



اثر غلظت‌های مختلف بوتیلید هیدروکسی آنیزول بر بهبود فراسنجه‌های کمی و کیفی اسپرم بز مهابادی در طی فرآیند انجماد- یخ‌گشایی

مهدی رحمت‌زاده^۱، حمید کهرام^۲ و احمد زارع شحنة^۳

۱ و ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران
۳- استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران، (نویسنده مسؤول: azareh@ut.ac.ir)
تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۱۸

چکیده

مطالعه حاضر به منظور بررسی تاثیر سطوح مختلف آنتی اکسیدان بوتیلید هیدروکسی آنیزول بر بهبود انجمادپذیری اسپرم بز مهابادی انجام شد. چهار راس بز مهابادی (۳-۴ سال) به منظور جمع‌آوری مایع منی توسط واژن مصنوعی، به مدت پنج هفته و هر هفته یک نوبت در طول فصل غیر تولیدمثلی مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های منی دارای کیفیت خوب با هم مخلوط شدند و همراه با رقیق‌کننده حاوی غلظت‌های مختلف بوتیلید هیدروکسی آنیزول (صفر، یک، دو و چهار میلی‌مولار) به پنج قسمت مساوی تقسیم شد. فراسنجه‌های اسپرم، از جمله جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده، زنده‌مانی، یکپارچگی غشا و ناهنجاری کل ارزیابی شد. با توجه به نتایج، غلظت چهار میلی‌مولار BHA، سبب بهبود معنی‌دار زنده‌مانی، یکپارچگی غشا و جنبایی پیش‌رونده اسپرم پس از یخ‌گشایی شده است ($P < 0.05$). اما تفاوت معنی‌داری بین سطوح دیگر (یک و دو میلی‌مولار) و گروه‌های شاهد وجود نداشت ($P > 0.05$). علاوه بر این درصد ناهنجاری بین سطوح مختلف BHA و گروه‌های شاهد دارای تفاوت آماری معنی‌داری نبود ($P > 0.05$). مطالعه حاضر نشان داد که وجود BHA در رقیق‌کننده، ممکن است روشی برای بهبود کیفیت اسپرم بز پس از یخ‌گشایی باشد.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، آنتی اکسیدان بوتیلید هیدروکسی آنیزول، بز مهابادی، جنبایی، کیفیت

مقدمه

ذخیره‌سازی بهینه اسپرم به صورت انجماد عملی ضروری در جهت بهبود بازده استفاده از تلقیح مصنوعی است اگرچه گزارش‌ها نشان می‌دهند که تلقیح مصنوعی با اسپرم منجمد یخ‌گشایی شده باروری کمتری را در مقایسه با اسپرم تازه داشته است (۲۱). انجماد اسپرم، شامل در معرض قرار دادن ابتدایی اسپرم‌ها با مواد محافظ انجماد، کاهش دما به زیر صفر درجه سانتی‌گراد، آیزدایی سلولی^۱ و ذخیره آن به مدت‌های طولانی می‌باشد (۱۷). از مزایای منجمد کردن اسپرم می‌توان به بارور نمودن همزمان تعداد زیادی دام ماده با استفاده از اسپرم دام‌های نر با نژاد برتر، حذف هزینه‌های مربوط به نگهداری حیوانات نر، جابه‌جایی آسان مایع منی از مراکز تولید و جمع‌آوری به دورترین مکان‌ها، از بین رفتن اثر فصل در جفت‌گیری، هم‌چنین ذخیره ژن‌ها برای استفاده آینده و تضمین در مقابل از دست دادن نرهای منحصر به فرد و جلوگیری از انقراض نسل نژادهای خاص اشاره نمود (۱۱). همه مراحل انجام گرفته برای انجماد اسپرم سبب بروز شوک سرمایی و حمله اکسیداتیو به غشای اسپرم می‌شود که موجب کاهش بقای اسپرم و در نهایت منجر به کاهش توانایی باروری سلول اسپرم می‌گردد (۱۶، ۹). هدف از اضافه کردن رقیق‌کننده‌های مناسب اسپرم از جمله زرده تخم‌مرغ و لسیترین سویا، تأمین انرژی مورد نیاز سلول‌های اسپرم، حفاظت سلول‌ها از آسیب‌های دمایی، کاهش تنش‌های ناشی از سرد کردن، انجماد و یخ‌گشایی سلول‌های اسپرم و در نهایت ایجاد یک محیط مناسب برای زنده ماندن اسپرم‌ها است (۲۷، ۸، ۲۰). رادیکال‌های آزاد، مولکول‌های مشتق شده از اکسیژن هستند

که از نظر فیزیولوژیکی به بلوغ اسپرم، ظرفیت‌پذیری^۴ و واکنش آکروزومی کمک می‌کند و از نظر پاتولوژیکی باعث پراکسیداسیون لیپید و آسیب به DNA سلول اسپرم می‌شوند (۲۴، ۳). میزان ROS^۵ موجود در مایع منی همبستگی منفی بسیار بالایی با جنبایی، تعداد اسپرم و ریخت‌شناسی عادی اسپرم‌ها دارد (۲). تنش اکسیداتیو در مایع منی اثر بدی بر روی جنبایی و سایر عملکردهای اسپرم به ویژه پیوستن اسپرم به اووسیت دارد و زمانی بوجود می‌آید که تعادلی بین تولید ROS و آنتی اکسیدان‌های موجود در محیط وجود نداشته باشد (۶، ۱). وجود آنتی اکسیدان‌های مختلف در محیط باعث می‌شود ROS در پلاسمای منی سطح ثابتی داشته باشند. آنتی اکسیدان‌ها با حذف رادیکال‌های آزاد، سبب می‌شوند اسپرم‌ها در برابر تنش‌های اکسیداتیو مقاوم‌تر شوند (۲۱، ۱۴، ۴). آنتی اکسیدان بوتیلید هیدروکسی آنیزول^۶ کریستال‌های جامد سفید با بوی ضعیف، ترکیب آنالوگی ویتامین E می‌باشد که مخلوطی از دو ترکیب ایزومریک عالی^۲-ترت- بوتیل- ۴- هیدروکسی آنیزول^۸ و ۳-ترت- بوتیل- ۴- هیدروکسی آنیزول^۷ است. از BHA به عنوان یک آنتی اکسیدان و ماده نگهدارنده در مواد غذایی، بسته بندی مواد غذایی، خوراک دام، محصولات آرایشی، لاستیک و محصولات نفتی استفاده می‌شود. این مشتقات فنولی با رادیکال‌های آزاد واکنش می‌دهند (جاروب کننده‌های رادیکال‌های آزاد نامیده می‌شوند) و می‌توانند سرعت اتواکسیداسیون که باعث تغییر رنگ و طعم مواد غذایی می‌شوند را کاهش دهند. BHA همچنین به عنوان یک تثبیت کننده مهار اتوپلیمریزاسیون پراکسیدهای آلی استفاده

1-Fresh semen

4-Capacitation

7-Butylated Hydroxy Anisole

2- Cryoprotectant

5-Reactive oxygen spaces

8- 2-tert-butyl

3- Cellular Dehydration

6-Fuse

9- 4-hydroxyanisole

می‌شود. BHA واکنش اتواکسیداسیون را با تبدیل رادیکال‌های پراکسی به هیدروپراکسیدها کنترل می‌کند. آنتی‌اکسیدان‌های غیرآزیمی (BHA) مانع شروع واکنش زنجیره‌ای و اکسیداسیون در واکنش پراکسیداسیون لیپید شده و در دفع دیگر ROSها نقش دارد (۱۴). مطالعات آزمایشگاهی روی اسپرم گاو نشان داد که BHA و BHT به‌عنوان پاک‌سازی کننده‌های رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند و غشای سلولی را در برابر پراکسیداسیون لیپیدی محافظت می‌کند (۵). در پژوهشی اثر آنتی‌اکسیدان‌های مختلف ویتامین E، BHA، پروپیل گالات^۱ و کاتالاز را بر میزان جنبایی اسپرم قوچ مورد بررسی قرار دادند (۲۸). در همین راستا پانکاج و همکاران (۱۹) اثر افزودن آنتی‌اکسیدان‌های BHT و BHA به رقیق کننده اسپرم سرد شده گونه‌ای از گاومیش رودخانه‌ای جهت بهبود فراسنجه‌های جنبایی را مورد ارزیابی قرار دادند. بنابراین با توجه به وجود تاثیر آنتی‌اکسیدان BHA بر فراسنجه‌های جنبایی اسپرم هدف از پژوهش پیش رو، بررسی سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان BHA در رقیق کننده منی بر شاخص‌های میکروسکوپی اسپرم بز مهابادی از جمله میزان جنبایی، زنده‌مانی، یکپارچگی غشا و مورفولوژی اسپرم پس از فرآیند انجماد یخ‌گشایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از منی چهار بز نر نژاد مهابادی (۳-۴ سال) استفاده شد. بزهای نر در ایستگاه پژوهشی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران واقع در محمد شهر و در شرایط محیطی و تغذیه‌ای یکسان نگهداری می‌شدند. پس از عادت‌دهی و آموزش بزها، جمع‌آوری منی به صورت هفته ای یک بار به مدت پنج هفته و در فصل غیر تولیدمثلی به وسیله مهبل مصنوعی^۲ از بزهای مورد نظر انجام شد. برای جلوگیری از ایجاد شوک سرمایی به اسپرم‌ها، نمونه‌های منی تا زمان انتقال به آزمایشگاه، درون فلاسک عایق دارای آب ۳۵-۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری و پس از اتمام نمونه‌گیری به سرعت، به آزمایشگاه منتقل و در حمام آب گرم قرار داده شدند. بی‌درنگ پس از جمع‌آوری منی و انتقال، بررسی‌های لازم اولیه روی منی صورت گرفت. غلظت بیشتر از $10^6 \times 2/5$ اسپرم در میلی‌لیتر، حجم بین ۲-۰/۷۵ میلی‌لیتر، جنبندگی بیشتر از ۷۰ درصد و ریخت‌شناسی کمتر از ۱۰ درصد اسپرم غیرطبیعی در هر انزال به‌عنوان نمونه طبیعی در نظر گرفته شدند. سپس جهت از میان برداشتن اثر فردی، نمونه‌های منی با یکدیگر آمیخته شدند و با توجه به احتمال وجود اثرات متقابل بین نمونه‌ها، نمونه‌های منی مخلوط شده نیز از نظر رنگ و جنبندگی ارزیابی مجدد می‌گردد، تا از سلامت نمونه برای انجماد اطمینان حاصل گردد (۷). برای آماده سازی رقیق کننده، اجزای تشکیل‌دهنده رقیق کننده بر پایه تریس از شرکت سیگما (SIGMA ALDRICH St. Louis, MO, USA) خریداری شده بودند. اسمولاریته و pH محیط پایه به ترتیب ۳۴۰ میلی‌اسمولار و ۶/۹ تا ۷/۱ تنظیم شد. در نهایت دو درصد لستین سوئا (وزنی / حجمی) و پنج درصد گلیسرول (حجمی / حجمی) به رقیق کننده بر پایه تریس

اضافه کردیم. سپس اسپرم‌های بدست آمده به براساس غلظت مورد نیاز به تیمارهای مختلف تقسیم شده و به رقیق کننده‌های حاوی غلظت‌های مختلف BHA (یک، دو و چهار میلی‌مولار)، گروه شاهد منفی (بدون آنتی‌اکسیدان) و گروه شاهد مثبت (دارای مقدار مشخص دی‌متیل سولفوکساید^۳) افزوده شدند. قبل از انجام این مراحل سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان به صورت الایکوت‌هایی^۴ در دی‌متیل سولفوکساید تهیه شده بودند. پس از رقیق‌سازی، برای تعویض گلیسرول با آب موجود در اسپرم، نمونه‌های رقیق شده برای پنج دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شده و سپس نمونه‌ها برای مدت ۲/۵ ساعت در یخچال قرار داده شدند تا دمای آن به حدود ۴ تا ۵ درجه سانتی‌گراد برسد. اسپرم‌ها پس از رقیق و سرد شدن تا دمای ۴ تا ۵ درجه سانتی‌گراد، به پایوت‌های (استرا) ۰/۲۵ میلی‌لیتری کشیده شده و انتهای آن‌ها به‌وسیله پودر پلی‌وینیل الکل^۵ بسته شد. سپس با استفاده از جعبه‌ی استایروفر^۶ پایوت‌ها در فاصله چهار سانتی‌متری از بخار نیتروژن قرار داده شده و پس از ۱۲ دقیقه در داخل نیتروژن مایع شناور شدند. در مرحله پایانی، پایوت‌ها به گویلت‌های نشان‌دار منتقل شده و تا زمان ارزیابی فراسنجه‌های کیفی در نیتروژن مایع نگهداری شدند. پس از ذخیره‌سازی به مدت دو هفته، پایوت‌ها به صورت جداگانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه در حمام آب گرم جهت ارزیابی میکروسکوپی ذوب شدند. جنبایی اسپرم‌ها با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست (بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر) تعیین شد. به این منظور پایوت‌های هر گروه تیماری یخ‌گشایی شدند و سپس با استفاده از سمپلر، ۱۰ میکرولیتر از منی روی لام گذاشته شد، جنبایی اسپرم با استفاده از سامانه کامپیوتری ارزیابی اسپرم^۷ (CASA; IVOS version 12; Hamilton-Thorne Biosciences) ارزیابی شد. فراسنجه‌های ارزیابی شده مربوط به تحرک در این برنامه شامل جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده، درصد خطی بودن جنبایی^۸ (LIN)، راستی مسیر طی شده^۹ (STR)، سرعت در مسیر منحنی^{۱۰} (VCL)، جنبایی عرضی سر^{۱۱} (ALH)، میانگین سرعت در مسیر^{۱۲} (VAP)، سرعت در مسیر مستقیم^{۱۳} (VSL) و تناوب عرضی زنش^{۱۴} (BCF) بودند. برآورد تحرک اسپرم بر اساس شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم با مشخصات سیستماتیک مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین برای بررسی یکپارچگی غشای اسپرم از آزمون هاس^{۱۵} (HOST) مطابق با روش ریوال و همکاران استفاده شد (۲۳). با توجه به اینکه اسمولاریتی محیط هاس ۱۰۰ میلی‌اسمولار و اسمولاریته مورد نیاز برای اسپرم ۵۲۵-۴۲۵ میلی‌اسمولار است. بنابراین اسپرم‌های سالم با قرار گرفتن در یک محیط با اسمولاریتی پایین به سرعت واکنش می‌دهد و انتهای دم آنها گره می‌خورد. برای این کار ۲۰ میکرولیتر از منی با ۲۰۰ میکرولیتر از محیط هاسپواسموتیک در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. پس از گذشت این زمان نمونه‌های انکوبه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری فاز کنتراست (بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر) ارزیابی و در هر گروه تیماری حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شده و درصد اسپرم‌های

1-n-propyl gallate

2- Artificial Vagina

3- Dimethyl sulfoxide

4- Aliquots

5- Poly Vinyl Alcohol

6- Styrofoam Box

7-Computer Assisted System Analyzer (CASA)^۱

8-Linearity

9- Sperm track straightness

10- Curvilinear velocity

11- Lateral head displacement

12-Average path velocity

13- Straight line velocity

14- Beat cross frequency

محاسبه شده است. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار توسط رویه‌ی GLM نرم‌افزار SAS 9.1 تجزیه و تحلیل شد و میانگین‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند:

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

در این رابطه: Y_{ij} عملکرد صفت وابسته نمونه زام در تیمار i ام، μ میانگین جامعه، T_i اثر تیمار و e_{ij} اثر عوامل باقی‌مانده است.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده و فراسنجه‌های حرکتی اسپرم‌های تیمار شده با BHA در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهند که افزودن سطوح مختلف BHA به رقیق‌کننده اسپرم بز مهابادی سبب بهبود معنی‌دار جنبایی کل نسبت به گروه شاهد شده است ($P < 0.05$). افزودن دوزهای یک و چهار میلی‌مولار BHA سبب بهبود معنی‌داری در جنبایی پیش‌رونده نسبت به سایر گروه‌های تیماری شده است ($P < 0.05$). همچنین افزودن چهار میلی‌مولار BHA سبب بهبود سرعت در مسیر مستقیم (VSL)، سرعت در مسیر منحنی (VCL)، جنبایی عرضی سر (ALH) و راستی مسیر طی شده (STR) شده است ($P < 0.05$).

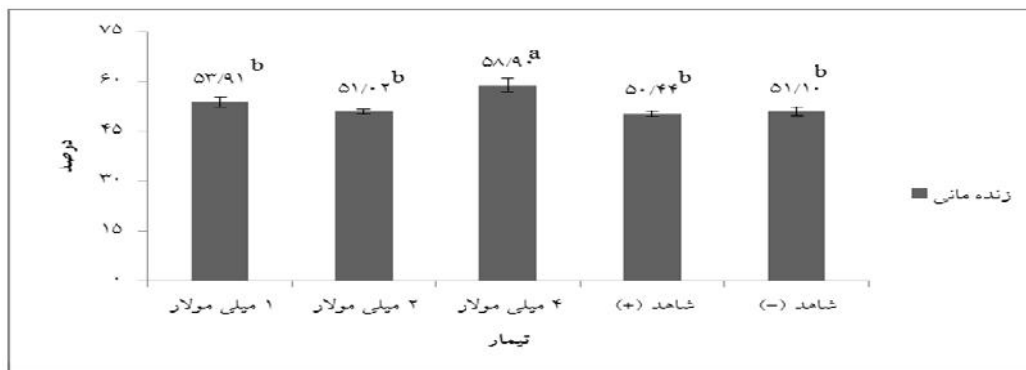
با دم سالم نسبت به اسپرم‌های مرده محاسبه شد. برای ارزیابی زنده‌مانی از رنگ‌آمیزی ائوزین - نگرزین استفاده شد. برای این کار حدود ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌ی اسپرم را برداشته و بر روی لام قرار می‌دهیم سپس حدود ۱۰ میکرولیتر نیز از رنگ آماده شده ائوزین- نگرزین روی نمونه ریخته و با سر سمپلر به آرامی نمونه را هم می‌زنیم تا اسپرم با رنگ مخلوط شود. پس از تهیه گسترش و خشک شدن نمونه، لام را زیر میکروسکوپ نوری و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ مشاهده شده و برای شمارش اسپرم‌ها از بخش‌های مختلف آن عکس گرفته شد. از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های مرده (رنگ گرفته) و زنده (بی رنگ) محاسبه شد. اسپرم‌هایی که رنگ صورتی کم رنگ به خود گرفته بودند و یا تنها بخشی از گردن آن‌ها رنگ گرفته بود به‌عنوان اسپرم زنده در نظر گرفته شد. برای ارزیابی اسپرم‌های غیرطبیعی نیز، حدود ۳۰ میکرولیتر از هر نمونه به میکروتیوب‌های حاوی ۳۰۰ میکرولیتر محلول هانکوک افزوده شد (۲۵). سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفته و توسط یک لامل پوشانده شده و با شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرماتوزوئید زیر میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگ‌نمایی ۴۰۰، درصد اسپرم با آکروزوم غیرطبیعی (اختلالات آکروزوم و سر، سر جدا شده، قطعه میانی غیر طبیعی و ناهنجاری دم)

جدول ۱- تاثیر سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان BHA بر فراسنجه‌های جنبایی اسپرم متجمد یخ‌گشایی شده بزهای مهابادی
Table 1. Influence of different concentrations of Butylated hydroxy anisole on sperm motility of Mahabadi goats following the freeze-thaw process

SEM	شاهد (-)	شاهد (+)	۴ میلی‌مولار	۲ میلی‌مولار	۱ میلی‌مولار	تیمار/ فراسنجه
۲/۱۱	۴۲/۲۰ ^{bc}	۳۸/۲۰ ^{bc}	۵۰/۶۰ ^a	۴۱/۶۰ ^{bc}	۴۵ ^{ab}	جنبایی کل (%)
۱/۵۲	۳۳/۴۰ ^d	۳۱ ^d	۳۸/۶۰ ^a	۳۲/۸۰ ^d	۳۴/۴۰ ^{ab}	جنبایی پیش‌رونده (%)
۱/۷۶	۴۸/۷۳ ^a	۴۳/۲۱ ^d	۵۲/۰۹ ^a	۳۹/۱۰ ^d	۴۱/۴۰ ^d	VSL (μm/s)
۴/۸۲	۱۲۰/۳۰ ^{ab}	۱۰۹/۱۵ ^{bc}	۱۲۸/۷۷ ^a	۱۰۴/۵۶ ^c	۱۰۸ ^{bc}	VCL (μm/s)
۲/۸۸	۷۰/۸۷ ^a	۶۶/۵۴ ^a	۷۲/۱۸ ^a	۵۲/۸۶ ^d	۵۶/۱۴ ^d	VAP(μm/s)
۰/۰۱	۴۱/۶۰ ^a	۴۰/۲۰ ^{ab}	۴۲/۲۰ ^a	۳۸ ^d	۳۸/۲۰ ^d	LIN (%)
۰/۲۰	۴/۶۶ ^{ab}	۴/۲۹ ^d	۵/۰۳ ^a	۴/۱۳ ^d	۴/۲۷ ^d	ALH(μm)
۰/۰۱	۵۰/۴۰ ^a	۴۹/۴۰ ^a	۴۷/۶۰ ^{ab}	۴۴/۸۰ ^d	۴۵/۲۰ ^d	WOB (%)
۰/۰۱	۵۸/۶۰ ^{ab}	۵۶/۴۰ ^d	۶۳/۲۰ ^a	۵۷/۸۰ ^d	۵۸/۴۰ ^{ab}	STR (%)
۰/۵۹	۱۶/۲۹ ^c	۱۶/۶۲ ^c	۱۹/۹۴ ^c	۱۷/۹۸ ^{bc}	۱۸/۶۰ ^{ab}	BCF (Hz)
۱/۰۴	۵۴/۵۵ ^a	۵۲/۸۳ ^a	۵۰/۹۶ ^d	۵۳/۵۷ ^{ab}	۵۴/۰۸ ^{ab}	MAD (°)

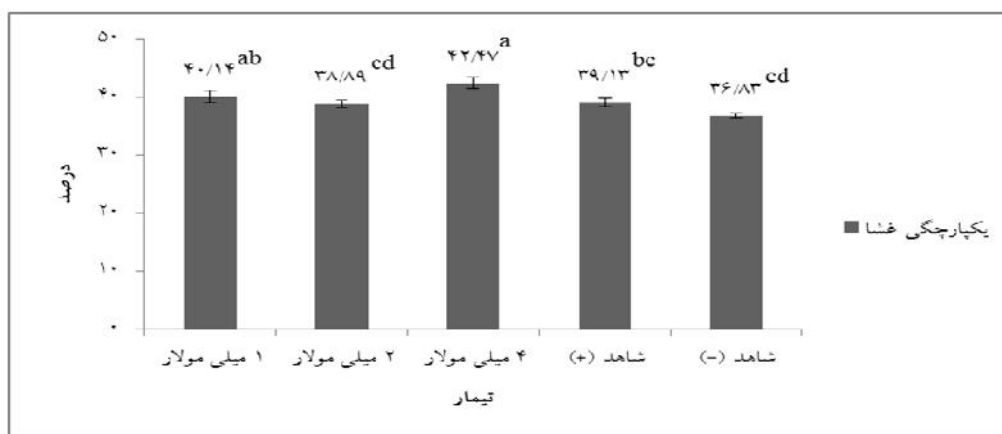
افزودن یک و چهار میلی‌مولار BHA به رقیق‌کننده اسپرم سبب بهبود یک‌پارچگی غشا نسبت به سایر گروه‌های تیماری شده است (شکل ۲، $P < 0.05$)، در حالیکه گروه تیماری یک میلی‌مولار BHA تفاوت معنی‌داری را با گروه شاهد ایجاد نکرد ($P > 0.05$). افزودن سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان BHA به رقیق‌کننده اسپرم بزهای مهابادی تفاوت آماری معنی‌داری را در ریخت‌شناسی و کاهش میزان اسپرم‌های نابهنجار نسبت به گروه شاهد نشان نداد (شکل ۳، $P > 0.05$).

نتایج مربوط به زنده‌مانی اسپرم‌های تیمار شده با BHA در شکل ۱ آورده شده است. این نتایج نشان می‌دهند که افزودن چهار میلی‌مولار BHA به رقیق‌کننده سبب بهبود معنی‌دار زنده‌مانی اسپرم بزهای مهابادی نسبت به گروه شاهد و سایر گروه‌های تیماری شده است ($P < 0.05$). اما گروه تیماری یک و دو میلی‌مولار آنتی‌اکسیدان BHA، تفاوت آماری معنی‌داری را با گروه شاهد نشان نداد ($P < 0.05$). همچنین یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که



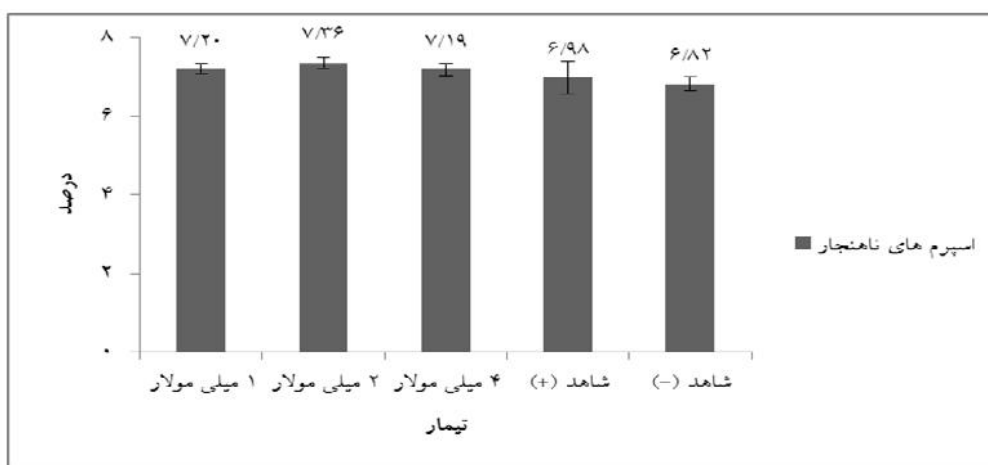
شکل ۱- تاثیر سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان بوتیل‌تند هیدروکسی آنیزول بر زنده‌مانی اسپرم منجمد- یخ‌گشایی شده بزهای مهابادی (میانگین ± خطای استاندارد).

Figure 1. Influence of different concentrations of Butylated hydroxy anisole on sperm viability of Mahabadi goats following the freeze-thaw process (Mean ± SEM)



شکل ۲- تاثیر سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان بوتیل‌تند هیدروکسی آنیزول بر یکپارچگی غشاء اسپرم پس از فرآیند انجماد یخ‌گشایی بزهای مهابادی (میانگین ± خطای استاندارد).

Figure 2. Influence of different concentrations of Butylated hydroxy anisole on sperm membrane integrity of Mahabadi goats following the freeze-thaw process (Mean ± SEM)



شکل ۳- تاثیر سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان بوتیل‌تند هیدروکسی آنیزول بر ناهنجاری اسپرم پس از فرآیند انجماد یخ‌گشایی بزهای مهابادی (میانگین ± خطای استاندارد).

Figure 3. Influence of different concentrations of Butylated hydroxy anisole on sperm abnormality of Mahabadi goats following the freeze-thaw process (Mean ± SEM)

هستند که جهت متوقف کردن اکسیداسیون که باعث یک واکنش زنجیره‌ای در اسیدهای چرب غیر اشباع در روغن‌ها و چربی می‌شود استفاده می‌گردد و در به تأخیر انداختن اکسیداسیون چربی‌ها و روغن‌ها موثر هستند. ویتامین C و E جز انواع آنتی‌اکسیدان‌های غیرآزمی هستند که بسته به دوز مشخصی اثرات حفاظتی خود را نشان می‌دهند. مصرف ویتامین C و E به ترتیب منجر به کاهش غلظت مارکرهای پرکسیداسیون لیپید و تجزیه شدن DNA می‌شود. بوتیلید هیدروکسی آنیزول از ترکیب‌های آنالوگی ویتامین E محسوب می‌شود و اثر خود را با کاهش رادیکال‌های اکسیژن و ایجاد وقفه در انتشار فرآیندهای اکسیداسیون اعمال می‌کند. با این وجود مطالعات معدودی در مورد تاثیر آنتی‌اکسیدانی BHA بر روی فراسنجه‌های کیفی اسپرم پستانداران انجام شده است و از BHA به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان و ماده نگهدارنده در مواد غذایی، محصولات آرایشی، لاستیک و محصولات نفتی استفاده می‌شود. با توجه به ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، اضافه نمودن یک میلی‌مولار بوتیلید هیدروکسی تولوئن در رقیق کننده بر پایه تریس باعث بهبود معنی‌دار کیفیت اسپرم بعد از فرآیند انجماد- ذوب در اسپرم بز شده است که با نتایج ما هم‌خوانی دارد (۱۸). نتایج مطالعه‌ای روی عملکرد دستگاه تولیدمثل موش نر بالغ در سال ۲۰۰۵ نشان داد که BHA اثر معنی‌داری روی جنبایی، تعداد و مورفولوژی اسپرم نداشت ولی میزان ۵۰۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن منجر به کاهش سرعت واقعی اسپرم در نتاج نر گردید که به نوعی با نتایج ما در فراسنجه‌های کیفی اسپرم بز دارای تناقض می‌باشد (۱۲). در پژوهشی که روی اسپرم سرد شده گونه‌ای از گاومیش رودخانه‌ای انجام شد، پژوهشگران گزارش کردند که افزودن آنتی‌اکسیدان‌های BHT و BHA به رقیق کننده سبب بهبود در جنبایی کل و یکپارچگی غشای آکروزومی شد. در این پژوهش نشان داده شد که اثر BHT بر جنبایی اسپرم گاومیش‌های رودخانه‌ای بسیار بیشتر از سایر آنتی‌اکسیدان‌ها به ویژه BHA بود. همچنین گزارش شد که آنتی‌اکسیدان BHA اثری بر کاهش شمار اسپرم‌های غیرطبیعی و یکپارچگی دیواره سلولی نداشت که با بررسی اسپرم‌های ناهنجار پژوهش حاضر مطابقت دارد (۱۹).

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که افزودن چهار میلی‌مولار آنتی‌اکسیدان بوتیلید هیدروکسی آنیزول در رقیق کننده بر پایه لیسیتین سبب بهبود معنی‌دار کیفیت اسپرم بز مهابادی پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی شده است.

حفظ و نگهداری از فسفولیپیدهای غشای اسپرم و حساسیت آن‌ها به پراکسیداسیون بستگی زیادی به میزان آنتی‌اکسیدان موجود در محیط دارد، که خطر آسیب به اسپرم‌ها را کاهش می‌دهد و شانس زنده‌مانی را در طول ذخیره‌سازی افزایش می‌دهد (۲۶). بنابراین، کمبود این بخش می‌تواند می‌تواند اثر منفی بر جنبایی و توانایی لقاح اسپرم داشته باشد. پراکسیداسیون فرآیندی است که باعث تغییرات ساختاری، به ویژه در آکروزوم سلول اسپرم، از دست دادن غیر قابل برگشت سریع جنبایی و تغییرات شدیدی در سوخت‌وساز سلول اسپرم می‌شود (۱۳). در حال حاضر سازوکار دقیقی که نشان دهد آنتی‌اکسیدان‌های غیرآزمی از طریق آن اسپرم را در برابر شوک سرمایی و گرمایی محافظت می‌کند مشخص نیست (۲۹،۲۲). نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که افزودن یک و چهار میلی‌مولار BHA به رقیق کننده اسپرم بزهای مهابادی، ممکن است سبب بهبود جنبایی کل، جنبایی پیش رونده و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم نسبت به گروه شاهد مثبت و منفی پس از فرآیند انجماد- ذوب گردد. همچنین افزودن چهار میلی‌مولار BHA به رقیق کننده سبب بهبود معنی‌داری در زنده‌مانی اسپرم بز نسبت به سایر گروه‌های تیماری شده است. تنش اکسیداتیو سبب آغاز سلسله فرآیندهای آشناری می‌شود که در نهایت سبب مرگ سلول می‌گردد. در این بین جنبایی و زنده‌مانی اسپرم مهم‌ترین فراسنجه‌هایی هستند که به‌راحتی تحت تاثیر قرار می‌گیرند و بنابراین اصلی‌ترین دلیل کاهش باروری پس از فرآیند یخ‌زدن و یخ‌گشایی کاهش زنده‌مانی و به دنبال آن کاهشی آشکار در جنبایی می‌باشند (۱۵). کملی و همکاران (۱۰) گزارش کردند که استفاده از BHA روی لنفوسیت‌هایی که با ترکیبات استروژنی تیمار شده‌اند، باعث کاهش آسیب به DNA این سلول‌ها شد. در پژوهشی دیگر اثر آنتی‌اکسیدان‌های مختلف را بر جنبایی اسپرم قوچ مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که تیمار اسپرم قوچ با دوزهای بالای ۱۰۰ میکرومولار BHA هیچ بهبودی در فراسنجه‌های جنبایی ایجاد نمی‌کند اما علاوه بر بهبود درصد جنبایی پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون کردن در دوزهای پایین BHA (۰/۱-۱۰ میکرو مولار) سایر شاخص‌های حرکتی نظیر میانگین شتاب در مسیر مستقیم (VAP)، شتاب اسپرم در خط مستقیم (VSL)، بیشینه‌ی دامنه‌ی حرکت‌های جانبی اسپرم بر حسب میکرومتر (ALH) نیز به‌طور مثبتی تحت تاثیر قرار گرفته است (۲۸). آنتی‌اکسیدان‌ها (مانند BHA و BHT)، نگهدارنده‌هایی

منابع

1. Agarwal, A. and L.H. Sekhon. 2010. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. *Human Fertility*, 13: 217-225.
2. Agarwal, A., R.K. Sharma, R. Sharma, M. Assidi, A.M. Abuzenadah, S. Alshahrani, D. Durairajanayagam and E. Sabanegh. 2014. Characterizing semen parameters and their association with reactive oxygen species in infertile men. *Reproductive Biology and Endocrinology*. pp: 12-33.
3. Aitken, R.I. and S.D. Roman. 2008. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1: 15-24.
4. Ball, B.A. 2008. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*, 107: 257-267.
5. Beconi, M., C. Francia, N. Mora and M. Affranchino. 1993. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology*, 40: 841-851.

6. Bouayed, J. and T. Bohn. 2010. Exogenous antioxidants-double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3: 228-237.
7. Bucak, M.N., A. Ateşşahin, Ö. Varışlı, A. Yüce, N. Tekin and A. Akçay. 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology*, 67: 1060-1067.
8. Buhr, M.M. and M.J. Pettitt. 1995. Frozen- thawed Boar sperm: Isolation of membranes and fluidity measurement. *Reproduction in Domestic Animals*, 31: 147-152.
9. Celeghini, E.C.C., R.P. De Arruda, A.F.C. De Andrade, J. Nascimento, C.F. Raphael and P. Rodrigues. 2008. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Animal Reproduction Science*, 104: 119-131.
10. Cemeli, E. and D. Anderson. 2011. Mechanistic investigation of ROS-induced DNA damage by oestrogenic compounds in lymphocytes and sperm using the comet assay. *International Journal of Molecular Sciences*, 12: 2783-2796.
11. Holt, W. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62: 3-22.
12. Jeong, S.H., B.Y. Kim, H.G. Kang, H.O. Ku and J.H. Cho. 2005. Effects of butylated hydroxyanisole on the development and functions of reproductive system in rats. *Toxicology*, 208: 49-62.
13. Jones, R. and T. Mann. 1977. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. *Journal of Reproduction and Fertility*, 50: 261-268.
14. Kefer, J.C., A. Agarwal and E. Sabanegh. 2009. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *International Journal of Urology*, 16: 449-457.
15. Li, Z., Q. Lin, R. Liu, W. Xiao and W. Liu. 2010. Protective effects of ascorbate and catalase on human spermatozoa during cryopreservation. *Journal of Andrology*, 31: 437-444.
16. Maxwell, W. and P. Watson. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 42: 55-65.
17. Medeiros, C., F. Forell, A. Oliveira and J. Rodrigues. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, 57: 327-344.
18. Najjian, H.R., H. Kohram, A.Z. Shahneh, M. Sharafi and M.N. Bucak. 2013. Effects of different concentrations of BHT on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi goat semen following the freeze-thaw process. *Cryobiology*, 66: 151-155.
19. Pankaj, P., V. Raina, B. Roy, T. Mohanty and A. Mishra. 2009. Effect of antioxidant preservative on cold protection ability of low grade riverine buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 22: 626-635.
20. Papa, F.O., G.B. Felício, C.M. Melo-Oña, M. A. Alvarenga, B. De Vita, C. Trínque and J.N. Puoli-Filho. 2011. Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen. *Animal Reproduction Science*, 129: 73-77.
21. Purdy, P.H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 63(3): 215-225.
22. Pursel, V. 1979. Effect of cold shock on boar sperm treated with butylated hydroxytoluene. *Biology of Reproduction*, 21: 319-324.
23. Revell, S. and R. Mrode. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*, 36: 77-86.
24. Saleh, R.A. and A. Agarwal. 2002. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *Journal of Andrology*, 23: 737.
25. Schäfer, S. and A. Holzmann. 2000. The use of transmigration and Spermac™ stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 59: 201-211.
26. Strzezek, J. 2002. Secretory activity of boar seminal vesicle glands. *Reproductive Biology*, 2: 243-266.
27. Thun, R., M. Hurtado and F. Janett. 2002. Comparison of Biociphos-Plus and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*, 57: 1087-1094.
28. Upreti, G., K. Jensen, J. Oliver, D. Duganzich, R. Munday and J. Smith. 1997. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Animal Reproduction Science*, 48: 269-278.
29. Watson, P. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60: 481-492.

Influence of Different Concentrations of Butylated Hydroxy Anisole on Quantity and Quality Parameters of Mahabadi goat Semen Following the Freeze-Thaw Process

Mehdi Rahmatzadeh¹, Hamid Kohram² and Ahmad Zare Shahneh³

1 and 2- M.Sc. Student and Assistant Professor, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran

3- Professor University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran
(Corresponding author: azareh@ut.ac.ir)

Received: December 6, 2015

Accepted: February 7, 2016

Abstract

Present study was conducted to evaluate the supplementation of different levels of antioxidant Butylated Hydroxyanisole (BHA) on the improvement cryopreservation of Mahabadi goat sperm. Four healthy Mahabadi goats (3-4 years) were used to collect semen samples by artificial vagina, once a week for five weeks during non-breeding season. Good quality samples were pooled and divided into five equal aliquots supplemented with extender containing different concentrations of BHA (0, 1, 2 and 4 mM). Sperm parameters, including motility and progressive motility, viability, membrane integrity and total abnormality were assessed. According to the results, BHA at the concentration of 4 mM significantly improved sperm post-thaw viability, membrane integrity, total and progressive motility ($P < 0.05$), but there were no significant differences among other levels (1 and 2 mM) and control groups ($P > 0.05$). Furthermore, abnormality percentage was not significant among different levels of BHA and control groups ($P > 0.05$). Current study indicated that inclusion of BHA in extender may be an approach to improve post thaw goat sperm quality.

Keywords: Antioxidant Butylated hydroxy anisole, Mahabadi Goat, Motility, Quality, Sperm