Iranian Journal of Animal Science
Vol 48, No 2, Summer 2017 (287-295)
DOI: 10.22059/ijas.2017.235753.653538

علوم دامی ایران
دورۀ ۴۸، شمارۀ ۲، تابستان ۱۳۹۶ (ص ۲۹۵-۲۸۷)

تأثیر بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول (BHA) و بوتیلیتید هیدروکسی تولوئن (BHT) بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ پس از فرآیند انجماد و یخ گشایی

احمد اکبری کله‌سر[۱]، افشین سیفی جمادی[۲]، جعفر یدی[۳] و حمید کهرام[۴*]
۱ و ۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام و استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج
۲ و ٤. دانشجوی دکتری فیزیولوژی دام و استادیار، پردیس کشاورزی ومنابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/٤/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/٦/۱۹)

چکیده

هدف از انجام این پژوهش، بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن (BHT) و بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول (BHA) بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی است. به این منظور، از چهار رأس قوچ بالغ و سالم نژاد سافولک (٤-۲/۵ سال) به مدت سه هفته و هر هفته دو نوبت اسپرم‌گیری شد. پس از ارزیابی اولیه، نمونه‌های منی با هم مخلوط و بر پایۀ غلظت مورد نیاز به هشت قسمت تقسیم شدند. سپس نمونه‌ها با تیمارهای آماده‌شده [شامل: شاهد منفی (بدون پاداکسنده یا آنتی‌اکسیدان و حلال)، شاهد مثبت (بدون پاداکسنده با افزودن حلال) و سطوح ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مول از پاداکسنده‌های BHA و BHT، هرکدام در قالب یک تیمار)] رقیق و به مدت ۱۵۰ دقیقه در دمای ٤ درجۀ سلسیوس به تعادل رسیده و به نی (پایوت)های ویژه ۰/۲۵ میلی‌لیتری کشیده شدند. پس از آن نی‌ها منجمد و برای ذخیره‌سازی به تانک نیتروژن منتقل شدند. پس از یخ‌گشایی، فراسنجه‌های کیفی اسپرم شامل جنبایی، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی ارزیابی شدند. نتایج به‌دست‌آمده از این آزمایش نشان می‌دهد، افزودن ۲ میلی‌مول BHA به رقیق‌کنندۀ اسپرم قوچ سبب بهبود جنبایی کل نسبت به گروه‌های شاهد مثبت و منفی شده است (P<۰/۰۱). همچنین، تیمار ۲ میلی‌مول BHA سبب افزایش جنبایی پیش‌رونده و یکپارچگی غشای اسپرم نسبت به دیگر گروه‌ها شده است (P<۰/۰۵)، اما زنده‌مانی تیمارهای حاوی سطوح مختلف BHA و BHT تفاوت معنی‌داری با گروه‌های شاهد مثبت و منفی نداشت (P>۰/۰۵). بنابراین، نتیجه‌گیری می‌شود که افزودن ۲ میلی‌مول پاداکسندۀ BHA به رقیق‌کننده، سبب بهبود فراسنجه‌های پس از انجماد اسپرم قوچ می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اسپرم قوچ، انجمادپذیری، جنبایی، غشای اسپرم، منی.

Effect of Butylated Hydroxy Anisole (BHA) and Butylated Hydroxy Toluene (BHT) on semen quality of Ram semen after freeze thawing Process

Ahmad Akbari-Kalesar[1], Afshin Seifi-Jamadi[2], Jaafar Yadi[3] and Hamid Kohram[4*]
1, 3. Former M. Sc. Student and Assistant Professor, Islamic Azad University, Karaj Branch, Iran
2, 4. Ph.D. Candidate in Animal Physiology and Assistant Professor, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: Jul. 1, 2017 - Accepted: Sep. 10, 2017)

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of different concentration of Butylated hydroxy toluene (BHT) and Butylated hydroxyanisole (BHA) on freezing capacity of Rams semen. Semen of four healthy mature ram (2.5 - 4 years) was collected, twice a week for three weeks. Collected semen samples were pooled after primary evaluation and divided into 8 groups. Then samples were diluted with one of the treatments [including negative control (without antioxidants and DMSO), positive control (without antioxidants, with DMSO), BHA-0.5 (containing 0.5 mM BHA), BHA-1 (containing 1 mM BHA), BHA-2 (containing 2 mM BHA), BHT-0.5 (containing 0.5 mM BHT), BHT-1 (containing 1 mM BHT) and BHT-2 (containing 2 mM BHT)] and were equilibrated at 4 ºC for 150 min. Afterward the cooled semen were loaded into 0.25 mL straws and were frozen in liquid nitrogen vapor. Motion characteristic (using CASA: Computer Assisted Sperm Analysis), viability and membrane integrity were assessed after thawing. The results of this study showed that addition of 2mM BHA to the extender could significantly increase total motility compared to the negative and positive control treatments (P<0.01). Also addition of 2 mM BHA significantly improved the progressive motility and membrane integrity compared to rest of the groups (P<0.05). However, different levels of BHA and BHT have not shown any significant difference in viability of ram sperm (P>0.05). So it is concluded that the addition of 2 mM BHA to the extender could improves the freezability of Ram semen.

Keywords: Freezabiliy, ram semen, intergrity, membrane, motion.

* Corresponding author E-mail: hamid_kohram@yahoo.com

مقدمه

انجماد منی پستانداران، تحولی اساسی در نگهداری منی (Purdy, 2006) و راهی برای حفظ ذخائر توارثی یا ژرم پلاسم[1] (پروتوپلاسم یاختهٔ جنسی) بوده که می‌تواند با حفظ DNA گونه‌ها، در دامپروری، آبزی‌پروری و حفظ تنوع زیستی کاربرد داشته (Holt, 2000) باشد. همچنین بانک‌های ذخیرهٔ اسپرم، می‌توانند همراه با دیگر فناوری‌های تولیدمثلی، در بهبود نژادها (Purdy, 2006) و حفاظت گونه‌های وحشی و بومی در حال انقراض، نقش داشته باشند (Quinn *et al*., 1980). اسپرم در گونه‌های مختلف از نظر اندازه، شکل و ترکیب‌های چربی متفاوت است و همهٔ این عامل‌ها در انجماد تأثیر مهمی دارند (Purdy, 2006). از سوی دیگر انجماد منی باعث ایجاد تغییر بیوشیمیایی و آسیب‌های فیزیکی به اسپرم شده و با کاهش جنبایی و زنده‌مانی اسپرم، میزان باروری را نیز کاهش می‌دهد (Leboeuf *et al*., 2000; Watson, 2000; Purdy, 2006). همچنین این آسیب‌های ساختاری در فرآیند انجماد- ذوب با تغییر بیوشیمیایی و از بین رفتن محتوای درونی اسپرم‌ها همراه است (Holt, 2000; Leboeuf *et al*., 2003; Gacitua & Arav, 2005).

رادیکال‌های آزاد مولکول‌های واکنش‌پذیر و فعال مشتق‌شده از اکسیژن (ROS) هستند که به دلیل داشتن الکترون جفت‌نشده، به مولکول‌های مانند خود حمله می‌کنند تا الکترون آن را به دست آورده و پایدار شوند. رادیکال‌های آزاد از نظر فیزیولوژیکی به بلوغ اسپرم، ظرفیت‌پذیری، بیش فعالی، واکنش آکروزومی و آمیختگی اسپرم-تخمک کمک می‌کند و از نظر بیماری‌شناسی (پاتولوژیکی) باعث بروز پراکسیداسیون چربی، آسیب DNA و آپوپتوز در اسپرم می‌شوند (Saleh and Agarwal, 2002). به دلیل اینکه غشای پلاسمایی اسپرم‌ها فسفولیپیدها، اسیدهای چرب اشباع، اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه (PUFA) و استرول‌های زیادی دارد، این ساختار به‌طور ویژه‌ای مستعد آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد هستند. از سوی دیگر اسپرم‌هایی که به لحاظ عملکردی طبیعی هستند، سطوح پایینی از ROS را تولید می‌کند اما در نتیجهٔ فرآیندهای سرد کردن و انجماد مسیر (کانال)های یونی کلسیم تحریک شده و یک آبشار وابسته به کلسیمی از ROS فعال می‌شود که در نهایت موجب بروز آسیب اکسایشی (اکسیداتیو) در یاخته می‌شود (Ogbuewu *et al*., 2010).

سازوکارهای متفاوتی برای مهار تنش اکسایشی و کاهش آسیب‌های ناشی از ROS وجود دارد که یکی از آن‌ها استفاده از سامانهٔ پاداکسندگی (آنتی‌اکسیدانی) است. برخی از پاداکسنده (آنتی‌اکسیدان)ها مانند کارنیتین‌ها، ویتامین C، ویتامین E، ترکیب‌های فنلی، گلوتاتیون، برخی مواد کانی ریزمغذی مانند روی، سلنیوم و برخی پاداکسنده‌های صنعتی مانند BHT، BHA و TBHQ در این فرآیند مؤثر هستند (Agarwal & Sekhon, 2010). اصلی‌ترین سازوکار پیشنهادی برای عملکرد پاداکسنده‌ها، دادن الکترون به ROS و ایجاد پایداری در آن‌ها است، که این عمل با جلوگیری از حملهٔ رادیکال‌های آزاد به ساختارهای دیگر، باعث می‌شود که زنجیرهٔ اکسایش (اکسیداسیون) شکسته شود. هنگامی‌که پاداکسندگی الکترون خود را به رادیکال‌های آزاد می‌دهد تبدیل به یک رادیکال مشخص می‌شوند که در این حالت زیانبار نیستند، چون توانایی انتقال الکترون بدون واکنش‌پذیر شدن را به دست می‌آورند (Ogbuewu *et al*., 2010).

بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن (BHT) و بوتیلید هیدروکسی آنیزول (BHA) نمونه‌هایی از پاداکسنده‌های فنولیک بازدارنده هستند. این ترکیب‌ها همسان مصنوعی (آنالوگ سنتتیک) ویتامین E هستند که واکنش اکسایش خود به خودی را با تبدیل رادیکال‌های پرکسی به هیدروپرکسیدها کنترل می‌کنند. این ترکیب‌ها در آب و پروپیل گلایکول نامحلول هستند، اما به‌آسانی در الکل حل می‌شوند. بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن به‌وسیلهٔ آلکیله شدن P-کرزول[2] با ایزوبوتن[3] یا به‌وسیلهٔ مونو بوتیلاسیون p[4] به

1. Germplasm

2. Alkylation p-kresol
3. Isobutene
4. Mono butylation p

m-کرزول[1] تبدیل می‌شود. همچنین BHA مخلوطی از دو ترکیب ایزومریک عالی ۲- ترت- بوتیل- ۴- هیدروکسی آنیزول[2] و ۳-ترت- بوتیل- ۴- هیدروکسی آنیزول[3] است.

در نتایج بررسی‌های پژوهشگران گزارش شده است، این مشتقات فنولی با رادیکال‌های آزاد واکنش می‌دهند و می‌توانند سرعت اکسایش خود به خودی که باعث تغییر رنگ و طعم مواد غذایی می‌شوند را کاهش دهند. همچنین، گزارش شده است که توان پاداکسندگی این ترکیب‌ها در مواد غذایی با دیگر پاداکسنده‌های شناخته‌شدهٔ مرسوم برابری می‌کند (Hinneburg *et al*., 2006; Soobrattee *et al*., 2005). پیش‌ازاین تأثیر مثبت BHT و BHA بر فراسنجه‌های کیفی اسب (Seifi-Jamadi *et al*., 2016)، بز (Rahmatzadeh *et al*., 2017) و گاومیش (Pankaj *et al*., 2009) بررسی شده است. به نظر می‌رسد افزودن این دو ترکیب به رقیق‌کنندهٔ اسپرم قوچ نیز باعث بهبود فراسنجه‌های کیفی آن پس از یخ‌گشایی شده و آسیب‌های ناشی از تولید رادیکال‌های آزاد در حین این فرآیند را کاهش دهد. اما بر پایهٔ نتایج پژوهش‌های صورت گرفته، تاکنون پژوهشی که به مقایسهٔ ویژگی‌های حفاظتی این دو ترکیب در اسپرم قوچ پرداخته باشد، انجام نشده است، بنابراین هدف از انجام این پژوهش، بررسی تأثیر پاداکسندگی BHT و BHA بر ویژگی‌های اسپرم قوچ پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی و مقایسهٔ ویژگی‌های محافظتی آن‌ها است.

مواد و روش‌ها

مکان انجام آزمایش و دام‌های مورد استفاده در طرح

در این پژوهش از منی چهار رأس قوچ نژاد سافولک با میانگین سنی ۲/۵ تا ۴ سال استفاده شد که در ایستگاه دامداری مؤسسهٔ تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی در شرایط یکسان تغذیه و نگهداری می‌شدند. در آغاز دورهٔ آزمایش ابتدا قوچ‌ها برای اسپرم‌گیری آموزش داده شدند و پس از آموزش و عادت‌دهی، گردآوری منی قوچ‌ها به‌صورت هفته‌ای دو مرتبه و به مدت سه هفته (شش تکرار در کل آزمایش) در فصل تولیدمثل (آغاز از نیمهٔ شهریورماه) انجام شد. بی‌درنگ پس از گردآوری منی و انتقال آن به آزمایشگاه (واقع درون ایستگاه) بررسی‌های اولیه روی منی صورت گرفت.

مواد مورد استفاده

همهٔ مواد شیمیایی مورد استفاده در پژوهش پیش‌رو از شرکت سیگما[4] (*Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA*.) و مرک[5] تهیه شدند.

گردآوری منی و ارزیابی‌های پیش از انجماد

نمونه‌های منی با مهبل مصنوعی، (با دمای درونی ۳۷-۴۰°C) از قوچ‌ها گردآوری شدند. برای جلوگیری از ایجاد تکانهٔ (شوک) سرمایی به اسپرم‌ها، نمونه‌های منی تا زمان انتقال به آزمایشگاه، درون فلاسک عایق دارای آب ۳۴-۳۵°C نگه‌داری و پس از پایان نمونه‌گیری به‌سرعت (در هرکدام از تکرارهای آزمایش این زمان بین ۲۰ تا ۲۵ دقیقه بود)، به آزمایشگاه منتقل و در حمام آب گرم قرار داده شدند. برای تحریک قوچ‌های نر برای پرش و انزال مطلوب، از یک رأس دام ماده و خرک جفت‌گیری استفاده شد. حجم منی بین ۲-۰/۷۵میلی‌لیتر، غلظت بیشتر از $۲/۵\times۱۰^{۹}$ در میلی‌لیتر، تحرک بیشتر از ۷۰ درصد و ریخت‌شناختی (مورفولوژی) اسپرم‌های غیرطبیعی کمتر از ۱۰ درصد، در هر انزال به‌عنوان اسپرم طبیعی در نظر گرفته شد.

روش تهیهٔ رقیق‌کنندهٔ پایه

برای ساخت رقیق‌کننده از یک محیط بر پایهٔ تریس استفاده شد. این محیط حاوی تریس (۳/۰۷ گرم)، سیتریک اسید (۱/۶۴ گرم)، فروکتوز (۱/۲۶ گرم)، زردهٔ تخم‌مرغ (۲۰ درصد حجمی/حجمی، بدون غشای ویتلین) و گلیسرول (۵ درصد حجمی/حجمی) در

1. M-kresol
2. 2-tert-butyl-4-hydroxyanisole
3. 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole
4. SIGMA
5. Merck

۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر بود. اسمولاریتی محیط پایه ۳۶۰-۳۲۵ میلی اسمول و اسیدیتهٔ آن ۷/۱-۶/۹ تنظیم شدند (Naijian *et al*., 2013).

روش تهیهٔ رقیق‌کننده‌های حاوی BHA و BHT

در آغاز به‌منظور حل شدن بهتر BHT و BHA در رقیق‌کننده‌ها، غلظت‌های مورد استفاده در۵۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل و سپس به رقیق‌کننده‌های بر پایهٔ زردهٔ تخم‌مرغ و تریس اضافه شد. تیمارهای آزمایشی شامل شاهد منفی: بدون پاداکسنده و حلال (- Control)، شاهد مثبت: بدون پاداکسنده و دارای حلال (+ Control)، تیمار دارای ۰/۰۵ میلی‌مول BHA (BHA-0.05)، تیمار دارای ۱ میلی‌مول BHA (BHA-1)، تیمار دارای ۲ میلی‌مول BHA (BHA-2)، تیمار دارای ۰/۰۵ میلی‌مول BHT (BHT-0.05) و تیمار دارای ۱ میلی‌مول BHT (BHT-1) و تیمار دارای ۲ میلی‌مول BHT (BHT-2) بودند. دُزهای مورد استفاده در این آزمایش بر پایهٔ نتایج پژوهش‌های صورت گرفته روی اسپرم اسب (Seifi-Jamadi *et al*., 2016) بز (Naijian *et al*., 2013) و گاومیش (Pankaj *et al*., 2009) انتخاب شدند.

پردازش و انجماد منی

بی‌درنگ پس از گردآوری منی و بررسی‌های اولیه و اطمینان از مناسب بودن آن‌ها، نمونه‌ها به‌منظور از میان برداشتن اثر فردی با یکدیگر آمیخته شدند و بر پایهٔ نسبت رقیق‌سازی مناسب (برای به دست آوردن غلظت ۲۰۰ میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر) به بخش‌های یکسان تقسیم شدند. لوله‌های آزمایشی حاوی گروه‌های تیماری در ظرف محتوای ۱۰۰ میلی‌لیتر آب هم دما با محیط به مدت ۱۵۰ دقیقه در یخچال ۴ درجهٔ سلسیوس قرار داده شدند. هدف از قرار دادن نمونه‌ها در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس، سرد کردن تدریجی نمونه‌ها است که در این زمان اسپرم‌ها با محیط به تعادل رسیده و آب‌گیری یاخته توسط مادهٔ سرما محافظ (گلیسرول) انجام می‌شود. آنگاه بی‌درنگ پس از سردسازی، نمونه‌ها در نی (پایوت)های ویژه انجماد ۰/۲۵ میلی‌لیتری کشیده شدند. پس از پر کردن نی‌ها، انتهای آن‌ها با استفاده از پودر پلی ونیلیل الکل بسته شد. در مرحلهٔ بعد، نی‌های بسته‌بندی‌شده به فاصلهٔ ۴ سانتی‌متری بالای سطح نیتروژن مایع قرار گرفته و پس از گذشت ده دقیقه در نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند. نی‌های مربوط به هر گروه در لیوان (گابلت)های ویژه قرار داده شده و تا زمان یخ‌گشایی (۳ تا ۴ هفته پس از انجماد) به مخزن (تانک) نیتروژن ویژهٔ نگهداری اسپرم انتقال داده شدند (Masoudi *et al*., 2016).

یخ‌گشایی

برای یخ‌گشایی، نی‌ها پس از خارج شدن از نیتروژن مایع، به مدت سی ثانیه در حمام آب گرم ۳۷ درجهٔ سلسیوس قرار داده شدند. پس از آن با استفاده از یک قیچی سمتی از نی که با پودر پلی واینیل الکل مسدود شده بود چیده و به درون ریز لوله (میکروتیوپ) ریخته شدند.

ارزیابی‌های انجام شده پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی

جنبایی

برای ارزیابی جنبایی اسپرم‌های تیمارشده با BHA و BHT، سه نی از هر گروه یخ‌گشایی شدند. آنگاه با استفاده از نمونه‌بردار (سمپلر) متغیر ۷ تا ۱۰ میکرولیتر از منی روی لام گذاشته شده و یک لامل تمیز روی آن قرار داده شد. سپس اسلاید ایجاد شده با استفاده از نرم‌افزار تجزیهٔ رایانه‌ای اسپرم (*VideoTesT®, Sperm 3.1, Russia*) بررسی شد. فراسنجه‌های ارزیابی‌شدهٔ مربوط به تحرک در این برنامه شامل جنبایی کل (TM)، جنبایی پیش‌رونده (PM) سرعت واقعی اسپرم در مسیر پیموده‌شده (VCL)، سرعت اسپرم در خط مستقیم (VSL)، میانگین سرعت در مسیر مستقیم (VAP)، معیار خطی بودن حرکت اسپرم (LIN)، معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم (STR)، بیشترین دامنهٔ حرکت‌های جانبی (ALH) و بسامد (فرکانس) حرکت‌های جانبی (BCF) بودند.

یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم

برای ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم از محیط‌هاست (HOST) استفاده شد (Uysal & Bucak, 2007). آزمون تورم کمتر اسمزی شده (هایپواسمتیک) بر پایهٔ میزان فعالیت اسمزی (اسمولاریتهٔ) محیطی که اسپرم در آن قرار می‌گیرد، عمل می‌کند. میزان فعالیت اسمزی محیط‌هاست ۱۰۰ میلی اسمول/کیلوگرم بوده و میزان فعالیت اسمزی مورد نیاز اسپرم قوچ ۳۷۵-۳۲۵ میلی اسمول/کیلوگرم است. بنابراین اسپرم‌های با غشای پلاسمایی سالم با قرار گرفتن در یک محیط با میزان فعالیت اسمزی پایین، به‌سرعت واکنش می‌دهند و انتهای دم‌های آن‌ها گره می‌خورد. به‌طور خلاصه حدود ۳۰ میکرولیتر از منی به ۳۰۰ میکرولیتر از محیط کمتر اسمزی شده که فروکتوز و سیترات سدیم داشت افزوده شد. پس از آن مخلوط به‌دست‌آمده ۳۰-۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ ^{o}C نگه داشته (انکوبه) شد. پس از گذشت این زمان ۱۰ میکرولیتر از نمونهٔ نگه داشته شده روی لام قرار داده شد و با استفاده از لامل روی لام گسترده شد و با استفاده از میکروسکوپ نوری فاز کنتراست و بزرگنمایی ۴۰۰ بررسی شد. در هر گروه تیماری دست‌کم ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های با دم گره‌خورده دارای غشاء یکپارچه نسبت به گره نخورده دارای غشاء غیر یکپارچه محاسبه شد (Revell & Mrode, 1994).

زنده‌مانی

برای ارزیابی زنده‌مانی از رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین استفاده شد. در این روش اسپرم‌های مرده رنگ ائوزین را به خود جذب می‌کنند ولی اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. برای این رنگ‌آمیزی حدود ۵ میکرولیتر از نمونهٔ اسپرم برداشته و روی لام قرار داده شد. سپس ۵ میکرولیتر از رنگ آماده شده ائوزین- نیگروزین نیز برداشته و روی نمونه ریخته و نمونه‌ها با سر نمونه‌بردار به‌آرامی هم زده شدند تا اسپرم با رنگ مخلوط شود. پس از ۳۰ ثانیه حدود ۵ میکرولیتر از نمونه برداشته و بر گوشهٔ لام دیگری گذاشته شده و با یک لام دیگر روی لام به‌آرامی گسترش تهیه شد. پس از خشک شدن اسلاید، از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم (با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۴۰۰) شمارش شد و درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده) محاسبه شد. اسپرم‌هایی که رنگ صورتی کم‌رنگ به خود گرفته یا تنها بخشی از گردن آن‌ها رنگ گرفته بود به‌عنوان اسپرم زنده در نظر گرفته شد. این اسپرم‌ها در اصطلاح اسپرم گردن سوراخ[1] می‌نامند (World Health Organization, 2010).

تجزیه‌وتحلیل آماری

عادی بودن داده‌های این آزمایش با استفاده از رویهٔ UNIVARIATE نرم‌افزار آماری SAS 9.1 ارزیابی و درصدهایی که غیرعادی بودند با تبدیل زاویه‌ای (Arc Sin √x) عادی شدند. آنگاه تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با رویهٔ GLM نرم‌افزار آماری SAS 9.1 به شکل مدل آماری زیر انجام گرفت. مقایسهٔ میانگین حداقل مربعات با استفاده از آزمون دانکن انجام و سطح معنی‌داری $P\leq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

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

Y_{ij}= اندازهٔ هر مشاهده از آزمایش (مشاهده‌ها شامل همهٔ فراسنجه‌های کیفی اسپرم پس از یخ زدن است)

μ= میانگین جامعه

A_i= اثر تیمارهای آزمایشی

e_{ij}= اثر باقیمانده (اشتباه آزمایش)

نتایج

نتایج مربوط به فراسنجه‌های جنبایی تیمارهای مختلف پس از فرآیند یخ‌گشایی، در جدول ۱ و شکل‌های ۱ و ۲ گزارش شده است.

بر پایهٔ نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش (جدول۱)، جنبایی کل اسپرم‌های تیمارشده با ۲ میلی‌مول پاداکسندهٔ BHA نسبت به دیگر گروه‌ها بالاتر بود اما تنها با گروه‌های شاهد مثبت و منفی تفاوت معنی‌دار ایجاد کرده بود ($P\leq ۰/۰۱$). همچنین جنبایی پیش‌رونده در گروه تیماری BHA-2 نسبت به همهٔ گروه‌های تیماری بالاتر بوده و

1. Leaky Neck Membrane

تفاوت معنی‌داری با آن‌ها داشت (P<۰/۰۳). نتایج گویای آن است که میزان VSL در گروه تیماری BHA-2 نسبت به گروه‌های شاهد مثبت و منفی بالاتر بود (P<۰/۰۱). اما از نظر دیگر فراسنجه‌های حرکتی مانند LIN، VCL، VAP، ALH و BCF هیچ تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تیماری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

نتایج ارائه‌شده در نمودار ۱ نیز نشان می‌دهد، یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم‌های تیمارشده با ۲ میلی‌مول پاداکسندهٔ BHA بالاتر از دیگر گروه‌های تیماری و شاهد مثبت و منفی بود (P<۰/۰۵). همچنین نمودار ۲ نشان می‌دهد، هیچ تفاوت معنی‌داری در میزان زنده‌مانی گروه‌های تیمارشده با سطوح مختلف پاداکسنده‌های BHA و BHT نسبت به گروه‌های شاهد مثبت و منفی وجود نداشت (P>۰/۰۵).

بحث

حفظ و نگهداری از فسفولیپیدهای غشای اسپرم و حساسیت آن‌ها به پراکسیداسیون بستگی زیادی به میزان پاداکسندهٔ موجود در محیط دارد، که خطر آسیب به اسپرم‌ها را کاهش و شانس زنده‌مانی را در طول ذخیره‌سازی افزایش می‌دهد (Strzezek, 2002). از سویی فرآیند انجماد و یخ‌گشایی سبب القای تولید رادیکال‌های آزاد شده و از سوی دیگر برخی از آنزیم‌های از بین برندهٔ رادیکال‌های آزاد را غیرفعال می‌کند (Rossi *et al.*, 2001). بنابراین، هرگونه کمبود در سامانهٔ دفاع پاداکسندگی می‌تواند تأثیر منفی بر جنبایی و توانایی لقاح اسپرم داشته باشد. اما هدف از افزودن پاداکسنده‌ها حذف کامل رادیکال‌های آزاد نیست، بلکه هدف اصلی نگه‌داشتن غلظت‌های رادیکال آزاد در یک حد فیزیولوژیکی ثابت است (Michael *et al.*, 2007).

جدول ۱. تأثیر سطوح مختلف پاداکسنده‌های BHA و BHT بر فراسنجه‌های جنبایی اسپرم پس از فرایند یخ‌گشایی (Lsmeans ±SE)

Table 1. Effect of Different levels of BHA and BHT on post-thawed motility parameter of Ram semen (Lsmeans ±SE)

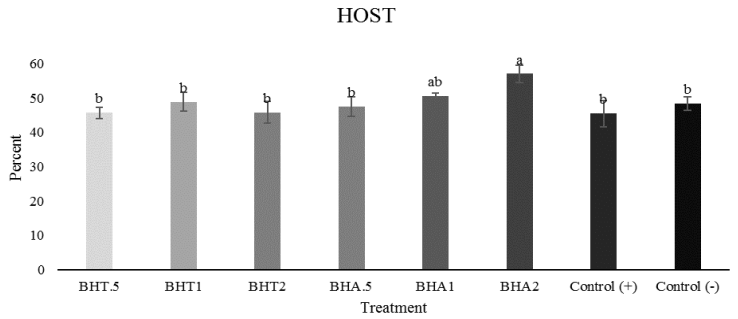
Treatment	BHA-0.5	BHA-1	BHA-2	BHT-0.5	BHT-1	BHT-2	Control (-)	Control (+)	P-value
TM (%)	48.83^{ab}±3.17	49.19^{ab}±3.91	59.17^{a}±3.01	48.33^{ab}±6.79	50.67^{ab}±3.73	48.00^{ab}±1.23	46.83^{b}±1.78	47.00^{b}±2.23	0.001
PM (%)	25.50^{b}±1.20	24.83^{b}±2.21	30.50^{a}±1.33	24.33^{b}±1.58	25.17^{b}±0.98	24.00^{b}±1.29	26.00^{b}±1.23	24.50^{b}±2.20	0.03
LIN (%)	69.83±2.67	69.65±2.75	71.46±5.02	68.38±4.05	66.00±2.81	69.46±3.31	67.75±3.29	67.06±2.07	ns
VSL(µm/s)	69.77^{ab}±3.38	69.83^{ab}±3.14	79.84^{a}±3.84	72.05^{ab}±2.58	67.49^{b}±2.29	70.29^{ab}±2.31	65.62^{b}±4.73	63.66^{b}±3.17	0.001
VCL(µm/s)	101.60±8.79	101.29±3.14	113.79±7.82	108.17±10.07	105.46±6.07	102.70±7.02	96.89±4.96	94.97±3.89	ns
VAP(µm/s)	78.79±4.13	77.63±3.05	81.90±2.20	86.47±4.42	76.58±2.78	79.66±2.74	87.47±4.49	82.75±3.67	ns
ALH(µm)	1.32±0.24	1.46±0.24	1.44±0.18	1.62±0.29	1.19±0.20	1.44±0.19	1.88±0.21	1.82±0.27	ns
STR (%)	88.63^{abc}±0.45	89.97^{ab}±2.05	97.87^{a}±5.57	83.72^{bcd}±2.53	88.16^{abc}±0.39	88.27^{abc}±0.64	76.01^{d}±6.23	77.53_{cd}±4.63	0.002
BCF (Hz)	10.50±1.77	11.17±1.07	11.00±0.90	11.63±1.34	10.33±1.35	11.22±1.12	11.84±0.75	12.32±0.73	ns

میانگین‌های با حرف‌های ناهمسان (a, c، b و d) بین تیمارها در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار است.

ALH: بیشترین دامنهٔ حرکت‌های جانبی بر حسب میکرومتر، BHA: بوتیلیتید هیدروکسی آنیزول، BHT: بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن، BCF: فرکانس حرکت‌های جانبی بر حسب هرتز، LIN: معیار خطی بودن حرکت اسپرم که برحسب درصد است، PM: جنبایی پیش‌رونده، SE: انحراف استاندارد، STR: معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم برحسب درصد، TM: جنبایی کل، VAP: میانگین سرعت در مسیر مستقیم، VCL: سرعت واقعی اسپرم در مسیر طی شده، VSL: سرعت اسپرم در خط مستقیم.

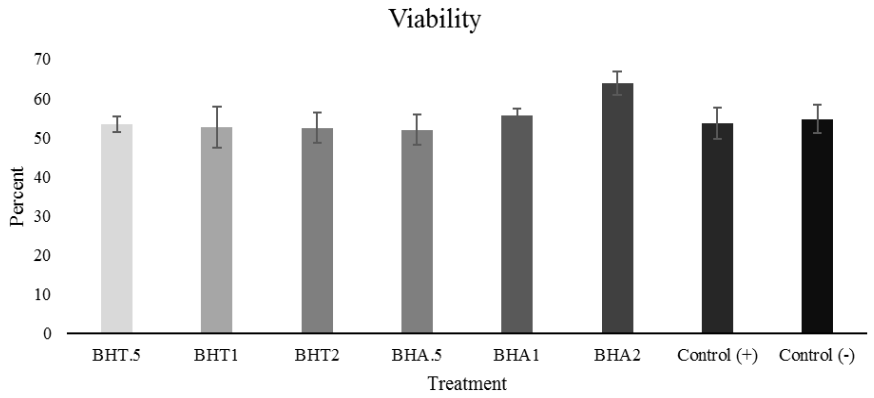
a, b, c and d: Means with different letters within a row are statistically significant.

Abbreviations: ALH, Amplitude of Lateral Head displacement; BHA, Butylated Hydroxy Anisole; BHT, Butylated Hydroxy Toluene; BCF, Beat Cross Frequency; LIN, Linearity; PM, Progressive Motility; SE, Standard Error; STR, Straightness; TM, Total Motility; VAP, Average Path Velocity; VCL, Curvilinear Velocity; VSL, Straight Line Velocity.



شکل ۱. تأثیر سطوح مختلف پاداکسنده‌های BHA و BHT بر یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم قوچ پس از فرآیند یخ‌گشایی (Lsmeans ±SE)

Figure 1. The effect of different levels of BHA and BHT on plasma membrane functionality of Ram spermatozoa after freeze-thawing procedure (Lsmeans ±SE)



شکل ۲. تأثیر سطوح مختلف پاداکسنده‌های BHA و BHT بر زنده‌مانی اسپرم قوچ پس از فرآیند یخ‌گشایی(Lsmeans ±SE)
Figure 2. The effect of different levels of BHA and BHT on viability of Ram spermatozoa after freeze-thawing procedure (Lsmeans ±SE)

امروزه سازوکار دقیقی که نشان دهد پاداکسنده‌های غیرآنزیمی از راه آن اسپرم را در برابر تکانهٔ سرمایی و گرمایی محافظت می‌کند مشخص نیست (Pursel, 1979; Watson, 2000). اما گزارش شده است که پاداکسنده‌های BHA و BHT (همسان‌های صنعتی ویتامین E) با کاهش رادیکال‌های آزاد از بروز تنش‌های اکسایشی در یاخته جلوگیری می‌کنند. این پاداکسنده‌ها به‌عنوان حذف‌کنندهٔ رادیکال‌های آزاد عمل کرده و دیوارهٔ یاخته‌ای را از آسیب‌های ناشی از تنش اکسایشی حفظ می‌کند (Pankaj *et al*., 2009). با این وجود، بر پایهٔ بررسی‌های صورت گرفته، به نظر می‌رسد پژوهش‌های معدودی در مورد تأثیر پاداکسندگی BHA و مقایسهٔ تأثیر آن با پاداکسنده BHT بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم پستانداران انجام شده باشد.

نتایج این پژوهش نشان داد، افزودن ۲ میلی‌مول BHA به رقیق‌کنندهٔ اسپرم قوچ سبب بهبود ویژگی‌های اسپرم پس از یخ‌گشایی می‌شود. در همین راستا در نتایج پژوهشی که روی اسپرم اسب انجام شد Seifi-Jamadi *et al*. (2016) بیان کردند، تیمارهای حاوی ۲ میلی‌مول BHA و تیمارهای حاوی ۱ میلی مول BHT سبب بهبود جنبایی، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای اسپرم پس از فرآیند یخ‌گشایی می‌شود. همچنین، نتایج بررسی‌های Rahmatzadeh *et al*. (2015) نشان داد، افزودن ۴ میلی‌مول BHA به رقیق‌کننده سبب بهبود فراسنجه‌های جنبایی، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای اسپرم بز نسبت به گروه شاهد شده است. اما این نتایج با نتایجی که Pankaj *et al*. (2009) گرفتند هماهنگی نداشت. آنان بیان کردند که افزودن BHA تأثیری روی جنبایی اسپرم‌های تیمارشده، شمار اسپرم‌های غیرطبیعی و یکپارچگی دیوارهٔ یاخته‌ای نسبت به گروه شاهد ندارد. در بررسی دیگر، پژوهشگران تأثیر BHA را روی عملکرد دستگاه تولیدمثل موش نر بالغ بررسی کرده و به این نتیجه رسیدند که BHA تأثیر معنی‌داری روی جنبایی، شمار و ریخت‌شناختی اسپرم نداشت ولی میزان ۵۰۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن موجب کاهش سرعت واقعی اسپرم در نتاج نر شد (Jeong *et al*., 2005)، که این نتایج نیز با نتایج پژوهش پیش‌رو هماهنگی نداشت. همچنین در نتایج بررسی دیگر نشان داده شده است، استفاده از BHA روی لنفوسیت‌هایی که با ترکیب‌های استروژنی تیمار شده‌اند، باعث کاهش آسیب به DNA این یاخته‌ها می‌شود (Cemeli and Anderson, 2011). برخلاف BHA پژوهش‌های گوناگونی در ارتباط با تأثیر پاداکسندگی BHT بر فرآیند انجماد اسپرم در گونه‌های مختلف پستانداران انجام شده است (Farshad *et al*., 2010; Ijaz *et al*., 2009; Naijian *et al*., 2013; Neagu *et al*., 2010; Roca *et al*., 2004). سازوکار دقیقی که BHT باعث بهبود ویژگی‌های

اسپرم می‌شود به‌طور روشن مشخص نیست (Farshad *et al*., 2010). اما Ijaz *et al*. (2009) سازوکار عمل BHT را تشریح کرده و پیشنهاد کردند که BHT با تبدیل رادیکال‌های پرکسی به هیدروپرکسیدها از فعالیت زیانبار آن‌ها جلوگیری می‌کند. با این وجود در این بررسی افزودن BHT هیچ تأثیر معنی‌داری بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم نسبت به گروه شاهد نداشت. برخلاف نتایج پژوهش پیش‌رو تأثیر مثبت سطح ۱ میلی‌مول BHT در گونه‌های گاو (Shoae and Zamiri, 2008) و سگ (Neagu *et al*., 2010) تأیید شده است. اگرچه در بعضی از گونه‌های دیگر مانند قوچ سطح ۲ میلی‌مولار BHT باعث بهبود معنی‌دار میزان جنبایی، یکپارچگی غشا و زنده‌مانی اسپرم شده است (Farshad *et al*., 2010). همچنین برخلاف نتایج این آزمایش Watson & Anderson (1983) در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند، BHT به‌طور معنی‌داری میزان تخریب آکروزمی اسپرم قوچ را در نتیجهٔ تکانهٔ سرمایی کاهش داده و میزان جنبایی اسپرم‌ها را پس از تکانهٔ سرمایی افزایش می‌دهد. در پژوهشی دیگر Ijaz *et al*. (2009) اثر BHT را روی کیفیت منی منجمد-یخ‌گشایی‌شدهٔ گاومیش ارزیابی کرده و به این نتیجه رسیدند که افزودن ۲ میلی‌مول BHT به رقیق‌کننده، بهترین تأثیر را روی اسپرم‌ها گذاشت که با یافته‌های این آزمایش هماهنگی نداشت.

نتیجه‌گیری کلی

اضافه کردن ۲ میلی‌مول BHA در رقیق‌کننده بر پایهٔ تریس باعث بهبود معنی‌دار جنبایی پیش‌روندهٔ اسپرم قوچ پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی نسبت به دیگر گروه‌های تیماری شده است. اما سطوح مختلف BHT تأثیری بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ نسبت به گروه شاهد نداشت. همچنین افزودن سطوح مختلف پاداکسنده‌های BHA و BHT باعث بهبود زنده‌مانی و فعالیت غشای اسپرم نشد.

REFERENCES

1. Agarwal, A. & Sekhon, L. H. (2010). The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. *Human Fertility*, 13, 217-225.
2. Cemeli, E. & Anderson, D. (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.
3. Farshad, A., Khalili, B. & Jafaroghli, M. (2010). Effects of Butylated Hydroxytoluene on Freezability of Ram Spermatozoa. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23, 1276-1281.
4. Gacitua, H. & Arav, A. (2005). Successful pregnancies with directional freezing of large volume buck semen. *Theriogenology*, 63, 931-938.
5. Hinneburg, I., Dorman, H. D. & Hiltunen, R. (2006). Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry*, 97, 122-129.
6. Holt, W. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62, 3-22.
7. Ijaz, A., Hussain, A., Aleem, M., Yousaf, M. & Rehman, H. (2009). Butylated hydroxytoluene inclusion in semen extender improves the post-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo (Bubalus bubalis). *Theriogenology*, 71, 1326-1329.
8. Jeong, S.-H., Kim, B.-Y., Kang, H.-G., Ku, H.-O. & Cho, J.-H. (2005). Effects of butylated hydroxyanisole on the development and functions of reproductive system in rats. *Toxicology*, 208, 49-62.
9. Leboeuf, B., Guillouet, P., Batellier, F., Bernelas, D., Bonne, J., Forgerit, Y., Renaud, G. & Magistrini, M. (2003). Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen. *Theriogenology*, 60, 867-877.
10. Leboeuf, B., Restall, B. & Salamon, S. (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, 62, 113-141.
11. Masoudi, R., Sharafi, M., Shahneh, A. Z., Towhidi, A., Kohram, H., Zhandi, M., ... & Shahverdi, A. (2016). Effect of dietary fish oil supplementation on ram semen freeze ability and fertility using soybean lecithin–and egg yolk–based extenders. *Theriogenology*, 86(6), 1583-1588.
12. Michael, A., Alexopoulos, C., Pontiki, E., Hadjipavlou-Litina, D., Saratsis, P. & Boscos, C. (2007). Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*, 68, 204-212.
13. Neagu, V., García, B. M., Sandoval, C. S., Rodríguez, A. M., Ferrusola, C. O., Fernández, L. G., Tapia, J. & Pena, F. (2010). Freezing dog semen in presence of the antioxidant butylated hydroxytoluene improves postthaw sperm membrane integrity. *Theriogenology*, 73, 645-650.

14. Naijian, H. R., Kohram ,H., Shahneh, A. Z., Sharafi, M. & Bucak, M. N. (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.
15. Ogbuewu, I., Aladi, N., Etuk, I., Opara, M., Uchegbu, M., Okoli, I. & Iloeje, M. (2010). Relevance of Oxygen Free Radicals and Antioxidants in Sperm Production and Function. *Research Journal of Veterinary Sciences*, 3, 138-164.
16. Pankaj, P., Raina, V., Roy, B., Mohanty, T. & Mishra, A. (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.
17. Pena, F., Johannisson, A., Wallgren, M. & Martinez, H. R. (2003). Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Animal Reproduction Science*, 78, 85-98.
18. Purdy, P. (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research* 63, 215-225.
19. Pursel, V. (1979). Effect of cold shock on boar sperm treated with butylated hydroxytoluene. *Biology of Reproduction*, 21, 319-324.
20. Quinn, P. J., Chow, P. Y. & White, I. G. (1980). Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *Journal of Reproduction and Fertility*, 60, 403-7.
21. Rahmatzadeh, M., Kohram, H., Zare Shahneh, A., Seifi-Jamadi, A. & Ahmad, E. (2017). Antioxidative effect of BHA in soya bean lecithin-based extender containing Glycerol or DMSO on freezing capacity of goat semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 00, 1–7.
22. Revell, S. & Mrode, R. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*, 36, 77-86.
23. Roca, J., Gil, M. A., Hernandez, M., Parrilla, I., Vazquez, J. M. & Martinez, E. A. (2004). Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Journal of Andrology*, 25, 397-405.
24. Rossi, T., Mazzilli, F., Delfino, M. & Dondero, F. (2001). Improved human sperm recovery using superoxide dismutase and catalase supplementation in semen cryopreservation procedure. *Cell and Tissue Banking*, 2, 9-13.
25. Saleh, R. A. & Agarwal, A. (2002). Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *Journal of Andrology*, 23, 737.
26. Seifi-Jamadi, A., Kohram, H., Zareh-Shahne, A., Dehghanizadeh, P. & Ahmad, E. (2016). Effect of various concentrations of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on freezing capacity of Turkman stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, 170, 108-113.
27. Shoae, A. & Zamiri, M. (2008). Effect of butylated hydroxytoluene on bull spermatozoa frozen in egg yolk-citrate extender. *Animal Reproduction Science*, 104, 414-418.
28. Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I. & Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 579, 200-213.
29. Strzezek, J. (2002). Secretory activity of boar seminal vesicle glands. *Reproductive Biology*, 2, 243-266.
30. Uysal, O. & Bucak, M. (2007). Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen .*Acta Veterinaria Brno*, 76, 383-390.
31. Watson, P. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60, 481-492.
32. Watson, P. & Anderson, W. (1983). Influence of butylated hydroxytoluene (BHT) on the viability of ram spermatozoa undergoing cold shock. *Journal of Reproduction and Fertility*, 69, 229-235.
33. World Health Organization. (2010). *WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen*. Switzerland.