مجله
تحقیقات دام و طیور
جلد۱- شماره ۳- پائیز ۱۳۹۱- ص ص ۹-۱۷

تاریخچه مقاله:
دریافت:۹۱/۰۹/۰۱
پذیرش: ۹۲/۰۲/۰۱

# اثر آنتی‌اکسیدانی بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن بر فراسنجه‌های اسپرم گاومیش پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی

**صادق تجویدی عصر[۱]، حمید کهرام[۲*]، رحیم بهشتی[۳]، ایرج اشرفی[۴]**

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر، شبستر، ایران
۲. استادیار دانشگاه تهران، کرج، ایران
۳. استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر، شبستر، ایران
۴. باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان ، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

**چکیده**

این تحقیق با هدف بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن (BHT) بر فراسنجه‌های اسپرم گاومیش پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی انجام شد. نمونه‌های منی گاومیش پس از جمع‌آوری، با دو نوع رقیق کننده تریس- سیترات– زرده تخم‌مرغ و بایوکسل به همراه غلظت‌های مختلف BHT (۰، ۰/۵، ۱، ۲ و۳میلی‌مولار) رقیق و تا ۵ درجه سانتی‌گراد سرد و سپس در معرض بخار ازت منجمد و در تانک حاوی ازت مایع ذخیره شدند. فراسنجه‌های تحرک اسپرم، قابلیت زنده ماندن، یکپارچگی غشای پلاسمایی و آکروزمی به ترتیب توسط میکروسکوپ فاز مقایسه‌ای، رنگ‌آمیزی سوپراویتال، تست التهابی هیپواسموتیک و واکنش آکروزمی پلاسما در زمان‌های صفر و ۶ ساعت پس از یخ‌گشایی مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده هر دو نوع رقیق کننده حاوی سطوح مختلف BHT نسبت به گروه شاهد به طورمعنی‌داری($P< ۰/۰۵$) باعث بهبود توانایی انجماد اسپرم شد. غلظت ۲میلی‌مول در زمان صفر بعد از یخ‌گشایی و ۱ میلی‌مول ۶ ساعت پس از یخ‌گشایی در هر دو نوع رقیق‌کننده بیشترین بهبود ($P< ۰/۰۵$) را در ویژگی‌های ارزیابی شده داشت. با این وجود افزودن ۳ میلی مول BHT نسبت به سایر غلظت های استفاده شده موجب کاهش کیفیت برخی از فراسنجه‌های ارزیابی شده گردید.

**کلمات کلیدی:** منی گاومیش، بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن، آنتی‌اکسیدان، محافظت از انجماد

نگارنده پاسخگو: حمید کهرام. آدرس: کرج، خیابان دانشکده، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران. گروه علوم دامی، تلفن و فکس: ۰۲۶۳۲۲۴۸۰۸۲
پست الکترونیک: kohram@can.ut.ac.ir

## مقدمه

درسیستم‌های صنعتی پرورش دام‌های اهلی، تلقیح مصنوعی نقش مهمی در کنترل تولید مثل دارد. به دلیل قابلیت انجماد و باروری ناچیز اسپرماتوزوآی گاومیش در مقایسه با گاو، کاربرد تلقیح مصنوعی با منی منجمد- یخ‌گشایی شده گاومیش در یک مقیاس محدود گزارش شده است (کاکار و آناند،۱۹۸۱؛ موئر و همکاران، ۱۹۸۸؛ اندرابی و همکاران، ۲۰۰۸؛ احمد و همکاران،۲۰۰۳؛ کومارسان و همکاران، ۲۰۰۵). از این رو، محافظت سرمایی موفق منی گاومیش به ایجاد ذخیره بلندمدت گامت‌های نر و نگهداری ذخیره ژنتیکی کمک خواهد کرد و نیزمی‌تواند تولید شیر و گوشت و ارزش اقتصادی این دام را بهبود دهد.

انجماد و ذخیره اسپرم، شامل قرار دادن اسپرم در ازت مایع و در نتیجه توقف واکنش‌های متابولیکی آن است. با کاهش و یا توقف متابولیسم اسپرم طول عمر باروری آن‌ها افزایش می‌یابد و در نتیجه می‌توان از آن‌ها برای مدت زمان طولانی‌تری استفاده نمود. حفظ انجمادی اسپرم تغییرات فراساختاری، بیوشیمیایی و عملکردی را در غشای اسپرم به وجود می‌آورد که در نتیجه آن زنده‌مانی اسپرم را بعد از انجماد-یخ گشایی تحت تأثیر قرار می‌دهد (هلت، ۲۰۰۰) .

یکی از عواملی که می‌تواند موجب تخریب غشای پلاسمایی، اختلال در حرکت و دیگر فعالیت‌های اسپرماتوزوییدها شود، رادیکال‌های آزاد هستند. ایجاد تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و فرآورده‌های گروه‌های واکنش اکسیژنی و سم‌زدایی آن‌ها توسط آنتی‌اکسیدان‌ها، یک عامل مهم در بقای سلول اسپرم و عملکرد آن‌ها، قبل و بعد از حفاظت انجمادی می‌باشد که به هم خوردن این تعادل باعث استرس اکسیداتیوی می‌شود (آیتکن، ۱۹۹۵) .

در پستانداران، پلاسمای منی حاوی ترکیبات آنتی اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و پاک کننده‌های رادیکال‌های آزاد از جمله ویتامین E، C، هیپوتائورین، تائورین و آلبومین می‌باشد (آمولر و سیتز،۱۹۹۰؛ زینی و همکاران، ۲۰۰۰؛ لویس و همکاران، ۱۹۹۷). با پیشرفت در تکنیک تلقیح مصنوعی، منی برای تولید حداکثر تعداد دوزها از یک انزال رقیق می‌شود و تکرار این عمل باعث کاهش غلظت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی اسپرم شده در نتیجه اسپرم‌ها آسیب‌پذیر می‌شوند. وقتی اسپرماتوزوآ در طی محافظت سرمایی در معرض آسیب قرار می‌گیرند شرایط برای تولید ROS افزایش می‌یابد و از طرف دیگر کمبود آنتی اکسیدان‌های طبیعی در منی رقیق شده شرایط را آسیب‌پذیرتر می‌نماید. بنابراین برای برگشت شرایط منی به حالت اول اضافه نمودن سطوح طبیعی آنتی‌اکسیدان‌ها در فرآیند انجماد منی ضروری به نظر می‌رسد (ایجاز و همکاران، ۲۰۰۹).

بوتیلیتد هیدروکسی‌تولوئن (BHT)، یک آنالوگ سینتتیک ویتامین E است و واکنش اتواکسیداسیون را بوسیله تبدیل رادیکال‌های پراکسی به هیدروپراکسیدها کنترل می‌کند. BHT با موفقیت برای حفظ مایع منی در بوقلمون نر (دونوغو و دونوغو، ۱۹۹۷) ، حداقل آسیب شوک سرما در اسپرم قوچ (واتسون و آندرسون، ۱۹۸۳)، گاو نر (شعاعی و ضمیری، ۲۰۰۸)، بز (خلیفا و همکاران، ۲۰۰۸) و دیگر گونه‌های حیوانی (روکا و همکاران، ۲۰۰۴) آزمایش شده است. بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر دوزهای مختلف BHT به عنوان یک آنتی‌اکسیدان در رقیق‌کننده منی گاومیش بود.

## مواد و روش‌ها

### تهیه نمونه منی و فرآوری آن

نمونه‌های منی بوسیله یک واژن مصنوعی از ۴ گاومیش بالغ (۲ تا ۴ سال) در فصل تولیدمثل (اواخر پاییز و اوایل زمستان) در مرکز تحقیقات گاومیش جبل ارومیه جمع‌آوری شد. بعد از تحریک اولیه که شامل ۳ پرش کاذب و ممانعت شدید از جفت‌گیری بود، به گاومیش نر اجازه داده شد که بر روی گاومیش ماده پرش انجام دهد. بعد از جمع‌آوری، نمونه های منی خام در عرض ۱ دقیقه به آزمایشگاه منتقل شده و در حمام آب $37^{\circ}C$ برای آزمایش نگهداری شد. پس از بررسی فراسنجه‌های حرکتی، مورفولوژی و غلظت، نمونه‌های طبیعی جهت حذف اثر دام از آزمایش با هم مخلوط شده در رقیق کننده‌های آماده شده در $37^{\circ}C$ در ۱۰ دقیقه بعد از جمع‌آوری رقیق شد. در این تحقیق از دو نوع رقیق کننده استفاده شد. برای تهیه ۱۰۰میلی‌لیتر رقیق کننده تریس -زرده تخم مرغ، ۳/۰۲۸ گرم تریس، ۱/۶۷۵ گرم اسید سیتریک، ۱/۲۵ گرم

فروکتوز، ۱۰۰،۰۰۰ واحد بین‌المللی پنی‌سیلین G، ۱۰۰،۰۰۰ میکروگرم استرپتومایسین سولفات را در ۵۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر شده حل کرده و بعد از افزودن ۲۰ میلی‌لیتر زرده تخم‌مرغ و ۷ میلی‌لیتر گلیسرول محلول به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. رقیق کننده تجاری بایوکسل بر اساس دستور عمل شرکت سازنده، با نسبت ۱ به ۴ با آب دوبار تقطیر شده رقیق شد. مقادیر۰/۱۱، ۰/۲۲، ۰/۴۴ و ۰/۶۶ میلی‌گرم BHT به ترتیب برای غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی‌مول وزن شده و در ۲ میلی‌لیتر اتانول حل شدند. پس از تبخیر کامل اتانول، یک لایه کریستالی نازک BHT در انتهای لوله‌های آزمایشی باقی ماند (ایجاز و همکاران، ۲۰۰۹).

**مراحل عمل‌آوری اسپرم قبل از انجماد**

پس از جمع‌آوری و ارزیابی اولیه، نمونه‌هایی که دارای تحرک بالای ۷۰ درصد و اسپرم‌های غیرطبیعی کمتر از ۱۰ درصد بود با هم مخلوط شدند. رقیق کننده‌هایی که قبلاً آماده شده بودند در لوله‌های فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شده و در بن‌ماری قرار داده شدند. بعد از اضافه نمودن اسپرم به لوله‌های فالکون حاوی رقیق کننده، مخلوط حاوی اسپرم و رقیق کننده به لوله‌های حاوی غلظت‌های مختلف BHT که در بن‌ماری قرار داشتند، منتقل و به مدت ۵ دقیقه در این لوله‌ها انکوبه شده و سپس لوله‌های فالکون در درون آب ۳۷°C (در حدود ۲۰۰ میلی‌لیتر) گذاشته و به یخچال منتقل شدند تا به تدریج به دمای ۵°C برسند.

بعد از سپری شدن ۴ ساعت زمان تعادل، مخلوط اسپرم و رقیق کننده‌ها بوسیله دستگاه فیلینگ- سیلینگ در پایوت‌های ۰/۵ میلی‌لیتری پر شدند. هر پایوت حاوی $۵۰ \times ۱۰^{۶}$ اسپرماتوزوآ بود. بعد از این مرحله، پایوت‌ها به وسیله بخار ازت مایع به مدت ۸ دقیقه با فاصله ۴ سانتی‌متر از سطح ازت مایع منجمد شده و تا زمان ارزیابی در ازت مایع ۱۹۶- °C ذخیره شدند (ایجاز و همکاران، ۲۰۰۹).

**ارزیابی فراسنجه‌های منی بعد از یخ گشایی**

برای ارزیابی نمونه‌های منی، ۵ پایوت از هر سطح در بن‌ماری ۳۷°C به مدت ۳۰ ثانیه، یخ‌گشایی گردیدند.

**تحرک اسپرم پس از یخ‌گشایی**

یک قطره اسپرم ذوب شده، روی یک لام قبلاً گرم شده گذاشته و با یک لامل پوشانده شد. با شمارش۲۰۰ اسپرماتوزوآ در هر اسلاید زیر میکروسکوپ (۴۰×) درصد تحرک تعیین شد. میانگین سه مشاهده به عنوان یک داده واحد در نظر گرفته شد.

**یکپارچگی غشای پلاسمایی**

یکپارچگی غشای پلاسمایی با استفاده از تست التهاب هیپواسموتیک تعیین شد (HOS). به طور خلاصه، یک محلول هیپواسموتیک (۱۹۰ mOsm/L) باحل کردن ۰/۷۳۵ گرم تری-سدیم سیترات دی‌هیدرات و ۱/۳۵۱ گرم D(-) فروکتوز در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر یونیزه آماده شد. برای این آزمایش ابتدا ۵۰۰ میکرولیتر محلول هیپواسموتیک با ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه اسپرم منجمد-ذوب مخلوط شده و برای ۴۵ دقیقه در ۳۷°C انکوبه شد. بعد از انکوباسیون، نمونه با ملایمت مخلوط شد. سپس یک قطره (حدود ۵ میکرولیتر) از مخلوط عمل‌آوری شده روی لام که قبلاً گرم شده قرار داده شد، با لامل پوشانده و با میکروسکوپ (۴۰×) بررسی شد. ۲۰۰ اسپرماتوزوآ در هر اسلاید شمارش شد و درصد اسپرماتوزوآی با دم تاب‌خورده تعیین شد. میانگین سه مشاهده به عنوان یک داده واحد در نظر گرفته شد (آدیل و همکاران، ۲۰۰۹).

**یکپارچگی آکروزوم**

۵۰۰ میکرولیتر از هر نمونه منجمد-ذوب شده در ۵۰ میکرولیتر سیترات فرمالدئید ۱٪ در ۲/۹ ٪ (W/V) سیترات تری-سدیم دی‌هیدرات فیکس شد. ۲۰۰ اسپرماتوزوآ زیر میکروسکوپ (۱۰۰×) برای برآمدگی رأس سر نرمال آن‌ها شمارش شد. ناهنجاری‌هایی شبیه نبود آکروزوم، آکروزوم موج دار و یا آکروزوم متورم شمارش می‌شود (ایجاز و همکاران، ۲۰۰۹).

**قابلیت زنده‌ماندن اسپرم**

۲۰ میکرولیتر از منی منجمد-ذوب شده روی یک اسلایدی که قبلاً گرم شده قرار داده شد و با ۱۰۰ میکرولیتر ترکیب رنگ‌آمیزی سوپراویتال [۱٪(w/v) ائوزین B، ۵ ٪ (w/v) نیگروزین در ۳ ٪ تری-سدیم سیترات دی‌هیدرات محلول] مخلوط شد. سپس برای ایجاد یک لایه نازک و یک شکل، یک

قطره (حدود ۵ میکرولیتر) از مخلوط عمل‌آوری شده روی لام که قبلاً گرم شده قرار داده شد و یک گسترش از آن تهیه شد. بعد از خشک شدن در هوا، نمونه اسلاید زیر میکروسکوپ (×۱۰۰) مشاهده می‌شود. ۲۰۰ اسپرماتوزوآ برای سرهای غیر رنگ‌آمیزی شده، اسپرماتوزوآ در حالت زنده و نیز برای سرهای رنگ‌آمیزی شده (به طور کامل یا جزیی) اسپرماتوزوآ در حالت مرده، شمارش شد (بالستری و همکاران،۲۰۰۷) .

**روش تجزیه و تحلیل اطلاعات**

داده‌های حاصل از این مطالعه به صورت جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی به کمک رویه Proc GLM نرم افزار SAS تجزیه و تحلیل و میانگین‌ها با LSD مقایسه شدند. نتایج حاصل از ۵ تکرار به صورت mean ± S.E.M. گزارش شد.

## نتایج

نتایج به دست آمده نشان داد که تحرک و یکپارچگی آکروزم اسپرماتوزوآ بعد از یخ‌گشایی به دلیل افزودن غلظت‌های مختلف BHT (۰، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی‌مول) در منی رقیق‌شده با رقیق‌کننده تریس- سیترات زرده تخم‌مرغ بهبود یافت (P<۰/۰۵) (جدول ۱). بیشترین تحرک و یکپارچگی آکروزم اسپرماتوزوآ در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌مول BHT بدست آمد (P< ۰/۰۵). پاسخ التهابی هیپواسموتیک و زنده‌مانی منی نیز با افزودن ۱ و ۲ میلی‌مول BHT بهبود یافت (P< ۰/۰۵). بالاترین مقدار زنده مانی در غلظت ۲ میلی‌مول بدست آمد (P< ۰/۰۵). مقدار تحرک، یکپارچگی آکروزم و پاسخ التهابی هیپواسموتیک در ۱ و ۲ میلی‌مول BHT تفاوت معنی‌داری نداشت. اما، با افزودن ۳ میلی‌مول به رقیق‌کننده منی فراسنجه‌های تحرک، یکپارچگی آکروزم، پاسخ التهابی هیپواسموتیک و زنده‌مانی اسپرماتوزوآها در مقایسه با غلظت‌های ۱ و ۲ میلی مول BHT کاهش یافت (P<۰/۰۵)، ولی در تمام موارد نسبت به گروه شاهد شرایط رقیق‌کننده را بهبود داد (P< ۰/۰۵). بهترین نتایج در این آزمایش تیماری بود که ۲ میلی‌مول BHT به رقیق‌کننده اضافه شد.

تمام فراسنجه‌های مورد ارزیابی بعد از ۶ ساعت از یخ‌گشایی در جدول ۲ نشان داده شده است که نسبت به فراسنجه‌های قبل از انجماد (جدول ۱) بطور قابل توجهی کاهش یافت. تحرک و یکپارچگی آکروزم اسپرماتوزوآ ۶ ساعت پس از یخ‌گشایی با افزودن غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌مول BHT در منی رقیق‌شده با رقیق‌کننده تریس- سیترات زرده تخم‌مرغ نسبت به شاهد و دیگر گروه‌های آزمایشی بهبود یافت (P< ۰/۰۵). بیشترین تحرک اسپرماتوزوآ در غلظت ۱ میلی مول BHT بدست آمد (P< ۰/۰۵). یکپارچگی آکروزم بین سطوح ۰/۵ و ۱ میلی‌مول BHT تفاوت معنی‌داری نداشت .پاسخ التهابی هیپواسموتیک با افزودن ۰/۵ و ۱ میلی‌مول BHTو زنده‌مانی منی با افزودن ۱ میلی‌مولBHT بهبود یافت (P< ۰/۰۵). بالاترین مقدار پاسخ التهابی هیپواسموتیک و زنده مانی در غلظت ۱ میلی‌مول بدست آمد (P< ۰/۰۵). اما با افزودن ۲ و ۳ میلی‌مول BHT به رقیق‌کننده منی فراسنجه‌های تحرک، یکپارچگی آکروزم، پاسخ التهابی هیپواسموتیک و زنده‌مانی اسپرماتوزوآ در مقایسه با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌مول BHT کاهش یافت (P< ۰/۰۵). بهترین نتایج در این آزمایش تیماری بود که ۱ میلی‌مول BHT به رقیق‌کننده اضافه شد.

فراسنجه‌های تحرک و یکپارچگی آکروزم اسپرماتوزوآ بعد از یخ‌گشایی در جدول ۳ نشان داده شده است که به دلیل افزودن غلظت‌های مختلف BHT (۰/۵، ۱ ، ۲ و ۳ میلی‌مول) در منی رقیق شده با رقیق‌کننده تجاری بایوکسل نسبت به گروه شاهد بهبود یافت (P< ۰/۰۵). بیشترین تحرک و یکپارچگی آکروزم اسپرماتوزوآ در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌مول BHT مشاهده شد. پاسخ التهابی هیپواسموتیک و زنده‌مانی منی نیز در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌مول BHT بهبود یافت (P< ۰/۰۵). بیشترین مقدار پاسخ زنده‌مانی در غلظت ۲ میلی مول بدست آمد (P< ۰/۰۵). مقدار تحرک، یکپارچگی آکروزم و پاسخ التهابی هیپواسموتیک در ۱ و ۲ میلی‌مول BHT تفاوت معنی‌داری نداشت. برعکس، با افزودن ۳ میلی‌مول BHT به رقیق‌کننده منی تمام فراسنجه‌های مورد ارزیابی در مقایسه با غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌مول BHT کاهش یافت (P< ۰/۰۵) ولی تحرک و یکپارچگی آکروزم را نسبت به گروه شاهد افزایش داد (P< ۰/۰۵). بهترین نتایج در این آزمایش تیماری بود که ۲ میلی‌مول BHT به رقیق‌کننده اضافه شد.

نتایج جدول ۴ نشان می‌دهد که تمام فراسنجه‌های مورد ارزیابی بعد از ۶ ساعت از یخ‌گشایی در مقایسه جدول ۳ و ۴ شدیداً کاهش یافت. تحرک و یکپارچگی آکروزم اسپرماتوزوآ، ۶ ساعت پس از یخ‌گشایی با افزودن غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی مول BHT در منی رقیق شده با رقیق‌کننده تجاری بایوکسل بهبود یافت (P< ۰/۰۵). بیشترین تحرک اسپرماتوزوآ و پاسخ التهابی هیپواسموتیک در غلظت ۱ میلی‌مول BHT بدست آمد (P< ۰/۰۵) . برعکس، با افزودن ۲ و ۳ میلی‌مول BHT به رقیق کننده منی تمام فراسنجه‌های مورد آزمایش در مقایسه با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌مول BHT کاهش یافت (P<۰/۰۵). بهترین نتایج در این آزمایش تیماری بود که ۱ میلی‌مول BHT به رقیق‌کننده اضافه شد.

**جدول ۱- تأثیر افزودن BHT بر کیفیت منی گاومیش محافظت سرمایی شده، بعد از یخ‌گشایی در رقیق‌کننده تریس- سیترات زرده تخم‌مرغ (میانگین ±خطای معیار)**

| غلظت‌های BHT (میلی‌مولار) | فراسنجه‌های اسپرماتوزوآ (٪) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | تحرک | یکپارچگی آکروزم | پاسخ التهابی هیپواسموتیک | زنده‌مانی |
| ۰/۰ | $^{a}$۱/۱۰ ± ۳۹/۱۶ | $^{a}$۱/۴۲ ± ۱۹/۲۸ | $^{a}$۳۷/۱ ± ۹۲/۴۲ | $^{a}$۱/۶۰ ± ۵۵/۰۸ |
| ۰/۵ | $^{b}$۱/۵۹ ± ۴۳/۲۰ | $^{b}$۱/۳۶ ± ۲۲/۳۶ | $^{ac}$۳۲/۱ ± ۰۸/۴۴ | $^{a}$۱/۲۸ ± ۵۵/۹۶ |
| ۱/۰ | $^{c}$۱/۴۴ ± ۵۳/۳۶ | $^{c}$۱/۴۲ ± ۲۶/۱۲ | $^{b}$۳۳/۱ ± ۱۲/۵۰ | $^{b}$۱/۴۰ ± ۶۵/۳۶ |
| ۲/۰ | $^{c}$۱/۴۹ ± ۵۳/۶۸ | $^{c}$۱/۳۲ ± ۲۶/۹۲ | $^{b}$۵۸/۱ ± ۲۴/۵۱ | $^{c}$۱/۲۳ ± ۷۰/۹۶ |
| ۳/۰ | $^{d}$۱/۴۶ ± ۴۸/۵۲ | $^{b}$۱/۲۲ ± ۲۳/۹۲ | $^{c}$۳۳/۱ ± ۸۸/۴۴ | $^{d}$۱/۲۴ ± ۵۸/۰۰ |

حروف مختلف (a, b, c, d) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار (P < ۰/۰۵) در هر ستون است.

**جدول ۲- تأثیر افزودن BHT بر کیفیت منی گاومیش محافظت سرمایی شده، ۶ ساعت بعد از یخ‌گشایی در رقیق‌کننده تریس- سیترات زرده تخم‌مرغ(میانگین ±خطای معیار)**

| غلظت‌های BHT (میلی‌مولار) | فراسنجه‌های اسپرماتوزوآ (٪) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | تحرک | یکپارچگی آکروزم | پاسخ التهابی هیپواسموتیک | زنده‌مانی |
| ۰/۰ | $^{a}$۱/۴۹ ± ۱۷/۱۶ | $^{a}$۱/۳۱ ± ۸/۰۰ | $^{a}$۱/۲۵ ± ۱۹/۱۲ | $^{a}$۱/۳۳ ± ۲۰/۸۸ |
| ۰/۵ | $^{b}$۱/۳۱ ± ۱۹/۲۰ | $^{b}$۱/۱۸ ± ۹/۷۲ | $^{b}$۱/۳۶ ± ۲۱/۶۴ | $^{a}$۱/۳۴ ± ۲۱/۶۸ |
| ۱/۰ | $^{c}$۱/۴۳ ± ۲۴/۰۸ | $^{b}$۱/۳۷ ± ۱۱/۳۶ | $^{b}$۱/۲۹ ± ۲۲/۴۴ | $^{b}$۱/۱۰ ± ۲۴/۲۴ |
| ۲/۰ | $^{d}$۱/۲۰ ± ۱۱/۹۲ | $^{a}$۱/۲۶ ± ۷/۶۸ | $^{c}$۱/۲۸ ± ۱۳/۰۸ | $^{c}$۱/۴۰ ± ۱۷/۲۰ |
| ۳/۰ | $^{e}$۰/۸۶ ± ۴/۷۶ | $^{c}$۱/۲۲ ± ۴/۱۲ | $^{d}$۱/۲۴ ± ۸/۲۸ | $^{d}$۱/۳۹ ± ۱۴/۹۶ |

حروف مختلف (a, b, c, d) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار (P < ۰/۰۵) در هر ستون است.

**جدول ۳- تأثیر افزودن BHT بر کیفیت منی گاومیش محافظت سرمایی شده، بعد از یخ‌گشایی در رقیق‌کننده تجاری بایوکسل(میانگین ±خطای معیار)**

| غلظت‌های BHT (میلی‌مولار) | فراسنجه‌های اسپرماتوزوآ (٪) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | تحرک | یکپارچگی آکروزم | پاسخ التهابی هیپواسموتیک | زنده‌مانی |
| ۰/۰ | $^{a}$۱/۶۴ ± ۴۷/۲۰ | $^{a}$۱/۳۰ ± ۲۲/۱۶ | $^{a}$۱/۲۹ ± ۴۵/۹۶ | $^{a}$۱/۲۲ ± ۶۱/۸۸ |
| ۰/۵ | $^{b}$۱/۵۸ ± ۴۹/۹۶ | $^{b}$۱/۱۱ ± ۲۴/۰۴ | $^{a}$۱/۲۶ ± ۴۶/۲۰ | $^{a}$۱/۳۳ ± ۶۲/۰۰ |
| ۱/۰ | $^{c}$۱/۶۳ ± ۵۹/۰۴ | $^{cd}$۱/۴۵ ± ۲۷/۲۸ | $^{b}$۱/۴۸ ± ۵۰/۵۲ | $^{b}$۱/۳۶ ± ۶۵/۸۰ |
| ۲/۰ | $^{c}$۱/۵۱ ± ۵۹/۲۸ | $^{c}$۱/۲۹ ± ۲۸/۰۰ | $^{b}$۱/۴۴ ± ۵۱/۰۸ | $^{c}$۱/۳۱ ± ۶۸/۹۶ |
| ۳/۰ | $^{d}$۱/۷۹ ± ۵۶/۲۴ | $^{d}$۱/۳۳ ± ۲۵/۸۸ | $^{a}$۱/۴۹ ± ۴۶/۰۴ | $^{a}$۱/۳۱ ± ۶۲/۹۶ |

حروف مختلف (a, b, c, d) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار (P < ۰/۰۵) در هر ستون است.

**جدول ۴- تأثیر افزودن BHT بر کیفیت منی گاومیش محافظت سرمایی شده،۶ ساعت بعد ازیخ‌گشایی دررقیق‌کننده تجاری بایوکسل(میانگین ±خطای معیار)**

| غلظت‌های BHT (میلی‌مولار) | فراسنجه‌های اسپرماتوزوآ (٪) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | تحرک | یکپارچگی آکروزم | پاسخ التهابی هیپواسموتیک | زنده‌مانی |
| ۰/۰ | $^{a}$۱/۱۰ ± ۲۱/۸۰ | $^{ac}$۱/۲۹ ± ۱۰/۱۲ | $^{a}$۱/۲۳ ± ۲۰/۹۶ | $^{a}$۱/۳۶ ± ۲۸/۹۲ |
| ۰/۵ | $^{b}$۱/۷۳ ± ۲۴/۳۶ | $^{ab}$۱/۲۹ ± ۱۱/۲۸ | $^{a}$۱/۳۷ ± ۲۱/۶۰ | $^{a}$۲/۰۱ ± ۲۹/۲۸ |
| ۱/۰ | $^{c}$۱/۷۱ ± ۲۸/۹۶ | $^{b}$۱/۲۴ ± ۱۲/۲۴ | $^{b}$۱/۳۱ ± ۲۴/۱۲ | $^{a}$۱/۳۳ ± ۳۰/۸۸ |
| ۲/۰ | $^{d}$۱/۱۷ ± ۱۷/۲۰ | $^{c}$۱/۳۳ ± ۹/۲۰ | $^{c}$۱/۴۱ ± ۱۶/۲۰ | $^{b}$۱/۳۲ ± ۲۴/۰۰ |
| ۳/۰ | $^{e}$۱/۲۱ ± ۹/۸۸ | $^{d}$۱/۰۹ ± ۴/۹۶ | $^{d}$۱/۲۹ ± ۱۰/۹۲ | $^{b}$۱/۴۲ ± ۲۲/۱۲ |

حروف مختلف (a, b, c, d) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < ۰/۰۵$) در هر ستون است.

## بحث

نتایج (جدول ۱) این آزمایش نشان داد که کیفیت پس ازیخ‌گشایی منی گاومیش برحسب فراسنجه‌های تحرک، یکپارچگی آکروزم، پاسخ التهابی هیپواسموتیک و زنده‌مانی با افزودن BHT در رقیق کننده بهبود یافت. گزارش‌های قبلی نشان می‌دهد به کار بردن BHT در رقیق‌کننده باعث بهبود کیفیت اسپرماتوزوآی سرد شده بوقلمون (دونوغو و دونوغو، ۱۹۹۷)، اسپرماتوزوآی محافظت سرمایی شده گاو نر(شعاعی و ضمیری،۲۰۰۸؛ چاترجی و گاگنن، ۲۰۰۱) ، قوچ (واتسون و آندرسون، ۱۹۸۳) ، بز (خلیفا و همکاران، ۲۰۰۸) و گونه‌های دیگر( روکا و همکاران، ۲۰۰۴؛ بامبا و کران، ۱۹۹۲) شده است.

اسپرمی‌که به لحاظ عملکردی طبیعی است، سطوح پایینی از گونه‌های اکسیژن فعال را تولید می‌کند. اما در اثر فرآیندهای سرد کردن و انجماد، کانال‌های یونی کلسیم تحریک شده و یک شیوع وابسته به کلسیمی از گونه‌های اکسیژن فعال را نشان داده که در نهایت منجر به استرس اکسیداتیو می‌شود. تولید مقدار متوسط از گونه‌های اکسیژن فعال ممکن است با فرآیندهای طبیعی بلوغ درگیر شده با کاپاسیتاسیون و واکنش آکروزمی، همراه شود ولی گونه‌های اکسیژن فعال اضافی و استرس اکسیداتیو باعث کاهش فعالیت آنزیم‌هایی که در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی نقش دارند شده و موجب افزایش پراکسیداسیون لیپید، کاهش یکپارچگی غشا، افزایش نفوذپذیری سلول، غیرفعال شدن آنزیم‌های موجود در غشا، آسیب به DNA، کاهش در جنبایی و ظرفیت باروری اسپرم ذخیره شده می‌شود و برای اسپرماتوزوآ زیان‌آور هستند (چاترجی و گاگنن، ۲۰۰۱؛ واتسون، ۲۰۰۰). BHT با دو مکانیسم محافظتی آسیب‌های ناشی از انجماد را کاهش می‌دهد، ۱)BHT 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).

اثر متقابل بین اجزا رقیق‌کننده و آنتی‌اکسیدان‌ها در حین ارزیابی کارآیی یک آنتی‌اکسیدان، عامل مهم دیگری برای تحقیق است. امکان دارد که مقدار زیادی ازBHT در محلول چربی پیوسته با لیپیدهای زرده تخم‌مرغ باقی بماند و یک غلظت پایینی از مولکول‌های BHT قابلیت نفوذ در غشا پلاسمایی منی را داشته باشند (خلیفا و همکاران، ۲۰۰۸). گراهام و همکاران (۱۹۹۲) گزارش کردند که افزودن آنالوگ‌های BHT، تحرک اسپرماتوزوآی رقیق شده در رقیق کننده‌های فاقد زرده تخم‌مرغ را هنگام مقایسه با رقیق کننده‌های حاوی زرده تخم‌مرغ کاهش داد. بر اساس این مطالعات نشان داده شد که BHT یا آنالوگ‌های آن اثر مکملی با زرده تخم‌مرغ در محافظت اسپرماتوزوآ از آسیب دارد. خلیفا و همکاران (۲۰۰۸) نیز گزارش کردند که میزان بهینه محافظت سرمایی منی بز در غلظت ۰/۵ میلی‌مول در رقیق کننده‌های منی بر پایه زرده تخم‌مرغ و غلظت ۰/۳ میلی‌مول BHT در رقیق کننده‌های فاقد زرده تخم‌مرغ می‌باشد.

محافظت از ROS در محدوده فیزیولوژی با عملکرد طبیعی اسپرماتوزوآ مانند پرتحرکی، ظرفیت‌پذیری و یکپارچگی آکروزم

مرتبط است (آیتکن، ۱۹۹۵). افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها در غلظت‌های بالاتر شاید روی استرس اکسیداتیو القا شده ROS بی‌اثر باشند ولی ارتباط عملکردی ROS و اسپرماتوزوآ را مختل می‌کنند (روکا و همکاران، ۲۰۰۴). به علاوه غلظت‌های بالاتر BHT می‌توانند سیالیت غشای پلاسمایی بالاتر از نقطه خواسته شده را افزایش دهند که باعث مستعد شدن آسیب آکروزمی می‌شود (شعاعی و ضمیری، ۲۰۰۸). از این رو غلظت BHT، عامل مهم دیگری است که هنگام به کارگیری در رقیق کننده بایستی مورد مطالعه قرار گیرد.

در این مطالعه، بالاترین غلظت BHT (۳ میلی‌مول) کیفیت اسپرماتوزوآ را پس از یخ‌گشایی کاهش داد. نتایج مشابه نیز نشان دادند که BHT در غلظت‌های بالا برای اسپرماتوزوآی گاو (شعاعی و ضمیری، ۲۰۰۸)، بز (خلیفا و همکاران، ۲۰۰۸)، انسان (آیتکن و کلارکسون، ۱۹۸۸) و دیگر گونه‌های حیوانی (روکا و همکاران، ۲۰۰۴؛ بامبا و کران، ۱۹۹۲) سمی است. ایجاز و همکاران (۲۰۰۹) نیز در تحقیقی که روی منی گاومیش انجام داده بودند، افزودن ۳ میلی‌مول BHT به رقیق کننده تریس- سیترات زرده تخم‌مرغ باعث کاهش معنی‌دار فراسنجه‌های اسپرماتوزوآ شده بود. بهترین نتایج مربوط به غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌مول BHT بود که تفاوت معنی‌داری بین این دو غلظت دیده نمی‌شد. با مقایسه نتایج تحقیق حاضر و مطالعه قبلی (ایجاز و همکاران، ۲۰۰۹) نشان داده شد که اسپرم از نژادهای مختلف گاومیش می‌تواند پاسخ مشابه به افزودن BHT داشته باشد. ایجاز و همکاران(۲۰۰۹) با افزودن ۲ میلی‌مول BHT در رقیق‌کننده تریس- سیترات زرده تخم مرغ در منی گاومیش بهترین نتایج را گزارش کرده بودند به طوری که فراسنجه‌های تحرک، یکپارچگی آکروزم، پاسخ التهابی هیپواسموتیک و زنده‌مانی اسپرماتوزوآ به ترتیب ۵۸/۵، ۲۸/۷، ۵۲/۳ و ۶۷/۶ درصد بود. در مطالعه حاضر نیز استفاده از ۲ میلی‌مول BHT بهترین نتایج را باعث شد، در رقیق‌کننده تریس- سیترات زرده تخم‌مرغ مقدار تحرک، یکپارچگی آکروزم، پاسخ التهابی هیپواسموتیک و زنده‌مانی به ترتیب ۵۳/۶۸، ۲۶/۹۲، ۵۱/۲۴ و ۷۰/۹۶ درصد بود و در رقیق‌کننده بایوکسل این مقادیر به ترتیب ۵۹/۲۸، ۲۸/۰۰، ۵۱/۰۸ و ۶۸/۹۶ درصد بودند. همان‌طور که مشاهده می‌شود نتایج گزارش ایجاز و همکاران (۲۰۰۹) از داده‌های به دست آمده با رقیق‌کننده تریس- سیترات زرده تخم‌مرغ تقریباً مشابه نتایج این مطالعه از داده‌های بدست آمده با رقیق کننده بایوکسل است. بهترین نتایج در مطالعه‌ای که شعاعی و ضمیری (۲۰۰۸) روی منی گاو انجام داده بودند، با افزودن ۱ میلی‌مول BHT در رقیق‌کننده زرده تخم‌مرغ- سیترات، برحسب حرکت روبه جلو، زنده‌مانی و اسپرم زنده با آکروزم یکپارچه به ترتیب ۴۴/۲، ۴۸/۹ و ۴۸/۷ گزارش کردند.

در این مطالعه، تفاوت غلظت‌های BHT (۰/۵-۳ میلی‌مول) بر کیفیت اسپرماتوزوآ بلافاصله پس از یخ‌گشایی و ۶ ساعت پس از یخ‌گشایی ارزیابی شد. ارزیابی اسپرماتوزوآ در رقیق کننده تریس-سیترات زرده تخم‌مرغ بلافاصله پس از یخ‌گشایی، نشان داد که به کارگیری ۱ و ۲ میلی‌مول BHT باعث افزایش معنی‌دار ۱۳ درصدی تحرک نسبت به گروه شاهد شد. بر حسب تحرک، یکپارچگی آکروزم و پاسخ التهابی هیپواسموتیک تفاوت معنی‌داری بین افزودن غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌مول BHT در رقیق‌کننده وجود نداشت ولی مقدار زنده‌مانی وقتی ۲ میلی مول BHT به رقیق‌کننده تریس-سیترات زرده تخم‌مرغ اضافه شد، بیشتر از سایر تیمارها بود. این نتایج موافق با یافته‌های ایجاز و همکاران (۲۰۰۹) بود.

نتایج بررسی فراسنجه‌های منی در رقیق‌کننده تجاری بایوکسل نیز مشابه نتایج در رقیق‌کننده تریس-سیترات زرده تخم‌مرغ بود. به طوری‌که در جدول ۳ نشان داده شده است افزودن ۱ و ۲ میلی‌مول BHT در رقیق کننده بایوکسل باعث بهبود کیفیت منی شد. همچنین از نظر تحرک، یکپارچگی آکروزم و پاسخ التهابی هیپواسموتیک تفاوت معنی‌داری بین افزودن غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌مول BHT به رقیق‌کننده وجود نداشت و مقدار زنده‌مانی تیمار ۲ میلی‌مول از تیمار ۱ میلی مول BHT بیشتر بود. افزودن ۳ میلی‌مول BHT به رقیق‌کننده نسبت به تیمار شاهد، بر حسب تحرک و یکپارچگی آکروزم سبب بهبود کیفیت اسپرماتوزوآ شد ولی باعث افت کیفیت اسپرماتوزوآ در مقایسه با تیمارهای ۱ و ۲ میلی‌مول BHT شد.

شعاعی و ضمیری (۲۰۰۸) در ارزیابی کیفیت منی ۲ و ۴ ساعت پس از یخ‌گشایی بهترین نتایج را با به کارگیری ۱ میلی‌مولBHT در رقیق‌کننده زرده تخم‌مرغ-سیترات در منی گاو گزارش کرده بودند. این نتایج برای ۲ ساعت پس از یخ گشایی برحسب حرکت روبه جلو، زنده‌مانی و اسپرم زنده با آکروزم یکپارچه به ترتیب ۳۵/۴، ۳۴/۴ و ۳۴ و برای ۴ ساعت پس از یخ‌گشایی نیز ۱۷/۱، ۲۸/۱ و ۲۷/۹ ثبت شده‌اند. همچنین، برای مثال حرکت رو به جلو با افزودن ۲ و ۴ میلی‌مول BHT، ۴ ساعت پس از یخ‌گشایی ۶/۷ و ۶/۲ بودند. به طوری که این نتایج نشان می‌دهد هر چه از لحظه یخ‌گشایی زمان بیشتری سپری می‌شود کیفیت منی نیز به همان نسبت کاهش می‌یابد.کاهش کیفیت منی ۶ ساعت پس از یخ‌گشایی در مطالعه حاضر هم گزارش شد.

به نظر می‌رسد که غلظت بهینه BHT وابسته به گونه حیوانات است. برای مثال غلظت بهینه BHT برای خوک ۰/۰۵-۲ میلی‌مول (بامبا و کران، ۱۹۹۲) و برای گاو ۰/۵-۱ میلی‌مول بود (شعاعی و ضمیری، ۲۰۰۸).

در این مطالعه، بررسی فراسنجه‌های اسپرماتوزوآ ۶ ساعت پس از یخ‌گشایی، نشان داد که غلظت‌های ۲ و ۳ میلی‌مول BHT، هم در رقیق‌کننده تریس- سیترات زرده تخم‌مرغ و هم در رقیق‌کننده تجاری بایوکسل باعث افت کیفیت منی شد.

نتایج با بررسی کیفیت اسپرماتوزوآ در رقیق‌کننده تریس-سیترات زرده تخم‌مرغ ۶ ساعت پس از یخ‌گشایی نشان داد که افزودن غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌مول BHT نسبت به سایر غلظت‌ها بهتر بود. برحسب تحرک، یکپارچگی آکروزم و پاسخ التهابی هیپواسموتیک تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌مول BHT وجود نداشت و بیشترین مقدار زنده‌مانی با افزودن ۱ میلی‌مولBHT بدست آمد. تیمارهای ۲ و ۳ میلی مولی BHT باعث کاهش ۶ تا ۱۳ درصدی تحرک در مقایسه با تیمار شاهد شدند (جدول ۲).

ارزیابی فراسنجه‌های منی در رقیق‌کننده تجاری بایوکسل ۶ ساعت پس از یخ‌گشایی (جدول ۴)، نشان داد که افزودن ۱ میلی‌مول BHT نسبت به سایر تیمارها باعث بهبود کیفیت اسپرماتوزوآ شد. همچنین غلظت‌های ۲ و ۳ میلی‌مولBHT باعث افت کیفیت منی نسبت به تیمار شاهد شدند.

این نتایج موافق با یافته‌های تحقیقی است که شعاعی و ضمیری (۲۰۰۸) روی منی گاو انجام داده و گزارش کرده بودند که غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌مولBHT، ۴ ساعت پس از یخ گشایی باعث افت کیفیت اسپرماتوزوآمی‌شود و بهترین نتایج با افزودن ۱ میلی‌مولBHT به رقیق کننده تریس- سیترات زرده تخم‌مرغ بدست آمده بود.

در نهایت غلظت‌های ۲ میلی‌مول BHT برای محافظت سرمایی منی گاومیش بلافاصله پس از یخ‌گشایی مناسب‌تر به نظر می‌رسند. کاهش شدید اکثر فراسنجه‌های اندازه‌گیری پس از ۶ ساعت از یخ‌گشایی پیشنهاد می‌کند که از منی بلافاصله پس از یخ‌گشایی استفاده شود. ولی نتایج بررسی اسپرماتوزوآ ۶ ساعت پس از یخ‌گشایی در این مطالعه نشان داد که افزودن ۲ میلی‌مول BHT نه تنها سبب بهبود فراسنجه‌های اسپرماتوزوآ نشد بلکه سبب افت کیفیت آن‌ها نیز شد و افزودن ۱ میلی‌مول BHT نتایج بهتری را ۶ ساعت پس از یخ‌گشایی باعث شد. در نتیجه با به تأخیر افتادن تلقیح مصنوعی استفاده از سطوح بالای BHT می‌تواند شرایط را نامطلوب‌تر نماید.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهدBHT به عنوان آنتی‌اکسیدان می‌تواند آسیب‌های ناشی از گونه‌های اکسیژن فعال را کاهش دهد ولی مطالعات بیشتری برای بررسی تأثیر به کارگیری BHT روی نرخ باروری گاومیش مورد نیاز است.

## منابع

Adeel, M., Ijaz, A., Aleem, M., Rehman, H., Yousaf, M.S. and Jabbar, M.A., 2009. Improvement of liquid and frozen-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo bulls (Bubalus bubalis) through supplementation of fat. Theriogenology. 71: 1220-1225.

Ahmad, Z., Anzar ,M., Shahab, M., Ahmad, N. and Andrabi, S.M., 2003. Sephadex and sephadex ion-exchange filtration improves the quality and freezability of low-grade buffalo semen ejaculates. Theriogenology. 59: 1189-1202.

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

Aitken, R.J. and Clarkson, J.S., 1988. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. Journal of Androlgy. 9: 367-376.

Andrabi, S.M., Ansari, M.S., Ullah, N., Anwar, M., Mehmood, A. and Akhter, S., 2008. Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. Animal Reproduction Science. 104: 427-433.

Aumuller, G. and Seitz, J., 1990. Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. International Review of Cytology. 121: 127-231.

Balestri, F., Giannecchini, M., Sgarrella, F., Carta, M.C., Tozzi, M.G. and Camici, M., 2007. Purine and pyrimidine nucleosides preserve human astrocytoma cell adenylate energy charge under ischemic conditions. Neurochemistry International. 50: 517-523.

Bamba, K. and Cran ,D.G., 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.

Chatterjee, S. and Gagnon, C., 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. Molecular Reproduction and Development. 59: 451-458.

Donoghue, A.M. and Donoghue, D.J., 1997. Effects of water- and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage. Poultry Science. 76: 1440-1445.

Graham, J.K. and Hammerstedt, R.H., 1992. Differential effects of butylated hydroxytoluene 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.

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.

Kakar, S.S. and Anand, S.R., 1981. Changes in adenosine 5'-triphosphate, adenylate energy charge and adenosine 3'5'-cyclic monophosphate during the freezing of buffalo semen. J Reproduction and Fertility. 62: 543-548.

Khalifa, T.A., Lymberopoulos, A.G. and El-Saidy, B.E., 2008. Testing usability of butylated hydroxytoluene in conservation of goat semen. Reproduction in Domestic Animals. 43: 525-530.

Kumaresan, A., Ansari, M.R. and Garg, A., 2005. Modulation of post-thaw sperm functions with oviductal proteins in buffaloes. Animal Reproduction Science. 90: 73-84.

Lewis, S.E., Sterling, E.S., Young, I.S. and Thompson, W., 1997. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. Fertility and Sterility. 67: 142-147.

Muer, S.K., Roy, S.B., Mohan, G. and Dhoble, R.L., 1988. Cryogenic changes in seminal protein of cattle and buffalo. Theriogenology. 30: 1005-1010.

Roca, J., Gil, M.A., Hernandez, M., Parrilla, I., Vazquez, J.M. and 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.

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

Watson, P.F., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal Reproduction Science. 60-61: 481-492.

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

Zini, A., Fischer, M.A., Mak, V., Phang, D. and Jarvi, K., 2002. Catalase-like and superoxide dismutase-like activities in human seminal plasma. Urological Research. 30: 321-323.