اثرات آنتی‌اکسیدانی بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن (BHT) در رقیق کننده بر پایه‌ی لستین سویا بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم منجمد-ذوب شده‌ی بز مرخز

حسن صادقی‌پناه[۱*]، حمیدرضا نائیجیان[۲] و رضا مسعودی[۲]

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۱۳

چکیده

این تحقیق با هدف بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن (BHT) بر فراسنجه‌های اسپرم بز مرخز پس از فرآیند انجماد- ذوب انجام شد. نمونه‌های منی توسط واژن مصنوعی از ۴ رأس بز نر بالغ، هفته‌ای ۲ بار جمع‌آوری شد. سطوح مختلف BHT (۰، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌مولار) در رقیق‌کننده‌ای که شامل تریس، فروکتوز و ۱/۵ درصد لستین سویا بود، استفاده شد. نمونه‌های اسپرم با رقیق‌کننده‌های مورد نظر رقیق و تا ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد سرد و سپس در معرض بخار ازت منجمد و در تانک حاوی ازت مایع ذخیره شدند. فراسنجه‌های جنبایی، زنده‌مانی، یکپارچگی غشاء، مرفولوژی و حالت آکروزومی اسپرم بز مرخز پس از انجماد- ذوب مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که رقیق‌کننده حاوی ۱ میلی‌مولار BHT در مقایسه با گروه شاهد موجب بهبود در میزان جنبایی، جنبایی پیشرونده، یکپارچگی غشاء و زنده‌مانی اسپرم می‌شود ($P<۰/۰۵$). سطوح مختلف BHT اثر معنی‌داری روی مرفولوژی و حالت آکروزومی اسپرم نداشتند ($P>۰/۰۵$). بر اساس نتایج این پژوهش به نظر می‌رسد که افزودن سطح ۱ میلی‌مولار BHT به رقیق‌کننده بر پایه‌ی ۱/۵ درصد لستین سویا، باعث بهبود معنی‌دار پارامترهای کیفیت اسپرم منجمد- ذوب شده، از جمله جنبایی و زنده‌مانی می‌شود.

کلمات کلیدی: بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن، لستین سویا، اسپرم منجمد، بز مرخز

مقدمه

در مورد گونه‌هایی که در خطر انقراض هستند، روش‌های حفاظت، مدیریت و کنترل تولید مثل از جنبه‌های گسترده‌تر باید مورد توجه قرار گیرند. بز مرخز یکی از نژادهای منحصر به فرد و یک منبع ژنتیکی با ارزش در منطقه‌ی کردستان است. در چند سال اخیر جمعیت آن به شدت کاهش یافته و در حال حاضر به حدود ۲۰۰۰ رأس رسیده است، به طوری که می‌توان گفت که این نژاد در خطر نابودی قرار گرفته است. در چنین شرایطی هر حرکتی که بتواند در حفظ و توسعه‌ی این نژاد مؤثر باشد، ضروری است. در چارچوب حفظ نژاد، جمع‌آوری، فرآوری، انجماد و ذخیره‌ی اسپرم با باروری مناسب، ابزاری کارآمد است. وجود چنین روشی، راهی مناسب جهت نگه داشتن مجموعه‌ی ژنی یک دام برای مدت طولانی، پخش و گسترش ژن‌های کمیاب است. بز مرخز، بومی نواحی کردنشین است و به نام محلی (بزنه‌مه‌رز) تنها بز تک پوششی کشور و تولیدکننده‌ی الیاف موهر (الیافی براق، ظریف و نرم) با نام محلی (مه‌رز) است. شواهد نشان می‌دهد که منطقه‌ی پرورش این نژاد در گذشته مناطق کردنشین استان‌های آذربایجان غربی (بوکان، مهاباد، سردشت، پسوه و منطقه‌ی ترگورومرگور ارومیه)، کرمانشاه (اورامانات) و کردستان (بانه، سقز، مریوان و بیجار) بوده، ولی در حال حاضر این منطقه به شمال غربی استان کردستان و بالاخص بخش‌های آلوت و آرمرده شهرستان بانه محدود شده

[۱*] استادیار موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، کرج
E-mail: h.sadeghipanah@gmail.com (نویسنده‌ی مسئول)
[۲] باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

است. در زیستگاه اصلی (بخش‌های آلوت و آرمرده شهرستان بانه)، بز مرخز به صورت گله‌های خالص (بدون وجود گوسفند و بز مویی) توسط کوخ نشین‌ها پرورش داده می‌شود، ولی در سایر مناطق اغلب نگهداری آن با بزهای موئی و گوسفند همراه است. یک یا چند خانوار یک واحد تولیدی به نام «کوخ» تشکیل می‌دهند و در مساحت مشخصی از مراتع مشجر منطقه اقدام به پرورش این بز می‌نمایند. منبع غذایی این بزها با شروع و اتمام فصل رویش، گیاهان مرتعی و در سایر مقاطع سال غالباً برگ درختان بلوط است (مفاخری ۱۳۹۰). بز مرخز در کشورهای دیگر به نام آنقوره معروف است (Pattie et al. 1990).

تلقیح مصنوعی مهم‌ترین روشی است که تاکنون برای ارتقای ژنتیکی حیوانات مزرعه‌ای ابداع گردیده است. این موضوع به این دلیل است که تعداد اندکی از دام‌های نر انتخاب شده قادر به تولید تعداد کافی اسپرم برای بارورسازی هزاران دام ماده در هر سال هستند، در حالی که در روش جفت‌گیری طبیعی و حتی با استفاده از روش‌هایی نظیر انتقال جنین فقط تعداد قابل قبولی نتاج به ازای هر دام ماده در سال حاصل می‌شود؛ به عبارت دیگر می‌توان گفت که تلقیح مصنوعی ارزشمندترین اقدام مدیریتی است که در سراسر جهان جهت حفظ منابع دامی مورد استفاده قرار می‌گیرد. استفاده از منی منجمد شده‌ی گاو شیری در برنامه‌ی تلقیح مصنوعی، نسبت به دیگر حیوانات اهلی رایج است و در مورد بز و گوسفندان شیری در چند سال گذشته به ویژه در کشورهای اروپایی افزایش یافته است (Anzar et al. 2003). موفقیت در برنامه‌ی تلقیح مصنوعی بز، به مدیریت صحیح جمع‌آوری منی، محافظت از اسپرم در برابر انجماد و چگونگی استفاده آن روی بزهای ماده با باروری بالا بستگی دارد، به طوری که با استفاده از ذخایر اسپرم بزهای نر اصیل با صفات ژنتیکی برتر و به کارگیری یک سیستم تلقیح مصنوعی کارآمد می‌توان با بارور نمودن چندین بز ماده، انتخاب را در جمعیت بزها تسریع و به این طریق، ژن مطلوب حیوان مزرعه‌ای را گسترش داد. یکی از اهداف حفاظت از انجماد منی حیوانات مزرعه‌ای، استفاده از آن در برنامه‌های تلقیح مصنوعی است و موفقیت در حفاظت از انجماد منی، مزیت‌های تلقیح مصنوعی را در اصلاح نژاد دام‌های بومی افزایش خواهد داد (Andrabi et al. 2006). در پستانداران، پلاسمای منی حاوی برخی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و پاک کننده‌های رادیکال‌های آزاد شبیه ویتامین E، C، هیپوتائورین، تائورین و آلبومین می‌باشد (Holt 2000). با پیشرفت در روش تلقیح مصنوعی، منی برای تولید حداکثر تعداد دوزها از یک انزال، رقیق می‌شود و تکرار این عمل باعث کاهش غلظت‌های ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی اسپرم شده، در نتیجه اسپرم‌ها آسیب‌پذیر می‌شوند. وقتی اسپرماتوزوآ در طی محافظت سرمایی در معرض آسیب قرار می‌گیرند، شرایط برای تولید (رادیکال‌های آزاد اکسیژن) 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 فراوری انجماد منی ضروری است (Ijaz et al. 2009). بوتیلیتد هیدروکسی‌تولوئن (BHT) یک آنالوگ سنتتیک ویتامین E است که واکنش اتواکسیداسیون را به وسیله‌ی تبدیل رادیکال‌های پرکسی به هیدروپرکسیدها کنترل می‌کند. BHT به صورت کریستال‌های جامد سفید با بوی ضعیف می‌باشد. در آب و پروپیل گلایکول نامحلول است، اما به راحتی در الکل حل می‌شود. علی‌رغم تأثیرات بسیار مثبت زرده‌ی تخم‌مرغ برای محافظت از اسپرم، در سال‌های اخیر پژوهشگران به دنبال راهکاری برای حذف و یا کاهش مقدار زرده‌ی تخم‌مرغ در رقیق کننده‌های منی پستانداران هستند. زرده‌ی تخم-مرغ به طور طبیعی حاوی آلودگی‌های مایکوپلاسمایی است که می‌تواند از طریق رقیق کننده‌های منی باعث انتقال آن به صورت درون گونه‌ای و بین گونه‌ای شود

(Gil et al. 2003). این آلودگی‌ها نه تنها به مناطق اطراف منتقل می‌شوند، بلکه از طریق صادرات اسپرم به کشورهای دیگر هم قابل انتقال هستند (Aires et al. 2003) و می‌توانند باعث شیوع انواع بیماری‌ها مثل آنفلونزای مرغی و ... شوند. Bousseau معتقد است که این آلودگی‌ها علاوه بر آن که می‌توانند باعث انتقال یک بیماری شوند، ممکن است میکروارگانیزم‌های موجود با تولید بعضی از سموم روی اسپرم تأثیر گذاشته و باعث مرگ آن‌ها می‌شوند (Bousseau et al. 1998). لستین سویا حاوی مقدار بالایی از فسفولیپیدهای شبیه زرده‌ی تخم‌مرغ است. لستین در حدود ۱۰ درصد از فسفولیپیدهای زرده را تشکیل می‌دهد و با توجه به حضور فسفولیپیدهای مشابه زرده در سویا می‌توان از آن به عنوان یک جایگزین گیاهی مناسب استفاده نمود. استفاده از منابع جایگزین گیاهی این امکان را به وجود می‌آورد که حذف منابع آلودگی به طور کامل صورت بگیرد (Fukui et al. 2007). نتایج مطالعات گسترده بیانگر خطر بالای انتقال بیماری‌های بین‌گونه‌ای و درون-گونه‌ای در استفاده از رقیق‌کننده‌های با منشأ حیوانی است. چندین محصول جدید رقیق‌کننده با منشأ گیاهی توسط کشورهای اروپایی به بازار مصرف عرضه شده که فرمول آن‌ها ناشناخته است. با توجه به هزینه‌ی نسبتاً بالای خرید این رقیق‌کننده‌ها لازم است که جهت ساخت رقیق‌کننده‌ی کارآمد با بهره‌گیری از نگهدارنده‌های با منشأ گیاهی در داخل کشور اقدام شود. با توجه به مطالب ذکر شده هدف از این آزمایش بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی سطوح مختلف BHT (۰، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌مولار) در رقیق-کننده‌ی حاوی ۱/۵ درصد لسیتین سویا روی فراسنجه‌های کیفی اسپرم بز مرخز بعد از فرآیند انجماد- ذوب بود.

مواد و روش کار

در این تحقیق از منی ۴ رأس بز نژاد مرخز، با سن ۴-۳ سال و متوسط وزن ۵۰-۶۵ کیلوگرم در مؤسسه‌ی علوم دامی کشور (واقع در کرج، استان البرز) استفاده شد. جمع‌آوری منی بزهای آموزش دیده به صورت هفته‌ای ۲ بار و در فصل تولید مثلی (اواخر شهریور تا اواسط دی ماه) صورت گرفت (Amoah and Gelaye 1997). بلافاصله پس از اسپرم‌گیری، نمونه‌ی منی در آب ۳۷°C قرار گرفت و برای ارزیابی کیفیت اسپرم به آزمایشگاه انتقال داده شد. فقط از نمونه‌هایی برای انجماد استفاده شد که دارای منی با غلظت بیش‌تر از $۲/۵\times۱۰^{۹}$ اسپرم در میلی‌لیتر، حداقل جنبایی ۷۵ درصد و مرفولوژی طبیعی بیش از ۸۵ درصد بودند. از نمونه‌های منی هر دام به یک مقدار مساوی در یک لوله‌ی آزمایش مجزا ریخته و با توجه به احتمال اثرات متقابل بین نمونه‌ها، نمونه‌های منی با هم مخلوط شد. محیط پایه‌ی مورد استفاده شامل تریس (۳۰/۷ گرم/لیتر)، سیتریک اسید (۱۶/۴ گرم/لیتر)، فروکتوز (۱۲/۶ گرم/لیتر)، لستین سویا (۱۵ گرم/لیتر)، مقدار گلیسرول ۵ درصد (V/V) و جنتامایسین (۰/۶ گرم/لیتر) بود. اسمولاریتی محیط پایه ۴۲۵ میلی‌اسمولار و pH آن بر روی ۷ تنظیم شد. تیمارهای آزمایشی حاوی ۵ سطح (۰، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌مولار) بوتیلیتید هیدروکسی تولوئن (BHT) بودند.

برای انجماد، ابتدا نمونه‌های آزمایشی در پایوت‌های ۰/۵ میلی‌لیتری بسته‌بندی شده و به مدت ۲ ساعت در دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از طی دوره‌ی تعادل، پایوت‌ها در فاصله‌ی ۵ سانتی‌متری به مدت ۱۰ دقیقه در معرض بخار ازت مایع منجمد و سپس در ازت مایع غوطه‌ور شده و برای نگهداری به تانک ازت منتقل شدند (Naijian et al. 2013).

برای ذوب منی، پس از خارج کردن پایوت‌های حاوی منی از ازت، پایوت‌ها، به مدت ۳۰ ثانیه در داخل آب گرم ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس پایوت‌ها به داخل لوله‌های اپندورف تخلیه شدند (Ijaz et al. 2009).

ارزیابی اسپرم‌ها پس از ذوب شدن

اولین فراسنجه‌ی مورد ارزیابی در این تحقیق بررسی جنبایی اسپرم پس از ذوب شدن بود. به این منظور ۳

پایوت از هر گروه تیماری ذوب شده و به داخل لوله‌های اپیندورف انتقال داده شدند؛ سپس با استفاده از سمپلر متغیر و با برداشتن ۷ تا ۱۰ میکرولیتر از منی روی لام و گذاشتن یک لامل تمیز روی آن، لام مورد نظر با استفاده از سیستم آنالیز اسپرم کامپیوتری بررسی شد. پس از بررسی نمونه‌های اسپرم به وسیله‌ی نرم‌افزار CASA، میزان جنبایی اسپرم‌ها ثبت گردید (Bucak et al. 2010). پارامترهای حرکتی ارزیابی شده شامل درصد جنبایی کل و پیش رونده، VAP (میانگین سرعت در مسیر منحنی الخط بر حسب میکرومتر بر ثانیه)، VSL (سرعت مستقیم الخط اسپرم‌ها برحسب میکرومتر بر ثانیه)، ALH (حداکثر دامنه‌ی حرکات جانبی برحسب درصد) و LIN (معیار خطی بودن حرکت برحسب درصد) بودند.

در این مطالعه برای بررسی یکپارچگی غشای اسپرم‌ها، از محلول هیپواسموتیک استفاده شد. محیط هیپواسموتیک بر اساس اسمولاریتی محیطی که اسپرم در آن قرار می‌گیرد، عمل می‌کند. در این آزمایش از محیط با فشار اسمزی ۱۰۰ میلی‌اسمولار در لیتر استفاده گردید. اسمولاریته محلول توسط دستگاه اسمومتر سنجیده شد. فشار اسمزی طبیعی برای اسپرم‌های بز ۴۲۵ میلی‌اسمولار در لیتر است. بنابراین اسپرم با قرار گرفتن در یک محیط با اسمولاریتی پایین به سرعت واکنش نشان می‌دهد. واکنش اسپرم‌ها به محیط هیپواسمول به صورت تورم دم می‌باشد. در این حالت اسپرم‌هایی که غشای پلاسمایی سالمی دارند به محلول واکنش داده ولی اسپرم‌های ناسالم بدون واکنش باقی می‌مانند. در واقع پس از انجام این آزمایش اسپرم‌های با دم گره خورده به عنوان اسپرم‌های زنده و اسپرم‌هایی که دم آن‌ها صاف است به عنوان اسپرم مرده تلقی می‌شوند . در تحقیق حاضر آزمایش تورم هیپواسموتیک مطابق با روش Revell و Morde (۱۹۹۴) انجام شد. مقدار ۱۰ میکرولیتر از اسپرم ذوب شده با ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک که مواد آن در جدول ۱ آمده است، مخلوط گردید و سپس ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از گذشت این زمان و با تهیه حداقل ۳ قطره (۱۰µl) از نمونه‌ی انکوبه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شد. بررسی میکروسکوپی با استفاده از یک صفحه‌ی داغ در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی-گراد و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ صورت گرفت. در هر گروه تیماری حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم-های دارای غشای یک‌پارچه محاسبه شد (Purdi 2006).

جدول ۱: اجزای مواد تشکیل دهنده‌ی محیط HOST برای ارزیابی یکپارچگی غشای اسپرم

مواد	مقدار
فروکتوز	۹ (گرم/لیتر)
سیترات سدیم	۴/۹ (گرم/لیتر)
اسمولاریتی	۱۰۰ (mOsm/L)

برای ارزیابی میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها از رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین استفاده گردید. مواد تشکیل دهنده‌ی این محیط در جدول ۲ آمده است. اساس این رنگ‌آمیزی بدین صورت است که رنگ ائوزین به داخل اسپرم‌های مرده نفوذ می‌کند، در حالی که اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. برای این رنگ‌آمیزی ۲۰µl از نمونه‌ی اسپرم بر روی لام قرار گرفت. مقدار ۲۰µl از رنگ آماده شده ائوزین- نیگروزین روی نمونه ریخته شد و به آرامی نمونه هم زده شد تا اسپرم با رنگ مخلوط شود. پس از ۳۰ ثانیه ۲۰µl از نمونه برداشته شد و بر گوشه‌ی لام دیگری گذاشته و با یک لام دیگر روی لام به آرامی گسترش تهیه شد . پس از خشک شدن، لام زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ قرار داده شد و برای شمارش اسپرم‌ها از بخش‌های مختلف آن عکس گرفته شد . از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده) محاسبه شد (Evans and Maxwell 1987).

جدول ۲: اجزای مواد تشکیل دهنده‌ی محیط ائوزین-نیگروزین جهت بررسی زنده‌مانی اسپرم

مواد	مقدار
رنگ ائوزین	۱۶/۷ (گرم/لیتر)
سیترات سدیم	۲۹ (گرم/لیتر)
رنگ نیگروزین	۱۰۰ (گرم/لیتر)

برای ارزیابی اسپرم با مرفولوژی غیرطبیعی حداقل ۳ قطره از هر نمونه به میکروتیوب‌های حاوی ۱ سی‌سی محلول هانکوک که شامل فرمالین ۳۷ درصد (۶۲/۵ میلی‌لیتر)، محلول سالین (۱۵۰ میلی‌لیتر)، محلول بافر فسفات (۱۵۰ میلی‌لیتر) و آب دو بار تقطیر (۵۰۰ میلی-لیتر) می‌باشد، افزوده شد و سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفت و توسط یک لامل پوشانده شد و با شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرماتوزوا زیر میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگ‌نمایی ۴۰۰، درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی محاسبه گردید . میانگین سه مشاهده به عنوان یک داده واحد در نظر گرفته شده است (Schafer and Holzmann 2000).

ارزیابی حالت آکروزمی بعد از فرآیند انجماد-ذوب از این جهت بسیار مهم است که آسیب‌های ناشی از فرآیند انجماد-ذوب ممکن است واکنش آکروزم را در بعضی از اسپرم‌ها تحریک کرده باشد و یا ناحیه‌ی آکروزم آن‌ها آسیب دیده باشد که در این صورت قادر به اتصال به تخمک نیستند و در نتیجه علی‌رغم داشتن جنبایی، نابارور می‌باشند. برای ارزیابی حالت آکروزمی در اسپرم روش-های متفاوتی وجود دارند که اساس اکثر آن‌ها رنگ‌آمیزی با رنگ‌های فلورسنت است. در تحقیق حاضر از روش اندازه‌گیری کلروتتراسایکلین فلورسنت استفاده شد که به روش CTC معروف است. این آزمایش مطابق با روش پرز و همکاران صورت گرفت (Perez et al. 1996). برای رنگ‌آمیزی کلروتتراسایکلین به ۳ محلول نیاز است. اجزاء محلول CTC در جدول ۳ درج شده است. محلول دوم در این رنگ‌آمیزی محلول Fixing است که شامل گلوتارآلدهید ۱ درصد در بافر تریس است. این محلول محدودیت نگهداری ندارد و می‌توان از آن برای مدت طولانی استفاده نمود. pH این محلول نیز مانند محلول CTC باید بر روی ۷/۴ تنظیم شود. محلول سوم که محلول Mounting است شامل ۰/۲۲M تری‌اتیلن‌دی‌آمین در یک محیط حاوی ۱۰ درصد فسفات بافر سالین و ۹۰ درصد گلیسرول است . اولین قدم در رنگ‌آمیزی، آماده‌سازی اسپرم است. منی پس از انجماد-ذوب حاوی پلاسمای منی و رقیق‌کننده می‌باشد که می‌تواند مانع از تأثیر رنگ بر روی اسپرم شود، بنابراین خارج کردن پلاسمای منی و رقیق‌کننده بسیار مهم است. به منظور حذف پلاسمای منی و رقیق‌کننده، پس از ذوب منی محتوی رقیق‌کننده ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ، در ۱۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پس از حذف مایع رویی و به منظور شستشوی مجدد، مقدار ۳ میلی‌لیتر محلول نمکی بافر فسفات به لوله اضافه شد و دوباره به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۷۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد، سپس مایع رویی حذف شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول CTC در یک اتاق تاریک روی لام قرار داده شد (زیرا نور رنگ فلورسنت را از بین می‌برد). سپس ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم به آرامی به محلول CTC روی لام اضافه شد و سریعاً با محلول CTC مخلوط شد. پانزده ثانیه بعد از مخلوط شدن سوسپانسیون اسپرم با محلول CTC، ۵ میکرولیتر از محلول Fixing به آن اضافه گردید و به آرامی مخلوط شد. بعد از مخلوط شدن کامل محلول Fixing با مخلوط اسپرم و محلول CTC، ۳ میکرولیتر از محلول Mounting به آن اضافه شد. یک لامل بزرگ روی آن قرار داده و لام و لامل بین دو دستمال کاغذی فشرده شد تا مایعات اضافی خارج شود و اسپرم‌ها در یک لایه قرار گیرند. دور تا دور لام و لامل با لاک ناخن مسدود شد و در جای تاریک در ۴°C قرار داده شد. تمامی لام‌های رنگ‌آمیزی شده حداکثر تا ۲ ساعت پس از رنگ‌آمیزی خوانده شد.

با استفاده از بررسی‌های میکروسکوپ فلورسنت، سه الگوی فلورسانت در اسپرم‌ها قابل مشاهده است:

الگوی F: فلورسانت روشن درکل سر یا تنها در ناحیه‌ی بعد از آکروزوم (اسپرم ظرفیت‌یابی نشده).

الگوی B: فلورسانت روشن تنها در ناحیه‌ی آکروزوم (اسپرم ظرفیت‌یابی شده).

الگوی AR: بدون فلورسانت در ناحیه‌ی سر و یا تنها فلورسانت در ناحیه‌ی استوایی (واکنش آکروزومی شده).

از هر تیمار حداقل ۳ لام تهیه شد و حداقل ۲۰۰ اسپرم در هر لام با درشت‌نمایی ۴۰ میکروسکوپ فلورسنت بررسی شدند.

جدول ۳: اجزای مواد تشکیل دهنده‌ی محیط CTC جهت ارزیابی حالت آکروزومی

مواد	مقدار (میلی مولار)
تریس	۲۰
سدیم کلراید	۱۳۰
ال سیستئین	۵
کلروتتراسایکلین فلورسنت	۰/۷۵
pH	۷/۴

تمام آزمایش‌ها، ۵ مرتبه تکرار شد. داده‌های حاصل از این مطالعه به صورت جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی به کمک رویه‌ی Proc GLM نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل و میانگین‌ها به روش دانکن مقایسه شدند.

نتایج

نتایج ویژگی‌های حرکتی اسپرم ذوب شده بز مرخز در جدول ۴ نشان داده شده است. رقیق‌کننده حاوی سطح ۱ میلی‌مولار BHT نسبت به سطوح دیگر به طور معنی‌داری باعث تغییر صفات جنبایی و جنبایی پیشرونده اسپرم پس از انجماد و ذوب شد (P<۰/۰۵). این تفاوت در مقایسه با گروه شاهد نیز معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). هم‌چنین نتایج حاصل از آنالیز کامپیوتری داده‌های مرتبط با جنبایی (CASA) نشان داد که در بین ویژگی‌های CASA هیچ اختلاف معنی‌داری در بین سطوح مختلف BHT و نیز شاهد وجود ندارد (P>۰/۰۵).

نتایج صفات تولید مثلی در جدول ۵ نشان داده شده است، رقیق‌کننده‌ی حاوی سطوح مختلف BHT نسبت به شاهد باعث تغییر صفات یکپارچگی غشا و زنده‌مانی اسپرم پس از انجماد و ذوب شد. در بین سطوح مختلف BHT، سطح ۱ میلی‌مولار باعث افزایش معنی‌دار در میزان درصد اسپرم‌های زنده و یکپارچه در مقایسه با گروه شاهد و سایر سطوح BHT شده است (P<۰/۰۵). هم‌چنین نتایج حاصل از تحلیل داده‌های آزمایش مرفولوژی نشان می‌دهد که هیچ اختلاف معنی‌داری از نظر درصد اسپرم‌های غیرطبیعی در بین هیچ یک از سطوح BHT وجود ندارد (P>۰/۰۵).

جدول ۴: مقایسه‌ی ویژگی‌های حرکتی اسپرم منجمد-ذوب شده بز مرخز در بین سطوح آزمایشی بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن (میلی‌مولار)

صفات	شاهد (۰)	۰/۵	۱	۲	۴	سطح معنی‌داری	SEM
جنبایی (٪)	۴۵/۳^{b}	۴۸/۲^{b}	۵۵/۴^{a}	۴۷/۹^{b}	۴۴/۳^{b}	۰/۰۵	۲/۲۱
پیشرونده (٪)	۲۱/۸^{b}	۲۵/۶^{b}	۳۲/۲^{a}	۲۵/۹^{b}	۲۱/۲^{b}	۰/۰۵	۱/۹۳
میانگین سرعت در مسیر (µm/s)	۹۲/۸	۹۴/۲	۹۶/۷	۹۴/۱	۹۱/۳	Ns	۲/۱۱
سرعت در مسیر مستقیم (µm/s)	۷۵/۶	۷۸/۲	۷۹/۴	۷۷/۸	۷۵/۶	Ns	۳/۰۸
خطی بودن جنبایی (٪)	۳۷/۹	۳۸/۸	۴۲/۷	۴۰/۱	۳۸/۷	Ns	۱/۲۵
جنبایی عرضی سر (٪)	۹/۷	۹/۵	۹/۲	۹/۸	۹/۹	Ns	۰/۲۷

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده‌ی تفاوت میانگین سطوح (با سطح احتمال ۵ درصد) می‌باشد.

Ns نشان‌دهنده‌ی این است که تفاوت معنی‌دار نمی‌باشد.

جدول ۵: مقایسه‌ی صفات یکپارچگی غشاء، مرفولوژی و زنده‌مانی اسپرم منجمد- ذوب شده بز مرخز در بین سطوح آزمایشی بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن (میلی‌مولار)

صفات تولید مثلی	شاهد(۰)	۰/۵	۱	۲	۴	سطح معنی‌داری	SEM
یکپارچگی غشا (٪)	۳۱/۱^{b}	۳۴/۲^{b}	۴۳/۸^{a}	۳۴/۴^{b}	۳۰/۱^{b}	۰/۰۵	۱/۷۲
زنده‌مانی (٪)	۳۲/۵^{b}	۳۶/۷^{b}	۴۴/۶^{a}	۳۵/۲^{b}	۳۰/۴^{b}	۰/۰۵	۲/۲۳
اسپرم های غیرطبیعی (٪)	۸/۱	۸/۵	۸/۲	۸/۷	۸/۹	Ns	۱/۲

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده‌ی تفاوت میانگین سطوح (با سطح احتمال ۵ درصد) می‌باشد.

Ns نشان‌دهنده‌ی این است که تفاوت معنی‌دار نمی‌باشد.

نتایج میانگین الگوهای آکروزومی اسپرم پس از انجماد-ذوب با استفاده از رنگ‌آمیزی کلروتتراسایکلین در جدول ۶ نشان داده شده است. مقایسه‌ی الگوهای F، B و AR در بین تیمارهای آزمایشی نشان داد که سطوح مختلف BHT در محیط انجماد اسپرم تأثیری بر حالت آکروزومی اسپرم‌ها نداشته است و اختلاف بین هیچ کدام از تیمارها از نظر آماری معنی‌دار نبوده است (P>۰/۰۵).

جدول ۶: اثر سطوح مختلف بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن (میلی‌مولار) بر حالت آکروزومی اسپرم منجمد- ذوب شده در بز مرخز

تیمار	الگوهای آکروزومی		
	F	B	AR
شاهد (۰)	۱۰/۲۱	۶۹/۳۳	۲۰/۴۶
۰/۵	۱۱/۴۴	۶۷/۷۸	۲۰/۷۸
۱	۱۳/۱۱	۶۴/۲۱	۲۲/۶۸
۲	۱۰/۷۸	۶۶/۵۱	۲۲/۷۱
۴	۹/۸۲	۶۸/۴۴	۲۱/۷۴

بحث

پژوهش‌های گوناگونی در خصوص اثرات آنتی‌اکسیدانی BHT بر فرآیند انجماد اسپرم در گونه‌های مختلف پستانداران بر پایه‌ی رقیق‌کننده‌ای که حاوی زرده‌ی تخم‌مرغ است انجام شده است (Farshad et al. 2010, Pursel and Graham 1967). ولی آزمایشی که اثرات آنتی‌اکسیدانی BHT را در رقیق‌کننده بر پایه‌ی گیاهی مورد مطالعه قرار دهد، تا کنون صورت نگرفته است. Graham و همکاران در سال ۱۹۹۲ گزارش دادند که BHT آنتی‌اکسیدانی فنولی است که به درون غشای اسپرم نفوذ می‌کند و در نتیجه باعث کاهش ویسکوزیته چربی‌های غشا می‌شود که سیالیت چربی هنگامی که دما کاهش می‌یابد، کاهش کم می‌شود و در نتیجه باعث کاهش نفوذپذیری غشای اسپرم در موقع قرار گرفتن در معرض شوک سرمایی می‌شود. همچنین پیش‌بینی شده که BHT با تبدیل رادیکال‌های پرکسی به هیدروپرکسیدها از فعالیت زیان‌بار آن‌ها جلوگیری می‌کند (Ijaz et al. 2009). مطابق با بسیاری از آزمایش‌ها، در این پژوهش نیز BHT باعث ایجاد تغییر معنی‌دار در کیفیت اسپرم در مقایسه با گروه شاهد شد. تنها سطح ۱ میلی‌مولار BHT توانست باعث ایجاد تغییرات معنی‌دار در میزان جنبایی و زنده‌مانی اسپرم گردد. در این آزمایش سطوح بالای BHT باعث ایجاد اثرات تخریب‌کننده بر کیفیت اسپرم بعد از فرآیند انجماد- ذوب شد که نتایج این آزمایش با گزارش Watson و همکاران در سال ۱۹۸۳ مطابقت دارد که نشان دادند که سطح ۴ میلی‌مولار BHT باعث کاهش معنی‌دار میزان باروری اسپرم شده است. Bamba و Cran در سال ۱۹۹۲ نیز مشاهده کردند که غلظت بیش‌تر از ۲ میلی‌مولار BHT هیچ اثر محافظتی بر اسپرم در فرآیند انجماد-ذوب ندارند. در خوک BHT باعث کاهش معنی‌دار میزان آسیب آکروزومی می‌گردد و میزان ۴ میلی‌مولار آن باعث افزایش میزان پرکسیداسیون لیپید می‌گردد که بر اسپرم اثر منفی

می‌گذارد (Pursel and Graham 1967). تخریب یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم ناشی از به هم ریختگی آرایش لیپیدها در داخل غشا در طول حفظ انجماد منی ممکن است آسیب‌های سلولی بیش‌تری را القا کند و در نتیجه منجر به مرگ سلول اسپرم شود (Holt and North 1994) . اعلام شده است که لستین (فسفاتیدیل کولین) موجود در سویا فسفولیپیدهای غشای اسپرم را با قرارگیری روی سطح غشاها محافظت کرده و تحمل و مقاومت اسپرم به آسیب‌های فرآیند انجماد- ذوب را افزایش می‌دهد (Watson 1981). تا کنون ساز و کار دقیقی که چگونه لستین سویا سبب محافظت اسپرم در طول فرآیندهای انجماد و ذوب می‌شود به طور کامل روشن نشده است. بسیاری از این پژوهشگران بر این نظر هستند که لستین قادر است به طور مؤثری اسپرماتوزوا را در برابر آسیب‌های ناشی از انجماد اسپرم محافظت کند، چون افزودن آن به رقیق‌کننده منجر به افزایش نسبت اسپرم زنده و غیر آپوپتوزیس پس از انجماد- ذوب می‌گردد . فرآیند انجماد- ذوب موجب تغییراتی در مرفولوژی 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.

براساس نتایج این مطالعه نشان داده شد که اضافه نمودن ۱ میلی‌مولار BHT در رقیق‌کننده بر پایه ۱/۵ درصد لستین سویا باعث بهبود معنی‌دار کیفیت اسپرم بز مرخز پس از فرآیند انجماد- ذوب می‌شود.

منابع

مفاخری، شیوا (۱۳۹۰). اثرات نوع، نسبت رقیق‌کننده و طول مدت نگهداری بر کیفیت اسپرم در بزهای مرخز. گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی، مؤسسه‌ی تحقیقات علوم دامی کشور، کرج، ایران. صفحات ۵-۳.

Aires, V.A.; Hinsch, K.D.; Mueller-Schloesser, F.; Bogner, K.; Mueller-Schloesser, S. and Hinsch, E. (2003). In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. Theriogenology, 60: 269-279.

Amoah, E.A. and Gelaye, S. (1997). Biotechnological advances in goat reproduction. Animal Reproduction Science, 75: 578-585.

Andrabi, S.M.H.; Siddique, M.; Ullah, N. and Khan, L.A. (2006). Effect of reducing sperm numbers per insemination dose on fertility of cryopreserved buffalo bull semen. Pakistan Veterinary Journal, 26: 17-19.

Anzar, M.; Farooq, U.; Mirza, M.A.; Shahab, M. and Ahmad, N. (2003). Factors affecting the efficiency of artificial insemination in cattle and buffalo in Punjab, Pakistan. Pakistan Veterinary Journal, 23: 106-113.

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

Bousseau, S.; Brillard, J.; Mar, L.; Guienne, B.; Guerin, B.; Camus, A. and Lechat, M. (1998). Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. Theriogenology, 50: 699-706.

Bucak, M.N.; Sarıözkan, S.; Tuncer, P.B.; Sakin, F.; Atessahin, A.; Kulaksız, R. et al. (2010). The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancryrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. Small Ruminant Research, 89: 24-30.

Evans, G. and Maxwell, W.M.C. (1987). Handling and examination semen. In: Maxwell WMC, editor. Salamon's artificial insemination of sheep and goat. Sydney: Butterworths, p: 93-106.

Farshad, A.; Khalili, B. and Jafaroghli, M. (2010). Effects of butylated hydroxytoluene on freezability of ram spermatozoa. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 23: 1276-1281.

Fukui, Y.; Kohno, H.; Togari, T. and Hiwasa, M. (2007). Fertility of ewes inseminated intrauterinally with frozen semen using extender containing bovine serum albumin. Journal of Reproduction and Development, 53: 959-962.

Gil, J.; Lundeheim, N.; Söderquist, L. and Rodríguez-Martínez, H. (2003). Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. Theriogenology, 59: 1241-1255.

Graham, J.K. and Hammerstedt, R.H. (1992). Differential effects of ButylatedHydroxytoluene analogs on bull sperm subjected to cold induced membrane stress. Cryobiology, 29: 106-117.

Holt, W.V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. Animal Reproduction Science, 62: 3-22.

Holt, W.V. and North, R.D. (1994). Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. Biology of Reproduction, 51: 414-424.

Ijaz, A.; Hussain, A.; Aleem, M.; Yousaf, M.S. 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.

Naijian, H.R.; Kohram, H.; Zare Shahneh, A. and Sharafi, M. (2013). Effects of various concentrations of BSA on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi goat semen following the freeze–thaw process. Small Ruminant Research, 113: 371-375.

Pattie, W.A.; Baker, R.L.; Nicoll, G.B. and Restall, B.J. (1990). Breeding for cashmere and mohair. Proceeding of 4th world congress on genetics applied to livestock production XV, 167-176.

Perez, L.J.; Valcarcel, A.; de las Heras, M.A.; Moses, D.F. and Baldassarre, H. (1996). In vitro capacitation and induction of acrosomal exocytosis in ram spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay. Theriogenology, 45: 1037-1046.

Purdi, P.H. (2006). A review on goat cryopreservation. Small Ruminant Research, 63: 215-225.

Pursel, V.G. and Graham, E.F. (1967). Phospholipids of bovine spermatozoa and seminal plasma. Journal of Reproduction and Fertility, 14: 203-211.

Revell, S.G. and Mrode, R.A. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. Animal Reproduction Science, 36: 77-86.

Schafer, S. and Holzmann, A. (2000). The use of transmigration and spermac stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. Animal Reproduction Science, 59: 201-211.

Watson, P.F. (1981). The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5 C and deep-freezing. Journal of Thermal Biology, 1: 137-141.

Watson, P.F. and Anderson, W.Y. (1983). Influence of butylated hydroxytoluene (BHT) on the viability of ram spermatozoa undergoing coldshock. Journal of Reproduction and Fertility, 69: 229-235.

Evaluation of antioxidant effects of butylated hydroxytoluene in the soybean lecithin based extender on frozen-thawed semen quality in Markhoz goat

Sadeghipanah, H.[1]; Naijian, H.R.[2] and Masoudi, R.[1]

Received: 05.02.2014 Accepted: 03.01.2015

Abstract

This study was carried out to evaluate the potential impact of butylated hydroxytoluene (BHT) on the frozen–thawed semen quality of Markhoz goat. Semen samples were collected by an artificial vagina, twice a week from the four matured goat. Semen samples were diluted in extender containing tris, fructose, 1.5% soybean lecithin and various concentrations of BHT (0, 0.5, 1, 2 and 4 mM). After cooling at 5 ºC for two hours, semen samples were frozen in liquid nitrogen vapor and plunged into liquid nitrogen for storage. Motility indices, viability, membrane integrity, morphology and acrosome status of Markhoz goat semen were assessed after freezing-thawing. Results of this experiment showed that extender containing 1mM BHT significantly improved motility, progressive motility, membrane integrity and viability compare with control treatment ($P<0.05$). Morphology and acrosome status were not significantly affected by the different levels of BHT ($P\geq0.05$). It can be concluded that adding 1mM BHT to the soybean lecithinin-based extender is suitable for cryopreservation of Markhoz gaot sperm and maintain its fertility.

Key words: Butylated hydroxytoluene, Soybean lecithin, Frozen sperm, Markhoz goat

1- Assistant Professor, Animal Science Research Institute, Karaj, Iran
2- Young Researchers Club and Elites, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
Corresponding Author: Sadeghipanah, H., E-mail: h.sadeghipanah@gmail.com