نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۱٤، بهـار ۱۳۹٦
ص‌ص: ٤۳~٥٦

بررسی اثرات متقابل ویتامین E و سلنیوم بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ عربی طی زمان‌های ذخیره سازی تحت شرایط مایع

- **پروانه محمدی**(نویسنده مسئول)
دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان.
- **صالح طباطبایی وکیلی**
دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان.
- **مرتضی مموییی**
استاد گروه علوم دامی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان.
- **جمال فیاضی**
دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان
- **مهدی زارعی**
دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز

تاریخ دریافت : دی ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش : فروردین ۱۳۹۵

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۶۸۸۳۶۹۴۸
Email: p.mohammadie@gmail.com

چکیده

غشای سلول اسپرم طی فرآیند نگهداری و ذخیره در معرض انواع آسیب‌های جبران ناپذیر ناشی از افزایش اکسیژن فعال می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان‌های ویتامینE و سلنیوم در رقیق‌کننده تریس و زرده تخم‌مرغ بر خصوصیات اسپرم قوچ نژاد عربی در زمان‌های مختلف نگهداری منی تحت شرایط مایع بود. برای این منظور، در فصل تولیدمثلی به‌طور هفتگی(دو روز در هفته) از تعداد هشت رأس قوچ نژاد عربی تحت شرایط تغذیه‌ای ومدیریت یکسان اسپرم‌گیری به عمل آمده و بلافاصله منی آن‌ها باهم ترکیب وپس از رقیق‌سازی جهت افزودن سطوح ویتامین E و سلنیوم آماده شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و به صورت فاکتوریل اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل سطوح مختلف ویتامین E(صفر، ۳۰ و ٦۰ میکروگرم در میلی لیتر)، سلنیوم (صفر، دو و چهار میکروگرم در میلی لیتر) و زمان نگهداری منی (صفر، دو، چهار و هشت ساعت) تحت دمای ٤ درجه سانتی‌گراد بود. تأثیر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم شامل درصد تحرک پیشرونده، زنده‌مانی و ناهنجاری‌های مورفولوژیکی در زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن نشان دادکه سطوح مورد مطالعه ویتامین E و سلنیوم به‌طور جداگانه در زمان‌های مختلف نگهداری منی باعث بهبود فراسنجه‌های تحرک، زنده مانی وناهنجاری‌های اسپرم نشدند. بررسی اثر متقابل ویتامین E و سلنیوم بر ویژگی‌های اسپرم نشان دادکه سطح ٦۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E و هر دوسطح سلنیوم بدون ویتامین باعث بهبود معنی‌دار خصوصیات کیفی اسپرم نسبت به تیمار شاهد شدند (P<۰/۰۰۱). در تیمارهایی که ویتامین E و سلنیوم همزمان وجود داشتند،کاهش معنی‌دار کیفیت اسپرم‌ها در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده شد (P<۰/۰۰۱). به‌طورکلی، استفاده ازآنتی‌اکسیدان-های ویتامینE (٦۰ میکرو گرم در میلی لیتر)، سلنیوم (دو میکروگرم در میلی لیتر) به تنهایی و نه در ترکیب با هم در رقیق‌کننده تریس و زرده تخم مرغ منجر به بهبودکیفیت منی قوچ عربی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: کیفیت اسپرم، سلنیوم، قوچ عربی، نگهداری منی، ویتامین E

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 114 pp: 43-56

The interaction effects of vitamin E and selenium on Arabian ram spermatozoa quality parameters during semen storage in liquid condition

Parvaneh Mohammadi, Saleh Tabatabaei Vakili, Morteza Mamouei, Jamal Fayazi, Mehdi Zarei.
Email: P.Mohammadie@gmail.com. Tel: +989168836948

Received: December 2015 **Accepted: March 2016**

The sperm cell membrane is susceptible to irreparable damages due to an increase in reactive oxygen species by process and storage. The aim of this study was to evaluate the effect of vitamin E and selenium antioxidants on the spermatozoa quality of Arabian ram at different times of semen storage under liquid condition. For this purpose, semen collected weakly (Two days a week) from 8 rams in breeding season under the same nutrition and management conditions. All semen samples were mixed immediately and diluted. This experiment was carried out in factorial arrangement with the use of completely randomized design. Treatments were included the different levels of vitamin E (0, 30 and 60 µg/ml), selenium (0, 2 and 4 µg/ml) and semen storage times (0, 2, 4 and 8 hours) Under 4 ° C. The effect of treatments on spermatozoa quality included the progressive motility, viability and morphological defects during various times were assessed. Based on Duncan test, the spermatozoa motility, viability and morphological defect rates were not improved by levels of vitamin E and selenium during semen storage in liquid condition. Evaluation the interaction effect of vitamin E and selenium on spermatozoa quality showed that the vitamin E in 60 µg/ml and both levels of the selenium without vitamin, caused the increase of semen quality than control group (P<0.001). In treatments there were both vitamin E and selenium, significantly reduced spermatozoa quality compared with the control group (P<0.001). Therefore, the use of vitamin E (60 µg/ml) and selenium (2 µg/ml), antioxidants separately in tris extender and egg yolk improved the semen quality of Arabian ram.

Key words: Spermatozoa quality, Selenium, Arabian ram, Semen storage, Vitamin E

مقدمه

بخشی از موفقیت تلقیح مصنوعی در گوسفند به ساخت رقیق‌کننده‌های مناسب بستگی دارد (قزوینیان و همکاران، ۱۳۷۹). اسپرم در منی رقیق‌نشده فقط برای مدت کوتاهی زنده می‌ماند، از طرفی خنک کردن آهسته منی رقیق‌نشده تا ۵ درجه سلسیوس باعث مرگ تعداد زیادی از اسپرم‌ها می‌شود. رقیق‌کننده‌ها محلول‌هایی هستند که به منظور حفاظت از سلول‌های اسپرم در مراحل سردشدن و انجماد پدید آمدند. زرده تخم‌مرغ یکی از اجزاء معمول رقیق‌کننده‌ها می‌باشد که به‌واسطه لیپوپروتئین و لسیتین، اسپرم را از شوک سرمایی محافظت می‌کند (لطیفیان، ۱۳۷۶). پوشش‌دار کردن اسپرم با رقیق‌کننده تریس حاوی زرده تخم‌مرغ روش مناسبی جهت جدا سازی سریع مایع منی است. در این روش مدت زمان مواجهه اسپرم و مایع منی از طریق جمع‌آوری اسپرم در لوله حاوی رقیق‌کننده تریس و زرده تخم مرغ به حداقل می‌رسد (De pauw و همکاران، ۲۰۰۳). از زمان جمع‌آوری منی تا تلقیح آن به دستگاه تناسلی ماده، اسپرم در معرض انواع مختلفی از عوامل مضر محیطی قرار می‌گیرد. لیپیدهای غشا پلاسمایی اسپرم پستانداران به دلیل وجود مقادیر بالای اسیدهای چرب غیر اشباع به شدت به خسارت‌های ناشی از ترکیبات فعال اکسیژن[1] (ROS) حساس است (Storey ، ۱۹۹۷). تولید مقادیر اندک و کنترل شده ROS برای انجام فرآیندهایی مانند ظرفیت‌دار شدن اسپرم، واکنش آکروزومی و اتصال اسپرم به

[1]. Reactive Oxygen Species

زوناپلوسیدا در پستانداران، اهمیت دارد. اما اگر تولید ROS، بیشتر از توان آنتی‌اکسیدانی اسپرم برای خنثی کردن اثر آن‌ها باشد، اسپرم دچار نوعی تنش اکسیداتیو می‌شود که از ویژگی‌های آن، آسیب پراکسیدی به غشای اسپرم و آسیب فیزیکی به DNA است (Aitken و همکاران، ۲۰۱۰). در طی جفت‌گیری طبیعی، اسپرم از ابتدا در شرایط بی‌هوازی قرار دارد و در نتیجه احتمال بروز خسارت توسط ترکیبات فعال اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدها کاهش می‌یابد (Bilodeau و همکاران، ۲۰۰۱). بنابراین ذخیره‌سازی اسپرم در شرایط بی‌هوازی می‌تواند خسارت‌های ناشی از پراکسیداسیون لیپیدهای غشا را کاهش دهد. کاهش دما و شوک سرما طی ذخیره سازی از طریق اعمال تغییرات فیزیکی و بیوشیمیایی توانایی باروری اسپرم را کاهش می‌دهد (Holt و North، ۱۹۸۶). روش‌های مختلفی جهت کاهش خسارت‌های ناشی از شوک سرما طی ذخیره‌سازی پیشنهاد شده است. کنترل سرعت سرد شدن و استفاده از زرده تخم مرغ از جمله ابزار مقابله با آسیب‌های شوک سرما هستند. به همین دلیل زرده تخم مرغ به عنوان ترکیب اصلی جهت تهیه رقیق‌کننده‌های منی مطرح است (rien و Manjunath، ۲۰۰۲). حفظ کیفیت اسپرم قوچ بیشتر مبتنی بر تغییر و جایگزین نمودن رقیق‌کننده‌ها و همچنین اضافه کردن ترکیبات ویژه می‌باشد (Sanchez-Partida ، ۱۹۹۷)، از آن‌جایی که غشای اسپرم قوچ نسبت به دیگر گونه‌های پستانداران دارای نسبت بالاتری از اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشد، بنابراین در مقایسه با سایر گونه‌ها نسبت به تنش‌های حرارتی حساسیت بالاتری از خود نشان می‌دهد (Baumber و همکاران، ۲۰۰۰). آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که با کاهش سرعت اکسیداسیون، باعث حفظ سلول از آسیب‌های شدید اکسیده‌شدن می‌شوند. این ترکیبات ممکن است به‌طور طبیعی در مواد وجود داشته باشند و یا به طریق روش‌های مصنوعی سنتز و به آن‌ها اضافه گردند. از ترکیبات موجود در منی که دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی هستند می‌توان به ویتامین E، سلنیوم، ویتامین C، آلبومین، تائورین و هیپوتائورین اشاره کرد. مجموع سیستم‌های آنزیمی و مواد آنتی‌اکسیدانی موجود در منی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسمای منی را تشکیل می‌دهند (Sekhon و Agarwal، ۲۰۱۰). ویتامین E مهمترین ترکیب آنتی‌اکسیدانی موجود در اسپرم است و جهت مقابله بر علیه انواع اکسیژن‌های واکنش‌پذیر در غشاء ضروری می‌باشد (Yousef و همکاران، ۲۰۰۳). این ویتامین به علت حلالیت در چربی می‌تواند از غشاء پلاسمایی اسپرم عبور نماید و اثر تخریبی رادیکال‌های آزاد را سرکوب کند (Clarkson و Aitken، ۱۹۸۸). سلنیوم نیز یک ماده آنتی‌اکسیدانی شناخته شده است که وجود آن برای عملکرد طبیعی بیضه و انجام فرآیند اسپرماتوژنز ضروری می‌باشد. سلنیوم جزء ساختاری آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز بوده و از این طریق در عملکرد اسپرم اثرگذار می‌باشد. عملکرد آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون پراکسیداز، شدیداً به وجود سلنیوم در جایگاه فعال آنزیم وابسته است. این ماده به عنوان کوفاکتور آنزیم آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون پراکسیداز منجر به کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود و لذا انتظار می‌رود که در افزایش باروری مؤثر باشد. این آنزیم نیز مانند سوپراکسید دیسموتاز، با ممانعت از پراکسیداسیون لیپید موجود در غشای اسپرم و در نهایت، از طریق بهبود حرکت اسپرم بر عملکرد اسپرم تأثیر می‌گذارد. گلوتاتیون پراکسیداز نقش مهمی در تولید اسپرم، بلوغ و باروری آن داشته و عدم وجود این آنزیم منجر به کاهش ظرفیت بارورسازی اسپرم می‌گردد (Olson و همکاران، ۲۰۰۴).در میان اندام‌های تولیدمثلی، بیضه دارای بالاترین غلظت سلنیوم است که مقدار آن حتی از کبد نیز بیشتر است. غلظت سلنیوم نشان دهندهٔ نقش محافظتی این عنصر کمیاب و آنزیم‌های مرتبط با آن در طی اسپرماتوژنز است (Behne و همکاران، ۱۹۹۶). عمل بیولوژیکی سلنیوم در پستانداران از طریق ترکیبات فعال زیستی شامل آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز[2] و سایر سلنوپروتئین‌های سرم و بافت بیان می‌شود (Hill و همکاران، ۱۹۹۶). نیازهای بیضه به سلنیوم در زمان بلوغ هم زمان با آغاز فرآیند اسپرماتوژنز افزایش می‌یابد و کاهش غلظت سلنیوم احتمالاً اسپرماتوزوئیدها را نسبت به رادیکال‌های آزاد اکسیژن آسیب‌پذیرتر می‌سازد (Shamberger، ۱۹۸۳). بنابراین سلنیوم یک آنتی‌اکسیدان قوی است که برای سیستم آنتی‌اکسیدانی داخل

[2]. Glutathione Peroxidase

سلولی به عنوان کوفاکتور آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز عمل نموده و این آنزیم نیز اثرات ویتامین E را تکمیل می‌نماید (Burk و همکاران، ۲۰۰۳). در پستانداران، ساخت طبیعی اسپرم به جذب کافی سلنیوم توسط بیضه‌ها وابسته است و کمبود متوسط تا شدید آن، با حرکت معیوب اسپرم و تغییرات مورفولوژیکی قطعه میانی مشخص شده، که اغلب منجر به جدایی سر اسپرم از دم آن می‌گردد و هنگامی‌که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بسیار کمی در مایع منی وجود دارد، تنش اکسیداتیو در اسپرماتوزوئیدها سبب ناباروری می‌شود، پس ضروری است که برای جبران کمبود سپر دفاعی، آنتی‌اکسیدان‌های خارجی به اسپرم افزوده شود (Bruemmer و همکاران، ۲۰۰۲). بنابراین با توجه به اهمیت این آنتی‌اکسیدان‌ها در جلوگیری از اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد بر اسپرم‌ها، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر متقابل دوطرفه سطوح مختلف ویتامین E، سلنیوم و زمان‌های مختلف نگهداری منی بر خصوصیات کیفی اسپرم قوچ عربی تحت شرایط مایع بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر در ایستگاه دامپروری دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان واقع در شهر ملاثانی در ۳۶ کیلومتری شمال شرقی اهواز انجام شد. برای این منظور، از تعداد ۸ رأس قوچ بالغ نژاد عربی با متوسط سن ۲/۵ سال و وزن تقریبی ۶۰ کیلوگرم و تحت تغذیه یکسان استفاده شد. اسپرم‌گیری، پس از عادت دادن قوچ‌ها به روش تحریک الکتریکی با دستگاه الکترواجاکولاتور، به‌طور هفتگی و به مدت ۸ هفته در پاییز که مصادف با فصل تولید مثلی گوسفند است، انجام گرفت. نمونه‌های منی جمع‌آوری شده از قوچ‌ها با هم مخلوط شده و سپس در رقیق‌کننده تریس حاوی زرده تخم مرغ (Maxwell و Salamon، ۲۰۰۰) به نسبت ۱۰ به ۱ (۱۰ قسمت محلول رقیق‌کننده و یک قسمت منی) رقیق گردید(جدول ۱). آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و به صورت فاکتوریل انجام شد.

سطوح به کار رفته ویتامین E و سلنیوم مشابه با مقادیر استفاده شده در مطالعات قبلی می‌باشد. تیمارها شامل سطوح مختلف ویتامین E (صفر، ۳۰ و ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) (پریزادیان کاوان و همکاران، ۱۳۸۶)، سلنیوم (صفر، دو و چهار میکروگرم در میلی‌لیتر) (Dorostkar و همکاران، ۲۰۱۲) و زمان‌های مختلف نگهداری منی (صفر، دو، چهار و هشت ساعت) (پریزادیان کاوان و همکاران، ۱۳۸۶) به حالت مایع در دمای چهار درجه سلسیوس بود. روند کار به این صورت بود که در هر بار نمونه‌گیری، منی مخلوط پس از رقیق‌سازی به نه قسمت مساوی جهت افزودن سطوح ویتامین E و سلنیوم تقسیم شده و در زمان‌های مختلف نگهداری تحت دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (دمای یخچال)، فراسنجه‌های کیفی اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفتند. به منظور تعیین درصد تحرک اسپرماتوزوئیدها در زمان‌های مختلف، یک قطره کوچک از نمونه منی رقیق شده بر روی یک لام تمیز گرم شده قرار داده شد و پس از لامل‌گذاری، با استفاده از بزرگنمایی ۴۰۰× میکروسکوپ نوری و با بررسی چند ناحیه از لام، درصد اسپرم‌های با تحرک پیشرونده تعیین گردید. جهت ارزیابی درصد اسپرم‌های زنده و نیز ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم (اسپرم دوسر، چرخش دم اسپرم، اسپرم بی سر و غیره) در زمان‌های مختلف مورد مطالعه از روش رنگ آمیزی ائوزین و نگروزین استفاده شد. برای رنگ‌آمیزی ابتدا یک قطره از منی رقیق‌شده در یکی از دو انتهای لام تمیز و گرم شده قرار داده شد و سپس یک قطره از مخلوط رنگ بر روی منی رقیق‌شده ریخته شد. بعد از مدت یک دقیقه، توسط لبه لام دیگری گسترش نازکی از آن تهیه شد و سپس لام در مجاورت هوای آزاد خشک گردید. اسپرم‌های زنده به دلیل داشتن غشاهای سالم، رنگ را به خود جذب نکرده و از این طریق از اسپرم‌های مرده قابل تشخیص بودند. میزان زنده‌مانی و ناهنجاری‌های اسپرماتوزوئیدها در بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰× (عدسی ۱۰۰) میکروسکوپ نوری و در چند میدان با استفاده از روغن ایمرسیون تعیین گردیدند.جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، از طرح کاملاً تصادفی به‌صورت آزمایش فاکتوریل و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد نرم افزار SAS نسخه ۹/۳ استفاده شد(منظور از تیمار شاهد در این پژوهش سطح صفر سلنیوم و ویتامین E می‌باشد).

نتایج

اثر متقابل سطوح مختلف ویتامین E و سلنیوم

یافته‌های مطالعه حاضر نشان دادند که اثرات متقابل دوطرفه ویتامین E (میکروگرم در میلی‌لیتر) و سلنیوم (میکروگرم در میلی‌لیتر) بر فراسنجه‌های کیفی اسپرماتوزوئیدها معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۱). تیمار (سطح دو سلنیوم و صفر ویتامینE) ، تیمار (چهار سلنیوم و صفر ویتامین E)، و تیمار (سطح ۶۰ ویتامین E و صفر سلنیوم) به ترتیب بیشترین درصد تحرک اسپرم را داشتند. کمترین درصد تحرک نیز در تیمار (سطح چهار سلنیوم و ۶۰ ویتامین E) مشاهده شد (P<۰/۰۰۱) (نمودار ۱). درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها نیز به ترتیب در تیمار (سطح دو سلنیوم و صفر ویتامین E)،تیمار (سطح چهار سلنیوم و صفر ویتامین E) و نیز تیمار (سطح ۶۰ ویتامین E و صفر سلنیوم) بیشتر از بقیه بودند.کمترین درصد زنده‌مانی نیز مربوط به تیمار (سطح چهار سلنیوم و ۶۰ ویتامین E) بود (P<۰/۰۰۱) (نمودار ۲). بیشترین میزان ناهنجاری‌های اسپرم مربوط به تیمار شاهد (سطح صفر سلنیوم و صفر ویتامین E) و تیمار (سطح دو سلنیوم و ۶۰ ویتامین E) بوده و کمترین درصد ناهنجاری نیز در تیمار (سطح ۶۰ ویتامین E و صفر سلنیوم) مشاهده شد (P<۰/۰۰۱). (نمودار ۳).

اثر متقابل سطوح مختلف ویتامین E و زمان‌های نگهداری منی

اثرات متقابل دو طرفه ویتامین E و زمان تنها بر درصد تحرک پیشرونده اسپرم‌ها معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۱). نتایج نشان دادند (نموار ۴) که سطوح به‌کار رفته ویتامین E در رقیق‌کننده تریس و زرده تخم مرغ باعث کاهش درصد تحرک اسپرم در زمان‌های مختلف نگهداری منی شد (P<۰/۰۰۱). همچنین، اختلاف معنی-داری بین سطوح مورد مطالعه ویتامین E و گروه شاهد (سطح صفر سلنیوم و صفر ویتامین E) از لحاظ میزان زنده‌مانی (نمودار ۵) و ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم (نمودار۶) یافت نشد (P>۰/۰۵).

اثر متقابل سطوح مختلف سلنیوم و زمان‌های نگهداری منی

اثرات متقابل دو طرفه سلنیوم و زمان تنها بر درصد ناهنجاری مورفولوژیکی (نمودار ۹) اسپرم‌ها معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۱). سطوح به‌کار رفته سلنیوم در رقیق‌کننده تریس و زرده تخم مرغ باعث افزایش درصد ناهنجاری اسپرم در زمان‌های مختلف نگهداری منی شد (P<۰/۰۰۱). به‌طوری‌که بیشترین و کمترین درصد ناهنجاری اسپرم به ترتیب مربوط به تیمار دو میکروگرم در میلی‌لیتر سلنیوم و شاهد (سطح صفر سلنیوم و صفر ویتامینE) بود. اختلاف معنی‌داری بین سطوح مورد مطالعه سلنیوم و گروه شاهد از لحاظ میزان تحرک (نمودار ۷) و زنده‌مانی (نمودار ۸) اسپرم‌ها یافت نشد (P>۰/۰۵).

بحث

پلاسمای منی عوامل کافی برای نگهداری اسپرم انزال شده را برای مدت زمان کوتاهی در خود دارد ولی رقیق‌کننده‌ها شرایطی را تأمین می‌کنند که به اسپرم اجازه تحمل شرایط غیرطبیعی مرتبط با نگهداری و تلقیح مصنوعی را می‌دهد. نوع رقیق‌کننده به هنگام نگهداری اسپرم به عنوان عامل مهم و تأثیرگذار مطرح می‌باشند و حفظ کیفیت اسپرم قوچ بیشتر مبتنی بر تغییر و جایگزین نمودن رقیق‌کننده‌ها و همچنین اضافه کردن ترکیبات ویژه (همچون زرده تخم مرغ) می‌باشد (Sanchez-Partida، ۱۹۹۷). در رقیق‌سازی اسپرم برای نگهداری به‌صورت مایع با افزایش زمان ذخیره‌سازی، تحرک و باروری کاهش می‌یابد، نوع متابولیسم غالب در هنگام ذخیره‌سازی به‌صورت مایع، هوازی می‌باشد و نیاز به اکسیژن و تهویه کافی وجود دارد (Dourad و همکاران، ۲۰۰۴)، رقیق‌کننده‌ها اغلب اثراتی کاهشی بر کیفیت و عملکرد اسپرم دارند (Blanco و همکاران، ۲۰۰۰). افزایش نرخ رقیق‌سازی موجب مصرف بیشتر اکسیژن می‌شود که در نتیجه افزایش متابولیسم، مصرف ATP و تحرک اسپرم را در پی دارد و موجب یک روند نزولی در کیفیت و عمل اسپرم می‌شود همچنین رقیق‌کننده موجب تغییر ویسکوزیته منی می‌شود که تحرک اسپرم را تحت تأثیر قرار می‌دهد (McDaniel و Parker، ۲۰۰۶).

در مقابل اثرات پاتولوژیک رادیکال‌های آزاد، اسپرماتوزوئیدها و پلاسمای منی، دارای مجموعه‌ای از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی از قبیل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز، ردوکتاز و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی از قبیل ویتامین‌های C و E، پیروات، گلوتاتیون، کارنیتین، تورین و هیپوتورین، تحت عنوان کلی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام یا TAC می‌باشند (Tremellen، ۲۰۰۸). پژوهشگران پیشنهاد داده‌اند که اختلالات اسپرم احتمالاً با سطح بالای ROS در اسپرم و کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسمای منی در ارتباط است. از آن‌جایی که حجم عمده‌ای از آنتی‌اکسیدان‌های سیتوپلاسمی اسپرم، طی اسپرماتوژنز تخلیه می‌شوند، اسپرماتوزوئیدها نسبت به اثرات پاتولوژیک رادیکال‌های آزاد بسیار حساس می‌باشند. لذا آنتی‌اکسیدان‌های مایع منی، جبرانی برای از دست رفتن این آنزیم‌های سیتوپلاسمی می‌باشند (Agarwal و همکاران، ۲۰۰۵).

اسپرم به‌صورت طبیعی خود دارای آنتی‌اکسیدان‌های مختلفی می‌باشد، ولی این آنتی‌اکسیدان‌ها برای نگهداری طولانی مدت منی کافی نیستند (Dourad و همکاران، ۲۰۰۴). بنابراین، هر عاملی که منجر به کاهش سطح آنتی‌اکسیدان‌های پلاسمای منی گردد، منجر به اختلال در تعادل آنتی‌اکسیدان‌ها و رادیکال‌های آزاد شده و بر عملکرد اسپرم اثر مخرب می‌گذارد. با این وجود، در شرایط پاتولوژیک، تولید بالای ROS، ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌ها را کاهش داده و منجر به افزایش تنش اکسیداتیو می‌گردد. پس اگرچه مواد آنتی‌اکسیدانی در منی وجود دارند، اما به دلیل مقدار کم آن‌ها و کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی منی در طی نگهداری، استفاده از این ترکیبات به صورت افزودنی می‌تواند در بهبود خصوصیات منی و در نتیجه اسپرم‌ها مؤثر باشد (Demirci و Sonmez ، ۲۰۰۴).

وجود غلظت بالای اسیدهای چرب غیر اشباع با چند پیوند دوگانه در لیپیدهای منی، نیازمند داشتن سیستم‌های مؤثری برای حفاظت غشای اسپرم در برابر آسیب‌های پراکسیداسیون است (Kelso و همکاران، ۱۹۹۶) که در این میان می‌توان به آنتی‌اکسیدان‌ها اشاره کرد. پژوهش‌های فراوانی برای تعیین تأثیر آنتی‌اکسیدان‌های گوناگون بر تولید مثل پستانداران انجام شده است که در میان آن‌ها، ویتامین E و سلنیوم نقش اصلی در حفاظت اسپرم در برابر پراکسیداسیون بر عهده دارند (Breque و همکاران، ۲۰۰۳). امروزه مشخص شده که استفاده مؤثر از ویتامین E در بدن وابسته به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بر پایه سلنیوم است. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل مایع پلاسمای منی از حاصل جمع پتانسیل آنزیم‌هایی همچون گلوتاتیون پراکسیداز بدست می‌آید (Mahfouzو همکاران، ۲۰۰۹).

در بررسی اثرات متقابل ویتامین E و سلنیوم، بیشترین درصد تحرک و زنده‌مانی مربوط به تیمار حاوی دو و چهار میکروگرم در میلی‌لیتر سلنیوم (سطح صفر ویتامین E) در رقیق‌کننده تریس بوده که با مطالعه انجام شده در انسان (Agarwal و همکاران، ۲۰۰۴) مطابقت داشته اما با پژوهش انجام شده در زمینه اثر بر ناهنجاری‌های اسپرم در موش‌های آزمایشگاهی بزرگ (Wallace و همکاران، ۱۹۸۳) مغایرت نشان می‌دهد. همچنین گزارش شده که همبستگی مثبتی مابین فراسنجه‌های اسپرم و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در پلاسمای منی وجود دارد (Contri و همکاران، ۲۰۱۱). همچنین کمتر بودن درصد ناهنجاری‌های اسپرم در تیمار حاوی ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E با مطالعه قبلی انجام شده در قوچ (Sarlos و همکاران، ۲۰۰۲) هم‌خوانی دارد. اما در برخی پژوهش‌ها نیز اثر افزایشی بر ناهنجاری اسپرم داشته است (Brail و Corteel، ۱۹۷۷). در پژوهشی، به‌کارگیری ویتامین E در رقیق‌کننده منی قوچ دارای تأثیر مثبت معنی‌داری بر زنده‌مانی اسپرم بوده است که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد (پریزادیان کاوان و همکاران، ۱۳۸۶). در مطالعه‌ای دیگر، مصرف این دوآنتی‌اکسیدان با یکدیگر نیز نتایج قابل قبولی بر کیفیت منی قوچ داشته است (Udala و همکاران، ۱۹۹۵). نتایج اثرات متقابل ویتامین E و زمان‌های مختلف نگهداری نشان‌دهنده اثر کاهشی این ویتامین در زمان‌های مختلف نگهداری بر روی تحرک اسپرم‌ها می‌باشد، که شاید علت این باشد که ویتامین E در غلظت‌های بالا می‌تواند به عنوان یک عامل اکسیدکننده اثر منفی بگذارد و در غلظت‌های دیگر نتایج متفاوتی

حاصل شود (De Man، ۱۹۹۹). در همین زمینه برخی محققین اثر معنی‌دار ویتامین E افزوده شده به‌طور مستقیم به منی قوچ و پرندگان بر تحرک (Donoghue و Donoghue ، ۱۹۹۷) و زنده‌مانی اسپرم (Sarlos و همکاران،۲۰۰۲) در شرایط مایع را گزارش نموده‌اند. اما در مطالعه دیگر، اثر آن بر درصد تحرک و زنده‌مانی اسپرم طیور معنی‌دار نبوده است (Blesbois و همکاران، ۱۹۹۳). در برخی پژوهش‌های انجام شده توسط محققین نشان داده شد که خوراندن ویتامین E به حیواناتی مثل پرنده در مقایسه با افزودن آن به منی، تأثیر بیشتری بر کاهش پراکسیداسیون غشای اسپرم داشت (Surai و همکاران، ۲۰۰۰) و در برخی مطالعات، ویتامین E باعث کاهش معنی‌دار ناهنجاری‌های اسپرم بز نیز شده است (Brail و Corteel، ۱۹۷۷)، که با نتایج این مطالعه همخوانی ندارد. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اسپرم و ویتامین E موجود در پلاسمای منی به علت خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالقوه و با جلوگیری از اثرات مخرب گونه‌های فعال اکسیژن می‌توانند تأثیر مهمی در کاهش پراکسیداسیون چربی موجود در اسپرم داشته باشند که اثر خود را به صورت حفظ کیفیت اسپرم در شرایط مایع نشان می‌دهند. عدم تأثیر معنی‌دار ویتامین E بر بهبود کیفیت منی قوچ عربی در زمان-های مختلف نگهداری منی و تفاوت یافته‌های این تحقیق با مطالعات دیگر احتمالاً مربوط به سطوح به‌کار رفته ویتامین E، نحوه افزودن آن (مستقیم به منی و نه جیره) و گونه و نژاد دام باشد. سلنیوم نیز یک ماده معدنی مهم مورد نیاز برای بسیاری از عملکردهای حیوان می‌باشد که در تعامل با ویتامین E،کارایی ویتامین E را به عنوان آنتی‌اکسیدان افزایش می‌دهد و باعث بهبود پارامترهای تولیدمثلی در هر دو جنس نر و ماده می‌گردد. این آنتی‌اکسیدان‌های جمع‌کننده‌ی رادیکال‌های آزاد، ROS های تولید شده از اکسید سلولی را از بین برده و در راستای حفاظت از اسپرماتوزوئیدها در برابر ROS عمل می‌کنند (Sikka ، ۱۹۹۶). سلنیوم از طریق کاهش مالون‌دی‌آلدئید (MDA) که محصول نهایی پراکسیداسیون چربی اسپرم می‌باشد، موجب ارتقای فراسنجه‌های کیفی اسپرم می‌شود (Huang و همکاران، ۲۰۰۰).

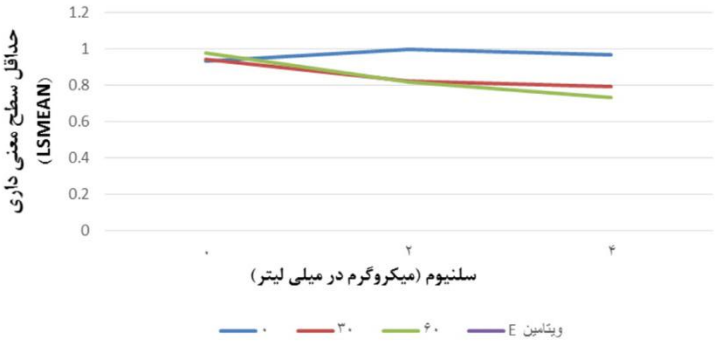
همچنین، این عنصر ممکن است از طریق نقش آنتی‌اکسیدانی خود، از DNA اسپرم در برابر آسیب اکسیداتیو حفاظت کرده و بدین وسیله موجب بهبود حرکت اسپرم و بقای آن شود (خرازی و همکاران، ۱۳۸۹). کمبود سلنیوم منجر به آسیب قطعه میانی اسپرم و کاهش تحرک آن و نیز افزایش ناهنجاری‌های مورفولوژیکی بخصوص در ناحیه سر اسپرم می‌شود (Sekhon و Agarwal، ۲۰۱۰). به‌دلیل خاصیت سینرژیستی (هم‌افزایی) ویتامین E با سلنیوم، مفید بودن ترکیب آن‌ها به عنوان آنتی‌اکسیدانی مشخص شده است (Traber و Burton، ۱۹۹۰). در این پژوهش اثر متقابل سلنیوم و زمان‌های مختلف نگهداری تنها بر روی ناهنجاری اثر گذاشته و باعث افزایش آن شد، در مقابل کمبود سلنیوم در موش‌های آزمایشگاهی کوچک منجر به کاهش تولید اسپرم و تحرک آن‌ها و افزایش اسپرم‌های ناهنجار شد. این اختلالات می-تواند در رابطه با افزایش شکنندگی کپسول میتوکندری اسپرم باشد (Wallace و همکاران، ۱۹۸۳) که با نتایج مطالعه حاضر مغایرت دارد.

در پژوهشی دیگر، همبستگی مثبت معنی‌داری مابین درجات مختلف عنصر سلنیوم در پلاسما و کیفیت اسپرم گزارش شده است (Noak-Fuller و همکاران، ۱۹۹۳). همچنین نتایج مطالعه Dorostkar و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که کاربرد عنصر سلنیوم در مایع منی گاومیش (افزودن سلنیوم به صورت مصنوعی به مایع منی در مقادیر ۰، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۸ میکروگرم در لیتر سلنیوم رقیق شده) به طور سودمندی بر روی کیفیت اسپرم و فرآیندهای فیزیولوژیکی آن در شرایط آزمایشگاه و در زمان‌های مختلف اثر گذاشت (بهترین نتایج مربوط به سطوح ۱ و ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر سلنیوم بود). نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که افزودن عنصر سلنیوم در هنگام ذخیره‌سازی اسپرم‌های گاومیش رودخانه‌ای، باعث بهبود کیفیت اسپرم و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی تام و فراسنجه‌های کیفی اسپرم می‌شود. همچنین در این مطالعه زنده‌مانی، باروری، یکپارچگی غشاء اسپرم و خسارات DNA در هنگام افزودن دو میکروگرم در میلی‌لیتر سلنیت سدیم به رقیق‌کننده بهتر بود. نتایج مطالعه Dorostkar و همکاران (۲۰۱۲) و سایر مطالعات انجام شده در شرایط آزمایشگاهی در زمینه موش (Mohammadi و همکاران،۲۰۰۸)، خوک

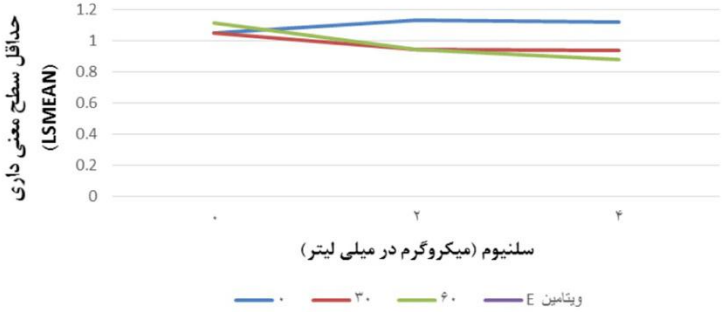
(Speight و همکاران، ۲۰۱۲) و قوچ (Baiomy و همکاران، ۲۰۰۹) نتایج مشابهی را نشان می‌دهندکه در مورد اثر بر روی تحرک و زنده‌مانی اسپرم موافق با پژوهش حاضر بوده اما در زمینه اثر سلنیوم بر روی ناهنجاری مغایرت نشان دادند. در سایر مطالعات نیز گزارش شده است که اضافه کردن عنصر سلنیوم به منی در فعالیت عنصر سلنیوم موجود در پلاسمای منی اثر گذاشته و فعالیت آن را افزایش می‌دهد (Gressier و همکاران، ۱۹۹۴). ممکن است در طول مدت زمان ذخیره‌سازی، حساسیت اسپرماتوزوئیدها به پراکسیداسیون لیپید و استرس اکسیداتیو افزایش پیدا کند که در این زمینه اثر محافظتی و تقویتی عنصر سلنیوم در شرایط مایع یعنی رقیق‌کننده تریس- سیترات و هنگام ذخیره‌سازی به وضوح نشان داده شده است (Kadirvel و همکاران، ۲۰۰۹). Dorostkar و همکاران (۲۰۱۲) بیان کردند که کارکرد اسپرم در مواقع کمبود عنصر سلنیوم تضعیف می‌شود و اثر تضعیف فعالیت‌های اسپرماتوزوئید در جنس نر در مواقع کمبود سلنیوم به وسیله تضعیف فرآیندهای اکسایشی شامل فیزیولوژیکی یا تنفس سلولی و یا تضعیف میتوکندری رخ می‌دهد (Turek وHawkes، ۲۰۰۱). اما در مطالعه خرازی و همکاران (۱۳۸۹)، غلظت سلنیوم پلاسمای منی انسان هیچ گونه ارتباط معنی‌داری با فراسنجه‌های کیفی اسپرم‌ها نداشت. سلنیوم از طریق کاهش مالون دی‌آلدئید (MDA) ، موجب ارتقای فراسنجه‌های کیفی اسپرم می‌شود (Huang و همکاران، ۲۰۰۰). همچنین، این عنصر ممکن است از طریق نقش آنتی‌اکسیدانی خود، از DNA اسپرم در برابر آسیب اکسیداتیو حفاظت کرده و بدین وسیله موجب بهبود حرکت اسپرم و بقای آن شود (خرازی و همکاران، ۱۳۸۹). اما ویتامین E ممکن است با تأثیر گذاشتن بر اسیدهای چرب فسفولیپیدها، موجب ثبات غشای اسپرم و یا موجب حفاظت زنجیره تنفسی میتوکندریایی شود و سلول را در برابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد محافظت کند (Dourad و همکاران، ۲۰۰۴). در نگاه کلی از مطالعه حاضر می‌توان چنین نتیجه گرفت که در بررسی اثر متقابل ویتامین E، سلنیوم و زمان بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ عربی، استفاده از دو آنتی‌اکسیدان با همدیگر نتیجه قابل قبولی را نشان نداده و استفاده مجزای آن‌ها نیز تابع شرایط خاصی می‌باشد که از جمله می‌توان به مقدار مصرف آن‌ها اشاره کرد که در دام دارای اهمیت ویژه‌ای بوده و استفاده از مقدارنامناسب یا دوره کوتاه مدت درمان آن‌ها، حتی اثر معکوس دارد (Agarwal و همکاران، ۲۰۰۴). پس آنتی اکسیدان‌ها شمشیر دو لبه‌ای هستند که مقدار و مدت زمان مصرف آن‌ها بسیار مهم می‌باشد (Kaur و Kaur، ۲۰۰۰). بنابراین با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر می‌توان گفت که، افزودن سطوح ویتامین E و سلنیوم به‌طور مجزا از هم به رقیق‌کننده تریس و زرده تخم مرغ، منجر به بهبود کیفیت منی قوچ عربی شد. ولی در تیمارهایی که ویتامین E و سلنیوم در ترکیب با هم به‌کار رفته بودند، کاهش کیفیت اسپرم‌ها در مقایسه با شاهد (سطح صفر سلنیوم و صفر ویتامین E) مشاهده شد.

جدول ۱- فرمول رقیق کننده تریس حاوی زرده تخم مرغ جهت نگهداری منی قوچ عربی در شرایط مایع (سالامون و ماکسول،۲۰۰۰)

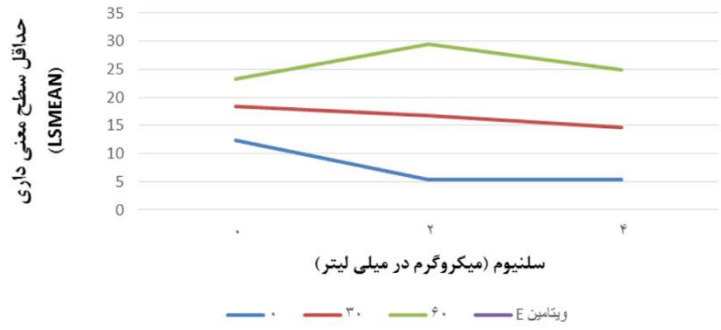
اجزای رقیق کننده	مقادیر
تریس (هیدروکسی متیل آمینومتان) (گرم)	۳/۶۳۴
فروکتوز (گرم)	۰/۵
اسید سیتریک (منوهیدرات) (گرم)	۱/۹۹
زرده تخم مرغ (میلی‌لیتر)	۱۴
آب مقطر (میلی‌لیتر)	۱۰۰



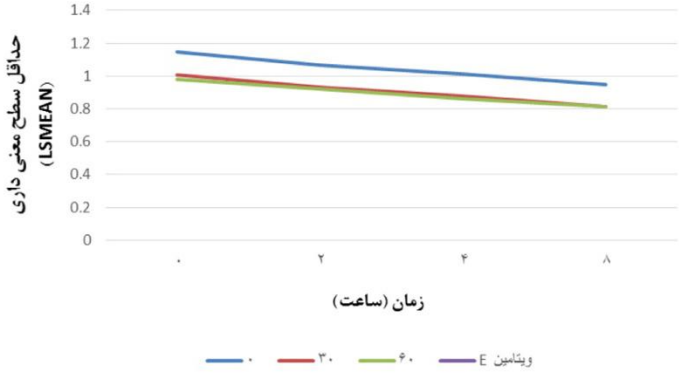
نمودار ۱- بررسی اثرات متقابل دوطرفه سطوح سلنیوم (میکروگرم در میلی لیتر) و ویتامین E (میکروگرم در میلی لیتر) بر روی تحرک



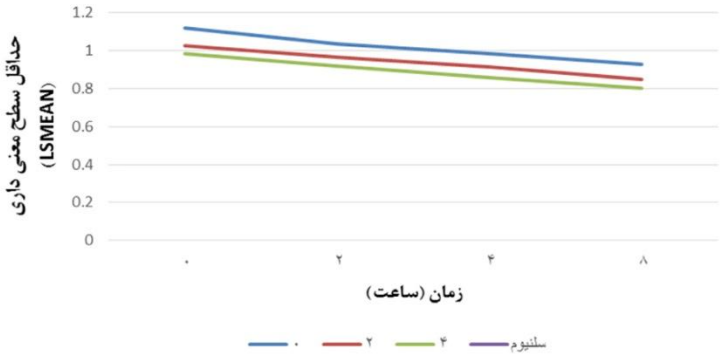
نمودار ۲- بررسی اثرات متقابل دوطرفه سطوح سلنیوم (میکروگرم درمیلی لیتر) و ویتامین E (میکروگرم در میلی لیتر) برروی زنده مانی



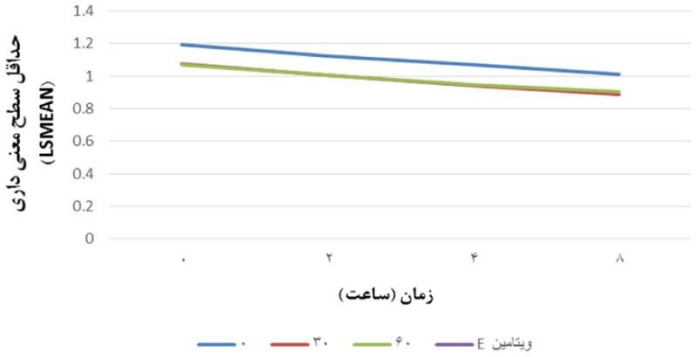
نمودار ۳- بررسی اثرات متقابل دوطرفه سطوح سلنیوم (میکروگرم در میلی لیتر) و ویتامین E (میکروگرم در میلی لیتر) بر روی ناهنجاری



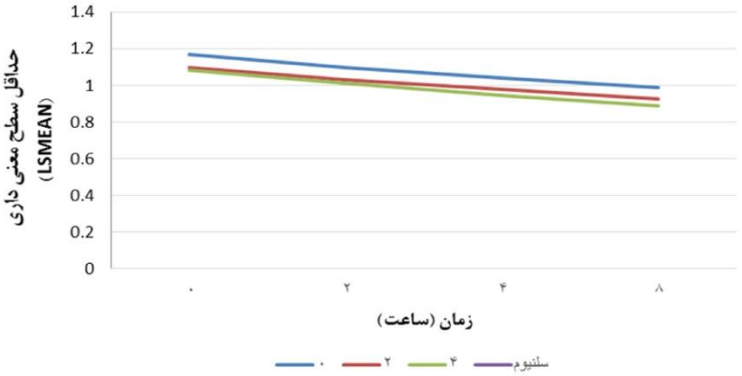
نمودار ۴- بررسی اثرات متقابل دوطرفه سطوح ویتامین E (میکروگرم در میلی لیتر) و زمان (ساعت) بر روی تحرک



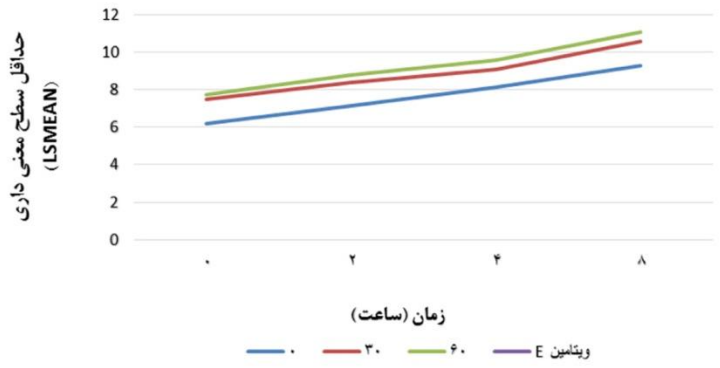
نمودار۷- بررسی اثرات متقابل دوطرفه سطوح سلنیوم (میکروگرم در میلی لیتر) و زمان (ساعت) بر روی تحرک



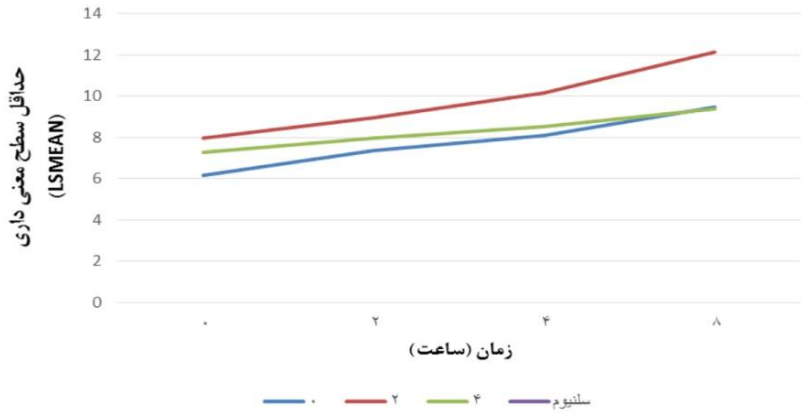
نمودار ۵- بررسی اثرات متقابل دوطرفه سطوح ویتامین E (میکروگرم در میلی لیتر) و زمان (ساعت) بر روی زنده مانی



نمودار۸- بررسی اثرات متقابل دوطرفه سطوح سلنیوم (میکروگرم در میلی لیتر) و زمان (ساعت) بر روی زنده مانی



نمودار ۶- بررسی اثرات متقابل دوطرفه سطوح ویتامین E (میکروگرم در میلی لیتر) و زمان (ساعت) بر روی ناهنجاری



نمودار۹- بررسی اثرات متقابل دوطرفه سطوح سلنیوم (میکروگرم در میلی لیتر) و زمان (ساعت) بر روی ناهنجاری

منابع

پریزادیان کاوان، ب. جعفری‌آهنگری، ی. زرده داران، س. (۱۳۸۶). تأثیر سطوح مختلف ویتامین‌های E و C در رقیق‌کننده‌های شیر و تریس بر خصوصیات اسپرم قوچ آتابای در شرایط مایع. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، جلد پانزدهم. شماره ۵.

خرازی، ه. ویسی‌رایگانی، ا. اعتصامی، ب. خزاعی، م. کیانی، ا. رفیعی‌علوی، ع. شاهرخی، س،س. (۱۳۸۹). مقایسه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان اسپرم و عناصر سلنیوم و روی پلاسمای منی در بین مردان بارور و نابارور ایدیوپاتیک. فصلنامه علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه. ۳۲۷-۳۱۶.

قزوینیان خ. جواهری وایقان ع. و ایرانی م.(ترجمه). (۱۳۷۹). *فیزیولوژی تولید مثل و تلقیح مصنوعی کاربردی در گوسفند و بز*. انتشارات دانشگاه سمنان. ۲۷۳ صفحه.

لطیفیان، ف. (۱۳۷۶). انجماد اسپرم گاو در رقیق کننده شیر نیمه پس چرخ. پایان نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان اصفهان. ۱۶۳ صفحه.

Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SR, Said TM. (2004). Role of antioxidant in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reproductive Biomedicine Online*. 8:616-27.

Agarwal, A., Prabakaran, S.A. and Said, T.M. (2005). Prevention of oxidative stress injury to sperm. *Journal Andrology*. 26(6): 654-60.

Agarwal, A. and L.H. Sekhon, L.H. (2010). The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. *Human Fertility*, 13(4): 217-225.

Aitken, R.J., and Clarkson, J.S. (1988). Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of spermatozoa preparation techniques. *Journal Andrology*. 9: 367-376.

Aitken, R.J., de Iuliis, G.N., Finnie, J.M., Hedges, A., McLachlan, R.I. (2010). Analysis of the relationships between oxidative Stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Human Reproduction*. 25: 2415-2426.

Baiomy, A.A., Mohamed, A.E.A. and Mottelib, A.A. (2009). Effect of dietary selenium and vitamin E supplementation on productive and reproductive performance in rams. *Bachelors Degree in Veterinary Medicine Journal*. 19: 39-43.

Baumber, J., Ball, B.A., Gravance, C.G., Medina, V., and Davies, M.C.G. (2000). The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *Journal Andrology*. 21: 895-902.

Behne, D., Weiler, H., and Kyriakopoulos, A. (1996). Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. *Journal of Reproduction and Fertility*. 106 (2): 291-7.

Bilodeau, J. F., S. Blanchette, C. Gagnon, and M. A. Sirard. (2001).Thiols prevent H2O2-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen.*Theriogenology*.56:275–286.

Blanco, J.M., Gee, G., Wildt, D.E. and Donoghue, A.M. (2000). Species Variation in Osmotic, Cryoprotectant, and Cooling Rate Tolerance in Poultry, Eagle, and eregrine Falcon Spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 63: 1164-1171.

Blesbois, E., I. Grasseau and J.C. Blum. (1993). Effects of vitamin-E on fowl semen storage at 4 C. *Theriogenology*. 39:771-779.

Breque C, Surai P & Brillard J.P. (2003). Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. *Molecular Reproduction and Development*. 66, 314-323.

Bruemmer, J.E., R.C. Coy, E.L. Squires and J.K. Graham. (2002). Effect of pyruvate on the function of stallion spermatozoa stored for up to 48 hours. *Journal of Animal Science*. 80:12-18.OCS Press, USA, pp. 250-267.

Burk, R.F., Hill, K.E., and Motley, A.K. (2003). Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for selenoprotein P .*Journal of Nutrition*. 133: 151-78.

Burton, G.W. and Traber, M.G. (1990). Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics and bioavailability. *Annual Review of Nutrition*. 10: 357-382.

Contri, A., De Amicis, I., Molinari, A. and et al. (2011). Effect of dietary antioxidant supplementation on fresh semen quality in stallion. *Theriogenology*. 75:1319-1326.

Corteel, J.M., and Brail, G. (1977). Production, storage and artificial insemination of goat semen. In: Management of reproduction in sheep and goat symposium. *Madison*. Pp: 41-57.

De Man, J.M. (1999). Principles of Food Chemistry. 3rd edn, An Aspen Publication. PP: 355-385.

De pauw, I. M. C., A. Van soom, D. Maes, S. Verberckmoes, and A. De Kruif. (2003). Effect of sperm coating on the survival and penetrating ability of invitro stored bovine spermatozoa. *Theriogenology*. 59: 1109-1122.

Dorostkar, K., Alavi-Shoushtari, S.M. and Mokarizadeh, A. (2012). Effects of in vitro selenium addition to the semen extender on the spermatozoa characteristics before and after freezing in water buffaloes (Bubalus bubalis). *Vererinary Research Forum*. 5: 263-268.

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. *Theriogenology*. 55:144-150.

Dourad, V., D. Hermier, M. Magistrini, C. Labbe & E. Blesbois. (2004). Impact of changes in composition storage medium on lipid content and quality of turkey spermatozoa. *Theriogenology*. 61: 1-13.

Gressier, B., Cabanis, A., Lebegue, S. and et al. (1994). Decrease of hypochlorous acid and hydroxyl radical generated by stimulated human neutrophils: comparison in vitro of some thiol-containing drugs. *Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology*. 16:9.

Hawkes, W.C. and Turek, P.J. (2001). Effects of dietary selenium on sperm motility in healthy men. *Journal Andrology*. 22: 764-772.

Hill, K.E., Xia, Y., Akesson, B., Boeglin, M.F., and Burk, R.F. (1996). Selenoprotein P concentration in plasma is an index of selenium status in selenium deficient and selenium supplemented Chinese subjects. *Journal of Nutrition*. 126: 138-45.

Holt, W. V., and V. North. (1986). Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 78:447-457.

Huang, Y.L., Tseng, W.C., Cheng, S.Y., and Lin, T.H. (2000). Trace elements and lipid peroxidation in human seminal plasma. *Journal of Trace Element Research*. 76 (3): 207-15.

Kadirvel, G., Kumar, S. and Kumaresan, A. (2009). Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. *Animal Reproduction Science*. 114: 125-134.

Kaur R, Kaur K. (2000). Effects of dietary selenium on morphology of testis and cauda epididymis in rats. *Indian Journal Pharmacology*. 44(3)265-72.

Kelso, K.A., S. Cerolini, R.C.Noble, N.H.C. Sparks & B.K.Speake. (1996). Lipid and antioxidant changes in semen of broiler fowl from 25 to 26 weeks of age. *Journal of Reproduction and Fertility*. 106: 201-206.

Mahfouz, R., Sharma, R., Sharma, D., Sabanegh, E. and Agarwal, A. (2009). Diagnostic value of the total antioxidant capacity (TAC) in human seminal plasma. *Fertility and Sterility Journal*. 91(3): 805–11.

Manjunath, P., and Therein, I. (2002). Role of seminal plasma phospholipid binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology*.53:109–119.

Mohammadi, S., Movahedin, M. and Mowla, S.J. (2008). Antioxidant effects of selenium on sperm parameters and testicular structure in young and aged mice. *Journal of Reproduction and Infertility*. 9:229-237.

Noack-Fuller, G., Beer, C., and Seiber, H. (1993). Cadmium, lead, selenium, and zinc in semen of occupationally unexposed men. *Andrologia Journal*. 25 (1): 7-12.

Olson, G.E., Winfrey, V.P., Hill, K.E. and Burk, R.F. (2004). Sequential development of flagellar defects in spermatids and epididymal spermatozoa of selenium-dificient rats. *Reproduction Journal*. 127: 335-42.

Parker, H.M., and McDaniel, C.D. (2006). The Immediate Impact of Semen Diluent and Rate of Dilution on the Sperm Quality Index, ATP Utilization, Gas Exchange, and Ionic Balance of Broiler Breeder Sperm. *The Journal of Poultry Science*. 85: 106-116.

Salamon, S. and W.M.C. Maxwell. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 62: 77-111.

Sanchez-Partida, L.G., Setchell, B.P., Maxwell, W.M. (1997). Epididymal compounds and antioxidants in. diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 9: 689-696.

Sarlos, P., Molnar, A., Kokai, M., Gabor, G., and Ratkey, J. 2002.Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Veterinaria Hungarica*. 50:235-245.

Shamberger, R.J. (1983). Biological interactions of selenium with other substances. In: Frieden E (editor). Biochemistry of selenium. New York: *Plenum Press* 125-166.

Sikka, S.C. (1996). Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Urology*. 1: 78-86.

Storey, B. T. (1997). Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*. 3: 203–214.

Sonmez, M., and Demirci, E. (2004). The effect of ascorbic acid on the freezability of ram semen diluted with extenders containing different proportions of glycerol. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 28: 893-899.

Speight, S.M., Estienne, M.J., Harper, A.F. and et al. (2012). Effects supplementation organic source of selenium on characteristics of semen quality and in vitro fertility in boars. *Journal of Animal Science*. 90(3): 761-770.

Surai P.F, Brillard J. P, Speake B.K, Blesbois E, Seigneurin F and Sparks N. H. (2000).Phospholipid fatty acid composition, vitamin E content and susceptibility to lipid peroxidation of duck spermatozoa. *Theriogenology*.53, 1025-1039.

Tremellen, K. (2008). Oxidative stress and male infertility-a clinical perspective. *Human Reproduction Update*. 14(3): 243–58.

Udala J., Ramisz A., Drewnowski W., Lasota B., Radoch W. (1995). Jakosc nasienia po podaniu buhajom selenu i witaminy E. Zeszyty Nauk. AR Szczecin. 168, 57-63.

Yousef, M.I., Abdollad, G.A., and Kamel, K.I. (2003). Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Animal Reproduction Science*. 76: 99-111.

Wallace, E., Calvin, H.I., and Cooper, G.W. (1983). Progressive effects observed in mouse sperm during course of three generations of selenium deficiency. *Gamete Resear ch*. 4: 377-387.