of boar semen prior to freezing–thawing: Its effects on post-thaw sperm characteristics. *Theriogenology,* 67(5), 994-1003.
14. Itoh, A., Isoda, K., Kondoh, M., Kawase, M., Kobayashi, M., Tamesada, M. & Yagi, K. (2009). Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin a-induced liver injury. *Biological and Pharmaceutical Bulletin,* 32(7),1215-1219.
15. Kim, MC., Kim, SJ., Kim, DS., Jeon, YD., Park, SJ., Lee, HS., Um, JY. & Hong, SH. (2011). Vanillic acid inhibits inflammatory mediators by suppressing NF-κB in lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal macrophages. *Immunopharmacology and Immunotoxicology,* 33(3), 525-532.

16. Lakshmanashetty, RH., Nagaraj, VB., Hiremath, MG. & Kumar, V. (2010). In vitro antioxidant activity of Vitex negundo L. leaf extracts. *Chiang Mai Journal of Science,* 37(3),489-497.
17. Leal LKAM Pierdoná, TM., Góes, JGS., Fonsêca, KS., Canuto, KM., Silveira, ER., Bezerra, AME. & Viana, GSB. (2011). A comparative chemical and pharmacological study of standardized extracts and vanillic acid from wild and cultivated Amburana cearensis AC Smith. *Phytomedicine,* 18(2-3),230-233.
18. Morucci, F., Lopez, P., Miño, J., Ferraro, G. & Gorzalczany, S. (2012). Antinociceptive activity of aqueous extract and isolated compounds of Lithrea molleoides. *Journal of Ethnopharmacology,* 142(2),401-406.
19. 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. *Animal Science Journal,* 28,893-899.
20. Najafi, A., Daghigh Kia, H., Dodaran, HV., Mehdipour, M. & Alvarez-Rodriguez, M. (2017). Ethylene glycol, but not DMSO, could replace glycerol inclusion in soybean lecithinbased extenders in ram sperm cryopreservation. *Animal Reproduction Science,* 177,35-4.
21. Najafi, A., Kia, HD., Mohammadi, H., Najafi, MH., Zanganeh, Z., Sharafi, M. & MartinezPastor, F. (2014). Different concentrations of cysteamine and ergothioneine improve microscopic and oxidative parameters in ram semen frozen with a soybean lecithin extender. *Cryobiology,* 69 (1),68-73.
22. Prince, PSM., Dhanasekar, K. & Rajakumar, S. (2015). Vanillic acid prevents altered ion pumps, ions, inhibits Fas-receptor and caspase mediated apoptosis-signaling pathway and cardiomyocyte death in myocardial infarcted rats. *Chemico-Biological Interactions,* 232,68-76.
23. Revell, SG. & Mrode, RA. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science,* 36, 77-86.
24. Rice-Evans, C., Miller, N. & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science,* 2(4), 152-159.
25. Salamon, S. & MaxwellW, MC. (1995). Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science,* 37, 185-249.
26. Salmani, H., Nabi, MM., Vaseghi-Dodaran, H., Rahman, MB., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Shakeri, M., Towhidi, A., Zare-Shahneh, A. & Zhandi, M. (2013). Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze–thawing. *Small Ruminant Research,* 112(1-3), 123-127.
27. Sharma, RK. & Agarwal, A. (1996). Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, 48, 835-50.
28. Sindhu, G., Nishanthi, E. & Sharmila, R. (2015). Nephroprotective effect of vanillic acid against cisplatin induced nephrotoxicity in wistar rats: a biochemical and molecular study. *Environmental toxicology and pharmacology,* 39(1), 392-404.
29. Singh, JCH., Kakalij, RM., Kshirsagar, RP., Kumar, BH., Komakula, SSB. & Diwan, PV. (2015). Cognitive effects of vanillic acid against streptozotocin-induced neurodegeneration in mice. *Pharmaceutical Biology,* 53(5), 630-636.
30. Smith, OB. & Akinbamijo, OO. (2000). Micronutrients and reproduction in farm animals. *Animal Reproduction Science*, 60, 549-560.
31. Tai, A., Sawano, T. & Ito, H. (2012). Antioxidative properties of vanillic acid esters in multiple antioxidant assays. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry,* 76(2), 314-318.
32. Vinothiya, K. & Ashokkumar, N. (2017). Modulatory effect of vanillic acid on antioxidant status in high fat diet-induced changes in diabetic hypertensive rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy,* 87, 640-652.
33. Wang, G., Kang, N., Gong, H., Luo, Y., Bai, C. & Chen, Y. (2015). Upregulation of uncoupling protein Ucp2 through acute cold exposure increases post-thaw sperm quality in zebrafish. *Cryobiology,* 71(3), 464-471.