دانشگاه علوم کشاورزي و منابع طبیعي ساري
پژوهشهای تولیدات دامی

"مقاله پژوهشی"

اثرات برون‌زادی نانوذرات سلنیوم بر پارامترهای کیفی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده خروس‌های مادر گوشتی تحت شرایط تنش اکسیداتیو

نامدارکامرانی[۱]، امیرکریمی[۲] و محمدرضا شیخلو[۲]

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 مسوول: pekarimi@tabrizu.ac.ir)
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۰۹
صفحه: ۵۱ تا ۵۹

چکیده

هدف از انجام این پژوهش، بررسی تأثیر استفاده از نانوذرات سلنیوم در رقیق‌کننده بر فرآسنجه‌های کیفی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده خروس‌های مادر گوشتی تحت شرایط تنش اکسیداتیو بود. جهت انجام این آزمایش، از تعداد ۱۲ پرنده سویه راس ۳۰۸ با سن ۲۸ هفتگی در قالب دو گروه آزمایشی تحت‌تأثیر تنش اکسیداتیو (DEX) و بدون تنش اکسیداتیو (CON) که به‌طور تصادفی، تقسیم و نگهداری شده بودند، اسپرم‌گیری به‌عمل آمد و پس از ارزیابی‌های اولیه، جهت اعمال برنامه‌های انجمادی در قالب تیمارهای آزمایشی مورد استفاده قرار گرفتند. جهت اعمال تنش اکسیداتیو به پرندگان از سه نوبت تزریق دگزامتازون به مقدار چهار میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن، طی یک هفته استفاده شد. تیمارهای آزمایشی اعمال شده طی برنامه انجماد عبارت بودند از: ۱) تیمار شاهد (CON)، ۲) تیمار دگزامتازون (DEX)، ۳) تیمار شاهد همراه با نانوذرات سلنیوم (CON_{NSe}) و ٤) تیمار دگزامتازون همراه با نانوذرات سلنیوم (DEX_{NSe}). از نانوذرات سلنیوم به مقدار، ۱ درصد ماده موثر به‌عنوان آنتی‌اکسیدان در رقیق‌کننده بلتسویل بهبود یافته، استفاده شد. نتایج نشان داد که استفاده از نانوذرات سلنیوم در رقیق‌کننده تیمار کنترل (CON_{NSe}) سبب بهبود پارامترهای کیفی اسپرم از قبیل جنبایی کل و پیش‌رونده، میانگین سرعت در مسیر، سرعت در مسیر مستقیم، سرعت در مسیر منحنی، خطی بودن تحرک، درصد مستقیم‌الخط بودن حرکت اسپرم‌ها، تحرک عرضی سر، فرکانس حرکات جانبی در مقایسه با تیمارهای دیگر شد ($p<0/05$). همچنین افزودن نانوذرات سلنیوم در رقیق‌کننده اسپرم خروس‌های گروه یاد شده مقدار زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی، گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز را نسبت به سایر تیمارها به‌طور معنی‌داری بهبود داد ($p<0/05$) ولی از نظر تولید مالون دی‌آلدهید و ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت. به‌طورکلی به‌نظر می‌رسد که نانوذرات سلنیوم در رقیق‌کننده، در گروه شاهد می‌تواند پارامترهای کیفی اسپرم‌های منجمد-یخ‌گشایی شده را بهبود ببخشد ولی در شرایط تنش اکسیداتیو، نمی‌تواند تأثیر چندانی بر پارامترهایی کیفی اسپرم جهت جبران اثرات منفی تنش اکسیداتیو، داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: اسپرم خروس، تنش اکسیداتیو، کیفیت اسپرم، منی منجمد-یخ‌گشایی شده، نانوذرات سلنیوم

مقدمه

فرآیند انجماد اسپرم، با ایجاد تنش اکسیداتیو ممکن است بر کیفیت اسپرم‌ها تأثیر منفی گذاشته و باعث کاهش میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها به مقدار ۵۰-۴۰ درصد شود (۱۹). در طول انجماد و ذوب شدن، تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS) افزایش می‌یابد (۲۵)؛ تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر و متعاقب آن تنش اکسیداتیو تأثیر عمده‌ای بر کیفیت مایع منی هنگام انجماد و ذوب دارد و در نتیجه باعث کاهش ظرفیت لقاح می‌شود (۲۰) و این اتفاقات با تغییر ساختاری شدید در بخش‌های مختلف سلول‌های اسپرم پس از انجماد و ذوب همراه می‌باشد (۴). افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها به رقیق‌کننده اسپرم برای جلوگیری از آسیب اکسیداتیو و به حداکثر رساندن نتایج لقاح درون آزمایشگاهی بسیار مهم است. آزمایشات متعددی برای کنترل تنش اکسیداتیو در طول نگهداری از اسپرم توسط مکمل‌سازی رقیق‌کننده با آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی مانند گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز (۱۵)، ویتامین‌هایی از قبیل اسید اسکوربیک، α-توکوفرول، β-کاروتن (۱۶) و مواد معدنی مانند روی یا سلنیوم (۳۰)، گزارش شده است؛ با این‌حال، بسیاری از این ترکیبات آبگریز هستند و بنابراین حل آنها در رقیق‌کننده اسپرم مشکل است و یا نیاز به حلال‌هایی مانند اتانول یا دی‌متیل‌سولفید، دارند که ممکن است اثرات منفی بر عملکرد اسپرم داشته باشند. بنابراین، مکمل با آنتی‌اکسیدان‌های مرسوم همیشه در کاهش تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد یا در بهبود زنده‌مانی اسپرم پس از ذوب، موفقیت‌آمیز نبوده است (۵). نانومواد ذراتی با ابعاد بسیار ریز در حد نانو می‌باشند. به‌خاطر خواص ویژه نانومواد شامل جذب سلولی بالا، واکنش‌پذیری، مساحت سطح، خاصیت اتصال و خاصیت آنتی‌اکسیدانی، جدیداً در بهینه‌سازی پروتکل‌های انجماد مشارکت داشته است (۲۳). از تکنولوژی نانو می‌توان برای به‌دست آوردن خواص زیست‌فعال عناصر مختلف، مانند نانو سلنیوم در تولیدمثل، هضم، رشد، ضد میکروبی و انجماد سلول‌ها استفاده کرد. سلنیوم به‌عنوان عنصر کمیاب اساسی برای اسپرماتوژنز شناخته شده است و بخشی از فسفولیپید سلنوپروتئین است. بیشتر سلنیوم موجود در بیضه در ارتباط با گلوتاتیون پراکسیداز است. گلوتاتیون پراکسیداز به‌عنوان یک پروتئین اساسی در تحرک اسپرم درگیر است و یک نوع از این پروتئین برای تراکم کروماتین و متعاقب آن ترکیب سر طبیعی اسپرماتوزوئید ضروری می‌باشد (۶). نانوذرات سلنیوم، سمیت کمتری نسبت به سلنیت، مانند ($SeO3^{-2}$) و ($SeO4^{-2}$) دارد (۳۵) که استفاده از نانوذرات سلنیوم می‌تواند کیفیت

اسپرماتوزوآ و اسپرماتوژنز در موش‌ها را بهبود بخشد (۱). چندین مطالعه بالینی و تجربی، تأثیر استفاده از نانوذرات سلنیوم بر کیفیت مایع منی را در بزهای نر (۳۲) و در شرایط آزمایشگاهی در خروس‌ها بررسی کرده‌اند (۳۱). در شرایط پرورشی، خروس‌ها تحت‌تأثیر تنش‌های مختلفی قرار می‌گیرند که پایه و اساس درون‌تنی دارند و با توجه به اینکه تنش‌های درون‌تنی اکثرا سبب کاهش لقاح و باروری می‌گردند پس بایستی به‌دنبال بوجود آوردن شرایطی باشیم که بتوانیم آثار مخرب تنش را کنترل کنیم لذا آزمایش حاضر با هدف بررسی اثرات نانوذرات سلنیوم در رقیق‌کننده بر پارامترهای کیفی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده خروس‌های مادر گوشتی که تحت استرس اکسیداتیو از طریق تزریق دگزامتازون قرار گرفته بودند، طراحی و انجام شد.

مواد و روش‌ها

در آزمایش حاضر ۱۲ پرنده سویه راس ۳۰۸ با سن ۲۸ هفتگی در قالب دو گروه آزمایشی هر کدام با شش پرنده، تحت‌تأثیر تنش اکسیداتیو (DEX) و بدون تنش اکسیداتیو (CON) به‌طور تصادفی، تقسیم و در واحد مرغداری دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز نگهداری شدند. خروس‌ها روزانه در دو نوبت صبح و عصر به‌صورت دستی تغذیه شدند و دسترسی آزاد به آب داشتند. نگهداری پرندگان در قفس‌های انفرادی و تحت شرایط، ۱۵ ساعت روشنایی و ۹ ساعت تاریکی انجام گرفت و با جیره پایه یکسان، تغذیه شدند (جدول۱). تیمارهای آزمایشی اعمال شده طی برنامه انجماد عبارت بودند از: ۱) تیمار شاهد (CON)، ۲) تیمار دگزامتازون (DEX)، ۳) تیمار شاهد همراه با نانوذرات سلنیوم (CON_{NSe}) و ۴) تیمار دگزامتازون همراه با نانوذرات سلنیوم (DEX_{NSe})، بودند.

جدول ۱- اجزای تشکیل‌دهنده و ترکیب شیمیایی جیره آزمایشی.

Table 1. Feed ingredients and composition of experimental diet.

اقلام خوراکی	درصد	ترکیب جیره
ذرت	۵۷	انرژی (۲۷۵۰) کیلوکالری در کیلوگرم
سویا	۱۰	پروتئین (۱۲درصد)
جو	۱۱	متیونین (۰/۳۲ درصد)
سبوس	۱۸	لایزین (۰/۵ درصد)
دی‌کلسیم فسفات	۱/۳	ترئونین (۰/۳۸ درصد)
صدف	۱/۶	کلسیم (۰/۷ درصد)
مکمل معدنی ویتامینه	۰/۵	فسفر (۰/۳۵ درصد)
نمک	۰/۳	سدیم (۰/۱۸ درصد)
جوش شیرین	۰/۰۵	کلر (۰/۱۶ درصد)
متیونین	۰/۱۱	اسیدلینولئیک ۱
ویتامین B	۰/۰۱	
ویتامین E	۰/۰۱	
کولین کلراید	۰/۰۱	

۱- هرکیلوگرم مکمل ویتامینی شامل: ویتامین A ۳۶۰۰۰۰۰واحد بین‌المللی، ویتامین D3 ۸۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی، ویتامین E ۷۲۰۰ واحد بین‌المللی، ویتامین B1 ۷۲۰ میلی‌گرم، ویتامین B2 ۲۶۴۰ میلی‌گرم، اسید پانتوتنیک ۴۰۰۰ میلی‌گرم،اسید نیکوتنیک ۱۲۰۰۰ میلی‌گرم، ویتامین B6 ۱۲۰۰ میلی‌گرم، اسید فولیک ۴۰۰ میلی‌گرم، ویتامین B12 ۶ میلی‌گرم، ویتامین K3 ۸۰۰ میلی‌گرم، بیوتین ۴۰ میلی‌گرم، کولین کلراید ۱۰۰۰۰۰ میلی‌گرم و آنتی اکسیدان ۴۰۰۰۰ میلی‌گرم. ۴۰ گرم منگنز به شکل سولفات منگنز، ۸۰ میلی‌گرم سلنیوم،۵۰ گرم آهن به شکل سولفات آهن، ۱۰ گرم مس به شکل سولفات مس، ۴۰۰ میلی‌گرم ید،

برای ایجاد تنش فیزیولوژیک که ایجادکننده تنش اکسیداتیو می‌باشد، در گروه DEX به‌صورت یک روز در میان و طی سه مرحله، مقدار چهار میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، دگزامتازون که از شرکت دارویی ابوریحان تهیه شده بود، تزریق گردید (۲۱). اسپرم‌گیری از خروس‌ها دو بار در هفته و به‌مدت دو هفته به‌روش مالش شکمی، در مجموع ۴ بار (۸)، انجام گرفت. نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در بن‌ماری قرار داده شدند تا ارزیابی اولیه اسپرم انجام شود. اسپرم‌های با تحرک ۶۰ درصد و غلظت مناسب به‌عنوان اسپرم‌های طبیعی در نظر گرفته شده و برای مراحل بعدی آزمایش، جهت از بین بردن اثرات فردی، نمونه‌ها با هم مخلوط شدند. در این آزمایش، از رقیق‌کننده بلتسویل بهبود یافته با pH ۷/۴ و اسمولاریته ۳۱۰ اسمول بر کیلوگرم. استفاده شد (۲۲) که تمامی ترکیبات آن از شرکت مرک (Merck- آلمان) تهیه شده بود (جدول ۲). از نانوذرات سلنیوم به‌مقدار ۱ درصد ماده مؤثر به‌عنوان آنتی‌اکسیدان در رقیق‌کننده استفاده شد (۳۱) که در گروه فناوری‌های نوین دانشگاه تبریز تهیه شده بود.

جدول ۲- اجزای تشکیل‌دهنده رقیق‌کننده بلتسویل بهبود یافته (۲۲).

Table 2. Modifed Biltsville Extender Components.

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	۰/۶۴گرم در لیتر
مونو پتاسیم فسفات	۰/۷گرم در لیتر
کلراید منیزیم	۰/۳۴گرم در لیتر
گلیسرول	۳ درصد
لسیتین	۰/۵ درصد

پس از آماده کردن نمونه‌ها، جهت سردسازی، نمونه‌ها درون یخچال با دمای چهار درجه سانتی‌گراد، انتقال داده شدند. پس از دو ساعت و رسیدن دمای نمونه‌ها به چهار درجه سانتی‌گراد، اسپرم‌ها به‌صورت دستی داخل پایوت‌ها کشیده و با خمیر هماتوکریت مهر و موم شدند. جهت انجام فرآیند انجماد، پایوت‌های دارای اسپرم، به‌مدت هفت دقیقه روی بخار ازت قرار داده شدند و پس از گذشت این زمان به داخل تانک ازت (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) انتقال داده شدند (۳). تیمارهای آزمایشی به‌منظور بررسی فرآسنجه‌های کیفی اسپرم، یخ‌گشایی شدند که برای این‌منظور، پایوت‌ها از ازت مایع خارج شدند و پس از قراردادن در حمام آب گرم دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، یخ‌گشایی شده و به داخل میکروتیوپ تخلیه شدند تا ارزیابی‌های مورد نظر انجام شود (۳).

فرآسنجه‌های جنبایی اسپرم از قبیل جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده، میانگین سرعت در مسیر، سرعت در مسیر مستقیم، سرعت در مسیر منحنی، خطی‌بودن تحرک، درصد مستقیم‌الخط بودن حرکت اسپرم‌ها، تحرک عرضی سر، فرکانس حرکات جانبی با استفاده از سیستم آنالیز رایانه‌ای مجهز به میکروسکوپ فازکنتراست (Labomed LX400، امریکا) با بزرگنمایی ۱۰۰ ارزیابی شدند. سه پایوت از هر تکرار، گروه تیماری با روشی که در بالا توضیح داده شد، یخ‌گشایی شده و به داخل میکروتیوب‌ها انتقال داده شدند، ۱۰ میکرولیتر از نمونه منی را با سمپلر برداشته و آن را روی لام ریخته و یک لامل تمیز روی آن قرار داده شد و فرآسنجه‌های جنبایی اسپرم با استفاده از کامپیوتر ارزیابی شد (۹).

به‌منظور ارزیابی زنده‌مانی اسپرم‌ها از رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین که حاوی ۱/۶۷ گرم رنگ ائوزین، ۱۰ گرم رنگ نیگروزین و ۲/۹ گرم سیترات سدیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، استفاده شد. برای تهیه گسترش، ۱۰ میکرولیتر منی رقیق‌شده را با ۲۰ میکرولیتر رنگ روی لام تمیز به آرامی مخلوط کرده و پس از خشک شدن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، زنده‌مانی تعداد ۲۰۰ اسپرم بوسیله میکروسکوپ نوری (Olympus، ژاپن) با بزرگنمای ۴۰× مورد بررسی قرار گرفت. اسپرم‌هایی که رنگ نگرفته بودند، زنده و اسپرم‌هایی که رنگ گرفته بودند، مرده تلقی شدند (۱۲).

از تست هایپواسموتیک، جهت ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم استفاده شد. برای این‌منظور ۱۰ میکرولیتر از مایع منی به ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک هاست که حاوی ۹ گرم فروکتوز، ۴/۹ گرم سیترات سدیم، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با اسمولاریته ۱۰۰ میلی‌اسمول است، اضافه شد و سپس ۶۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از انکوباسیون و تهیه حداقل ۳ قطره از نمونه انکوبه شده، وضعیت اسپرم‌های با دم صاف و دم پیچیده زیر میکروسکوپ (Olympus، ژاپن) 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 به‌سرعت واکنش داده و انتهای دم آن‌ها گره می‌خورد. در واقع پس از انجام این آزمایش، اسپرم‌های با دم گره خورده به‌عنوان اسپرم‌های دارای غشاء یکپارچه و اسپرم‌های که دم آن‌ها صاف است به‌عنوان اسپرم داری غشاء غیر یکپارچه تلقی شدند (۲۹).

برای اندازه‌گیری غلظت مالون دی‌آلدهید به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید، مقدار یک میلی‌لیتر از منی رقیق‌شده با یک میلی‌لیتر کلرید سدیم ۰/۹ درصد مخلوط شده و سپس نمونه‌ها با دور ۳۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شده و به تعداد سه بار با بافر سیترات شستشو و مجدداً سانتریفیوژ شدند. در نهایت محلول رویی دور ریخته شده و رسوب باقیمانده اسپرم‌ها در یک میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شده و تا زمان انجام تست، نمونه‌ها در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای اندازه‌گیری غلظت مالون دی‌آلدهید مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از هر نمونه را برداشته و با یک میلی‌لیتر محلول اسید تری‌کلریدریک ۲۰ درصد و تیوباربیتوریک اسید ۰/۵ درصد مخلوط شده و به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. سپس نمونه‌ها بعد از سرد شدن در داخل یخ، به‌مدت ۱۵ دقیقه با ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. در پایان عدد جذب مالون دی‌آلدئید محلول بالایی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (JENWAY-6405، انگلیس) در طول موج ۵۸۶ نانومتر خوانده شده و غلظت مالون دی‌آلدهید ثبت شد (۲۶). از کیت های تجاری شرکت طب پژوهان (تهران-ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده جهت اندازه‌گیری پارامترهای اندازه‌گیری سوپراکسیددیسموتاز و اندازه‌گیری ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی استفاده شد. ضرایب تغییرات سنجش داخل و بین اندازه‌گیری‌ها به‌ترتیب ۵/۷ و ۳/۷ درصد برای ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی و ۸/۰ و ۷/۱ درصد برای سنجش سوپراکسیددیسموتاز بود. سنجش فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز توسط کیت تجاری زل‌بیو (Zellbio GmBH, Germany) انجام شد و مقادیر ضرایب تغییرات سنجش داخل و بین اندازه‌گیری‌ها به‌ترتیب ۳/۵ و ۴/۷ بود. کلیه خوانش‌ها با دستگاه اتوآنالایزر (آلسیون ۳۰۰) و در آزمایشگاه مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شد.

آنالیز آماری بخش اول آزمایش، مقایسه دو گروه آزمایشی کنترل و دریافت‌کننده دگزامتازون با کمک آزمون t-Test و در سطح معنی‌دار پنج درصد انجام شد. همچنین به‌منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌های جمع‌آوری شده از تیمارهای آزمایشی در بخش دوم مطالعه، از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۱) در قالب طرح کاملاً تصادفی تحت رویه GLM، با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ و براساس مدل آماری زیر استفاده شد.

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

که در این رابطه، Y_{ij}: مقدار عملکرد صفت وابسته‌ی نمونه‌ی jام در تیمار iام، μ: میانگین کل تیمار، T_i: اثر تیمار و e_{ij}: اثرات باقیمانده، هستند.

نتایج و بحث

نتایج کلی حاصل از آنالیز آماری داده‌های حاصل از اسپرم‌گیری در دو گروه پرنده شاهد (CON) و دریافت‌کننده دگزامتازون (DEX) در جدول (۳) نمایش داده شده‌است. همانگونه که انتظار می‌رفت کلیه پارامترهای سنجش شده اعم از جنبایی کل و پیش‌رونده، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در گروه DEX نسبت به گروه CON به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود ($p>۰/۰۵$).

جدول ۳- تأثیر تزریق دگزامتازون روی کیفیت اسپرم خروس‌های گله مادر گوشتی.

Table 3. The effect of dexamethasone injection on sperm quality of broiler breeder roosters.

پارامترها	شاهد	دگزامتازون
جنبایی کل (درصد)	۷۹/۴[a]	۶۲/۲[b]
جنبایی پیش‌رونده (درصد)	۴۲/۵۳[a]	۲۷/۰۳[b]
زنده‌مانی (درصد)	۷۸/۳۳[a]	۷۳/۵۸[b]
یکپارچگی غشای پلاسمایی (درصد)	۸۰/۷۸[a]	۷۱/۹۲[b]
ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (کل)	۱/۲۶[a]	۱/۰۵[b]

*وجود حروف ناهمنام نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح آماری ۵ درصد طی آزمون t-Test» در فرآسنجه مورد نظر می‌باشد.

نتایج ما از نظر اینکه دگزامتازون سبب ایجاد تنش اکسیداتیو می‌گردد با نتایج سایر محققین در توافق بود که نشان داده‌اند، در خروس‌هایی که دگزامتازون دریافت کرده بودند، پاسخ ایمنی تمایل به کم شدن داشت و درصورت ادامه یافتن تنش اکسیداتیو، آسیب‌های اکسیداتیو به بیومولکول‌های حیاتی (مانند ژنوم) وارد آمده و تجمع این آسیب‌ها منجر به برخی اثرات بیولوژیک مانند تغییر در بیان ژن، جهش و مرگ سلولی می‌شود (۲۱). به‌طور مشابه در مطالعه‌ای در خروس‌های گله مادر گوشتی، تأثیر منفی تزریق دگزامتازون به مقدار چهار میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، بر اسپرم طیور نشان داده شده است و نتایج تحقیق حاضر با مطالعه مذکور مطابقت دارد (۱۱). با توجه به نتایج جدول (۳) این سوال پیش می‌آید که راندمان انجماد اسپرم این دسته از پرندگان دریافت‌کننده دگزامتازون که تحت شرایط استرس بوده‌اند، چگونه است؟ و اینکه آیا استفاده از سلنیوم، به‌عنوان بخشی از سیستم محافظت‌کننده آنتی‌اکسیدانی، به‌صورت نانو می‌تواند تأثیری بر راندمان انجماد اسپرم این پرندگان جهت بهبود انجمادپذیری داشته باشد؟ به‌منظور بررسی پرسش‌های فوق، نتایج به‌دست آمده از ادامه آزمایش در جدول (۴) نشان داده شده‌است. با توجه جدول مذکور مشاهده می‌شود که تزریق دگزامتازون سبب شده است که فرآسنجه‌های جنبایی کل و جنبایی پیش‌رونده در اسپرم‌های منجمد-یخ‌گشایی شده کاهش یابد. مطابق با این نتایج، طی آزمایشی، کاهش در جنبایی اسپرم با تزریق چهار میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دگزامتازون، گزارش شده است (۱۱). افزودن نانوذرات سلنیوم به رقیق‌کننده خروس‌هایی که دگزامتازون دریافت کرده‌اند (DEX_{NSe}) نیز نتوانسته اثر منفی دگزامتازون را بعد از انجماد جبران کند و این در حالی‌است که نانوذرات سلنیوم افزوده شده به رقیق‌کننده پرندگان بدون تجویز دگزامتازون (تیمار CON_{NSe}) دارای بهترین عملکرد بوده و جنبایی کل و جنبایی پیش‌رونده در این تیمار در مقایسه با تیمار کنترل و دو تیمار دیگر، تفاوت معنی‌داری نشان می‌دهد ($p<۰/۰۵$). مطابق با نتایج آزمایش حاضر، در آزمایشی نشان داده شده است که افزودن سلنیوم در محیط رقیق‌کننده‌ی منی گاومیش موجب افزایش کیفیت اسپرم، جنبایی، مورفولوژی، یکپارچگی غشائ و نسبت اسپرم‌های زنده به مرده پس از انجماد و اسپرم تازه می‌شود (۱۰). همچنین بهبود تحرک اسپرم گاو در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از سلنیوم به‌مقدار یک میکروگرم بر میلی‌لیتر در رقیق‌کننده، نشان داده شده است (۳۳). به‌طور مشابه در مطالعه‌ای، نشان داده شده است که سلنیوم می‌تواند در طول اسپرماتوژنز روی بافت تولیدمثلی عمل کند تا کیفیت مایع منی را بهبود بخشد و در این رابطه محققان گزارش کرده‌اند گنجاندن سلنیوم آلی به‌صورت سلپلکس در رژیم غذایی خروس با افزایش قابل توجه دو برابری غلظت سلنیوم در مایع منی همراه است (۲۴). طی آزمایشی نشان داده شده است که استفاده از پنج میکروگرم بر میلی‌لیتر ویتامین E و نانوذرات سلنیوم یک درصد، تحرک کل اسپرم، حرکت پیش‌رونده، زنده‌مانی اسپرم، یکپارچگی غشای پلاسمایی را پس از فرآیند انجماد و ذوب بهبود بخشیده و همچنین غلظت مالون دی‌آلدهید را کاهش داد و در این رابطه رقیق‌کننده حاوی نانوذرات سلنیوم دارای بیشترین فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز بود (۳۱). پارامترهای حرکتی اسپرم از قبیل، سرعت در مسیر مستقیم، خطی‌بودن تحرک و درصد مستقیم‌الخط بودن حرکت اسپرم‌ها، در بین تمامی تیمارها از نظر آماری، اختلاف معنی‌داری نشان نمی‌دهند ولی سایر پارامترهای حرکتی اسپرم مانند، میانگین سرعت در مسیر، سرعت در مسیر منحنی، تحرک عرضی سر و فرکانس حرکات جانبی، در تیمار CON_{NSe} دارای عملکرد مناسبی بوده و در DEX_{NSe} و DEX نسبت گروه CON پایین‌تر بود ($p<۰/۰۵$).

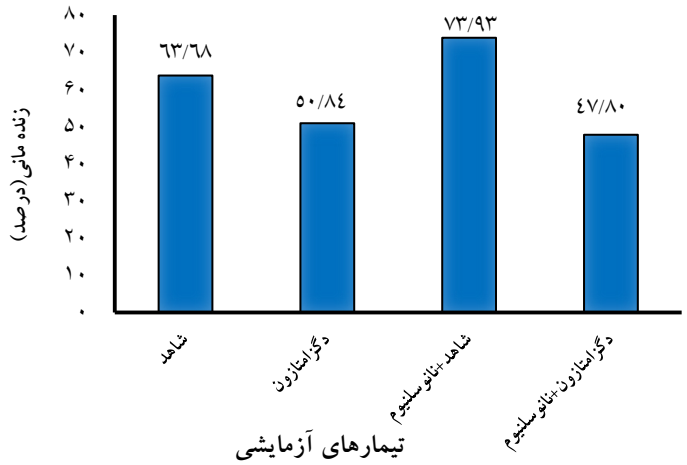
جدول ۴- اثر مکمل‌سازی نانوذرات سلنیوم در رقیق‌کننده بلتسویل بهبود یافته، بر تحرک و فرآسنجه‌های حرکتی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده خروس‌های مادر گوشتی تحت تنش اکسیداتیو.

Table 4. The effect of supplementation of selenium nanoparticles in modifed Beltsville extender on motility and motility parameters of frozen-thawed sperm of broiler breeder roosters under oxidative stress.

	تیمارهای آزمایشی[۱]					
فرآسنجه	شاهد	دگزامتازون	شاهد+نانوسلنیوم	دگزامتازون+نانوسلنیوم	خطای استاندارد	سطح معنی‌داری
جنبایی کل (درصد)	۶۸/۸۶^{b}	۴۹/۱۶^{c}	۷۵/۵۳^{a}	۴۸/۴۰^{c}	۰/۹۸	<۰/۰۰۰۱
جنبایی پیش‌رونده (درصد)	۲۶/۳۳^{a}	۱۲/۴۶^{b}	۲۷/۱۳^{a}	۱۲/۳۶^{b}	۰/۹۵	۰/۰۰۰۲
میانگین سرعت در مسیر (میکرومتر بر ثانیه)	۱۹/۰۸^{a}	۱۱/۹۹^{b}	۱۹/۳۲^{a}	۱۳/۲۲^{ab}	۱/۰۶	۰/۰۶۰۸
سرعت در مسیر مستقیم (میکرومتر بر ثانیه)	۱۴/۸۳	۹/۴۸	۱۵/۰۳	۱۰/۳۱	۱/۰۴	۰/۱۴۲۰
سرعت در مسیر منحنی (میکرومتر بر ثانیه)	۵۳/۲۸^{a}	۳۴/۹۲^{b}	۵۴/۲۶^{a}	۳۷/۳۱^{b}	۱/۳۶	۰/۰۰۴۴
خطی بودن تحرک (درصد)	۲۵/۶۶	۲۲/۲۵	۲۵/۶۴	۲۳/۰۶	۱/۰۵	۰/۵۱۵۶
درصد مستقیم‌الخط بودن حرکت اسپرم-ها (درصد)	۷۰/۸۵	۶۴/۴۵	۷۱/۱۸	۶۶/۲۸	۱/۰۸	۰/۱۱۸۵
جنبایی عرضی سر (میکرومتر)	۱/۴۸^{a}	۰/۹۰^{b}	۱/۵۱^{a}	۰/۹۸^{b}	۰/۲۳	۰/۰۰۳۴
فرکانس حرکات جانبی (هرتز)	۱۴/۱۹^{b}	۱۶/۰۸^{a}	۱۴/۱۳^{b}	۱۶/۲۲^{a}	۰/۴۷	۰/۰۰۷۱

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

مطابق شکل (۱) و با بررسی مقدار زنده‌مانی اسپرم‌ها، مشاهده می‌شود که بیشترین مقدار زنده‌مانی برای تیمار نانوذرت سلنیوم در رقیق‌کننده تیمار کنترل می‌باشد. این موضوع نشان‌دهنده این امر است که نانوذرات سلنیوم اثر مثبتی بر زنده‌مانی اسپرم دارد و از نظر عددی و آماری اختلاف معنی‌داری با تیمار کنترل دارد. در این ارتباط به‌نظر می‌رسد که افزودن نانوذرات سلنیوم به رقیق‌کننده اسپرم، موجب کاهش تولید و فعالیت رادیکال‌های آزاد شده که این امر به نوبه‌ی خود سبب افزایش زنده‌مانی اسپرم‌ها گردیده است (۲۸) نانوذرات سلنیوم در رقیق‌کننده، تیمار کنترل همراه با دگزامتازون اختلاف معنی‌داری با تیمار دگرامتازون، نشان نمی‌دهد و هر دوی این تیمارها کمترین مقدار زنده‌مانی را دارند. در مطالعه‌ای انجام شده روی انجماد پذیری اسپرم گاو، بهبود زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و تحرک پیش‌رونده اسپرم با افزودن نیم و یک میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرات سلنیوم در رقیق‌کننده اسپرم گاو که بر پایه‌ی تریس-زرده تخم‌مرغ و فروکتوز بود، نشان داده شده است (۱۸). همچنین به‌طور مشابه در مطالعه‌ای روی خروس، افزایش زنده‌مانی اسپرم از طریق مکمل‌سازی جیره پرندگان با سلنیوم آلی ۰/۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم خوراک در شرایط نگهداری به‌صورت مایع، نشان داده شده‌است (۲).

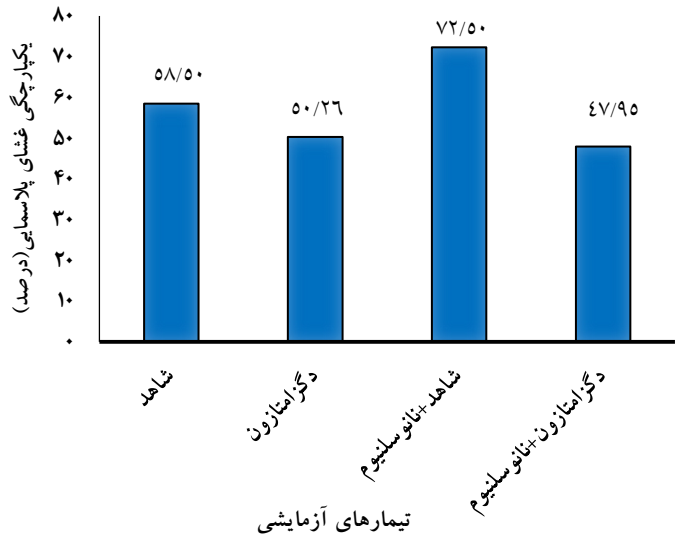


شکل ۱- اثر مکمل‌سازی نانوذرات سلنیوم در رقیق‌کننده بلتسویل بهبود یافته، بر زنده‌مانی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده خروس‌های مادر گوشتی تحت تنش اکسیداتیو.

Figure 1. The effect of supplementation of selenium nanoparticles in modifed Beltsville extender on viability of frozen-thawed sperm of broiler breeder roosters under oxidative stress.

نتایج بررسی یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم در شکل (۲)، نشان داده شده است. با توجه به این نمودار مشاهده می‌شود که نانوذرات سلنیوم در رقیق‌کننده CON_{NSe} عملکرد خوبی در یکپارچگی غشای اسپرم را موجب شده است، ولی از طرفی دیگر تیمار DEX_{NSe} نتایج قابل توجهی را در فرآسنجه مذکور ندارد و نشان داد که نانوذرات سلنیوم در رقیق‌کننده نتوانسته بهبودی در گروه DEX ایجاد کند. در تحقیقی انجام شده توسط محققین، بیشترین تحرک، زنده‌مانی و درصد

یکپارچگی غشاء در مایع منی بعد از ذوب در تیمار نانوذرات سلنیوم یک درصد همراه با پنج میکروگرم بر میلی‌لیتر ویتامین E، مشاهده شد (۳۱) که یک اثر وابسته به دز را در مطالعه مذکور نشان داده اما مقادیر زیادتر از افزودنی‌های آنتی‌اکسیدانی، تمامیت عملکردی آکسوزوم و میتوکندری سلول‌های اسپرم را می‌تواند به‌خطر اندازد (۷). در پژوهشی دیگر توصیه شده است که اضافه کردن دو میکروگرم در میلی‌لیتر سدیم سلنیت به رقیق‌کننده منی بوفالو، باعث افزایش تحرک اسپرم، قابلیت زنده‌مانی و افزایش عملکرد غشایی و کاهش آسیب و ناهنجاری DNA می‌شود و در مطالعه مذکور به این نتیجه رسیدند که استفاده از سلنیوم در اندازه نانوذرات در غلظت‌های بسیار کم، نتایج بهتری را در مورد کیفیت اسپرم نسبت به سلنیت سدیم به‌دست می‌آورد (۱۰). این امر، ممکن است به‌دلیل ذرات کوچک‌تر نانوذرات سلنیوم باشد، که با دسترسی و فعالیت بالاتر در سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی باعث می‌شود سطح بیشتری از رادیکال‌های آزاد گرفته شود، که فضای زیادی برای حذف مشتقات واکنش‌پذیر اکسیژنی (ROS) فراهم می‌کند (۳۱).



شکل ۲- اثر مکمل‌سازی نانوذرات سلنیوم در رقیق‌کننده بلتسویل بهبود یافته، بر یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده خروس‌های مادر گوشتی تحت تنش اکسیداتیو

Figure 2. The effect of supplementation of selenium nanoparticles in modifed Beltsville extender on membrane integrity of frozen-thawed sperm of broiler breeder roosters under oxidative stress

داده‌های مربوط به پارامترهای بیوشیمیایی در جدول (۵) ارایه شده است. جدول مذکور نشان می‌دهد که مالون دی‌آلدهید، در تیمار DEX بیشترین مقدار می‌باشد. نانوذرات سلنیوم افزوده شده به رقیق‌کننده در تیمارهای کنترل (CON_{NSe}) و دگزامتازون (DEX_{NSe})، مالون‌دی‌آلدهید کمتری در مقایسه با تیمار DEX تولید کرده‌اند که از نظر آماری نیز اختلاف معنی‌داری دارند ($p<۰/۰۵$) ولی در مقایسه با تیمار CON از نظر عددی بالا بوده ولی از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند ($p<۰/۰۵$). اسیدهای چرب یکی از مؤلفه‌های اصلی مایع منی هستند که در ساختار غشایی اسپرم‌ها، متابولیسم سلول‌های اسپرم و توانایی آنها در ظرفیت‌پذیر شدن و لقاح تخمک دخالت دارند (۳۴). وجود غلظت بالای اسیدهای چرب غیر اشباع در بخش لیپیدها به یک سیستم آنتی‌اکسیدانی کارآمد جهت محافظت در برابر آسیب پراکسیداتیو و اختلال عملکرد احتمالی اسپرم و ناباروری در نرها، نیاز دارد. بنابراین، افزایش میزان مالون‌دی‌آلدهید به‌عنوان شاخصی از پراکسیداسیون لیپیدی در پلاسمای منی، می‌تواند تحرک اسپرم را در شرایط پر استرس، تحت‌تأثیر قرار دهد. سلنیوم، از طریق کاهش مالون دی‌آلدهید، فرآسنجه‌های کیفی اسپرم را، ارتقاء می‌دهد (۱۷). سطح بیشتر مالون دی‌آلدهید در مایع منی با تحرک ضعیف اسپرم در منی همراه است. طی یک آزمایش، نشان داده شد که افزودن یک میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرات سلنیوم در رقیق‌کننده اسپرم گاو بر پایه‌ی تریس-زرده تخم مرغ و فروکتوز، سبب افزایش ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی در پلاسمای منی و کاهش مالون دی‌آلدهید شد که رابطه منفی بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و مالون دی‌آلدهید را نشان داد، که حاکی از کاهش قابل توجه پراکسیداسیون لیپید در پلاسمای مایع منی منجمد گاو نر حاوی نانوذرات سلنیوم در غلظت یک میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (۱۸). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نیز تأییدکننده داده‌های مالون دی‌آلدهید بوده و نشان می‌دهد که نانوذرات سلنیوم افزوده شده به رقیق‌کننده تیمار کنترل، دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مناسبی است. شواهدی برای بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به‌دنبال مکمل رقیق‌کننده با آنتی‌اکسیدان‌های موجود در منی قوچ (۷) و خروس (۲۸) ارائه شده است. همبستگی مثبتی بین فرآسنجه‌های اسپرم و ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی پلاسمای منی، گزارش شده است. افزودن نانوذرات سلنیوم در رقیق‌کننده، توانسته میزان گلوتاتیون پراکسیداز را در تیمار CON_{NSe}، افزایش دهد که در مقایسه با تیمار CON مشاهده می‌شود که این پارامتر کاملاً

بهبود یافته است. لازم به ذکر است که تیمار نانوذرات سلنیوم در رقیق‌کننده تیمار DEX_{NSe} در مقایسه با تیمار CON و DEX به‌طور معنی‌داری باعث افزایش فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز شده است ($p<۰/۰۵$)؛ اگرچه مقدار آن نسبت به تیمار CON_{NSe} پایین‌تر می‌باشد ($p<۰/۰۵$)، مایع منی شامل آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی است. در مطالعات مختلف، نگهداری از کیفیت اسپرم با افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی مایع منی با استفاده از رقیق‌کننده‌های حاوی آنتی‌اکسیدان‌های افزوده شده، نشان داده شده‌است (۲۵). طی مطالعه‌ای که در خصوص اثر نانوذرات سلنیوم بر فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز بز بوئر انجام شد نشان داده شده‌است، در گروهی که نانوذرات سلنیوم را دریافت کرده بودند، به‌طور قابل توجهی غلظت گلوتاتیون پراکسیداز افزایش یافته بود (۳۲). داده‌های مربوط به فراسنجه سوپراکسید دیسموتاز در مطالعه حاضر نیز نشان می‌دهد که نانوذرات سلنیوم کاملاً مؤثر واقع شده و سبب افزایش این فراسنجه در تیمار CON_{NSe} نسبت به سایر تیمارهای آزمایشی شده است که اختلاف معنی‌داری نشان می‌دهد ($p<۰/۰۵$). ولی سایر تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی‌داری باهم نداشتند. ارتباطات فیزیولوژیک بین وضعیت بدن، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و عملکرد اسپرم در آزمایشات مختلف روی حیوانات دیگر نشان داده شده است (۱۳). کاهش در بیان آنتی‌اکسیدان درون‌زادی سبب کاهش رقابت اسپرم می‌شود و موش‌هایی که در آنزیم آنتی‌اکسیدانی درون‌زادی مانند سوپراکسید دیسموتاز کمبود داشته باشند، در آزمایشات اسپرم، هیچ موفقیتی در لقاح ندارند (۱۴). محققین دیگر در مطالعه‌ای به این نتیجه رسیدند که افزودن سوپر اکسید دیسموتاز (به‌صورت برون‌زادی) به‌مقدار U/mL ۱۰۰ در رقیق‌کننده اسپرم گاومیش گایال Mithun (Bos frontalis)، سبب کاهش درصد اسپرم‌های مرده، اسپرماتوزوآی ناهنجار و ناهنجاری‌های آکروزومی در ساعات مختلف نگهداری در مقایسه با تیمار کنترل گردید که آنها نتیجه گرفتند که اثرات حفاظتی احتمالی سوپراکسید دیسموتاز بر پارامترهای اسپرم به‌وسیله جلوگیری از تولید مالون دی‌آلدهید بوده و آنتی‌اکسیدان‌ها و آنزیم‌های درون سلول را در طول نگهداری اسپرم، حفظ می‌کند (۲۷).

جدول ۵- اثر مکمل‌سازی نانوذرات سلنیوم در رقیق‌کننده بلتسویل بهبود یافته، بر پارامترهای بیوشیمیایی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده خروس‌های مادر گوشتی تحت تنش اکسیداتیو.

Table 5. The effect of supplementation of selenium nanoparticles in modifed Beltsville extender on biochemical parameters of frozen-thawed sperm of broiler breeder roosters under oxidative stress.

	تیمارهای آزمایشی[۱]					
فرآسنجه	شاهد	دگزامتازون	شاهد+نانوسلنیوم	دگزامتازون+نانوسلنیوم	خطای استاندارد	سطح معنی‌داری
مالون دی آلدهید (nmol/ ml)	۶/۹۴^{b}	۹/۱۱^{a}	۷/۰۴^{b}	۷/۷۷^{b}	۰/۴۸	۰/۰۱۸۶
ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی (U/ml)	۱/۱۶^{a}	۱/۰۱^{b}	۱/۱۳^{ab}	۱/۱۰^{ab}	۰/۱۳	۰/۰۴۵۸
گلوتاتیون پراکسیداز (U/ml)	۵۵/۶۹^{c}	۴۶/۱۶^{c}	۸۳/۴۰^{a}	۶۹/۵۳^{b}	۱/۳۴	۰/۰۰۰۲
سوپر اکسید دیسموتاز (U/ml)	۱۱۱/۷۲^{b}	۱۰۳/۴۵^{b}	۱۲۴/۱۶^{a}	۱۰۵/۷۴^{b}	۱/۴۵	۰/۰۱۵۸

[۱]تیمارها با حروف متفاوت ار نظر آماری در سطح احتمال ۰/۰۵ تفاوت معنی‌دار دارند.

به‌طور کلی نتایج حاصل از این آزمایش نشان می‌دهد که استرس تأثیر منفی بر کیفیت اسپرم تولیدشده در پرندگان به‌جا می‌گذارد و با اضافه کردن نانوذرات سلنیوم در محیط رقیق‌کننده طی فرآیند انجماد-یخ‌گشایی نیز تأثیر منفی استرس وارده جبران نمی‌شود و این در حالی است که استفاده از نانوذرات سلنیوم در پرندگان گروه شاهد کیفیت اسپرم را طی فرآیند انجماد- یخ‌گشایی را افزایش می‌دهد.

منابع

1. Abd-Allah, S. and K.S. Hashem. 2015. Selenium nanoparticles increase the testicular antioxidant activity and spermatogenesis in male rats as compared to ordinary selenium. Int J Adv Res, 3: 792-802.
2. 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.
3. 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.
4. Barthelemy, C., D. Royere, S. Hammahah, C. Lebos, M.J. Tharanne and J. Lansac. 1990. Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during cryopreservation. Archives of Andrology, 25: 29-40.
5. Benhenia, K., H. Rahab, M.A. Smadi, H. Benmakhlouf, A. Lamara, T. Idres and M. Iguer-Ouada. 2018. Beneficial and harmful effects of cyclodextrin-vitamin E complex on cryopreserved ram sperm. Animal Reproduction Science, 195: 266-273.
6. Bindari, Y. R., S. Shrestha, N. Shrestha and T.N. Gaire. 2013. Effects of nutrition on reproduction-A review. Adv. Applied Scientific Research, 4: 421-429.
7. Bucak, M.N., A. Ateşşahin and A. Yüce. 2008. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. Small Ruminant Research, 75: 128-134.
8. Burrows, W. and J. Quinn. 1937. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. Poultry Science, 16: 19-24.

9. Da Silva Maia, M., S.D. Bicudo, H.C. Azevedo, C.C. Sicherle, D.B. de 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.
10. Dorostkar, K., S.M. Alavi-Shoushtari and A. Mokarizadeh. 2012. Effects of in vitro selenium addition to the semen extender on the spermatozoa characteristics before and after freezing in water buffaloes (Bubalus bubalis). In: Veterinary research forum, 263 pp.
11. 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.
12. Evans, G. and W.C. Maxwell. 1987. Salamons' artificial insemination of sheep and goats. Butterworths.
13. Friesen, C.R., S.P. de Graaf and M. Olsson. 2019. The relationship of body condition, superoxide dismutase, and superoxide with sperm performance. Behavioral Ecology, 30: 1351-1363.
14. Garratt, M., R. Bathgate, S.P. de Graaf and R.C. Brooks. 2013. Copper-zinc superoxide dismutase deficiency impairs sperm motility and in vivo fertility. Reproduction, 146: 297-304.
15. Ghorbani, M., A. Vatannejad, I. Khodadadi, I. Amiri and H. Tavilani. 2016. Protective effects of glutathione supplementation against oxidative stress during cryopreservation of human spermatozoa. Cryoletters, 37: 34-40.
16. Giaretta, E., E. Estrada, D. Bucci, M. Spinaci, J.E. Rodríguez-Gil and M. Yeste. 2015. Combining reduced glutathione and ascorbic acid has supplementary beneficial effects on boar sperm cryotolerance. Theriogenology, 83: 399-407.
17. Huang, Y.L., W.C. Tseng, S.Y. Cheng and T.H. Lin. 2000. Trace elements and lipid peroxidation in human seminal plasma. Biological trace element research, 76: 207-215.
18. Khalil, W.A., M.A. El-Harairy, A.E. Zeidan and M.A. Hassan. 2019. Impact of selenium nano-particles in semen extender on bull sperm quality after cryopreservation. Theriogenology, 126: 121-127.
19. Kumaresan, A., G. Kadirvel, K. Bujarbaruah, R. Bardoloi, A. Das, S. Kumar and S. Naskar. 2009. Preservation of boar semen at 18 C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. Animal Reproduction Science, 110: 162-171.
20. Lucio, C.D.F., F.M. Regazzi, L. Silva, D.D.S.R. Angrimani, M. Nichi and C.I. Vannucchi. 2016. Oxidative stress at different stages of two-step semen cryopreservation procedures in dogs. Theriogenology, 85: 1568-1575.
21. 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.
22. 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.
23. Nel, A., T. Xia, L. Mädler and N. Li. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. science, 311: 622-627.
24. Pappas, A., F. Karadas, B. Speake, P. Surai and N. Sparks. 2005. Detection and dietary manipulation of selenium in avian semen. British Poultry Science S, 1: 60-61.
25. Partyka, A., E. Łukaszewicz and W. Niżański. 2012. Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. Theriogenology, 77: 1497-1504.
26. 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.
27. Perumal, P. 2014. Effect of superoxide dismutase on semen parameters and antioxidant enzyme activities of liquid stored (5 C) Mithun (Bos frontalis) semen. Journal of Animals.
28. Rad, H.M., M. Eslami and A. Ghanie. 2016. Palmitoleate enhances quality of rooster semen during chilled storage. Animal Reproduction Science, 165: 38-45.
29. Revell, S. and R. Mrode. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. Animal Reproduction Science, 36: 77-86.
30. Rezaeian, Z., H. Yazdekhasti, S. Nasri, Z. Rajabi, P. Fallahi and F. Amidi. 2016. Effect of selenium on human sperm parameters after freezing and thawing procedures. Asian Pacific Journal of Reproduction, 5: 462-466.
31. Safa, S., G. Moghaddam, R.J. Jozani, H.D. Kia and H. Janmohammadi. 2016. Effect of vitamin E and selenium nanoparticles on post-thaw variables and oxidative status of rooster semen. Animal Reproduction Science, 174: 100-106.
32. Shi, L.G., R.J. Yang, W.B. Yue, W.J. Xun, C.X. Zhang, Y.S. Ren, L. Shi and F.L. Lei. 2010. Effect of elemental nano-selenium on semen quality, glutathione peroxidase activity, and testis ultrastructure in male Boer goats. Animal Reproduction Science, 118: 248-254.
33. Siegel, R.B., F.A. Murray, W. Julien, A. Moxon and H. Conrad. 1980. Effect of in vitro selenium supplementation on bovine sperm motility. Theriogenology, 13: 357-367.
34. Surai, P. 2002. Selenium in poultry nutrition 2. Reproduction, egg and meat quality and practical applications. World's Poultry Science Journal, 58: 431-450.
35. Zhang, J., H. Wang, X. Yan and L. Zhang. 2005. Comparison of short-term toxicity between Nano-Se and selenite in mice. Life sciences, 76: 1099-1109.

Effects of Extrinsic Selenium Nanoparticles on the Qualitative Parameters of Frozen-Thawed Sperm of Broiler Breeder Roosters under Oxidative Stress Conditions

Namdar Kamrani[1], Amir Karimi[2] and Mohammad Reza Sheikhloo[2]

1- M.Sc. Student, Animal Physiology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Ahar, University of Tabriz
2- Faculty of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Ahar, University of Tabriz
(Corresponding author: pekarimi@tabrizu.ac.ir)
Received: June 19, 2020 Accepted: January 28, 2021

Abstract

The objective of the present experiment was the study of selenium nanoparticle (NanoSe) in freezing extender on quality parameters of frozen-thawed sperm in broiler breeder roosters reared under physiological stress. Semen samples were collected from 12 birds Ross308, 28 week-age-old, which randomly allocated 2 groups included with physiologic stress (DEX group: using the injection of dexamethasone 0.4 mg/Kg body weight, three times, every other day for 1 week) or without dexamethasone injection (CON). Subsequently, after preliminary evaluation, samples collected from CON and DEX groups were divided into 4 experimental treatments for freezing using modified Beltsville extender either with or without NanoSe. Experimental treatments were included: 1) CON: control group, 2) DEX semen sample from dexamethasone group, 3) CONNSe: inclusion of NanoSe in CON semen sample, and 4) DEXNSe: inclusion of NanoSe in the DEX semen sample. Results show inclusion of Nano selenium in extender of CONNSe improved the Total motility (TM), Progressive Motility (PM), Average Path Velocity (VAP), Straight Line Velocity (VSL), Curvi Linear Velocity (VCL), Linearity (LIN), Straightness (STR), Lateral Head Displacement (ALH) and Beat Cross Frequency (BCF) in comparison with other experimental groups ($P<0.05$) Also, the Viability and Integrity of sperm Membrane, Glutathione Peroxidase (GPX) and Superoxide Dismutase (SOD) activities were higher in mentioned groups then other experimental groups ($P<0.05$) but there were no significant differences among groups in Malondialdehyde (MDA) and Total Antioxidant Capacity (TAC) ($P>0.05$). While the inclusion of NanoSe had no positive effects in DEXNSe versus DEX group ($P>0.05$). It seems the inclusion of NanoSe in extender improves the quality of frozen-thawed sperm, while cannot compensate for the negative effects of oxidative stress.

Keywords: Frozen-thawed semen, Oxidative stress, Rooster sperm, Selenium nanoparticles, Sperm quality