نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۶ شماره ۳/ سال۱۳۹۵

تأثیر افزودن مقادیر مختلف بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن بعنوان آنتی‌اکسیدان سنتتیک بر فرآیند انجماد - یخ گشایی منی قوچ

فاطمه زارع قلعه‌جیق[۱]، حسین دقیق‌کیا[۲*]، غلامعلی مقدم[۳] و صادق علیجانی[۲]

تاریخ دریافت : ۹۵/٤/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۵/٦/۲۰

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

[۲] دانشیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

[۳] استاد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

*مسئول مکاتبه: Email: daghighkia@tabrizu.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: یکی از دلایل کاهش باروری اسپرم، تولید مقادیر زیاد رادیکال آزاد طی فرآیندهای انجماد، نگهداری و یخ‌گشایی است. رادیکال‌های آزاد منجر به تغییرات فراساختاری و بیوشیمیایی غشاء اسپرم وکاهش میزان زنده‌مانی آنها پس از یخ‌گشایی می‌شوند. بوتیلید هیدروکسی تولوئن (BHT) یک آنالوگ سنتتیک ویتامین E است که با تبدیل کردن رادیکال‌های پروکسی به هیدروپروکساید، باعث کنترل اتواکسیداسیون می‌شود. **هدف**: هدف این تحقیق بررسی اثرات استفاده از سطوح مختلف BHT به منظور بهبود کیفیت منی قوچ در فرآیند انجماد- یخ‌گشایی بود. **روش‌کار**: از پنج قوچ، دوبار در هفته اسپرم گیری شد. سطوح مختلف BHT (۱، ۱/۵، ۲ و ۳ میلی‌مولار) به رقیق‌کننده بر پایه تریس افزوده شد. بعد از یخ‌گشایی نمونه‌های منی، فراسنجه‌های حرکتی، زنده‌مانی، یکپارچگی غشاء، شمار اسپرم‌های غیر طبیعی و مقدار لیپید پراکسیداسیون (MDA) ارزیابی شدند. **نتایج**: افزودن سطوح ۱/۵ و ۲ میلی‌مولار BHT باعث افزایش درصد زنده-مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و تحرک کل اسپرم‌ها و کاهش درصد اسپرم های غیرطبیعی نسبت به گروه کنترل شد (P<۰/۰۵). افزودن ۱/۵ و ۲ میلی‌مولار از BHT باعث کاهش معنی‌دار میزان MDA شد (P<۰/۰۵). افزودن سطوح مختلف BHT باعث کاهش معنی‌دار حرکت پیش‌رونده اسپرم‌ها نسبت به گروه شاهد شد (P<۰/۰۵). تیمارهای ۱ و ۲ میلی‌مولار باعث کاهش معنی‌داری سرعت حرکت اسپرم‌ها در مسیر مستقیم شدند (P<۰/۰۵). افزودن سطوح مختلف BHT تاثیر معنی داری در فراسنجه های تناوب عرضی زنش، خطی بودن حرکت و سرعت در مسیر منحنی نسبت به گروه شاهد ایجاد نکرد. تیمارهای ۱/۵ و ۳ میلی‌مولار راستی مسیر طی شده اسپرم‌ها را نسبت به گروه شاهد بطور معنی‌داری افزایش دادند. **نتیجه‌گیری**: داده‌های حاصل از آنالیز آماری نشان داد که افزودن BHT به رقیق کننده منی باعث بهبود اکثر پارامترهای اسپرم‌ها، بعد از یخ گشایی می شود.

واژگان کلیدی: اسپرم، رادیکال‌های آزاد، BHT، انجماد/یخ گشایی

مقدمه

به منظور تحقق بخشیدن به بسیاری از مزایای بالقوه تلقیح مصنوعی، ذخیره‌سازی منی برای بلند مدت یک امر ضروری محسوب می‌شود. این امر بوسیله فرآیند انجماد محقق می‌شود، فرآیندی که باعث توقف فعالیت-های متابولیکی اسپرم‌ها و در نتیجه امکان ذخیره‌سازی بطور نامحدود و بدون کاهش معنی‌دار باروری می‌شود (بایلی و همکاران ۲۰۰۰). وقتی اسپرم طی محافظت سرمایی در معرض آسیب قرار می‌گیرد، شرایط برای تولید رادیکال‌های آزاد[۱] (ROS) افزایش می‌یابد و از طرف دیگر کمبود آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در منی رقیق شده اسپرم‌ها را آسیب‌پذیرتر می‌نماید. بنابراین برای اینکه شرایط منی به حالت اول برگردد، اضافه نمودن سطوح طبیعی آنتی‌اکسیدان‌ها در فرآیند فرآوری انجماد منی ضروری است (ایجاز و همکاران ۲۰۰۹). از سوی دیگر انجماد اسپرم با مشکلاتی از قبیل کاهش زنده‌مانی و تحرک اسپرم‌ها بعد از فرآیند انجماد و یخ‌گشایی مواجه است. انجماد منی در واقع به حداقل ممکن رساندن فعالیت‌های متابولیکی اسپرم تا زمان یخ‌گشایی و فرآیند تلقیح است (فروزانفر و همکاران ۲۰۰۷). ایجاد تعادل بین تولید ROS و پاکسازی آنها توسط آنتی-اکسیدان‌ها عامل مهمی برای بقای سلول اسپرم و عملکرد آنها پیش و پس از حفاظت انجمادی است (آیتکن ۱۹۹۵). آنتی‌اکسیدان‌ها با مهار واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداتیو و ایجاد تعادل بین مواد اکسیدانی و آنتی-اکسیدانی موجب کاهش استرس اکسیداتیو می‌شوند (بانسال و بیلاسپوری ۲۰۱۱). وجود غلظت‌های بالای اسیدهای چرب بلند زنجیر در داخل ساختار لیپید سلول اسپرم نیاز به سیستم آنتی‌اکسیدانی مؤثر برای حفاظت اسپرم در مقابل آسیب پراکسیداسیون دارد (ماکسل و واتسون ۱۹۹۶ و بانسال و بیلاسپوری ۲۰۱۱). بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن[۲] (BHT) یک آنالوگ سنتتیک ویتامین E است که واکنش اتواکسیداسیون را بوسیله تبدیل رادیکال‌های پراکسی به هیدروپراکسیدها کنترل می‌کند. BHT بصورت کریستال‌های جامد سفید رنگ می‌باشد که در آب و پروپیل گلایکول نامحلول بوده اما به راحتی در الکل حل می‌شود. این مشتقات فنولی با رادیکال‌های آزاد واکنش می‌دهند (جاروب کننده‌های رادیکال‌های آزاد نامیده می‌شوند) و می‌توانند سرعت اتواکسیداسیون را کاهش دهند (واتسون و اندرسون ۱۹۸۳). گراهام و هرمستد در سال ۱۹۹۲ گزارش کردند که BHT آنتی‌اکسیدانی فنولی است که به درون غشای اسپرم نفوذ کرده باعث کاهش ویسکوزیته لیپیدهای غشایی می‌شود. طی انجماد سیالیت غشا کاهش می‌یابد که در نتیجهBHT باعث کاهش نفوذپذیری غشای اسپرم در موقع قرارگرفتن در معرض شوک سرمایی می‌شود. همچنین نشان داده شده است که BHT با تبدیل رادیکال‌های پراکسی به هیدروپراکسیدها از فعالیت زیان‌بار آن‌ها طی فرایند انجماد در اسپرم گاومیش جلوگیری می‌کند (ایجاز و همکاران ۲۰۰۹). بنابراین هدف از این پژوهش استفاده از سطوح مختلف BHT در جهت بهبود کیفیت منی و عملکرد اسپرم قوچ در حین فرآیند انجماد/یخ گشایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری منی

این تحقیق در ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان و با استفاده از پنج قوچ قزل با سن ۲-۳ سال انجام شد. جمع‌آوری منی از قوچ‌های آموزش دیده در فصل تولیدمثلی، هفته‌ای دو بار و با استفاده از واژن مصنوعی صورت گرفت. برای از بین بردن اثرات فردی دام‌های نر، مقادیر مساوی از نمونه‌های منی از هر چهار رأس قوچ در هر تکرار آزمایشی باهم مخلوط

[۱]- Reactive oxygen species

[۲]- Butylated hydroxy toluene

شده و سپس مورد استفاده قرار گرفت. در هر انزال نمونه‌های با غلظت بیش از ۳×۱۰^{۹} اسپرم در میلی‌لیتر، تحرک بیش از ۷۰ درصد و اسپرم غیرطبیعی کمتر از ۱۰ درصد بعنوان منی طبیعی در نظر گرفته شدند.

تهیه رقیق‌کننده، سردسازی و انجماد

برای ساخت انواع رقیق کننده‌ها از یک محیط بر پایه بافر تریس استفاده شد (تریس ۲۷/۱گرم/لیتر، اسیدسیتریک ۱٤گرم/لیتر و فروکتوز ۱۰گرم/لیتر). گلیسرول و زرده تخم مرغ بعنوان عوامل محافظ انجمادی مورد استفاده قرار گرفت. اسمولاریتی محیط پایه در ۳۲۵ میلی اسمول/کیلوگرم و اسیدیته آن در ۷/۲ تنظیم شد. قبل از شروع کار محیط‌های انجمادی در بن ماری ۳۷°C قرار داده شد. سپس زرده تخم مرغ به نسبت ۲۰ درصد و گلیسرول به نسبت هفت درصد به محیط پایه تریس اضافه شد. آنگاه سطوح مختلف BHT (۱، ۱/۵، ۲ و ۳میلی‌مولار) بعد از انجام پیش آزمایش های تعیین سطوح بهینه، به ۵ میلی‌لیتر از محیط‌های انجمادی آماده شده اضافه شد و یک تیمار به عنوان شاهد درنظر گرفته شد. رقیق‌سازی به نسبت ۱ به ۲۰ و در دمای ۳۷°C انجام شد. سپس لوله منی در ظرف محتوی ۱۰۰ میلی‌لیتر آب ۳۷°C قرار داده شد. در مرحله بعدی نمونه‌ها در یخچال ٤°C به مدت ۱۲۰ دقیقه قرار گرفتند. بلافاصله بعد از سرد نمودن نمونه‌ها در داخل پایوت‌های انجماد ۰/۲۵ میلی‌لیتر کشیده شد و به فاصله ۵ سانتی‌متری بالای سطح ازت قرار گرفتند. پس از گذشت ۱۲ دقیقه، سریعا پایوت‌ها به‌داخل ازت مایع (۱۹٦°C-) انتقال یافتند. بمنظور ارزیابی نمونه‌های منی، پایوت‌های منی را به مدت ۳۰ ثانیه در حمام آبگرم ۳۷°C قرار دادیم تا عمل یخ‌گشایی انجام شود.

ارزیابی تحرک اسپرم

بمنظور بررسی تحرک اسپرم‌ها بعد از فرایند انجماد-یخ‌گشایی از هر گروه تیماری دو پایوت یخ‌گشایی شده و به داخل لوله‌های میکروتیوب انتقال داده شدند. رقیق سازی نمونه به نسبت های مختلف برای کاهش غلظت و ارزیابی مطلوب تر انجام گرفت. سپس ۷ تا ۱۰ میکرولیتر از نمونه منی رقیق شده روی لام قرار گرفت و فراسنجه‌های حرکتی اسپرم، با استفاده از سیستم کامپیوتری ارزیابی اسپرم (CASA,Video TesT Sperm 3.1, Russia) ارزیابی شدند.

زنده‌مانی اسپرم

برای تعیین درصد اسپرم‌های زنده از محلول رنگ آمیزی ائوزین- نیگروزین استفاده شد. درصد سلول-های زنده و مرده در میدان دید میکروسکوپی با بزرگنمایی ٤۰x شمارش شدند. برای رنگ آمیزی، ۵۰ میکرولیتر از اسپرم رقیق شده با ۱۰ میکرولیتر از رنگ ائوزین نیگروزین سریعا روی لام مخلوط و گسترشی از آن تهیه شد سپس در مجاورت هوا خشک گردید. از آنجائیکه رنگ ائوزین قادر به نفوذ در اسپرم‌های زنده نمی باشد، سلول‌های با هسته بنفش بعنوان مرده و اسپرم‌های با هسته به رنگ صورتی کم‌رنگ یا سفید به عنوان اسپرم زنده در نظر گرفته و شمارش گردید.

یکپارچگی غشای اسپرم

برای ارزیابی پارامتر یکپارچگی غشای اسپرم از محلول هایپواسموتیک مطابق روش ریوال و مرود[1](فروکتوز ۹ گرم/لیتر، سیترات سدیم ٤/۹ گرم/لیتر و اسمولاریته ۱۰۰میلی اسمول/کیلوگرم) استفاده شد. بعد از یخ‌گشایی، محتوای پایوت‌ها به داخل میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری تخلیه شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰ سانتریفیوژ و سپس قسمت بالای میکروتیوب که حاوی رقیق‌کننده جدا شده و بعد از آن ۱۰ میکرولیتر از منی به ۱۰۰میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک هاس (HOS[2]) اضافه گردید. سپس در داخل انکوباتور ۳۷°C به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده و پس از گذشت این زمان وضعیت اسپرمها با تهیه حداقل سه قطره (۱۱۰ µ) از

[1] Revell and Mrode

[2] Hypo-osmotic swelling test

نمونه انکوبه شده با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست بررسی گردید. در هر گروه تیماری حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شد. سپس درصد اسپرم‌های با دم گره خورده (دارای غشای یکپارچه) نسبت به اسپرم‌های گره نخورده (دارای غشاء غیریکپارچه)، محاسبه شد.

اسپرم غیرطبیعی

برای بررسی درصد اسپرم‌های غیرطبیعی حداقل ۳ قطره از هر نمونه منی به میکروتیوب‌های حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول هانکوک اضافه و سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار داده و پس از پوشش با یک لامل حداقل ۲۰۰ اسپرماتوزوآ زیر میکروسکوپ فاز کنتراست ٤٠x اسپرم‌های غیرطبیعی (ضخیم بودن قطعه میانی، خمیدگی قطعه میانی، دم بریده، دم پیچ خورده) شمارش گردید.

اندازه‌گیری غلظت مالون دی‌آلدهید

غلظت مالون‌دی‌آلدهید (MDA)[1] بعنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید در نمونه‌های منی است که با استفاده از واکنش تیوباربیتوریک اسید اندازه‌گیری می‌شود. برای این منظور یک میلی‌لیتر از هر نمونه منی با یک میلی‌لیتر EDTA و دو میلی‌لیتر TCA[2] را با هم مخلوط کرده و به داخل لوله‌های مخروطی ریخته شدند. لوله مخروطی در g ۱۲۰۰ برای مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ کرده سپس یک میلی‌لیتر از محلول بالای لوله مخروطی با یک میلی‌لیتر TBA در میکروتیوب مخلوط گردید. لوله مخروطی برای مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۹۵°C قرارداده شد. نمونه‌ها در مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سرد شده و سپس میزان جذب نوری آنها را با استفاده از اسپکتروفتومتر و در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. در پایان، غلظت MDA (نانو مول در میلی‌لیتر منی) محاسبه گردید.

آنالیز آماری

این مطالعه در ۵ تکرار انجام شد. داده‌های حاصل از این مطالعه به صورت جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی به کمک نرم افزار SAS رویه GLM تجزیه و تحلیل شده و مقایسه میانگین‌ها به روش توکی انجام گرفت. مدل آماری این طرح عبارت است از:

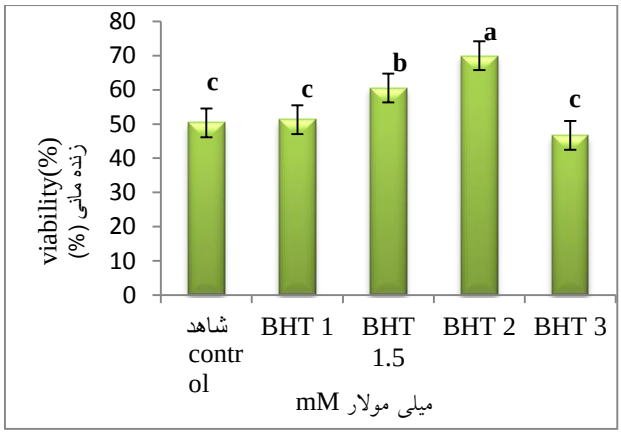
$$Y_{ij} = \mu + Treat_i + e_{ij}$$

در این مدل، Yij برابر است با داده مشاهده شده برای فراسنجه‌های اندازه‌گیری شده، μ= میانگین جامعه، Treati=اثر تیمار iام برابر است با اثر تیمار، و eij= اثر باقیمانده یا خطا بود.

نتایج

زنده‌مانی

افزودن ۱/۵ و ۲ میلی‌مولار BHT بطور معنی‌داری درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها را نسبت به گروه کنترل افزایش داد. در حالیکه افزودن سطوح بالاتر از این مقادیر (سطح ۳ میلی‌مولار) زنده‌مانی را کاهش داد (P<۰/۰۵).



شکل ۱-اثرات سطوح مختلف BHT بر درصد زنده مانی

Figure 1- Effects of different levels of BHT on viability percentage

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

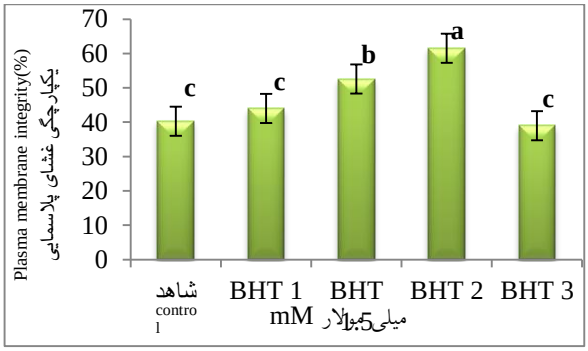
Dissimilar letters show significantly different (P < 0.05).

یکپارچگی غشای پلاسمایی

[1] Malondialdehyde
[2] Trichloroacetic acid

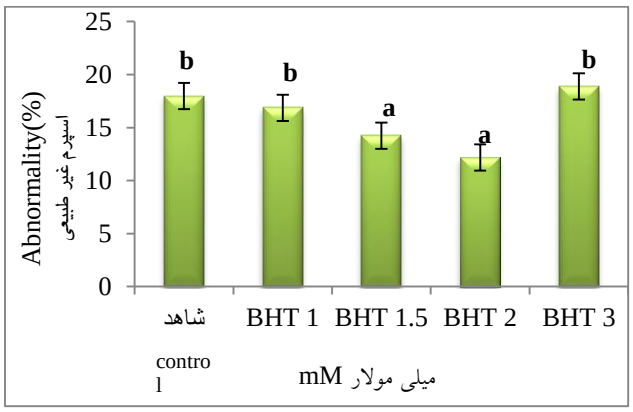
تیمار دارای ۲ میلی‌مول از BHT بیشترین افزایش یکپارچگی غشاء را نسبت به گروه شاهد داشت. تیمار ۱/۵ میلی‌مولار نیز بطورمعنی‌داری سبب افزایش یکپارچگی غشای اسپرم‌ها نسبت به گروه شاهد شد (P<۰/۰۵). تیمار ۱ میلی‌مولار تفاوت معنی داری نسبت به گروه کنترل نداشت. تیمار ۳ میلی‌مولار BHT کمترین درصد یکپارچگی غشا را نسبت به گروه‌های دیگر داشت.

نتایج این مطالعه نشان داد که تیمارهای ۱/۵ و ۲ میلی-مولار BHT باعث کاهش معنی‌دار درصد اسپرم‌های غیرطبیعی نسبت به گروه شاهد شد (P<۰/۰۵). این در حالی است که سطوح ۱ و ۳ میلی‌مولار از آن تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد ایجاد نکرد و سطح ۳ میلی‌مولار BHT بیشترین درصد اسپرم‌های غیرطبیعی را داشت.



شکل ۲-اثرات سطوح مختلف BHT بردرصد یکپارچگی غشای پلاسمایی

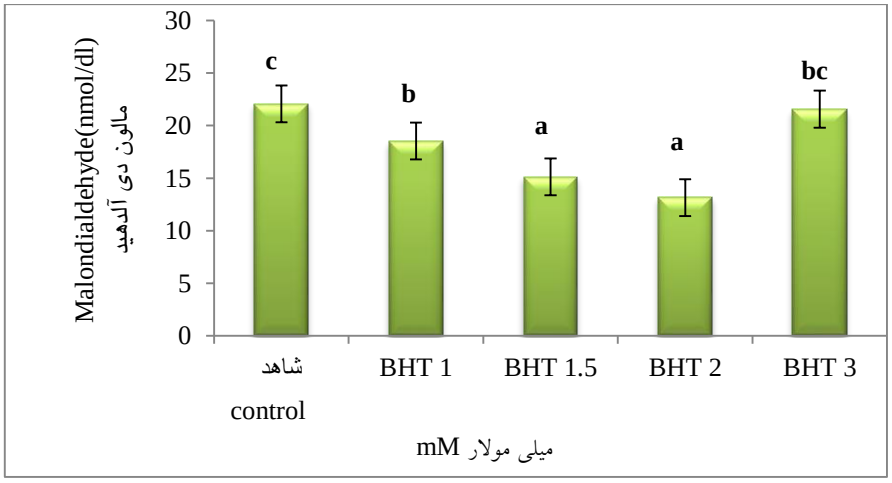
Figure 2- effects of different levels of BHT on Plasma membrane integrity percentage



شکل ۳-اثرات سطوح مختلف BHT بر درصد اسپرم غیرطبیعی

Figure 3- effects of different levels of BHT on Abnormality percentage

درصد اسپرم‌های غیرطبیعی



شکل ۴-اثرات سطوح مختلف BHT بر غلظت مالون‌دی‌آلدهید

Figure 4- Effects of different levels of BHT on malondialdehyde concentration

غلظت مالون دی‌آلدهید

تیمارهای حاوی ۱/۵ و ۲ میلی‌مولار BHT بطور معنی-داری میزان تولید مالون دی‌آلدهید را کاهش دادند

(P<۰/۰۵). بین تیمار حاوی ۱ میلی‌مولار BHT و تیمار شاهد نیز تفاوت معنی‌دار بود اما میزان کاهش تولید مالون‌دی‌آلدهید نسبت به دو تیمار ۱/۵ و ۲ میلی مولار کمتر بود (P<۰/۰۵). بین تیمار حاوی ۳ میلی‌مولار BHT و شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

ارزیابی تحرک کل و تحرک پیش‌رونده

تأثیرات سطوح مختلف BHT بر پارامترهای تحرک اسپرم در جدول ۱ آمده است. مطابق نتایج این جدول تیمارهای دارای سطوح ۱، ۱/۵، ۲ و ۳ میلی‌مولار از BHT سبب افزایش معنی‌دار تحرک کل (TM)[1]نسبت به گروه شاهد شد (P<۰/۰۵). تحرک پیش‌رونده (PM)[2] اسپرم‌ها در تیمارهای دریافت کننده ۱، ۱/۵ و ۲ میلی-مولار نسبت به گروه شاهد کاهش یافت (P<۰/۰۵) درحالیکه تیمار دریافت کننده ۳ میلی‌مولار تفاوت معنی-داری با تیمار شاهد نداشت.

پارامترهای تحرک اسپرم

با توجه به نتایج به دست آمده هیچ یک از سطوح مختلف BHT از نظر خطی بودن حرکت اسپرم‌ها (LIN)[3]با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نداشتند.

افزودن سطوح مختلف BHT باعث کاهش معنی دار تحرک عرضی سر (ALH)[4]نسبت به گروه شاهد شد (P<۰/۰۵).

افزودن ۱/۵ و ۳ میلی‌مولار باعث افزایش معنی‌دار راستی مسیر طی شده (STR)[5]نسبت به گروه شاهد شدند(P<۰/۰۵) در حالیکه سایر سطوح تغییر معنی داری را در این صفت ایجاد نکردند.

افزودن سطوح مختلف BHT تاثیر معنی‌داری در تناوب‌عرضی زنش (BCF)[6]گروه‌های مختلف تیماری نسبت به گروه شاهد ایجاد نکرد.

افزودن ۱ و ۱/۵ میلی‌مولار باعث کاهش معنی‌دار سرعت حرکت اسپرم‌ها در مسیر مستقیم (VSL)[7] نسبت به گروه شاهد شد (P<۰/۰۵) درحالیکه سایر سطوح اختلاف معنی داری با گروه شاهد ایجاد نکرد.

افزودن سطوح مختلف BHT تاثیر معنی‌داری در سرعت حرکت اسپرم‌ها در مسیر منحنی (VCL)[8] نسبت به گروه شاهد ایجاد نکرد.

تیمارهای ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌مولار از BHT میانگین سرعت در مسیر (VAP)[9]را بطور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد کاهش دادند (P<۰/۰۵) درحالیکه افزودن ۳ میلی‌مولار تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد ایجاد نکرد.

1- Total Motility (TM)

2- Progressive Motility (PM)

3- Linearity (%) (LIN = VSL/VCL × 100)

4- Lateral head displacement (micron)

5- Straightness (%) (STR= VSL/VAP × 100)

6- Beat cross frequency (Hz)

7- Straight line velocity (micron/sec)

8- Curvilinear velocity (micron/sec)

9- Average path velocity (micron/sec)

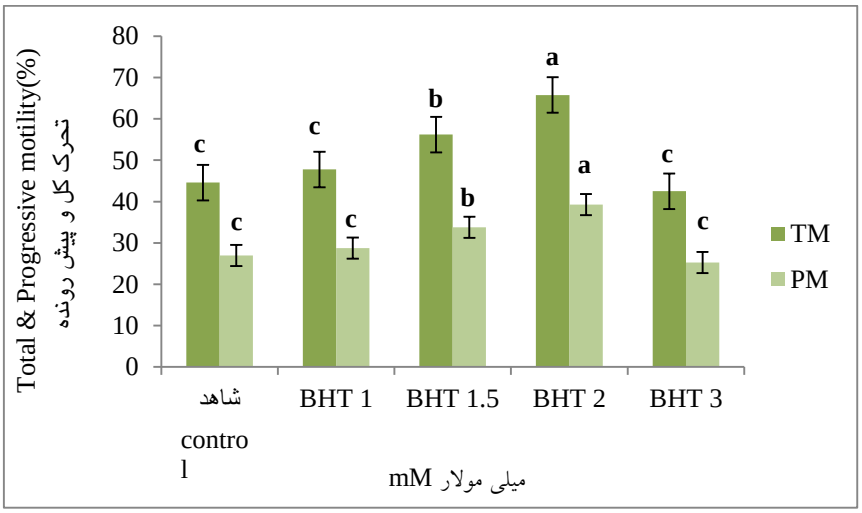
جدول ۱- مقایسه میانگین‌های پارامترهای جنبایی اسپرم قوچ بعد از فرآیند انجماد/ یخ گشایی در سطوح مختلف BHT

Table 1- comparison of ram sperm motility parameters after the process of freezing / thawing at different levels of BHT

Parameters	TM (%)	PM (%)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	STR (%)	ALH (µm)	LIN (%)	BCF (Hz)
Control	44.6^{b}±5.59	27.0^{a}±3.56	30.4^{a}±3.32	24.9^{a}±2.92	40.3^{a}±7.30	60.5^{b}±2.12	2.1^{a}±0.23	26.2^{a}±3.34	16.8^{a}±2.54
BHT 1	77.2^{a}±6.25	13.4^{b}±3.98	16.5^{b}±3.71	13.6^{b}±3.27	40.5^{a}±8.16	66.3^{ab}±2.37	1.0^{b}±0.26	25.5^{a}±3.74	14.2^{a}±2.84
BHT 1.5	76.6^{a}±5.59	14.5^{b}±3.56	16.7^{b}±3.32	13.4^{b}±2.92	42.5^{a}±7.30	68.9^{a}±2.12	1.1^{b}±0.23	23.8^{a}±3.34	17.4^{a}±2.54
BHT 2	76.5^{a}±5.59	14.1^{b}±3.98	19.4^{b}±3.32	16.3^{ab}±2.92	46.7^{a}±7.30	65.4^{ab}±2.12	1.2^{b}±0.23	23.8^{a}±3.34	14.4^{a}±2.54
BHT 3	79.3^{a}±7.22	17.0^{ab}±4.60	20.9^{ab}±4.2	17.4^{ba}±3.78	48.0^{a}±9.42	68.5^{a}±2.78	1.1^{b}±0.30	28.3^{a}±4.32	12.1^{a}±3.28

میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می باشند (P<۰/۰۵).

Mean within same column with different superscripts differ (P< 0.05)



شکل ۵- اثرات سطوح مختلف BHT بر درصد تحرک کل و پیش‌رونده

Figure 5- Effects of different levels of BHT on Total & Progressive motility percentage

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

Dissimilar letters show significantly different (P < 0.05).

بحث

وقتی اسپرماتوزوآ در طی محافظت سرمایی در معرض آسیب قرار می‌گیرد، شرایط برای تولید ROS افزایش می‌یابد و از طرف دیگر کمبود آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در منی رقیق شده اسپرم‌ها را آسیب‌پذیرتر می‌نماید. بنابراین برای اینکه شرایط منی به حالت اول برگردد، اضافه نمودن سطوح طبیعی آنتی‌اکسیدان‌ها در فرآیند فرآوری انجماد منی ضروری است (ایجاز و همکاران ۲۰۰۹). ویتامین E که جزو آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی طبقه‌بندی می‌شود بیشتر از آلفاتوکوفرول تشکیل یافته و بعنوان ماده‌ای قوی جهت حذف رادیکال‌های آزاد به کار می‌رود، بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن نیز از آنالوگ‌های سنتتیک ویتامین E است که به عنوان آنتی‌اکسیدان در صنایع مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. گراهام و همرستد در سال ۱۹۹۲ گزارش دادند که BHT آنتی‌اکسیدانی فنولی است که به درون غشای اسپرم نفوذ می‌کند و در نتیجه باعث کاهش ویسکوزیته لیپیدهای غشا می‌شود. سیالیت غشا هنگامی که دما کاهش می‌یابد، کم می‌شود و در نتیجه افزودن این آنتی اکسیدان باعث کاهش نفوذپذیری غشای اسپرم هنگام قرار گرفتن در معرض شوک سرمایی می‌شود. همچنین نشان داده شده است که BHT با تبدیل رادیکال‌های پراکسی به هیدرو پراکسیدها از فعالیت زیانبار آنها جلوگیری می‌کند (ایجاز و همکاران ۲۰۰۹). در پژوهش حاضر به

بررسی اثرات سطوح مختلف این ماده در فرآیند انجماد و یخ‌گشایی پرداخته شده است. در این مطالعه افزودن سطوح ۱/۵ و ۲ میلی‌مولار BHT زنده‌مانی اسپرم‌ها را بطور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش داد. این در حالی است که افزودن سطح بالاتر از این مقادیر تأثیر معکوسی بر زنده‌مانی داشته و افزودن سطح ۳ میلی‌مولار زنده‌مانی را کاهش داد. نتایج مطالعه تجویدی عصر و همکاران (۱۳۹۱) روی اسپرم گاومیش نیز نشان داد بالاترین درصد زنده مانی اسپرم‌ها با افزودن ۲ میلی‌مولار BHT بدست آمد و با بالا بردن سطح این آنتی‌اکسیدان به ۳ میلی‌مولار درصد زنده‌مانی کاهش یافت، در واقع بالا بردن سطح آنتی‌اکسیدان مورد استفاده با برهم زدن تعادل بین آنتی‌اکسیدان‌ها و اکسیژن‌های فعال سبب افت جنبایی اسپرم‌ها می‌شود. صادقی پناه و همکاران (۱۳۹٤) نیز بالاترین درصد زنده‌مانی اسپرم بز مرخز را در سطح ۱ میلی‌مولار بدست آوردند و با افزایش سطوح BHT با کاهش درصد زنده‌مانی مواجه شدند. بامبا و کران در سال ۱۹۹۲ مشاهده کردند که غلظت بیشتر از ۲ میلی‌مولار هیچ اثر محافظتی بر اسپرم بز بوئر در فرآیند انجماد-ذوب ندارند. نتایج ویژگی‌های حرکتی اسپرم ذوب شده بز مرخز نشان داد که رقیق کننده حاوی سطوح مختلف BHT نسبت به شاهد باعث تغییر صفات یکپارچگی غشا و زنده‌مانی اسپرم پس از انجماد و ذوب شد (صادقی‌پناه و همکاران ۱۳۹٤). در بین سطوح مختلف، سطح ۱ میلی‌مولار باعث افزایش معنی‌دار درصد اسپرم‌های زنده و یکپارچه بز مرخز در مقایسه با گروه شاهد شده است. تیمارهای دارای سطوح ۱، ۱/۵، ۲ و ۳ میلی‌مولار از BHT باعث افزایش معنی‌دار تحرک کل اسپرم‌ها نسبت به گروه شاهد شد که تیمار دارای ۳ میلی‌مولار بیشترین تاثیر را داشت ($P<۰/۰۵$). تحرک پیش‌رونده در تیمارهای دریافت کننده سطوح ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌مولار BHT نسبت به گروه شاهد کاهش معنی-داری را نشان داد ($P<۰/۰۵$).

در پژوهشی که توسط صادقی پناه و همکاران (۱۳۹٤) انجام شد رقیق کننده حاوی سطح ۱ میلی‌مولار BHT نسبت به سطوح دیگر بطور معنی‌داری باعث تغییر صفات جنبایی و جنبایی پیشرونده اسپرم پس از انجماد و ذوب شد. در واقع فرآیند انجماد-ذوب موجب تغییراتی در مورفولوژی اسپرم می‌شود که این تغییرات باعث آسیب به غشای آکروزوم و میتوکندری اسپرم می‌گردد. این امر سبب می‌شود که تنها درصد کمی از اسپرم‌ها بعد از انجماد-ذوب دارای غشای سالم و فعالیت طبیعی میتوکندری باشند و در نتیجه تعداد اسپرم‌های جنبای کمتری بعد از انجماد-ذوب وجود خواهد داشت. مرینو و همکاران (۲۰۱۵) نیز نشان دادند که با افزایش سطح BHT مورد استفاده در منی منجمد انسان درصد تحرک پیش‌رونده به شدت کاهش می‌یابد و در سطوح بالاتر نزدیک صفر می‌شود. ترزینسکا و همکاران (۲۰۱۵) با مطالعه روی اسپرم خوک نشان دادند که سطوح ۱ و ۲ میلی‌مولار BHT سبب بهبود تحرک کل و پیش‌رونده شده و نیز زنده‌مانی اسپرم‌ها را بطور معنی داری در مقایسه با گروه شاهد بالا می‌برد. نتایج این آزمایش با گزارش واتسون و اندرسون (۱۹۸۳) مطابقت دارد که نشان دادند سطح ٤ میلی‌مولار BHT باعث کاهش معنی‌دار مقدار باروری اسپرم قوچ شده است، در خوک BHT باعث کاهش معنی دار مقدار آسیب آکروزمی می‌گردد و میزان ٤ میلی‌مولار آن باعث افزایش مقدار پراکسیداسیون لیپید می‌گردد که بر اسپرم اثر منفی می‌گذارد (پورسل و گراهام ۱۹٦۷). در واقع BHT با دو مکانیسم محافظتی آسیب‌های ناشی از انجماد را کاهش می‌دهد: ۱) به غشای اسپرماتوزوآ وارد شده و سیالیت غشا را افزایش داده باعث محافظت آن می‌شود، ۲) از فعالیت زیان‌آور رادیکال‌های لیپید پراکسید با تبدیل آنها به هیدروپراکسیدها، جلوگیری می‌کند (آیتکن و کلارکسون ۱۹۸۸). در پژوهش حاضر افزودن مقدار ۱/۵ و ۲ میلی‌مولار BHT میزان پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش داده و سبب کاهش

تولید مالون‌دی‌آلدهید شد اما با افزایش غلظت آنتی-اکسیدان مورد استفاده نتیجه بطور معکوسی تغییر یافته و تولید مالون‌دی‌آلدهید افزایش یافت. مطابق همین تحقیقات، مطالعه ممون و همکاران (۲۰۱۱)، نیز نشان داد به کار بردن تیمارهای دارای ۱ و ۲ میلی‌مولار BHT سبب افزایش کیفیت اسپرم‌ها شده و زنده‌مانی، تحرک و یکپارچگی غشا را افزایش می‌دهد. نتایج مشابه نیز در غلظت‌های بالا نشان دادند که برای اسپرماتوزوآی گاو (شعاعی و ضمیری ۲۰۰۸)، بز (خلیفا و همکاران ۲۰۰۸)، انسان (آیتکن و کلارکسون ۱۹۸۸) و دیگر گونه‌های حیوانی (روکا و همکاران ۲۰۰٤ و بامبا و کران ۱۹۹۲) سمی است. ایجاز و همکاران (۲۰۰۹) نیز در تحقیق خود روی گاومیش نشان دادند، افزودن ۳ میلی‌مول BHT به رقیق کننده تریس–سیترات زرده تخم‌مرغ باعث کاهش‌معنی‌دار فراسنجه‌های اسپرماتوزوآ طی انجماد نمونه ها می‌شود. نتایج مطالعات تجویدی عصر و همکاران نیز با نتایج حاضر همخوانی داشته و نتایج آنها نشان داد که تحرک و یکپارچگی آکروزم اسپرماتوزوآ بعد از یخ‌گشایی بدلیل افزودن غلظت‌های مختلفBHT (۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی-مول) با رقیق کننده تریس–سیترات زرده تخم‌مرغ بهبود یافت. بیشترین تحرک و یکپارچگی آکروزم اسپرماتوزوآ در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌مول BHT به دست آمد. نتایج مطالعات صادقی پناه و همکاران (۱۳۹٤) نشان داد بین سطوح مختلف BHT از نظر پارامترهای میانگین سرعت در مسیر، سرعت در مسیر مستقیم، خطی بودن جنبایی، تحرک عرضی سر و درصد اسپرم‌های غیرطبیعی تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. تفاوت‌های موجود در نتایج این پژوهش‌ها احتمالا به نوع حیوان مورد آزمایش، نوع رقیق کننده یا روش انجمادی مربوط می‌باشد.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که سطوح ۱/۵ و ۲ میلی-مولار BHT باعث بهبود پارامترهای زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی، درصد اسپرم های غیرطبیعی، غلظت مالون‌دی‌آلدهید و تحرک کل بعد از فرآیند انجماد و یخگشایی شده درحالیکه سطوح بالاتر از این مقادیر باعث افت این پارامترها شدند. بنابر این BHT به عنوان آنتی‌اکسیدان می‌تواند آسیب‌های ناشی از گونه‌های اکسیژن فعال را کاهش دهد، ولی مطالعات بیشتری بمنظور بررسی تأثیر سطوح مختلف BHT در فرآیند انجماد و یخ‌گشایی نیاز است.

منابع مورد استفاده

تجویدی عصر ص، کهرام ح، بهشتی ر و اشرفی ا، ۱۳۹۱. اثر آنتی‌اکسیدانی بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن بر فراسنجه‌های اسپرم گاومیش پس از فرآیند انجماد–یخ‌گشایی. تحقیقات دام و طیور. جلد ۱، شماره۳، ص ۹ تا ۱۷.

صادقی پناه ح، نائیجیان ح ر و مسعودی ر، ۱۳۹٤. اثرات آنتی‌اکسیدانی بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن در رقیق کننده بر پایه لستین سویا بر فراسنجه های کیفی اسپرم منجمد–ذوب شده ی بز مرخز. دامپزشکی ایران. جلد ۲، شماره ۱۱، ص ۱ تا ۱۰.

Aitken RJ, 1995. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. Reproduction, Fertility, and Development 7: 659-668.

Aitken RJ and Clarkson JS, 1988. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. Journal of Andrology 9: 367-376.

Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW and Van Duin M, 1995. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa is involved in the control of human sperm function. Journal of Cell Science 108: 2017–2025.

Bailey JL, Bilodeau JF and Cormier N, 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. Journal of Andrology 21: 1-7.

Bamba K and Cran DG, 1992. Effects of treatment with butylated hydroxytoluene on the susceptibility of boar spermatozoa to cold stress and dilution. Journal of Reproduction and Fertility 95: 69-77.

Bansal AK and Bilaspuri GS, 2011. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. Veterinary Medicine International 1-7.

Forouzanfar M, Fazilati M, Hosseini SM, Moulavi F, Hajian M, Salehi AE, Rabiei AE and Nasresfahani MH, 2007. Investigation of different glycerol and Egg Yolk concentration on freezing Bakhtiari Ram Semen. Iranian Anatomical Sciences 5: 17-25.

Graham JK and Hammerstedt RH, 1992. Differential effects of butylated hydroxytoluene analogs on bull sperm subjected to cold-induced membrane stress. Cryobiology 29: 106-117.

Ijaz A, Hussain A, Aleem M, Yousaf MS and 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.

Khalifa TA, Lymberopoulos AG and El-Saidy BE, 2008. Testing usability of butylated hydroxytoluene in conservation of goat semen. Reproduction in Domestic Animals 43: 525-530.

Maxwell WMC and Watson PF, 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. Animal Reproduction Science 42: 55-65.

Memon AA, Wahid H, Rosnina Y, Goh YM, Ebrahimi M, Nadia F and Audrey G, 2011. Effect of butylated hydroxytoluene on cryopreservation of Boer goat semen in Tris egg yolk extender. Animal Reproduction Science 129: 44–49.

Merino O, Aguagüina WE, Esponda P, Risopatrón J, Isachenko E, Isachenko V and Sánchez R, 2015. Protective effect of butylated hydroxytoluene on sperm function in human spermatozoa cryopreserved by vitrification technique. Andrologia. 47:186–193.

Pursel VG and Graham EF, 1967. Phospholipids of bovine spermatozoa and seminal plasma. Journal Reproduction and Fertility 14: 203-211.

Revell SG and Mrode RA, 1994. An osmotic resistance test for bovine semen Animal Reproduction Science 36: 77-86.

Roca J, Gil MA, Hernandez M, Parrilla I, Vazquez JM and Martinez EA, 2004. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. Journal of Andrology 25: 397-405.

Shoae A and Zamiri MJ, 2008. Effect of butylated hydroxytoluene on bull spermatozoa frozen in egg yolk-citrate extender. Animal Reproduction Science 104: 414-418.

Trzcinska M, Bry1a M, Gajda B and Gogol P, 2015. Fertility of boar semen cryopreserved in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. Theriogenology 83: 307-313.

Watson PF and Anderson WJ, 1983. Influence of butylated hydroxytoluene (BHT) on the viability of ram spermatozoa undergoing cold shock. Journal of Reproduction and Fertility 69: 229-235.

Effect of adding Butylated hydroxytoluene as a synthetic antioxidant on freezing/thawing process of ram semen

F Zareh Ghaleh Jig[1], H Daghigh Kia[2*], Gh Moghaddam[3] and S Alijani[2]

Received: July 01, 2016 Accepted: September 10, 2016
[1]MSc Graduated, Department of Animal Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]Associate Professor, Department of Animal Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[3] Professor, Department of Animal Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

[*]Corresponding author: daghighkia@tabrizu.ac.ir

Abstract

BACKGROUND: One of the reasons for reduction of fertility in sperm is extra production of free radicals during various stages including cryopreservation, storage and freeze-thawing process of sperm. Free radicals lead to changes in biochemical and ultrastructure of the sperm membrane, decreasing survival rate after thawing of sperm. Butylated hydroxytoluene (BHT) is a synthetic analogue of vitamin E that controls the auto-oxidation reaction by converting peroxy radicals to hydroperoxides. **OBGECTIVES:** The purpose of this study was to investigate the effects of different levels of Butylated hydroxytoluen (BHT) to improve the quality of ram semen in the process of freezing/thawing. **METHODS:** In this study, five rams were used for semen collection twice a week. Different levels of BHT (1, 1.5, 2, 3 mM) were added to tris-yolk based diluents. After freezing-thawing of semen samples, the dynamic parameters, viability, membrane integrity, sperm abnormality and lipid peroxidation (MDA) were evaluated. **RESULTS:** the addition of 1.5, 2 mM BHT significantly improved total and progressive motility, viability and plasma membrane integrity and decreased the sperm abnormality percentage compared with the control group ($P< 0.05$). Addition of 1.5 and 2 mM BHT was significantly reduced MDA concentration ($P < 0.05$). Treatments 1 and 2 mM significantly decreased sperm straight line velocity. Treatments 1 mM showed significant differences with the control group regarding beat cross frequency of sperm. Treatments 1.5, 2 and 3 mM were significantly increased sperm curvilinear velocity. **CONCLUSIONS:** Statistical analysis of data showed that the addition of BHT to semen diluent improves the majority of sperm parameters after thawing.

Keywords: Sperm, Free Radicals, BHT, Freezing/Thawing