



"مقاله پژوهشی"

اثر مکمل سازی جیره با منابع آلی و معدنی سلیوم بر کیفیت منی منجمد یخ گشایی شده در خروس های مادر گوشتی تحت تنش اکسیداتیو با دگزامتازون

نامدار کامرانی^۱، امیر کریمی^۲، ذبیح اله نعمتی^۳ و مقصود بشارتی^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، فیزیولوژی دام، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز
۲- هیئت علمی گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز، (نویسنده مسؤول: pekairimi@tabrizu.ac.ir)
۳- دانشیار، گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۲۴

صفحه: ۱ تا ۱۰

چکیده

مطالعه حاضر به منظور مقایسه منابع آلی و معدنی سلیوم در خوراک بر کیفیت اسپرم های منجمد یخ گشایی شده خروس های گله مادر گوشتی تحت تنش اکسیداتیو انجام شد. در این تحقیق، ۲۴ قطعه خروس سویه راس ۳۰۸ با سن ۲۸ هفتگی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و ۶ پرنده در هر تیمار نگهداری شدند. تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از: (۱) گروه شاهد: جیره پایه بدون مکمل سازی با منابع سلیوم و یا تزریق دگزامتازون (CON)، (۲) گروه DEX: جیره پایه همراه با تزریق دگزامتازون (به مقدار ۴ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن طی ۳ مرحله و به صورت یک روز در میان) (۳) گروه DEX_(OSE): گروه دریافت کننده دگزامتازون همانند گروه ۲، همراه با جیره مکمل سازی شده با ۳/۰ میلی گرم سلیوم بر کیلوگرم خوراک از سلنومیتوین به عنوان منبع سلیوم آلی و (۴) گروه DEX_(ISE): مانند گروه ۳، اما جیره با ۳/۰ میلی گرم سلیوم بر کیلوگرم خوراک از سلنیت سدیم به عنوان منبع سلیوم معدنی مکمل سازی شد. پس از اسپرم گیری فرایند انجماد اسپرم با کمک رقیق کننده پلتسویل مدیفای شده انجام گرفت. پس از یخ گشایی اسپرم ها، فرآیندهای حرکتی با کمک سیستم آنالیز کامپیوتری انجام شد. نتایج نشان داد که مکمل سازی جیره با سلیوم آلی در پرندگان تحت تنش با دگزامتازون (DEX_(OSE))، سبب بهبود تحرک کل و تحرک پیش رونده اسپرم نسبت به سایر گروه های آزمایشی شد ($p < 0.05$) اگرچه DEX_(OSE) تفاوت معنی داری با گروه شاهد در حرکت پیش رونده اسپرم، نداشت ($p > 0.05$). همچنین مصرف سلیوم معدنی (DEX_(ISE)) تاثیر معنی داری بر بهبود تحرک کل و تحرک پیش رونده اسپرم، نسبت به گروه DEX نداشت ($p > 0.05$). از طرف دیگر، نه تنها زنده مانده و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم، بلکه پارامترهای بیوشیمیایی (گلوکاتایون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز) نیز در گروه DEX_(OSE) نسبت به سایر گروه های آزمایشی بالاتر بود ($p < 0.05$). به طور کلی به نظر می رسد، مکمل سازی جیره خروس های مادر با سلیوم آلی که تحت شرایط تنش با تزریق دگزامتازون قرار گرفته باشند، می تواند موجب بهبود کیفیت اسپرم نسبت به سلیوم معدنی شود.

واژه های کلیدی: اسپرم یخ گشایی شده، تنش اکسیداتیو، سلیوم آلی، سلیوم معدنی

مقدمه

عملکرد اسپرم است (۵). در شرایط فیزیولوژیکی، گونه های فعال اکسیژن برای عملکرد اسپرم مهم است (۲۶). در مقادیر اندک، آنها برای لقاح واکنش آکروزومی، تحرک و ظرفیت پذیری، لازم هستند (۱). با این حال، در شرایط پاتولوژیک، سطح بیش از حد ROS ممکن است بر کیفیت آنها تاثیر منفی بگذارد (۲۶). اسپرم ها به عنوان سلول هایی که در شرایط هوای زندگی می کنند، با یک تناقض اکسیژن روبرو هستند: O₂ برای آنها بسیار مهم است، اما متابولیت های آن مانند ROS می توانند عملکرد اسپرم را تغییر داده و بقای آنها را به خطر بیندازند (۱۱). ROS با دو مکانیسم اصلی باعث ناباروری می شود. این مواد با آسیب بر غشای اسپرم، نه تنها موجب کاهش تحرک اسپرم و توانایی لقاح آنها با تخمک ها می شوند، بلکه می توانند به DNA اسپرم آسیب رسانده و منجر به انتقال DNA معیوب پدیری به جنین شوند (۱۱). محافظت آنتی اکسیدانی نقش اساسی در حفظ یکپارچگی غشای اسپرم و توانایی لقاح آنها دارد (۴۴). سلیوم درگیر در دفاع آنتی اکسیدانی ارگانیسم، به طور قابل توجهی کیفیت انزال در جنس نر را تعدیل می کند (۴۵). سلیوم را می توان در بدن به عنوان بخشی از حداقل ۲۵ سلنوپروتئین مشاهده کرد

مناسب ترین ابزار جهت به دست آوردن بازده ژنتیکی بالا و کاهش بیماری های تولید مثلی، تلقیح مصنوعی است که تحت تاثیر فاکتورهای متعددی قرار دارد، یکی از فاکتورهای اصلی و مهم در تلقیح مصنوعی موفق، داشتن اسپرم های بارور می باشد که از طریق فرایند انجماد موفق به دست می آیند (۴۹). شواهد قابل توجهی وجود دارد که فریز کردن، باعث افزایش آسیب DNA، آنابولییدی (تخریب کروموزومی) و خرد شدن کروموزوم می شود (۲۹۶). غشای پلاسمایی اسپرم به دلیل وجود غلظت بالای اسیدهای چرب غیر اشباع (PUFAs) به پراکسیداسیون لیپید بسیار مستعد است (۱۶، ۱۰، ۷). این اسیدهای چرب غیر اشباع، سطح بالایی از سیالیت و خاصیت ارتجاعی لازم برای تحرک اسپرم و لقاح آن ها با تخمک را به غشا می دهند. پراکسیداسیون لیپید می تواند منجر به از بین رفتن سیالیت و یک پارچگی غشاها و در نتیجه کاهش توانایی لقاح اسپرم-تخمک شود (۱۶). استرس اکسیداتیو، عامل مهمی است که با پراکسیداسیون لیپیدها بر پتانسیل باروری اسپرماتوزوآها تاثیر منفی می گذارد (۵). تعداد اسپرم و تحرک آن ها شاخص های اساسی توانایی

دسترس آلود به آب داشتند. خروس ها با جیره پایه یکسان، تغذیه شدند (جدول ۱). تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از: ۱) گروه شاهد: مصرف کننده جیره پایه بدون مکمل سازی با منابع سلیوم و یا تزریق دگزامتازون (CON، 2) گروه DEX: مصرف کننده جیره پایه همراه با تزریق دگزامتازون (به مقدار ۴ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن طی ۳ مرحله و به صورت یک روز در میان) ۳) گروه DEX_(OSE): گروه دریافت کننده دگزامتازون همراه با مصرف جیره مکمل سازی شده با سلیوم به عنوان منبع سلیوم آلی به مقدار ۰/۳ میلی گرم بر کیلوگرم خوراک و ۴) گروه DEX_(ISE): گروه دریافت کننده دگزامتازون همراه با جیره مکمل سازی شده با ۰/۳ میلی گرم بر کیلوگرم خوراک سلیت سدیم به عنوان منبع سلیوم معدنی.

تزریق دگزامتازون و اسپرم گیری

در آزمایش حاضر، القاء تنش اکسیداتیو، از طریق تزریق دگزامتازون که از شرکت دارویی ابوریحان (ابوریحان-ایران) تهیه شده بود، به مقدار ۴ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن طی ۳ مرحله و به صورت یک روز در میان، انجام شد (۳۱). پس از دو هفته عادت پذیری، اسپرم گیری از ۲۴ قطعه خروس به مدت ۲ هفته و هفته ای ۲ بار به روش مالش پشتی-شکمی، انجام گرفت (۸). نمونه ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در بن ماری قرار داده شدند تا ارزیابی اولیه از نظر تحرک، غلظت و رنگ اسپرم انجام شود. اسپرم های با تحرک ۷۵٪ و غلظت مناسب به عنوان اسپرم های طبیعی در نظر گرفته شده و برای مراحل بعدی آزمایش، جهت از بین بردن اثرات فردی، نمونه ها با هم مخلوط شدند. محیط رقیق کننده مورد استفاده در این آزمایش، رقیق کننده بلتسویل بهبود یافته بود (۳۲) که تمامی ترکیبات آن از شرکت مرک (مرک، آلمان) تهیه شده بود (جدول ۲).

انجماد و یخ گشایی اسپرم

نمونه های منی که به منظور حذف اثرات فردی مخلوط شده بودند، به نسبت ۱ به ۲۰ به محیط رقیق کننده افزوده و درون یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد، انتقال داده شدند. پس از ۲ ساعت و رسیدن دمای نمونه ها به ۴ درجه سانتی گراد، اسپرم ها به صورت دستی داخل پایوت ها کشیده و با خمیر همتوکریت مهر و موم شدند. پایوت های دارای اسپرم، در ارتفاع ۴ سانتی متر بالای بخار ازت به مدت ۷ دقیقه قرار داده شدند و سپس برای ذخیره سازی به داخل تانک ازت (۱۹۶- درجه سانتی گراد) انتقال داده شدند تا پروسه انجماد اسپرم ها تکمیل شود (۳). برای بررسی فرآیندهای کیفی اسپرم تیمارهای مختلف آزمایشی، پایوت های حاوی اسپرم منجمد، از ازت مایع خارج شدند و پس از قراردادن در حمام آب گرم دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، یخ گشایی شده و به داخل میکروتیوپ تخلیه شدند تا ارزیابی های مورد نظر انجام شود (۳).

(۲۸،۴۸). این سلنوپروتئین ها در تنظیم عملکردهای مختلف فیزیولوژیکی از جمله محافظت از آنتی اکسیدان ها، تنظیم ردوکس بیان ژن، متابولیسم تیروئید و حفظ یکپارچگی ساختار اسپرم درگیر هستند (۴۳). نشان داده شده است که سلیوم یک عنصر تشکیل دهنده اسپرم و از عناصر اساسی برای اسپرماتوژنز است (۵۰). در بیضه ها، چندین سلنوپروتئین مانند سلنوسفات سنتاز (SPS-2) و سلنوپروتئین میتوکندریایی وجود دارند (۲۱،۱۴). عمل بیولوژیکی سلیوم در پستانداران از طریق ترکیبات فعال زیستی شامل آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز و سایر سلنوپروتئین های سرم و بافت بیان می شود (۲۴). سلیوم از طریق مشارکت در محل فعال آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز، که هم در پلاسما منی و هم در اسپرم وجود دارد، دارای خاصیت آنتی اکسیدانی است. این عنصر، در باروری جنس نر ضروری و نقش بسیار مهمی را می تواند برعهده داشته باشد (۲۳). استفاده از منابع سلیومی مانند سلنومیتوئین، باعث افزایش کمیت و کیفیت مایع منی می شود (۱۸). عنصر سلیوم می تواند در حالت اکسیداسیون یا احیاء به شکل سلیت سدیم، سلنات سدیم و سلنید سدیم وجود داشته باشد. بنابراین سلیوم معدنی را می توان در اشکال مختلف نظیر سلیت سدیم، سلنات سدیم و سلنید سدیم دید که رایج ترین نوع معدنی آن سلیت سدیم است (۹). امروزه برای جلوگیری از بیماری ها، بیشتر از فرم آلی استفاده می شود، چون مشخص شده است که سلیت سدیم سمیت بیشتری نسبت به این مکمل ها (سلیوم آلی) دارد (۴۶). در مطالعه ای، نشان داده شد که مکمل سازی جیره خروس با سطوح ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ میلی گرم بر کیلوگرم خوراک سلیوم آلی (سلپلکس) هیچ تأثیری بر غلظت، حجم و pH اسپرم نداشت ولی مکمل سازی جیره خروس با ۰/۳ میلی گرم بر کیلوگرم خوراک سلیوم آلی (سلپلکس) می تواند سبب بهبود کیفیت اسپرم خروس گردد (۲).

هدف از مطالعه حاضر مقایسه منابع مختلف سلیومی با منشاء معدنی و آلی بر فرآیندهای کیفی اسپرم منجمد یخ گشایی شده خروس های گله مادر گوشتی تحت القاء تنش اکسیداتیو با استفاده از تزریق دگزامتازون، می باشد.

مواد و روش ها

مکان انجام آزمایش و تیمارهای آزمایشی

این تحقیق، در واحد مرغداری دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز انجام شد. به منظور انجام این آزمایش، از ۲۴ خروس سویه راس ۳۰۸ با سن ۲۸ هفته در ۴ تیمار و ۶ پرنده در هر تیمار استفاده شد. خروس ها در قفس های انفرادی و تحت شرایط، ۱۵ ساعت روشنایی و ۹ ساعت تاریکی قرار گرفته و تغذیه آنها به صورت دستی و در دو نوبت صبح و عصر انجام گرفت و از طریق آبخوری نیپلی،

جدول ۱- اجزای تشکیل دهنده و ترکیب شیمیایی جیره آزمایشی

Table 1. Feed ingredients and composition of experimental diet

ترکیب جیره	درصد	اقلام خوراکی
انرژی (۳۷۵۰) کیلوکالری در کیلوگرم	۵۷	ذرت
پروتئین (۱۲ درصد)	۱۰	سویا
متیونین (۰/۳۲ درصد)	۱۱	جو
لازین (۰/۵ درصد)	۱۸	سیوس
ترئونین (۰/۳۸ درصد)	۱/۳	دی کلسیم فسفات
کلسیم (۰/۷ درصد)	۱/۶	صدف
فسفر (۰/۳۵ درصد)	۰/۵	مکمل معدنی ویتامینه
سدیم (۰/۱۸ درصد)	۰/۳	نمک
کلر (۰/۱۶ درصد)	۰/۰۵	جوش شیرین
اسیدلینولیک ۱	۰/۱۱	متیونین
	۰/۰۱	ویتامین B
	۰/۰۱	ویتامین E
	۰/۰۱	کولین کلراید

۱- هر کیلوگرم مکمل ویتامینی شامل: ویتامین A ۳۶۰۰۰۰ واحد بین المللی، ویتامین D3 ۸۰۰۰۰ واحد بین المللی، ویتامین E ۷۲۰۰ واحد بین المللی، ویتامین B1 ۷۲۰ میلی گرم، ویتامین B2 ۲۶۴۰ میلی گرم، اسید پانتوتنیک ۴۰۰۰ میلی گرم، اسید نیکوتینیک ۱۲۰۰۰ میلی گرم، ویتامین B6 ۱۲۰۰ میلی گرم، اسید فولیک ۴۰۰ میلی گرم، ویتامین B12 ۶ میلی گرم، ویتامین K3 ۸۰۰ میلی گرم، بیوتین ۴۰ میلی گرم، کولین کلراید ۱۰۰۰۰ میلی گرم و آنتی اکسیدان ۴۰۰۰۰ میلی گرم. ۴۰ گرم منگنز به شکل سولفات منگنز، ۸۰ میلی گرم سلنیوم، ۵۰ گرم آهن به شکل سولفات آهن، ۱۰ گرم مس به شکل سولفات مس، ۴۰۰ میلی گرم ید

جدول ۲- اجزای تشکیل دهنده رقیق کننده بلتسویل بهبود یافته

Table 2. Composition of modified Beltsville extender

ترکیبات شیمیایی	مقدار
دی پتاسیم فسفات	۷/۵۹ گرم در لیتر
سدیم گلوتامات	۸/۶۷ گرم در لیتر
فروکتوز	۵ گرم در لیتر
سدیم استات	۳/۲ گرم در لیتر
تریس	۳/۲ گرم در لیتر
پتاسیم سیترات	۰/۶۴ گرم در لیتر
مونو پتاسیم فسفات	۰/۷ گرم در لیتر
کلراید منیزیم	۰/۳۴ گرم در لیتر
گلیسرول	۳ درصد
لسیتین	۰/۵ درصد

ارزیابی تحرک اسپرم با دستگاه کاسا

جهت ارزیابی فرآیندهای حرکتی اسپرم از قبیل تحرک کل، تحرک پیش رونده، میانگین سرعت در مسیر، سرعت در مسیر مستقیم، سرعت در مسیر منحنی، خطی بودن تحرک، درصد مستقیم الخط بودن حرکت اسپرم ها، تحرک عرضی سر، فرکانس حرکات جانبی از سیستم آنالیز رایانه ای مجهز به میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگنمایی ۱۰۰ استفاده شد. بدین منظور سه پایوت از هر گروه تیماری با روشی که در بالا توضیح داده شد، بـخ گشایی شده و به داخل میکروتیوب ها انتقال داده شدند، سپس ۱۰ میکرولیتر از نمونه منی رقیق شده را روی لام ریخته و یک لامل تمیز روی آن قرار داده شد و فرآیندهای جنبایی اسپرم با استفاده از کامپیوتر ارزیابی شد (۱۳).

وضعیت زنده ماننی اسپرم

وضعیت زنده ماننی اسپرم ها به وسیله رنگ آمیزی انوزین-نگروزین حاوی رنگ انوزین (۱/۶۷ گرم)، رنگ نیگروزین (۱۰ گرم) و سیترات سدیم (۲/۹ گرم) در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر، بررسی شد. برای این منظور، ۱۰ میکرولیتر منی رقیق شده را با ۲۰ میکرولیتر رنگ روی لام تمیز به آرامی مخلوط کرده و پس از تهیه گسترش و خشک شدن در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، زنده ماننی تعداد ۲۰۰

اسپرم به وسیله میکروسکوپ نوری با بزرگنمای ۴۰× مورد بررسی قرار گرفت. اسپرم هایی که رنگ نگرفته بودند، زنده و اسپرم هایی که رنگ گرفته بودند، مرده تلقی شدند (۲۰).

ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم

در این آزمایش، از تست هایپواسموتیک (HOST) به منظور بررسی یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم استفاده شد. برای این منظور ۱۰ میکرولیتر از مایع منی به ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک هاست که حاوی ۹ گرم فروکتوز، ۴/۹ گرم سیترات سدیم، ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر با اسمولاریته ۱۰۰ میلی اسمول است، اضافه شد و سپس ۶۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از انکوباسیون و تهیه حداقل ۳ قطره از نمونه انکوبه شده، وضعیت اسپرم های با دم صاف و دم پیچیده زیر میکروسکوپ با عدسی ۴۰× مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. با توجه به اینکه اسمولاریته مورد نیاز برای اسپرم ۳۷۵-۳۲۰ میلی اسمول است، اسپرم با قرار گرفتن در این محیط به سرعت واکنش داده و انتهای دم آن ها گره می خورد. در واقع پس از انجام این آزمایش، اسپرم های با دم گره خورده به عنوان اسپرم های دارای غشاء یکپارچه و اسپرم های که دم آن ها صاف است به عنوان اسپرم داری غشاء غیر یکپارچه تلقی شدند (۳۸).

معنی داری نشان داد ($p < 0.05$). تحرک پیش رونده اسپرم در تیمار سلیوم آلی در مقایسه با تیمار شاهد، اختلاف معنی داری ندارد ($p > 0.05$) ولی در مقایسه با شاهد همراه با دگزامتازون و سلیوم معدنی همراه با دگزامتازون، تفاوت معنی داری نشان داد ($p < 0.05$). در آزمایشی که بر روی خروس انجام شد، نشان داده شد که استفاده از دگزامتازون به مقدار ۴ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، سبب کاهش در تحرک اسپرم در مقایسه با تیمار شاهد شد (۱۹). مکمل سلیوم باعث افزایش فعالیت آنزیمی با استفاده از ATP و مسیره های احیا کننده ATP در اسپرم می شود که با تحرک و مصرف اکسیژن اسپرم ارزیابی می شوند (۳۷، ۳۰). تغییرات در وضعیت سیستم آنتی اکسیدانی اسپرم خروس و پلاسمای منی اطراف آن در حین انجماد ممکن است بر کیفیت منی و توانایی لقاح اسپرم تأثیر بگذارد (۳۴). همچنین در مطالعه ای دیگر نیز افزایش تحرک اسپرماتوزوئیدها در خروس ها، پس از مکمل سازی با سلیوم آلی ۰/۳ میلی گرم بر کیلوگرم خوراک (سلپلکس)، نشان داده شده است (۱۷). در مطالعه ای به این نتیجه رسیدند هنگامی که ۰/۲ میلی گرم بر کیلوگرم خوراک، سلیوم آلی به رژیم غذایی خروس اضافه شود، درصد اسپرم های نرمال تا ۹۸/۷ درصد، افزایش می یابد (۱۸). به طور مشابه، در مطالعه انجام شده بر روی خوک، نشان داده شد، کمترین کاهش در تحرک پیش رونده در طول ۷ روز ذخیره سازی، در تیمار سلیوم آلی (سلپلکس) ppm ۰/۳، در مقایسه با تیمارهای سلیوم معدنی (سدیم سلیت) ppm ۰/۳ و شاهد مشاهده شد (۳۶). به جز دو پارامتر سرعت در مسیر مستقیم و خطی بودن تحرک، که در تمامی تیمارها غیر معنی دار هستند، سایر پارامترهای حرکتی اسپرم از قبیل، میانگین سرعت در مسیر، درصد مستقیم الخط بودن حرکت اسپرم ها، تحرک عرضی سر، نیز در تیمار سلیوم آلی که دگزامتازون نیز دریافت کرده بود، دارای بیشترین مقدار بوده در حالی که گروه آزمایشی شاهد دریافت کننده دگزامتازون، کمترین مقادیر را نشان داد ($p < 0.05$). سرعت در مسیر منحنی، در تیمار شاهد بیشترین مقدار بود ولی اختلاف معنی داری با تیمار سلیوم آلی نداشت. در مورد فرکانس حرکات جانبی تیمارهای شاهد و سلیوم آلی مقادیر کمتری نسبت به تیمارهای شاهد همراه با دگزامتازون و سلیوم معدنی نشان دادند. این فرآیندها نیز موید اثر مثبت سلیوم بر پارامترهای اسپرم می باشد، زیرا در پژوهش های دیگر نشان داده شده است که پارامترهای حرکتی ارتباط توأم و نزدیکی با تحرک اسپرم دارند (۲۷).

شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی

برای اندازه گیری غلظت مالون دی آلدئید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید، مقدار یک میلی لیتر از منی رقیق شده با یک میلی لیتر کلرید سدیم ۰/۹ درصد مخلوط شده و سپس نمونه ها با دور ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و به تعداد سه بار با بافر سترات شستشو و مجدداً سانتریفیوژ شدند. در نهایت محلول رویی دور ریخته شده و رسوب باقیمانده اسپرم ها در یک میلی لیتر آب دیونیزه حل شده و تا زمان انجام تست، نمونه ها در ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. برای اندازه گیری غلظت مالون دی آلدئید مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از هر نمونه را برداشته و با یک میلی لیتر محلول اسید تری کلریدریک ۲۰ درصد و تیوباربیتوریک اسید ۰/۵ درصد مخلوط شده و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد حرارت داده شد. سپس نمونه ها بعد از سرد شدن در داخل یخ، به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. در پایان عدد جذب مالون دی آلدئید محلول بالایی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۸۶ نانومتر خوانده شده و غلظت مالون دی آلدئید ثبت شد (۳۵).

اندازه گیری فعالیت گلوکوتایون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و اندازه گیری ظرفیت کل آنتی اکسیدانی

اندازه گیری فعالیت آنزیم های گلوکوتایون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز موجود در پلاسمای منی و ظرفیت کل آنتی اکسیدانی پلاسمای منی توسط کیت های تجاری شرکت طب پژوهان (ایران-تهران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

آنالیز آماری

به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده های جمع آوری شده، از نرم افزار SAS، در قالب طرح کاملاً تصادفی تحت رویه GLM و براساس مدل آماری زیر با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال ۰/۰۵ استفاده شد.

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

که در این مدل، Y_{ij} = مقدار عملکرد صفت وابسته ی نمونه ی j ام در تیمار i ام، μ = میانگین کل تیمار، T_i = اثر تیمار و e_{ij} = اثرات باقیمانده، هستند.

نتایج و بحث

داده های مربوط به فرآیندهای حرکتی اسپرم، در (جدول ۳) ارائه شده است. با توجه به این جدول، مشاهد می شود که سلیوم آلی دارای بهترین عملکرد بوده و تحرک کل اسپرم در این تیمار در مقایسه با تیمار شاهد، شاهد همراه با دگزامتازون و سلیوم معدنی همراه با دگزامتازون، تفاوت

جدول ۳- اثرات منابع آلی و معدنی سلیوم بر تحرک و فرآیندهای حرکتی اسپرم منجمد یخ گشایی شده خروس‌های مادر گوشتی تحت تنش اکسیداتیو

Table 3. Effects of organic and inorganic forms of selenium on motility and motility parameters of frozen-thawed sperm in broiler breeder roosters under oxidative stress

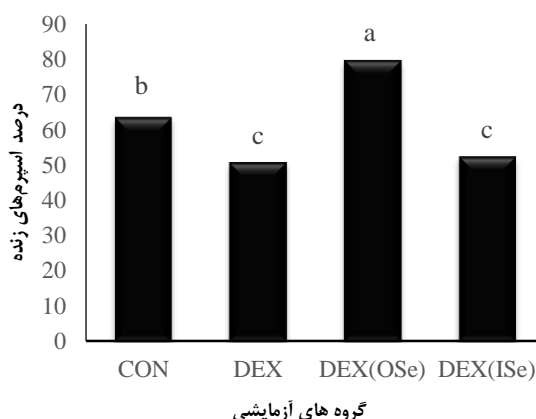
پارامترها	CON ^۱	DEX	DEX _(OSe)	DEX _(ISe)	خطای استاندارد	سطح معنی‌داری
تحرک کل اسپرم (%)	۶۸/۸۶ ^b	۴۹/۱۶ ^c	۷۹/۹ ^a	۵۴/۵ ^c	۱	<۰/۰۰۰۱
تحرک پیش‌رونده اسپرم (%)	۳۶/۳۳ ^a	۱۲/۴۶ ^b	۳۲/۸۶ ^a	۱۵/۶۳ ^b	۱/۳۵	۰/۰۰۶۶
میانگین سرعت در مسیر (میکرومتر بر ثانیه)	۱۹/۰۸ ^a	۱۱/۹۹ ^b	۲۰/۶۷ ^a	۱۵/۰۳ ^{ab}	۱	۰/۰۳۱۴
سرعت در مسیر مستقیم (میکرومتر بر ثانیه)	۱۴/۸۳	۹/۴۸	۱۷/۰۹	۱۲/۱۱	۰/۹۹	۰/۰۶۲۴
سرعت در مسیر منحنی (میکرومتر بر ثانیه)	۵۳/۲۸ ^a	۳۴/۹۳ ^c	۴۷/۳۰ ^{ab}	۴۲/۰۳ ^{bc}	۱/۱۹	۰/۰۰۴۷
خطی بودن تحرک (%)	۲۵/۶۶	۲۲/۲۵	۳۷/۷۳	۲۷/۸۳	۱/۴۱	۰/۰۶۱۲
درصد مستقیم‌الخط بودن حرکت اسپرم‌ها (%)	۷۰/۸۵ ^{ab}	۶۴/۴۵ ^b	۷۵/۶۰ ^a	۷۳/۶۷ ^a	۱/۱۴	۰/۰۲۸۲
تحرک عرضی (سر میکرومتر)	۱/۴۸ ^a	۰/۹۰ ^b	۱/۳۳ ^a	۱/۰۹ ^b	۰/۱۹	۰/۰۰۲۱
فرکانس حرکات جانبی (هرتز)	۱۴/۱۹ ^b	۱۶/۰۸ ^a	۱۴/۲۱ ^b	۱۶/۶۹ ^a	۰/۵۳	۰/۰۱۳۸

۱- تیمارها با حروف متفاوت از نظر آماری در سطح احتمال ۰/۰۵ تفاوت معنی‌دار دارند.

۲- CON: گروه شاهد (مصرف کننده جیره پایه بدون مکمل سلیوم و یا تجویز دگزاتازون)، DEX: گروه مصرف کننده جیره پایه همراه با تجویز دگزاتازون، DEX(OSe): گروه دریافت کننده دگزاتازون همراه با مصرف جیره حاوی سلیوم معدنی، DEX(ISe): گروه دریافت کننده دگزاتازون همراه با مصرف جیره حاوی سلیوم معدنی.

گلوکاتینون ترکیب شده و منجر به تولید سوپراکسیدها و نیز دیگر مشتقات اکسیژنی فعال در بافت‌ها و سلول‌های مربوطه که سلنیت سدیم در آنها تجمع دارد، شده و باعث تأثیرات منفی مانند آسیب دیدگی غشای سلولی و کاهش زنده‌مانی سلول شود؛ زیرا گلوکاتینون پروکسیداز بخش بسیار مهمی از سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول در محافظت از غشای سلولی در برابر عوامل اکسید کننده می‌باشد (۴۰). خروس‌هایی که دگزاتازون به آنها تزریق شده بود نیز دارای درصد زنده‌مانی پایین بودند؛ نتایج پژوهش حاضر، با نتایج آزمایش عید و همکاران (۱۹) مطابقت دارد که در آن نشان دادند، استفاده از دگزاتازون به مقدار ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن سبب افزایش درصد اسپرم‌های مرده می‌شود.

با توجه به داده‌های موجود در (شکل ۱) مشاهده می‌شود که سلیوم آلی (۷۹/۸۴ درصد)، زنده‌مانی اسپرم‌ها در برابر شوک سرمایی وارد شده موقع انجماد را توانسته به خوبی کنترل کند و این تیمار دارای بیشترین مقدار زنده‌مانی بوده و از نظر آماری نیز اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نشان می‌دهد ($p < 0.05$). افزایش زنده‌مانی اسپرم پس از دوره انجماد-یخ گشایی، با مکمل‌سازی سلیوم در جیره گاو میش نیز نشان داده شده است (۲۵). برخلاف سلیوم آلی، مکمل‌سازی جیره مصرفی با سلیوم معدنی نتوانسته به خوبی اثرات منفی تنش ایجاد شده توسط دگزاتازون بر زنده‌مانی اسپرم را کاهش دهد. دلیل این امر شاید مربوط به تبدیل شدن سلنیت سدیم به مشتقات دیگری مانند سلنیدها و یا دی‌اکسید سلیوم باشد که می‌تواند با ملکول‌های زیستی مانند



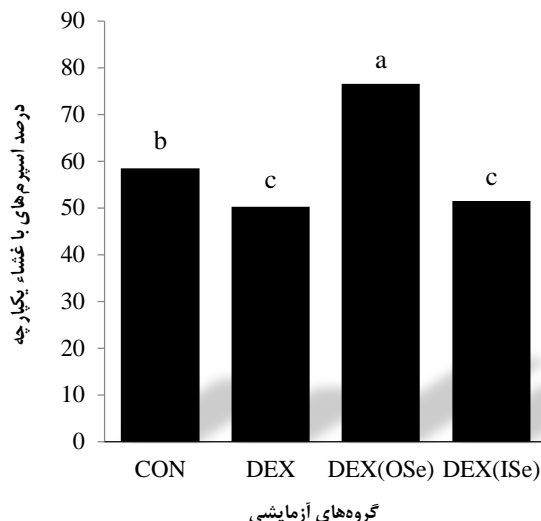
شکل ۱- اثرات منابع آلی و معدنی سلیوم بر زنده‌مانی اسپرم منجمد یخ گشایی شده خروس‌های مادر گوشتی تحت تنش اکسیداتیو.
Figure 1. Effects of organic and inorganic forms of selenium on sperm viability of frozen-thawed sperm in broiler breeder roosters under oxidative stress.

شکل ۲، نشان‌دهنده مطالعه یک پارچگی غشای پلاسمایی اسپرم می‌باشد. با توجه به این شکل، مشاهده می‌شود، یک پارچگی غشای پلاسمایی در گروه آزمایشی مصرف کننده سلیوم آلی در حداکثر مقدار نسبت به گروه‌های آزمایشی دیگر بوده و با آنها اختلاف معنی‌داری نشان می‌دهد

($p < 0.05$). در مطالعه حاضر، سلیوم معدنی نیز نتوانسته آن چنان که انتظار می‌رفت، عملکرد خوبی از خود نشان دهد و یک پارچگی غشای پلاسمایی در این تیمار، متاسفانه نسبت به گروه‌های مصرف کننده سلیوم آلی و نیز گروه شاهد ضعیف تر بود ($p < 0.05$). در این رابطه شایان ذکر است در

مذکور را کاهش دهد. همین نتیجه یاد شده نیز در مورد فراسنجه یک پارچگی غشای پلاسمایی (نمودار ۲) مشاهده می شود.

تیمارهای مصرف کننده مکمل سلنیوم چه بصورت آلی و چه به صورت معدنی، تزریق دگزامتازون نیز انجام شده است. و در این رابطه گویا به نظر می رسد مصرف کننده تیمار معدنی نسبت به تیمار آلی، نتوانسته اثرات منفی دگزامتازون در گروه



شکل ۲- اثرات منابع آلی و معدنی سلنیوم بر یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم منجمد یخ گشایی شده خروس های مادر گوشتی تحت تنش اکسیداتیو

Figure 2. Effects of organic and inorganic forms of selenium on plasma membrane integrity of frozen-thawed sperm in broiler breeder roosters under Oxidative stress

ولی در مقایسه با تیمار شاهد و شاهد همراه با دگزامتازون به طور معنی داری بالاتر بودند ($p < 0.05$). حداقل ۵۰ درصد از مواد کپسولی را پروتئین گلوپروتئین پراکسیداز شامل می شود که ماریچ میتوکندری را در خود جای داده است (۴۷). با توجه به فعالیت گلوپروتئین پراکسیداز در پلاسمای منی، آنزیم حاوی سلنیوم، گلوپروتئین پراکسیداز، نقش مهمی را در سم زدایی از هر پراکسید لیپیدی که در اسپرم خروس ظاهر می شود، دارد (۲۲). در طیور، حدود ۶۰ درصد از شکل وابسته به سلنیوم از گلوپروتئین پراکسیداز در اسپرماتوزوآ در پلاسمای منی و ۴۰ درصد در اسپرماتوزوآ مشاهده می شود (۴۱) در حالی که در مطالعه سوریا و همکاران (۴۲) که مصرف سلنیوم (۰/۳ میلی گرم در کیلوگرم) در رژیم غذایی جنس نر باعث افزایش فعالیت وابسته به گلوپروتئین پراکسیداز می شود که با محافظت بیشتر در برابر پراکسیداسیون لیپیدها در مایع منی مرتبط است. در مطالعه ای دیگر، نشان داده شد خروس های تغذیه شده با سلنیوم آلی (سلپلکس) به مقدار ۰/۳ میلی گرم در کیلوگرم خوراک، میزان فعالیت گلوپروتئین پراکسیداز منی افزایش یافت (۱۷). گلوپروتئین پراکسیداز آنزیم آنتی اکسیدانی است که همانند سوپراکسید دیسموتاز با مانع از پراکسیداسیون لیپید موجود در غشای اسپرم و در نهایت از طریق بهبود حرکت اسپرم، بر عملکرد اسپرم تأثیر می گذارد (۳۳). گلوپروتئین پراکسیداز، نقش مهمی در تولید اسپرم، بلوغ و باروری آن داشته و عدم وجود این آنزیم منجر به کاهش ظرفیت بارورسازی اسپرم می گردد (۳۳). در تحقیقی، اثرات سطوح مختلف سلنیوم معدنی جیره (سدیم سولیت ۰/۵، ۱ و ۲

داده های مربوط به پارامترهای بیوشیمیایی در جدول (۴) نشان شده است. با نگاه به این جدول مشاهده می شود که مالون دی آلدئید در تیمارهای سلنیوم آلی و معدنی به همراه دگزامتازون در مقایسه با سایر تیمارها اختلاف معنی داری نشان داده ($p < 0.05$). به گونه ای که مالون دی آلدئید تولید شده در این ۲ تیمار در مقایسه با سایر تیمارها کمترین مقدار می باشد و در تیمار شاهد همراه با دگزامتازون بیشترین مقدار می باشد. نشان داده شده است که در اسپرم خروس، کیفیت ضعیف مایع منی مانند تحرک اسپرم با مقادیر بیشتری از مالون دی آلدئید همراه است (۳). پراکسیداسیون باعث ایجاد تغییرات نامطلوب در ساختار بخش آکروزومی اسپرم ها می شود و در نتیجه تحرک و زنده ماندن اسپرم ها را کاهش می دهد (۱۵). عید و همکاران (۱۹) نشان دادند که تنش ممکن است پراکسیداسیون لیپیدها را در پلاسمای منی و همچنین در غشای اسپرماتوزوای بالغ، در خروس افزایش دهد. ظرفیت آنتی اکسیدانی کل نیز تأیید کننده داده های مالون دی آلدئید بوده و نشان می دهد که مکمل سازی سلنیوم آلی و معدنی در گروه های دریافت کننده دگزامتازون توانسته است به خوبی اثرات سرکوب کنندگی دگزامتازون را از بین ببرد. با نگاه به جدول (۴)، مشاهده می شود که ظرفیت کل آنتی اکسیدانی در تیمارهای شاهد و شاهد همراه با دگزامتازون نسبت به دو تیمار قبلی کاهش یافته به گونه ای که از نظر عددی به ترتیب برابر با ۱/۱۶ و ۱/۰۱ می باشند. فعالیت آنزیمی گلوپروتئین پراکسیداز تولید شده در تیمارهای مصرف کننده سلنیوم آلی و معدنی به همراه دگزامتازون اختلاف معنی داری نشان ندادند؛

دیسموتاز، شرایط خوبی را دارد ولی در تیمار شاهد و شاهد همراه با دگزامتازون کاهش یافته و کمترین مقدار برای تیمار کنترل به همراه دگزامتازون می باشد. سوپراکسید دیسموتاز، مهم ترین و اولین آنزیم آنتی اکسیدانی در تمام ارگانسیم های هوازی می باشد که در کاهش مستقیم مشتقات اکسیژنی فعال، نقش دارد (۱۲). سوپراکسید دیسموتاز ثابت شده است که به ایفای نقش کلیدی در دفاع سلولی در برابر آسیب های اکسیداتیو می پردازد. آنزیم SOD دیسموتاسیون O_2 را به H_2O_2 کاتالیز می کند (۴).

میلی گرم در کیلوگرم ماده خشک) بر شرایط آنتی اکسیدانی در بیضه خروس ها مورد مطالعه قرار گرفت و مشاهده شد که فعالیت گلوکوتاتیون پراکسیداز در تیمار ۰/۵ میلی گرم در کیلوگرم ماده خشک، سدیم سلنیت، حداکثر بوده و میزان مالون دی آلدئید در کمترین مقدار خود می باشد (۳۹). داده های مربوط به پارامتر سوپراکسید دیسموتاز موجود در جدول (۴) نشان می دهند که تیمار سلنیوم آلی به مراتب بهتر از سایر گروه های آزمایشی بوده و اختلاف معنی داری را در مقایسه با تیمارهای دیگر نشان می دهد ($p < 0.05$). سلنیوم معدنی نیز نسبت به تیمار شاهد از نظر تولید سوپراکسید

جدول ۴- اثرات منابع آلی و معدنی سلنیوم بر پارامترهای بیوشیمیایی اسپرم منجمد یخ گشایی شده خروس های مادر گوشتی تحت تنش اکسیداتیو

Table 4. Effects of organic and inorganic forms of selenium on biochemical parameters of frozen-thawed sperm in broiler breeder roosters under oxidative stress

تیمارهای آزمایشی						پارامترها
سطح معنی داری	خطای استاندارد	DEX _(ISe)	DEX _(OSe)	DEX	CON ^۱	
۰/۰۰۰۳	۰/۴۵	۵/۲۹ ^c	۵/۷۱ ^c	۹/۱۱ ^a	۶/۹۴ ^{ab}	مالون دی آلدئید (nmol/ml)
۰/۰۰۴۳	۰/۱۳	۱/۱۹ ^{ab}	۱/۲۸ ^a	۱/۰۱ ^b	۱/۱۶ ^{ab}	ظرفیت کل آنتی اکسیدانی (U/ml)
۰/۰۰۰۱	۱/۱۳	۶۹/۳ ^a	۷۱/۱۳ ^a	۴۶/۱۶ ^c	۵۵/۶۹ ^d	گلوکوتاتیون پراکسیداز (U/ml)
۰/۰۰۲۴	۱/۴۶	۱۱۶/۵ ^d	۱۳۴/۲ ^a	۱۰۳/۴۵ ^c	۱۱۱/۷۳ ^{bc}	سوپر اکسید دیسموتاز (U/ml)

۱- تیمارها با حروف متفاوت از نظر آماری در سطح احتمال ۰/۰۵ تفاوت معنی دار دارند.
۲- CON: گروه شاهد (مصرف کننده جیره پایه بدون مکمل سلنیوم و یا تجویز دگزامتازون)، DEX: گروه مصرف کننده جیره پایه همراه با تجویز دگزامتازون، DEX_(OSe): گروه دریافت کننده دگزامتازون همراه با مصرف جیره حاوی سلنیوم معدنی.

بر بهبود فرآیندهای حرکتی از قبیل تحرک کل، تحرک پیش رونده، میانگین سرعت در مسیر، سرعت در مسیر مستقیم، سرعت در مسیر منحنی، خطی بودن تحرک، درصد مستقیم الخط بودن حرکت اسپرم ها، تحرک عرضی سر، فرکانس حرکات جانبی و ویژگی های آنتی اکسیدانی اسپرم دارد.

تزریق دگزامتازون سبب ایجاد تنش اکسیداتیو شده که منجر به کاهش تحرک اسپرم و فرآیندهای حرکتی و همچنین افزایش پراکسیداسیون اسیدهای چرب، کاهش ظرفیت کل آنتی اکسیدانی، می گردد. به نظر می رسد، مکمل سازی جیره مصرفی با سلنیوم بتواند از اثرات منفی تنش بکاهد و نتایج مطالعه حاضر حاکی از آن است که سلنیوم آلی نسبت به فرم معدنی، موثرتر بوده و تأثیر بسزایی

منابع

- Agarwal, A., K.P. Nallella, S.S. Allamaneni and T.M. Said. 2004. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. Reproductive Biomedicine Online, 8: 616-627.
- Ahangari, Y., B. Parizadian and M. Zamani. 2013. The impact of organic selenium supplementation on rooster semen quality in liquid condition. Poultry Science Journal, 1: 23-31.
- Amini, M.R., H. Kohram, A. Zare-Shahaneh, M. Zhandi, H. Sharideh and M.M. Nabi. 2015. The effects of different levels of catalase and superoxide dismutase in modified Beltsville extender on rooster post thawed sperm quality. Cryobiology, 70: 226-232.
- Avunduk, A.M., S. Yardımcı, M.C. Avunduk, L. Kurnaz and M. Cengiz. 2000. A Possible Mechanism of X-Ray-Induced Injury in Rat Lens. Japanese Journal of Ophthalmology, 44: 88-91.
- Badade, Z., K. More and J. Narshetty. 2011. Oxidative stress adversely affects spermatogenesis in male infertility. Biomedical Research, 22(3): 319-322.
- Baumber, J., B.A. Ball, J.J. Linfor and S.A. Meyers. 2003. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. Journal of Andrology, 24: 621-628.
- Brouwers, J.F and B.M. Gadella. 2003. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. Free Radical Biology Medicine, 35: 1382-1391.
- Burrows, W. and J. Quinn. 1937. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. Poultry Science, 16: 19-24.
- Carvalho, F., J. Stringhini, N. Leandro, R. Jardim, W. Cunha and M. Café. 2003. Influência das linhagens e idades de poedeiras comerciais na qualidade interna e da casca para ovos armazenados sobre diferentes temperaturas. Revista Brasileira de Ciência Avícola, 101: 101.
- Carolini, S., A. Maldjian, P. Surai and R. Noble. 2000. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. Animal Reproduction Science, 58: 99-111.
- Chandra, G., A. Aggarwal, A. Singh, A. Singh, M. Kumar, R. Kushwaha and Y. Singh. 2012. Oxidative stress in sperm biology-a review. Agricultural Reviews, 33: 54-61.

12. Cunningham, M.L., P.S. Ringrose and B.R. Lokesh. 1984. Inhibition of the genotoxicity of bleomycin by superoxide dismutase. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 135: 199-202.
13. Da Silva Maia, M., S.D. Bicudo, H.C. Azevedo, C.C. Sicherle, D.B. Sousa and L. Rodello. 2009. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti oxidants. *Small Ruminant Research*, 85: 85-90.
14. Davis, C.D., P.A. Tsuji and J.A. Milner. 2012. Selenoproteins and cancer prevention. *Annual Review of Nutrition*, 32: 73-95.
15. Dimitrov, S., V. Atanasov, P. Surai and S. Denev. 2007. Effect of organic selenium on turkey semen quality during liquid storage. *Animal Reproduction Science*, 100: 311-317.
16. Duru, N.K., M. Morshedi and S. Oehninger. 2000. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertility Sterility*, 74: 1200-1207.
17. Ebeid, T. 2009. Organic selenium enhances the antioxidative status and quality of cockerel semen under high ambient temperature. *British Poultry Science*, 50: 641-647.
18. Edens, F. 2002. Practical applications for selenomethionine: broiler breeder reproduction. In: *Proceeding of the 18th annual symposium: nutritional biotechnology in the feed and food industry*. Nottingham University Press, Nottingham, 29-42.
19. Eid, Y., T. Ebeid and H. Younis. 2006. Vitamin E supplementation reduces dexamethasone-induced oxidative stress in chicken semen. *British Poultry Science*, 47: 350-356.
20. Evans, G. and W.C. Maxwell. 1987. *Salamons' artificial insemination of sheep and goats*. Butterworths.
21. Fairweather-Tait, S.J., R. Collings and R. Hurst. 2010. Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91: 1484S-1491S.
22. Froman, D. and R. Thurston. 1981. Chicken and turkey spermatozoal superoxide dismutase: a comparative study. *Biology of Reproduction*, 24: 193-200.
23. Hansen, J. and Y. Deguchi. 1996. Selenium and fertility in animals and man--a review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 37: 19-30.
24. Hill, K.E., Y. Xia, B. Åkesson, M.E. Boeglin and R.F. Burk. 1996. Selenoprotein P concentration in plasma is an index of selenium status in selenium-deficient and selenium-supplemented Chinese subjects. *The Journal of Nutrition*, 126: 138-145.
25. Jamali, N.U., A. Kaka, P. Khatri, M. Malhi, M. Naeem, A.A. Memon, R.R. Kaleri, H. Janyaro and D.H. Kalhoro. 2019. Effect of in vitro selenium addition to the semen extender on the spermatozoa characteristics before and after freezing in Kundhi Buffalo bull and in vivo fertility rate. *Pakistan Journal of Zoology*, 51: 317-323.
26. Kefer, J.C., A. Agarwal and E. Sabanegh. 2009. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *International Journal of Urology*, 16: 449-457.
27. King, L. M., D.R. Holsberger and A.M. Donnoghue. 2000. Correlation of CASA velocity and linearity parameters with sperm mobility phenotype in turkeys. *Journal of Andrology*, 21: 65-71.
28. Kryukov, G.V., S. Castellano, S.V. Novoselov, A.V. Lobanov, O. Zehtab, R. Guigó and V.N. Gladyshev. 2003. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, 300: 1439-1443.
29. Li, M.W., S. Meyers, T.L. Tollner and J.W. Overstreet. 2007. Damage to chromosomes and DNA of rhesus monkey sperm following cryopreservation. *Journal of Andrology*, 28: 493-501.
30. Marin-Guzman, J., D. Mahan and R. Whitmoyer. 2000. Effect of dietary selenium and vitamin E on the ultrastructure and ATP concentration of boar spermatozoa, and the efficacy of added sodium selenite in extended semen on sperm motility. *Journal of Animal Science*, 78: 1544-1550.
31. Min, Y., Z. Niu, T. Sun, Z. Wang, P. Jiao, B. Zi, P. Chen, D. Tian and F. Liu. 2018. Vitamin E and vitamin C supplementation improves antioxidant status and immune function in oxidative-stressed breeder roosters by up-regulating expression of GSH-Px gene. *Poultry Science*, 97: 1238-1244.
32. Nabi, M.M., H. Kohram, M. Zhandi, H. Mehrabani-Yeganeh, H. Sharideh, A. Zare-Shahaneh and V. Esmaili. 2016. Comparative evaluation of Nabi and Beltsville extenders for cryopreservation of rooster semen. *Cryobiology*, 72: 47-52.
33. Olson, G.E., V.P. Winfrey, K.E. Hill and R.F. Burk. 2004. Sequential development of flagellar defects in spermatids and epididymal spermatozoa of selenium-deficient rats. *Reproduction*, 127: 335-342.
34. Partyka, A., E. Łukaszewicz and W. Niżański. 2012. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in avian semen. *Animal Reproduction Science*, 134: 184-190.
35. Peris, S.I., J.F. Bilodeau, M. Dufour and J.L. Bailey. 2007. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Molecular Reproduction Development*, 74: 878-892.
36. Petrujkić, B., D. Šefer, I. Jovanović, M. Jovičin, S. Janković, G. Jakovljević, R. Beier and R. Anderson. 2014. Effects of commercial selenium products on glutathione peroxidase activity and semen quality in stud boars. *Animal Feed Science Technology*, 197: 194-205.
37. Pratt, W.D., F.A. Murray, H. Conrad, A. Moxon and J.E. Kinder. 1980. Effects of selenium supplementation on bull sperm metabolism in vitro. *Theriogenology*, 13: 369-379.
38. Revell, S., and R. Mrode. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*, 36: 77-86.

39. Shi, L., H. Zhao, Y. Ren, X. Yao, R. Song and W. Yue. 2014. Effects of different levels of dietary selenium on the proliferation of spermatogonial stem cells and antioxidant status in testis of roosters. *Animal Reproduction Science*, 149: 266-272.
40. Spallholz, J.E. 1997. Free radical generation by selenium compounds and their prooxidant toxicity. *Biomedical and Environmental Sciences*, 10: 260-270.
41. Surai, P., E. Blesbois, I. Grasseau, T. Chalah, J.P. Brillard, G. Wishart, S. Cerolini and N. Sparks. 1998. Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen. *Comparative Biochemistry Physiology Part B: Biochemistry Molecular Biology*, 120: 527-533.
42. Surai, P., I. Kostjuk, G. Wishart, A. Macpherson, B. Speake, R. Noble, I. Ionov and E. Kutz. 1998. Effect of vitamin E and selenium supplementation of cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testes, and liver. *Biological Trace Element Research*, 64: 119-132.
43. Surai, P.F. 2002. Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. Nottingham University Press Nottingham.
44. Surai, P.F. 2006. Selenium in nutrition and health. Nottingham university press Nottingham.
45. Surai, P.F. and V.I. Fisinin. 2015. Selenium in pig nutrition and reproduction: Boars and semen quality. A Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28: 730.
46. Underwood, E.J. 1999. The Mineral Nutrition of Livestock. Cabi.
47. Ursini, F., S. Heim, M. Kiess, M. Maiorino, A. Roveri, J. Wissing and L. Flohé. 1999. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science*, 285: 1393-1396.
48. Ursini, F., M. Maiorino and A. Roveri. 1997. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx): more than an antioxidant enzyme? *Biomedical environmental sciences: BES*, 10: 327-332.
49. Watson, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60: 481-492.
50. Wu, S., J. Oldfield, P. Whanger and P. Weswig. 1973. Effect of selenium, vitamin E, and antioxidants on testicular function in rats. *Biology of Reproduction*, 8: 625-629.

The Effect of Dietary Supplementation with Organic and Inorganic Selenium on Quality of Frozen-Thawed Semen in Broiler Breeder Cockerel under Oxidative Stress with Dexamethasone

Namdar Kamrani¹, Amir Karimi², Zabihullah Nemati³ and Maghsoud Besharati³

1- M.Sc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Ahar Agriculture & Natural Resources, University of Tabriz

2- Department of Animal Science, Faculty of Ahar Agriculture & Natural Resources, University of Tabriz
(Corresponding author: pekarimi@tabrizu.ac.ir)

3- Associate Professor, Faculty of Ahar Agriculture & Natural Resources, University of Tabriz
Received: April 5, 2020 Accepted: May 13, 2020

Abstract

The present study was performed to investigate the effects of dietary organic and inorganic selenium on the quality of frozen-thawed semen of broiler breeder cockerel under oxidative stress. In this experiment, a total of 24, 28-week-old Ross 308 cockerels were allocated into 4 treatments each of which had 6 birds, in a completely randomized design. Experimental groups were: 1) control group (CON): basal diet without selenium supplementation or dexamethasone administration, 2) DEX group: birds consumed the basal diet with dexamethasone injection (4 mg/Kg body weight, three times, every other day for 1 week), 3) DEX_(OSe) group: addition of 0.3 mg selenium per kilogram of diet from selenomethionine as organic selenium to the basal diet of birds administered dexamethasone like group 2 and 4) DEX_(ISe) group: similar to group 3 but selenite sodium as an inorganic source was added to the diet. After semen collection, the semen was frozen by modified Beltsville extender. Sperm evaluation was carried out by the Computer-Assisted Sperm Analysis system (CASA) in thawed semen. Results showed that the addition of organic selenium to the diet of stressed birds (DEX_(OSe)) improved total and progressive motility versus other experimental groups ($P < 0.05$); although, DEX_(OSe) was not statistically different with CON in progressive motility ($P > 0.05$). Also, the addition of inorganic selenium in the diet of stressed birds (DEX_(ISe)) did not improve the mentioned parameters versus DEX ($P > 0.05$). On the other hand, not only the viability and membrane integrity of sperm but also biochemical parameters (glutathione peroxidase and superoxide dismutase) of DEX_(OSe) were higher than other experimental groups ($P < 0.05$). It seems, the addition of organic selenium in the diet of cockerel under physiologic stress results in higher sperm quality than inorganic selenium.

Keywords: Frozen-thawed semen, Inorganic Selenium, Organic Selenium, physiological Stress