اثر افزودن نانوذرات سلنیوم در محیط رقیق‌کننده منی در آزمایشگاه بر فراسنجه‌های اسپرم پس از انجماد قوچ فراهانی

فاطمه خرم‌آبادی، مهدی خدایی مطلق و محمدحسین مرادی

اراک، دانشگاه اراک، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم دامی

تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱/۲۷

چکیده

اغلب سلنیوم موجب ساخت سلنوپروتئین‌هایی می‌شود که در ساختمان آنزیم‌های آنتی‌اسیدانی به کار می‌رود و آنتی‌اکسیدان‌ها نیز جهت حفظ سلامتی سلول‌ها در معرض آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو ضروری هستند. وجود سلنیوم برای عملکرد طبیعی و انجام فرایند اسپرماتوژنز ضروری است. این ماده به عنوان عامل کمک‌کننده آنتی‌اکسیدانی به کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن منجر می‌شود و انتظار می‌رود در افزایش باروری مؤثر باشد. هدف از این تحقیق بررسی اثر سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم در محیط رقیق‌کننده آزمایشگاهی بر برخی از صفات اسپرم در طی فرایند انجماد- یخ‌گشایی تعیین شد. نمونه‌های انزالی با استفاده از واژن مصنوعی از چهار رأس قوچ سالم فراهانی با میانگین وزن ۵±۵۵ کیلوگرم جمع‌آوری و پس از ارزیابی اولیه نمونه‌ها باهم مخلوط شدند. پس از مخلوط کردن نمونه با رقیق‌کننده به پنج گروه حاوی۰٪ ۱٪، ۲٪، ۴٪، ۸٪ نانوذرات سلنیوم تقسیم شدند. هر پنج گروه به مدت پنج روز منجمد شدند. پس از یخ‌گشایی، فراسنجه‌های، تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی، سلامت غشاء پلاسمایی و ناهنجاری‌های موفولوژیکی اسپرم با استفاده از نرم‌افزار کاسا (CASA) ارزیابی شد و داده‌ها به‌وسیله ANOVA مورد تحلیل قرار گرفتند. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد اثر نانوذرات سلنیوم بر تحرک اسپرم معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). اثر نانوذرات سلنیوم بر سلامتی غشاء پلاسمایی اسپرم و ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم معنی‌دار بود (P<۰/۰۵)، اما بر زنده‌مانی اثر معنی‌داری نداشت. نتیجه تحقیق حاضر نشان داد که افزودن نانوذرات سلنیوم به محیط رقیق‌کننده، سبب بهبود فراسنجه‌های اسپرم طی شرایط انجماد- یخ‌گشایی شد.

واژه‌های کلیدی: اسپرم قوچ، نانوذرات سلنیوم، تحرک، انجماد- یخ گشایی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۶۲۷۷۶۰۰۱ ، پست الکترونیکی: m-motlagh@araku.ac.ir

مقدمه

با توجه به اینکه اغلب نژادهای گوسفند دارای تولیدمثل فصلی هستند، این خصوصیت گوسفند منجر به محدود شدن رفتار تولیدمثلی شده و در بسیاری از مناطق دنیا تنها یک‌بار در سال زایش انجام می‌پذیرد. در سال‌های اخیر برای افزایش نرخ بره‌زایی، تولید بره‌های هم‌سن و تولید بره در ماه‌هایی از سال که عرضه گوشت گوسفند محدود است، تلاش زیادی شده است. در اغلب نقاط دنیا برای اینکه بتوان بیشترین بهره‌وری را در طول زندگی میش به دست آورد از تکنیک‌های تولیدمثلی استفاده می‌شود (۲). توجه کردن به تولیدمثل یکی از مهم‌ترین راه‌های موفقیت در صنعت پرورش گوسفند می‌باشد. برای این منظور روش‌های متفاوتی پیشنهاد شده است که یکی از بهترین روش‌ها تلقیح مصنوعی است (۴) لازمه انجام تلقیح مصنوعی در میش، دسترسی به اسپرم تازه یا منجمد می‌باشد. انجماد روشی مناسب و مورد استفاده برای ذخیره‌سازی طولانی مدت مایع منی و اسپرم است، اما ممکن است باعث آسیب جزئی برگشت‌ناپذیری به سلول اسپرم به‌خصوص به ناحیه غشایی آن شود (۶ و ۲۴).

Archive of SID

www.SID.ir

ذخیره اسپرم در دماهای پایین سبب ناهنجاری‌های مورفولوژیکی، کاهش زنده‌مانی و کاهش باروری می‌شود (۷). در همین زمینه محققین نشان دادند که اسپرم‌های نگهداری شده در دماهای پایین از نصف باروری اسپرم‌های تازه انزال شده برخوردار می‌باشند (۱۳). خسارات ساختاری و غیرساختاری غشاء به علت نگهداری سرمایی، نقص‌های مورفولوژیک، غیرطبیعی بودن آکروزوم و دیگر تغییرات نامطلوب در طی کاهش دما می‌توانند از عوامل عمده پایین‌تر بودن باروری اسپرم‌های نگهداری شده در دماهای پایین باشند (۷).

یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر در پایین بودن کیفیت مایع منی، استرس اکسیداتیو است. استرس اکسیداتیو به عنوان اختلال در تعادل بین تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و دفاع آنتی‌اکسیدان در بدن تعریف‌شده است. که عامل اصلی ناباروری و کاهش کیفیت اسپرم در طی فرایند نگهداری است (۸). استرس اکسیداتیو به‌وسیله‌ی رادیکال-های آزاد ایجاد می‌شود (۱۰).

آنتی‌اکسیدان‌ها مانع فعالیت رادیکال‌های آزادشده و از اکسیداسیون آنها جلوگیری می‌کنند و با غیرفعال کردن آنها سلول‌های بدن را از اثرات مخرب این ترکیبات مصون نگاه می‌دارند (۲۰). و به عنوان ترکیبات خوبی برای بهبود زنده‌مانی و تحرک سلول‌های اسپرم منجمد شناخته‌شده‌اند (۲۱).

سلنیوم به عنوان آنتی‌اکسیدانی است که وجود آن برای عملکرد طبیعی و انجام فرایند اسپرماتوژنز ضروری می‌باشد. این ماده به عنوان کوفاکتور آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، منجر به کاهش رادیکال‌های آزاد و افزایش باروری اسپرم می‌گردد (۱۱). سلنیوم یک آنتی‌اکسیدان قوی است که جزء ضروری آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز می‌باشد (۲۵). در خصوص بکارگیری سلنیوم در سطح نانومقیاس در محیط انجماد اسپرم قوچ فراهانی تاکنون گزارشی منتشر نشده است این مطالعه باهدف بررسی اثر نانوذره سلنیوم بر فراسنجه‌های اسپرم در قوچ نژاد فراهانی در محیط انجماد- ذوب طراحی شد.

مواد و روشها

این مطالعه با استفاده از چهار رأس قوچ نژاد فراهانی با متوسط وزن ۵±۵۵ کیلوگرم و میانگین سنی ۳ تا ۴ سال و یک رأس میش با وزن ۳۵ کیلوگرم و سن ۲/۵ سال از اوایل پاییز تا اواسط زمستان ۱۳۹۴ در دامداری گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه اراک صورت گرفت.

نمونه‌های منی به‌صورت دوبار در هفته، به فاصله دو روز و به کمک مهبل مصنوعی و حضور میش فحل، جمع‌آوری شد. در این آزمایش از رقیق‌کننده بر پایه‌ی تریس استفاده شد که ترکیبات آن در جدول ۱ نشان داده شده است. نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در بن‌ماری قرارداده شدند تا ارزیابی اولیه اسپرم انجام شود. نمونه‌هایی که تحرک پیش‌رونده کمتر از ۸۰ درصد و غلظت کمتر از ۲/۵×۱۰۹ داشتند، از آزمایش حذف شدند و دیگر نمونه‌ها بمنظور جلوگیری از اثرات فردی هر دام پس از تأیید شرایط قابل‌قبول آزمایش که قبلاً به آن اشاره شد با یکدیگر مخلوط شدند. این مخلوط منبع مورد استفاده در تیمارهای آزمایش بود.

جدول۱- ترکیبات رقیق‌کننده مورد استفاده در آزمایش (۱۹)

اجزای رقیق‌کننده	مقدار
تریس (گرم)	۳/۰۷
فروکتوز (گرم)	۱/۲۶
سیتریک اسید (گرم)	۱/۶۴
گلیسرول (درصد)	۵
زرده تخم‌مرغ (درصد)	۱۵
آب مقطر (میلی‌لیتر)	۱۰۰

انجماد و یخ‌گشایی: پس از آماده کردن نمونه‌های آزمایشی آن‌ها را در ظرف آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد گذاشته و بعد ظرف بزرگتر که حاوی آب معمولی است قرارداده تا در یخچال به‌آرامی به دمای ۵-۴ درجه

Archive of SID

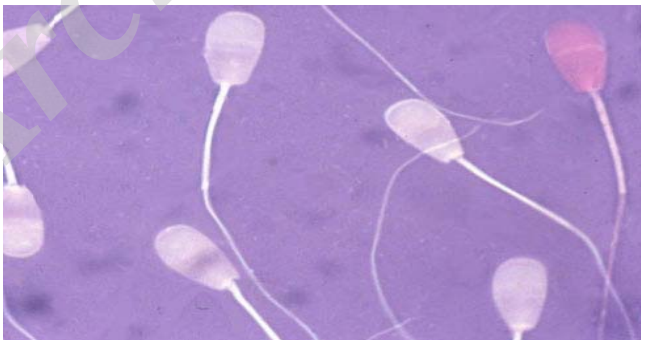
www.SID.ir

سانتی‌گراد برسد. بعد از ۲ ساعت در یخچال شروع به کشیدن پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری شد (انتهای هر پایوت براساس غلظت توسط مارکر رنگ‌آمیزی شد) انتهای آنها برای جلوگیری از ورود هوا توسط پودر پلی ونیل الکل بسته شد. سپس پایوت‌های دارای اسپرم روی بخار ازت مایع به فاصله ۵ سانتی‌متری ازت به مدت ۱۰ دقیقه منجمد شدند. پس از انجماد، پایوت‌ها به کانتینرهای دارای ازت مایع با دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند (۱). پایوت‌های حاوی اسپرم منجمد، پس از پنج روز از ازت مایع خارج شدند و پس از قراردادن در حمام آب گرم دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، یخ‌گشایی صورت گرفت و به داخل میکروتیوپ تخلیه شدند تا ارزیابی‌های مورد نظر انجام شود (۲۳).

ارزیابی اسپرم‌ها پس از یخ‌گشایی

جنبایی: ارزیابی جنبایی نمونه‌ها، با استفاده از دستگاه CASA(Computer Assisted Semen Analysis) و با قراردادن ۵ میکرولیتر از منی روی لام در دمای ۳۷ درجه و گذاردن یک لامل روی آن انجام شد. سپس با استفاده از میکروسکوپ اختلاف فاز با بزرگنمایی ۴۰۰× و مجهز به صفحه گرم با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جنبایی ۲۰۰ سلول اسپرم با اختلاف ۱۰ درصد در حداقل ۵ میدان دید تخمین زده شد (۹). در انتها میانگین حاصل از این تخمین‌ها به عنوان درصد جنبایی کل، جنبانی پیش‌رونده و برای تمام تیمارهای آزمایشی ثبت شد.

زنده‌مانی: برای اندازه‌گیری درصد اسپرم‌های زنده از محلول رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد. مقدار ۰/۶۷ گرم ائوزین همراه با ۰/۹ گرم سدیم کلراید را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر روی حرارت حل شده، بعد از حل شدن آنها ۱۰ گرم نگروزین را افزوده شد، سپس محلول جوشانیده شد. پس از اینکه در دمای اتاق محلول سرد شد با کاغذ صافی آن را صاف کرده تا رسوب‌های ژلاتینی جدا شود و سپس در بطری شیشه‌ای تیره و در بسته در یخچال نگهداری شد. با توجه به سلامت غشای پلاسمایی اسپرم‌ها، درصد سلول‌های زنده و مرده در میدان دید میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰x شمارش شدند. برای رنگ‌آمیزی، یک قطره اسپرم رقیق شده با یک قطره رنگ ائوزین-نیگروزین را مخلوط نموده و پس از ۲ دقیقه، گستره‌ای روی لام تهیه تا در مجاورت هوا خشک شود. تعداد۲۰۰ اسپرم را شمارش، و با توجه به شکل ۱ سلول‌های اسپرماتوزوایی که رنگ قرمز گرفته را، به عنوان مرده و تعداد اسپرم‌هایی که به رنگ سفید دیده شد، به عنوان زنده، در نظر گرفته شد (۱۵).



شکل ۱- رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین اسپرم: اسپرم‌هایی که رنگ قرمز به خود گرفته‌اند، به عنوان مرده و اسپرم‌هایی که به رنگ سفید دیده شد، به عنوان زنده، شمارش شده‌اند.

یکپارچگی غشا: سومین فراسنجه‌ی مورد ارزیابی، بررسی زنده‌مانی اسپرم با استفاده از آزمایش HOST است. اساس آزمایش HOST، اسمولاریتی محیطی است که اسپرم در آن قرار می‌گیرد. اسمولاریتی محیطHOST ۱۰۰ میلی‌اسمول و اسمولاریتی موردنیاز برای اسپرم ۳۷۵-۳۲۰ میلی‌اسمول است. بنابراین اسپرم با قرارگرفتن در یک محیط

Archive of SID

www.SID.ir

هایپواسمولار به سرعت واکنش داده و انتهای دم آنها پیچ خواهد خورد. بدیهی است که تنها اسپرم‌های زنده قادر هستند به این نوع تغییر محیط، واکنش دهند و اسپرم‌های مرده که در این محیط قرار می‌گیرند هیچ واکنشی نشان نمی‌دهند. درواقع پس از انجام این آزمایش، اسپرم‌های با دم گره‌خورده به عنوان اسپرم‌های زنده و اسپرم‌هایی که دم آنها صاف است به عنوان اسپرم‌های مرده در نظرگرفته شدند. برای انجام این ارزیابی نیاز به تهیه‌ی محلول‌هاست می‌باشد. برای تهیه محلول‌هاست، مقدار ۱/۳۵۴ گرم فروکتوز همراه با ۰/۷۳۵ گرم سیترات سدیم را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر روی حرارت حل شده. پس از اینکه در دمای اتاق محلول سرد شد با کاغذ صافی آن را صاف کرده تا رسوب‌های ژلاتینی جدا شود و سپس در بطری شیشه‌ای تیره و در بسته در یخچال نگهداری شد (۱۸).

آنالیز آماری: به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها جمع‌آوری‌شده از نرم‌افزار SAS استفاده شد.

مدل شماره یک در این آزمایش بصورت زیر است:

$$Yij=\mu+Ti+eij \qquad (1)$$

که در آن Y مقدار عملکرد صفات وابسته‌ی نمونه‌ی jام در تیمار iام، μ میانگین کل تیمار، Ti اثر تیمار (سطوح غلظت نانو ذرات سلنیوم) و Eij اشتباه آزمایشی هستند.

نتایج و بحث

اثرات استفاده از نانوذرات سلنیوم بر فراسنجه‌های اسپرم در جدول ۲ آورده شده است. میانگین تحرک کل، سطح ۴ درصد نانوذره سلنیوم، افزایش معنی‌داری را نسبت به دیگر سطوح نانوذرات سلنیوم نشان داد ولی سطح ۸ درصد کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل داشت. و همچنین تحرک پیش‌رونده در سطح ۸ درصد نانوذره سلنیوم کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($P< ۰/۰۱$).

جدول ۲- اثر سطوح نانوذرات سلنیوم بر فراسنجه های تحرک اسپرم قوچ فراهانی

فراسنجه	٪۰	٪۱	٪۲	٪۴	٪۸	P-value
تحرک پیشرونده	۳۶/۵۰±۴/۴۲^{a}	۴۱/۱۷±۴/۴۹^{a}	۳۷/۸۳±۴/۶۲^{a}	۴۱/۰۰±۴/۸۱^{a}	۳۲/۶۷±۲/۷۳^{b}	۰/۰۱۱
تحرک کل	۴۴/۸۳±۱/۹۴^{b}	۴۳/۶۷±۵/۶۴^{b}	۴۱/۰۰±۲/۷۵^{b}	۵۰/۰۰±۳/۲۹^{a}	۳۲/۵۰±۱/۳۸^{c}	۰/۰۰۱

*حروف a، b و c در جدول نشان از وجود تفاوت معنی‌دار در بین گروه‌ها می‌باشد

اثر سلنیوم بر میزان حرکت، مورفولوژی و زنده‌مانی اسپرم پس از پدیده انجماد و ذوب بررسی شد. نتایج نشان داد سلنیوم به‌صورت معنی‌داری بر حرکت، مورفولوژی و زنده‌مانی اسپرم نسبت به گروه شاهد تأثیر مثبت داشت. در مطالعه حاضر نیز افزایش معنی‌دار تحرک اسپرم در نمونه‌های حاوی سلنیوم نسبت به گروه شاهد احتمالاً ناشی از تأثیر سلنیوم بر فسفریلاسیون اکسیداتیو میتوکندری اسپرم باشد (۳).

سلنیوم یک آنتی‌اکسیدان قوی است که جزء ضروری آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز می‌باشد (۲۵). گلوتاتیون پراکسیداز در حذف رادیکال‌های آزاد، حفاظت از اسپرم در روند اسپرماتوژنز، محافظت از غشای سلولی و تنظیم فرایندهای اکسیداتیو نقش مهمی دارد (۱۷ و۵).

گلوتاتیون به عنوان یک سوبسترا در سر اسپرم، فرایند پراکسیداسیون را کند می‌کند. از این رو باعث حفظ تحرک اسپرم می‌شود. با ترکیب کردن گلوتاتیون به عنوان یک افزودنی در مایع منی منجمد، تلاش‌های فراوانی برای بهبود تحرک و باروری اسپرم صورت گرفته است. گلوتاتیون، کوفاکتور آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز که باعث احیای H_2O_2 سمی و سایر پراکسیدها می‌شود (۲۷).

مطالعه دیگری که در خصوص اثر نانوذرات سلنیوم بر فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز بز نر بوئر انجام شد نشان داد

Archive of SID

www.SID.ir

در گروهی که نانوذرات سلنیوم را دریافت کرده بودند نسبت به گروه شاهد، به‌طور قابل‌توجهی غلظت گلوتاتیون پراکسیداز افزایش‌یافته بود (۲۶).

در پژوهش حاضر، به‌کارگیری سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم نتوانست تأثیر معنی‌داری بر زنده‌مانی اسپرم در شرایط انجماد- یخ‌گشایی داشته باشد (جدول ۳). اما بیشترین مقدار این صفات نسبت به گروه کنترل در شرایط پس از انجماد درسطح ۴ درصد نانوذرات سلنیوم با میانگین ۱۱/۱۶±۵۲/۱۷ درصد و کمترین درسطح ۸ درصد با میانگین ۴/۵۱±۴۲/۵۰ درصد حاصل شد.

نتایج حاصل از آنالیز کامپیوتری نشان داد که تأثیر نانو ذرات سلنیوم بر درصد یکپارچگی غشا اسپرم در رقیق‌کننده تریس (جدول ۴) در شرایط انجماد-یخ گشایی معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵$). به طوری که استفاده از سطح ۴ درصد نانوسلنیوم دارای بیشترین اثر در افزایش یکپارچگی غشا اسپرم نسبت به سایر سطوح شد.

تحقیقات نشان داده است، زمانی که اسپرم در طی فرایند انجماد در معرض تنش ازجمله تنش دمایی قرار می‌گیرد، باعث آسیب و تخریب غشاء اسپرم می‌شود، این آسیب‌ها در اسپرم قوچ شدیدتر از اسپرم گاو می‌باشد (۱۴).

جدول ۳- اثر سطوح نانوذرات سلنیوم بر فراسنجه‌ی زنده‌مانی اسپرم قوچ فراهانی

فراسنجه	٪۰	٪۱	٪۲	٪۴	٪۸	P-value
زنده‌مانی	۸/۸۳±۴۸/۴۷	۱۱/۸۷±۵۵/۱۶	۳/۷۷±۴۳/۳۳	۱۱/۱۶±۵۲/۱۷	۴/۵۱±۴۲/۵۰	۰/۲۹۱

جدول ۴- اثر سطوح نانوذرات سلنیوم بر فراسنجه یکپارچگی غشا اسپرم قوچ فراهانی

فراسنجه	٪۰	٪۱	٪۲	٪۴	٪۸	P-value
یکپارچگی غشا	۳/۹۰±۵۰/۰۰ ^{bc*}	۵/۳۶±۵۱/۵۰ ^{b}	۴/۲۳±۵۲/۵۰ ^{b}	۲/۹۴±۵۹/۳۳ ^{a}	۳/۷۱±۴۵/۸۳ ^{c}	۰/۰۰۰۲

*حروف a، b و c در جدول نشان از وجود تفاوت معنی‌دار در بین گروه‌ها می‌باشد

کمبود سلنیوم در موش سبب تغییر میتوکندری و غیرطبیعی شدن غشاء می‌شود (۱۲). سلنوپروتئین‌ها باعث پاکسازی مایع سمینال از انواع ROS شده و غشای اسپرم را از آسیب‌های وارده محافظت می‌کند. کاهش آسیب‌های سلولی باعث افزایش درصد اسپرم‌های زنده و کاهش درصد اسپرم‌های مرده و آسیب دیده می‌شود (۲۲).

سلنیوم فعالیت‌های فیزیولوژیکی خود را به عنوان اسیدآمینه سلنوسیستئین اعمال می‌کند که به ساختار اولیه سلنوپروتئین برمی‌گردد (۲۸). بیشتر سلنوپروتئین‌های اسپرم به شکل فسفولیپیدهیدروپراکسیداز و گلوتاتیون پراکسیداز PHGPx، هستند و همچنین سلنوپروتئین‌ها در کپسول میتوکندری اسپرم دارای نقش آنزیمی و ساختاری می‌باشند، که در درجه اول به عنوان یک آنزیم فعال در حفاظت از اسپرم در برابر پراکسیداسیون لیپیدی و در درجه دوم به عنوان یک پروتئین آنزیمی غیرفعال که نقش ساختاری در تشکیل کپسول میتوکندری را دارد (۲۹). گلوتاتیون پراکسیداز غشای اسپرم را از پراکسیداسیون لیپیدی محافظت می‌کند و درنهایت بر عملکرد اسپرم تأثیر مثبتی می‌گذارد. گلوتاتیون پراکسیداز نقش مثبتی را در بلوغ اسپرم، از زمان تولید تا هنگامی که قدرت باروری می‌یابد، ایفا می‌کند (۱۶). با توجه به نتایج بررسی حاضر به نظر می‌رسد که افزودن نانوذرات سلنیوم در سطح ۴ درصد به رقیق‌کننده بر پایه تریس، باعث حفظ تحرک کل، یکپارچگی غشا نسبت به گروه شاهد می‌شود. افزودن نانوذرات سلنیوم اثر معنی‌داری بر زنده‌مانی و تحرک پیش‌رونده اسپرم نداشت. بهبود وضعیت تحرک کل و یکپارچگی غشا با افزودن سلنیوم به شکل نانومقیاس شاید بتواند باعث افزایش راندمان باروری برون تنی تخمک نیز شود. همچنین برای اثبات اثر مفید نانوذره سلنیوم بر کیفیت

Archive of SID

www.SID.ir

اسپرم در محیط برون تنی و درون تنی نیاز به مطالعات بیشتر است.

منابع

۱. احمدی همدانی، م.، جعفری آهنگری، ی.، و زرهداران، ی.، ۱۳۹۳. تأثیر سطوح مختلف زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده تریس بر کیفیت اسپرم قوچ زل در شرایط سردسازی و انجماد، پژوهش‌های تولیدات دامی، سال پنجم، شماره ۱۰، صفحات ۱۲۲-۱۳۴.

۲. سوخته‌زاری، ع.، وجگانی، م.، و نیاسری نسلجی، الف.، ۱۳۸۴. بررسی کارایی تجویز ملاتونین در قوچ نژاد آتابای روی شاخص-های باروری میش، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۶۱، شماره ۲، صفحات ۱۸۱-۱۸۵.

۳. نصری، س.، عمیدی، ف.، و رضاییان، ز.، ۱۳۹۳. اثر سلنیوم بر میزان حرکت، مورفولوژی و زنده‌مانی اسپرم پس از پدیده انجماد و ذوب، مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، سال هجدهم، شماره ۱، صفحات ۱۱-۱۷.

4. Adams, N. R., 1990. Permanent infertility in ewes exposed to plant estrogens. Australian Veterinary fournal, 67, PP: 197-201.

5. Alvarez, J. G., and Storey, B. T., 1989. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipidperoxidation, Gamete Research, 23, PP: 77–90.

6. Amann, R., and Pickett, B., 1987. Principles of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa, Equine, Veterinary Science, 7, PP: 145–173.

7. Bailey, J. L., Bilodeau, J. F., and Cormier, N., 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon, Journal of Andrology, 21, PP: 1-7.

8. Betteridge, D. J., 2000. What is oxidative stress? Metabolism, 49, PP: 3-8.

9. Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Sarıözkan, S., and Ulutaş, P. A., 2009. Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities, Small Ruminant Research, 81, PP: 13-17.

10. Bucak, M. N., Sari¨ozkan, S., and Tuncer, P. B., 2010. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (Capra hircus ancryrensis) spermparameters, lipid peroxidation and antioxidant activities, Small Ruminant Research, 89(1), PP: 24–30.

11. Burk, R. F., Hill, K. E., and Motley, A. K., 2003. Seleno protein metabolism and function: evidence for more than one function for seleno protein P, Journal Nutrition, 133(5), PP: 151-178.

12. Calvin, I. H., Cooper, G. W., and Wallace, E., 1981. Evidence that selenium in rat sperm is associated with a cysteine-rich structural protein of the mitochondrial capsules, Gamete Research, 4, PP: 139–149.

13. Crabo, B. G., 1991. Preservation of boar semen: a worldwide perspective. In: Johnson, L. A. D., Rath, Boar semen preservation, Berlin: Paul. Parey, Scientific Publishers, PP: 3- 9.

14. Devireddy, R. V., Swanlund, D. J., Alghamdi, A. S., and Duoos, L. A., 2002. Measured effect of collection and cooling conditions on the motility and the water transport parameters at subzero temperatures of equine spermatozoa. Reproduction, 124(5) PP: 643-648.

15. Evans, G., Maxwell, W. M. C., Maxwell, W. M. C., and Salamon, S., 1987. Artificial Insemination of Sheep and Goat, Butterworths, Sidney.

16. Hall, L., Williams, K., Perry, A. C., Frayne, J., and Jury, J. A., 1998. The majority of human glutathione peroxidase type 5 (GPX5) transcripts are incorrectly spliced: implications for the role of GPX5 in the male reproductive tract. Journal Biochem, 333(1), PP: 5-9.

17. Hefnawy, A. G., and Tortora-Perez, J. L., 2010. The importance of selenium and the effects of its deficiency in animal health, Small Ruminant Research, 89, PP: 185-192.

18. Jeyendran, R. S., VanderVen, H. H., and Zaneveld, L. J., 1992. The hypoosmotic swelling test: an update, Archive of Andrology, 29, PP: 105–116.

19. Kumar, S., Millar, J. D., and Watson, P. F., 2003. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. Cryobiology, 46, PP: 246–253.

20. Lewis, S. E., Sterling, E. S., Young, I. S., and Thompson, W., 1997. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in

Archive of SID

www.SID.ir

fertile and infertile men, Fertility and Sterility, 67(1), PP: 142- 7.

21. Maxwell, W. M. C., and Watson, P. F., 1996. Recent progress in the preservation of ram semen, Animal Reproduction Science, 42, PP: 55–65.

22. Mohammadi, S. H., Movahedin, M., and Mowla, S. J., 2008. The effects of selenium antioxidant activity on sperm parameters and testis structure in aging and adult male mice. Medical Journal of Reproduction & Infertility, 3, PP: 230-238.

23. Mustafa, N. B., Ahmet, A., and Abdurrauf, Y., 2008. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process, Small Ruminant Research, 75, PP: 128–134.

24. Purdy, P. H., 2006. A review on goat sperm cryopreservation, Small Ruminant Research, 63, PP: 215-225.

25. Shamberger, R. J., 1983. Biological interactions of selenium with other substances, In: Frieden E (editor). Biochemistry of selenium, New York: Plenum Press, PP: 125-66.

26. Shi, G., Yang, R., Yue, W., Xun, W., Zhang, C. H., Ren, Y., Shi, L., and Lei, F., 2010. Effect of elemental nano-selenium on semen quality, glutathione peroxidase activity, and testis ultrastructure in male Boer goats, Journal of Animal Science, 118, PP: 248- 254.

27. Slaweta, L., 1973. Wplyw dodatku glutation zredukowanego i cysteiny do nasienia mrozonogona jego zdolnosc zapladniajaca (Effect of adding reduced glutathione and cysteine on fertilizing capacity of frozen bull semen). Medycyna Wet, 29, PP: 11-12.

28. Stadtman, T. C., 1996. Selenocysteine, Annu Rev Biochem, 65, PP: 83–100.

29. Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., and Wissing, J., et al. 1999. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation, Science, 285, PP: 1393–1396.

Effect of in vitro selenium nanoparticles addition to the semen extender on the spermatozoa parameters after freezing in Farahani ram

KhoramAbadi F., Khodaei Motlagh M. and Moradi M.H.

Animal Science Dept., Faculty of Agriculture, Arak University, Arak, I.R. of Iran

Abstract

Selenium is often caused selenoproteins, which is using in the construction of antioxidant enzymes that are necessary for the health of those cells which are subjected to oxidative stress-induced. Selenium is essential for the normal function of sperm cells and spermatogenesis. This element as an antioxidant cofactor reduces oxygen free radicals, and is expected to be effective for increasing fertility. The aim of the study was to investigate the effects of in vitro selenium nanoparticles additive to semen extender on sperm parameters after cryopreservation. Seminal samples were collected with an artificial vagina from four healthy Farahani ram with an average weight 55 ± 5 kg. Samples were collected and were pooled after the initial assessment. Each sample was divided into five equal parts received 0%, 1%, 2%, 4%, 8% selenium nanoparticles. Every five parts were freezed for five days, and subsequently they were thawed and total motility, progressive motility, viability, plasma membrane integrity and sperm abnormalities were assessed by CASA software. Data were analyzed by one-way ANOVA. The results of this experiment showed the effect of selenium nanoparticles on sperm motility was significantly ($P<0.01$). The effect of selenium nanoparticles on sperm plasma membrane integrity and sperm abnormalities were significant ($P<0.05$), but survival was not statistically significant. The results indicate that the addition of selenium nanoparticles thinner improve the conditions of freeze-thawing the sperm parameters.

Key words: ram semen, selenium nanoparticles, mobility, freeze-thawing

Archive of SID

www.SID.ir