دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

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

مهدی رحمت‌زاده[1]، حمید کهرام[2] و احمد زارع شحنه[3]

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 مسوول: azareh@ut.ac.ir)
تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۱۸

چکیده

مطالعه حاضر به‌منظور بررسی تاثیر سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول بر بهبود انجمادپذیری اسپرم بز مهابادی انجام شد. چهار راس بز مهابادی (۳-٤ سال) به‌منظور 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 بوتیلیتد 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<۰/۰۵). اما تفاوت معنی‌داری بین سطوح دیگر (یک و دو میلی‌مولار) و گروه‌های شاهد وجود نداشت (P>۰/۰۵). علاوه بر این درصد نابهنجاری بین سطوح مختلف BHA و گروه‌های شاهد دارای تفاوت آماری معنی‌داری نبود (P>۰/۰۵). مطالعه حاضر نشان داد که وجود BHA در رقیق‌کننده، ممکن است روشی برای بهبود کیفیت اسپرم بز پس از یخ‌گشایی باشد.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، آنتی‌اکسیدان بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول، بز مهابادی، جنبایی، کیفیت

مقدمه

ذخیره‌سازی بهینه اسپرم به‌صورت 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[1] داشته است (۲۱). انجماد اسپرم، شامل در معرض قرار دادن ابتدایی اسپرم‌ها با مواد محافظ انجماد[2]، کاهش دما به زیر صفر درجه سانتی‌گراد، آبزدایی سلولی[3] و ذخیره آن به مدت های 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 لسیتین 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[4] و واکنش آکروزومی کمک می‌کند و از نظر پاتولوژیکی باعث پراکسیداسیون لیپید و آسیب به DNA سلول اسپرم می‌شوند (۲۴،۳). میزان ROS[5] 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[6] دارد و زمانی بوجود می‌آید که تعادلی بین تولید ROS و آنتی‌اکسیدان‌های موجود در محیط وجود نداشته باشد (۶،۱). وجود آنتی‌اکسیدان‌های مختلف در محیط باعث می‌شود ROS در پلاسمای منی سطح ثابتی داشته باشند. آنتی‌اکسیدان‌ها با حذف رادیکال‌های آزاد، سبب می‌شوند اسپرم‌ها در برابر تنش‌های اکسیداتیو مقاوم‌تر شوند (۲۱،۱۴،۴). آنتی‌اکسیدان بوتیلید هیدروکسی آنیزول[7] کریستال‌های جامد سفید با بوی ضعیف، ترکیب آنالوگی ویتامین E می‌باشد که مخلوطی از دو ترکیب ایزومریک عالی۲- ترت- بوتیل- ۴- هیدروکسی آنیزول[8] و ۳- ترت - بوتیل- ۴- هیدروکسی آنیزول[9] است. از BHA به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان 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 تثبیت‌کننده مهار اتوپلیمریزاسیون پراکسیدهای آلی استفاده

1-Fresh semen 2- Cryoprotectant 3- Cellular Dehydration
4-Capacitation 5-Reactive oxygen spaces 6-Fuse
7-Butylated Hydroxy Anisole 8- 2-tert-butyl 9- 4-hydroxyanisole

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-11-18]
[DOI: 10.29252/rap.8.16.79]

می‌شود. BHA واکنش اتواکسیداسیون را با تبدیل رادیکال‌های پراکسی به هیدروپرکسیدها کنترل می‌کند. آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی (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[1] و کاتالاز را بر میزان جنبایی اسپرم قوچ مورد بررسی قرار دادند دادند (۲۸). در همین راستا پانکاج و همکاران (۱۹) اثر افزودن آنتی‌اکسیدان‌های BHT و BHA به رقیق‌کننده 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 رقیق‌کننده 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[2] 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 ۳۷- ۳۵ 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 $۲/۵ \times ۱۰^{۹}$ 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 رقیق‌کننده، اجزای تشکیل‌دهنده رقیق‌کننده 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 لسیتین سویا (وزنی / حجمی) و پنج درصد گلیسرول (حجمی/حجمی) به رقیق‌کننده بر پایه تریس اضافه کردیم. سپس اسپرم‌های بدست آمده به براساس غلظت مورد نیاز به تیمارهای مختلف تقسیم شده و به رقیق‌کننده‌های حاوی غلظت‌های مختلف BHA (یک، دو و چهار میلی‌مولار)، گروه شاهد منفی (بدون آنتی‌اکسیدان) و گروه شاهد مثبت (دارای مقدار مشخص دی‌متیل سولفوکساید[3]) افزوده شدند. قبل از انجام این مراحل سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان به صورت الایکوت‌هایی[4] 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[5] بسته شد. سپس با استفاده از جعبه‌ی استایروفوم[6] 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 گوبلت‌های 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[7] (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[8](LIN)، راستی مسیر طی شده[9] (STR)، سرعت در مسیر منحنی[10] (VCL)، جنبایی عرضی سر[11] (ALH)، میانگین سرعت در مسیر[12] (VAP)، سرعت در مسیر مستقیم[13] (VSL) و تناوب عرضی زنش[14] (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[15] (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 کار۲۰ میکرولیتر از منی با ۲۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک 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) 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

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-11-18]
[DOI: 10.29252/rap.8.16.79]

با دم سالم نسبت به اسپرم‌های مرده محاسبه شد. برای ارزیابی زنده‌مانی از رنگ‌آمیزی ائوزین – نگروزین 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- نیگروزین 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 فازکنتراست با بزرگ‌نمایی ۴۰۰، درصد اسپرم با آکروزوم غیرطبیعی (اختلالات آکروزوم و سر، سر جدا شده، قطعه میانی غیر طبیعی و ناهنجاری دم) محاسبه شده است. این آزمایش در قالب طرح کاملا 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 jام در تیمار iام، 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<۰/۰۵). افزودن دوزهای یک و چهار میلی‌مولار BHA سبب بهبود معنی‌داری در جنبایی پیش‌رونده نسبت به سایر گروه‌های تیماری شده است (P<۰/۰۵). 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<۰/۰۵).

جدول ۱- تاثیر سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان BHA بر فراسنجه‌های جنبایی اسپرم منجمد یخ‌گشایی شده بزهای مهابادی

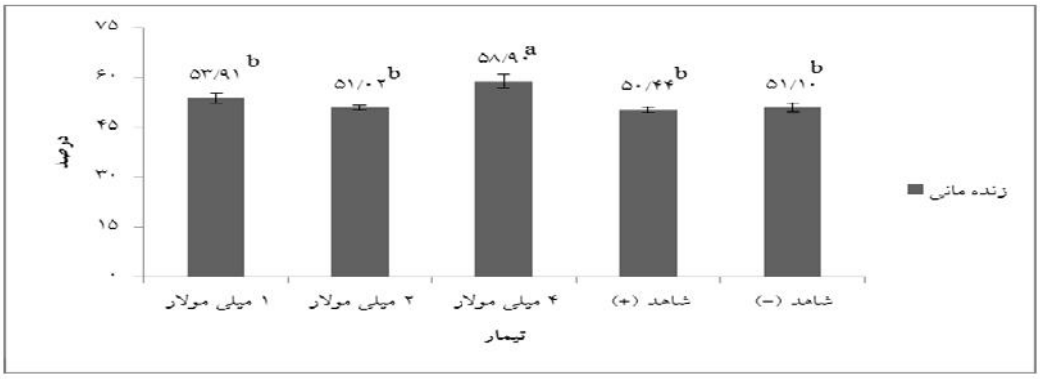
Table 1. Influence of different concentrations of Butylated hydroxy anisole on sperm motility of Mahabadi goats following the freeze–thaw process

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

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<۰/۰۵). اما گروه تیماری یک و دو میلی‌مولار آنتی‌اکسیدان BHA، تفاوت آماری معنی‌داری را با گروه شاهد نشان نداد (P<۰/۰۵). همچنین یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که افزودن یک و چهار میلی‌مولار BHA به رقیق‌کننده اسپرم سبب بهبود یک‌پارچگی غشا نسبت به سایر گروه‌های تیماری شده است (شکل ۲، P<۰/۰۵)، در حالیکه گروه تیماری یک میلی‌مولار BHA تفاوت معنی‌داری را با گروه شاهد ایجاد نکرد (P>۰/۰۵). 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>۰/۰۵).

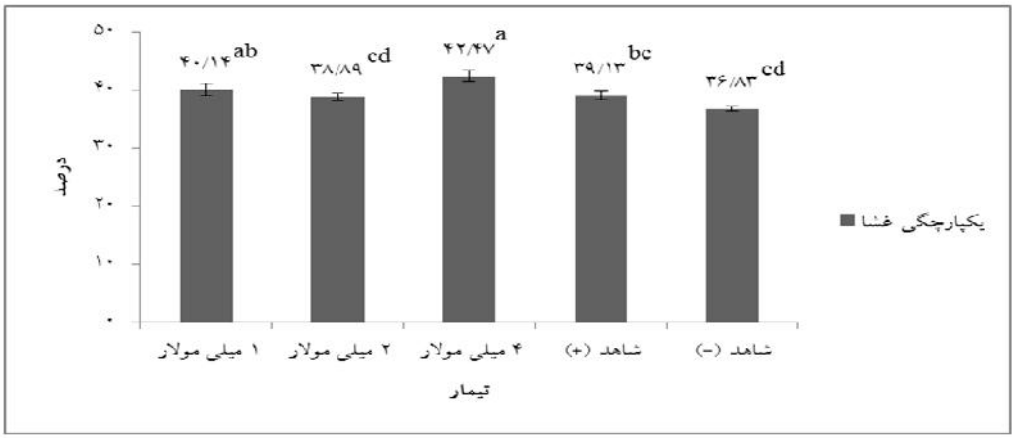
[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-11-18]

[DOI: 10.29252/rap.8.16.79]



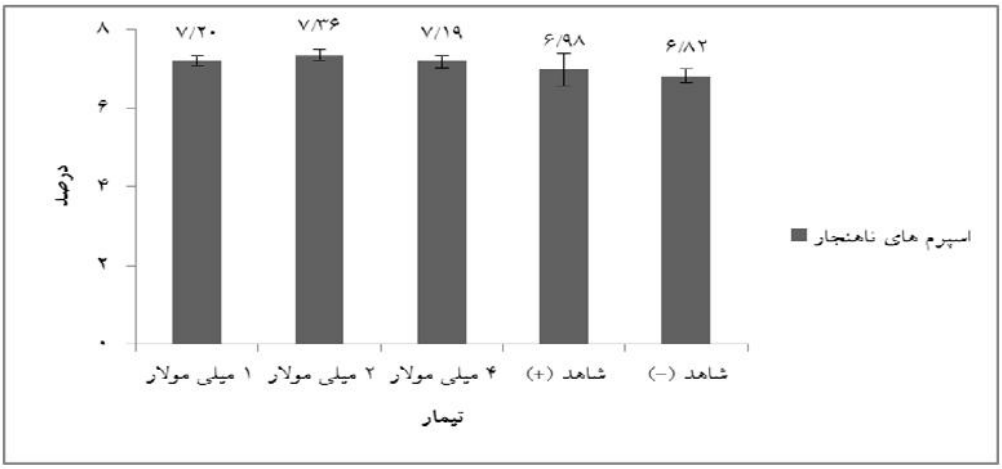
شکل ۱- تاثیر سطوح مختلف انتی‌اکسیدان بوتیلیتد هیدروکسی انیزول بر زنده‌مانی اسپرم منجمد- یخ‌گشایی شده بزهای مهابادی (میانگین± خطای استاندارد).

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 بوتیلیتد 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 بوتیلیتد 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)

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-11-18]

[DOI: 10.29252/rap.8.16.79]

حفـظ و نگهـداری از فسـفولیپیدهای غشـای اسـپرم و حساسیت آن‌ها به پراکسیداسـیون بسـتگی زیـادی بـه میـزان آنتـی‌اکسـیدان موجـود در محـیط دارد، کـه خطـر آسـیب بـه اسپرم‌ها را کاهش مـی‌دهـد و شـانس زنـده‌مـانی را در طـول ذخیره‌سازی افزایش می‌دهد (۲۶). بنابراین، کمبود این بخـش می‌تواند می‌تواند اثر منفی بـر جنبـایی و توانـایی لقـاح اسـپرم داشته باشد. پراکسیداسیون فرآیندی است که باعـث تغییـرات ساختاری، به ویژه در آکروزوم سلول اسپرم، از دست دادن غیر قابل برگشت سریع جنبایی و تغییرات شدیدی در سوخت‌وسـاز سلول اسپرم می‌شود (۱۳). در حال حاضر سازوکار دقیقـی کـه نشان دهد آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی از طریق آن اسـپرم را در برابر شوک سرمایی و گرمایی محافظت می‌کنـد مشـخص نیست (۲۹،۲۲)، نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که افزودن یک و چهار میلی‌مولار BHA به رقیـق‌کننـده اسـپرم بزهـای مهابادی، ممکن است سبب بهبود جنبایی کل، جنبـایی پـیش رونده و یک‌پارچگی غشای پلاسمایی اسپرم نسـبت بـه گـروه شـاهد مثبـت و منفـی پـس از فرآینـد انجمـاد- ذوب گـردد. همچنین افزودن چهار میلی‌مولار BHA به رقیق‌کننده سـبب بهبود معنی‌داری در زنده‌مانی اسپرم بز نسبت بـه سـایر گـروه های تیماری شده است. تنش اکسـیداتیو سـبب آغـاز سلسـله فرآیندهای آبشاری می‌شود که در نهایت سـبب مـرگ سـلول می‌گردد. در این بین جنبایی و زنـده‌مـانی اسـپرم مهـم‌تـرین فراسنجه‌هایی هستند که به‌راحتی تحت تاثیر قرار می‌گیرنـد و بنابراین اصلی‌ترین دلیل کاهش باروری پس از فرآیند یـخ‌زدن و یخ‌گشایی کاهش زنده‌مانی و به دنبال آن کاهشی آشـکار در جنبایی می‌باشند (۱۵). کملی و همکاران (۱۰) گـزارش کردنـد که اسـتفاده از BHA روی لنفوسـیت‌هـایی کـه بـا ترکیبـات استروژنی تیمار شده‌اند، باعث کاهش آسـیب بـه DNA ایـن سلول‌ها شد. در پژوهشی دیگر اثر آنتی‌اکسیدان‌هـای مختلـف را بر جنبایی اسپرم قوچ مورد بررسی قرار دادند و نشـان دادنـد 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 دوزهـــای پـــایین BHA (۰/۱- ۱۰ میکـــرو مـــولار) ســـایر شاخص‌های حرکتی نظیر میـانگین شـتاب در مسـیر مسـتقیم (VAP)، شـتاب اسـپرم در خـط مسـتقیم (VSL)، بیشـینه‌ی دامنه‌ی حرکت‌های جانبی اسپرم بر حسب میکرومتـر (ALH) نیـز بـه‌طـور مثبتـی تحـت تـاثیر قـرار گرفتـه اسـت (۲۸). آنتـی‌اکسـیدان‌هـا (ماننـد BHA و BHT)، نگهدارنـده‌هـایی هستند که جهت متوقف کردن اکسیداسـیون کـه باعـث یـک واکنش زنجیره‌ای در اسیدهای چرب غیر اشباع در روغن‌هـا و چربـی مـی‌شـود اسـتفاده مـی‌گـردد و در بـه تـأخیر انـداختن اکسیداسیون چربی‌ها و روغن‌ها موثر هستند. ویتـامین C و E جز انواع آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی هستند که بسته بـه دوز مشخصی اثرات حفـاظتی خـود را نشـان مـی‌دهنـد. مصـرف ویتامین C و E به ترتیب منجر به کاهش غلظـت مارکرهـای پرکسیداسیون لیپید و تجزیه شدن DNA مـی‌شـود. بوتیلیتـد هیدروکسی آنیزول از ترکیب‌های آنالوگی ویتامین E محسوب می‌شود و اثر خود را با کاهش رادیکال‌های اکسـیژن و ایجـاد وقفه در انتشار فرآیندهای اکسیداسیون اعمال می‌کند. بـا ایـن وجود مطالعات معدودی در مورد تاثیر آنتی‌اکسیدانی BHA بـر روی فراسنجه‌های کیفی اسپرم پستانداران انجام شده اسـت و از BHA به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان و ماده نگهدارنده در مـواد غـذایی، محصـولات آرایشـی، لاسـتیک و محصـولات نفتـی استفاده می‌شود. با توجه به ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، اضـافه نمودن یک میلی‌مولار بوتیلیتد هیدروکسـی تولـوئن در رقیـق کننده بر پایه تریس باعث بهبود معنی‌دار کیفیت اسپرم بعـد از فرآیند انجماد- ذوب در اسپرم بز شده است کـه بـا نتـایج مـا هم‌خوانی دارد (۱۸). نتـایج مطالعـه‌ای روی عملکـرد دسـتگاه تولیدمثل موش نر بالغ در سال ۲۰۰۵ نشان داد که BHA اثـر معنی‌داری روی جنبایی، تعداد و مورفولوژی اسپرم نداشت ولی میزان ۵۰۰ میلی‌گرم بـه ازای کیلـوگرم وزن بـدن منجـر بـه کاهش سرعت واقعی اسپرم در نتاج نر گردید که به نـوعی بـا نتایج مـا در فراسـنجه‌هـای کیفـی اسـپرم بـز دارای تنـاقض مـی‌باشـد (۱۲). در پژوهشـی کـه روی اسـپرم سـرد شـده گونه‌ای از گاومیش رودخانه‌ای انجام شد، پژوهشگران گزارش کردنـد کـه افـزودن آنتـی‌اکسـیدان‌هـای BHT و BHA بـه رقیق‌کننده سبب بهبود در جنبایی کـل و یکپـارچگی غشـای آکروزومی شد. در این پژوهش نشان داده شد که اثر BHT بر جنبایی اسپرم گاومیش‌های رودخانه‌ای بسـیار بیشـتر از سـایر آنتی‌اکسیدان‌ها به ویژه BHA بود. همچنین گزارش شـد کـه آنتـی‌اکسـیدان BHA اثـری بـر کـاهش شـمار اسـپرم‌هـای غیرطبیعی و یکپارچگی دیواره سلولی نداشـت کـه بـا بررسـی اسپرم‌های ناهنجار پژوهش حاضر مطابقت دارد (۱۹).

نتایج ایـن پـژوهش نشـان مـی‌دهـد کـه افـزودن چهـار میلـی‌مـولار آنتـی‌اکسـیدان بوتیلیتـد هیدروکسـی آنیـزول در رقیق‌کننده بر پایه لسیتین سویا سبب بهبـود معنـی‌دار کیفیـت اسپرم بز مهابادی پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی شده است.

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.J. 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.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-11-18]

[DOI: 10.29252/rap.8.16.79]

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. Naijian, 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. Trinque 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.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-11-18]

[DOI: 10.29252/rap.8.16.79]

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

Mehdi Rahmatzadeh[1], Hamid Kohram[2] and Ahmad Zare Shahneh[3]

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 significantly 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

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-11-18]

[DOI: 10.29252/rap.8.16.79]