

بررسی اثرات سطوح مختلف ویتامین E و نانوسلنیوم بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم خروس نژاد لگهورن طی نگهداری در دمای ۴°C

سروش صفا^۱، غلامعلی مقدم^{۲*}، رضی‌الله جعفری جوزانی^۳، حسین دقیق‌کیا^۴، حسین جانمحمدی^۲ و ذبیح اله نعمتی^۴

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۲۷

^۱ دانشجوی دکتری گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

^۲ استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

^۳ دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز

^۴ استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی اهر، دانشگاه تبریز

* مسئول مکاتبه: Email: ghmoghaddam@tabrizu.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: استفاده از آنتی اکسیدان‌ها سبب کاهش آسیب‌های وارده به سلول اسپرم طی سرد سازی می‌شود. **هدف:** این پژوهش به منظور افزایش خصوصیات کیفی منی خروس توسط ویتامین E و نانوسلنیوم طی فرآیند سردسازی در دمای ۴ درجه سانتیگراد انجام پذیرفت. **روش کار:** منی جمع‌آوری شده از ۲۰ خروس نژاد لگهورن سفید، با رقیق کننده‌ی بدون آنتی اکسیدان (شاهد) و یا دارای ۵ (E5) و ۱۰ (E10) میکروگرم ویتامین E در هر میلی‌لیتر، یا ۰/۵٪ (NS0.5)، ۱٪ (NS1) و ۲٪ (NS2) نانوسلنیوم رقیق شده و در دمای ۴°C در یخچال قرار گرفتند. خصوصیات کیفی اسپرم‌ها شامل زنده‌مانی، درصد تحرک کل و پیش‌رونده، سلامت غشای پلاسمایی، درصد اسپرم‌های ناهنجار در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت طی فرآیند سردسازی و میزان مالون دی‌آلدهید در پایان آزمایش مورد بررسی قرار گرفتند. **نتایج:** درصد زنده‌مانی، تحرک کل و پیش‌رونده و همچنین سلامت غشای سیتوپلاسمی اسپرم‌ها در اثر گذر زمان کاهش معنی‌داری داشت ($P<0/05$). همچنین درصد اسپرم‌های ناهنجار در طی آزمایش روند افزایشی داشته است ($P<0/05$). با این وجود افزودن سطوح مختلف ویتامین E و نانوسلنیوم موجب افزایش درصد زنده‌مانی، درصد اسپرم‌های با جنبایی پیش‌رونده و غشای پلاسمایی سالم در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نسبت به تیمار شاهد شده است ($P<0/05$). همچنین درصد اسپرم‌های متحرک در زمان ۴۸ ساعت در تیمارهای E5 و E10 (به ترتیب ۶۷/۹۱٪ و ۶۹/۸۴٪) و در زمان ۷۲ ساعت در تیمار E10 (۵۶/۷۳٪) نسبت به سایر تیمارها افزایش معنی‌داری داشته است ($P<0/05$). درصد اسپرم‌های ناهنجار در زمان ۲۴ ساعت در تیمار E10 (۱۲٪) و در زمان ۷۲ ساعت در تیمارهای E5 (۱۷/۹۲) و E10 (۱۷/۹۹) کمتر از سایر تیمارها بود ($P<0/05$). همچنین تیمار NS2 در زمان ۷۲ ساعت بیشترین درصد اسپرم‌های ناهنجار (۲۱٪/۵۳) را نسبت به سایر تیمارها دارا بود ($P<0/05$). میزان پراکسیداسیون لیپیدها (nmol/ml) نیز در تیمارهای E5 (۳/۰۴)، E10 (۳/۳۴) و NS0.5 (۳/۲۴) و NS1 (۳/۳۰) کمتر از گروه شاهد (۴/۴۱) بود ($P<0/05$). **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج نشان دادند که افزودن سطوح ویتامین E ($\mu\text{g/ml}$ ۵ و ۱۰) و نانوسلنیوم (۰/۵ و ۱ درصد) موجب بهبود کیفیت و کاهش آسیب‌های اکسیداتیو اسپرم در طی سردسازی نسبت به گروه شاهد می‌شود.

واژگان کلیدی: آنتی‌اکسیدان، تنش اکسیداتیو، ویتامین E، نانوسلنیوم، اسپرم خروس

مقدمه

عملکرد تولید مثلی در حیوانات تحت تاثیر ژنتیک، تغذیه، مدیریت و محیط می باشد (کومار ۲۰۰۳). یکی از دغدغه‌های بزرگ در صنعت پرورش طیور، تولید تعداد انبوه تخم‌های نطفه‌دار و قابل تبدیل به جوجه‌های گوشتی می‌باشد. اگرچه جهت نیل به نرخ باروری مناسب در گله، هم مرغ و هم خروس نقش مهمی ایفا می کنند، اما تاثیر خروس بیشتر از مرغ می باشد. چرا که تعداد خروس‌ها نسبت به مرغ‌ها کمتر می‌باشد (امتی و همکاران ۲۰۱۳).

درباره‌ی خصوصیات اسپرم طیور و میزان باروری آن پس از نگهداری طولانی مدت، آزمایشات زیادی صورت گرفته که به دلیل تفاوت در مدت زمان نگهداری (بین ۶ الی ۴۸ ساعت)، شیوه تلقیح مصنوعی و آنالیزهای مختلف در میزان باروری، نتایج متفاوت از یکدیگر بوده و مقایسه‌ی آن‌ها با یکدیگر، دشوار می‌باشد. اما ویژگی بارز و مشترکی که در تمامی آزمایشات به آن اشاره شده است این موضوع است که نگهداری اسپرم رقیق شده بیش از ۶ ساعت، موجب کاهش نرخ باروری می‌شود. این کاهش باروری پس از ۲۴ ساعت به حداکثر میزان خود می‌رسد (دونگو و ویشارت ۲۰۰۰).

یکی از عوامل مهم در قابلیت باروری اسپرم، لیپیدهای غشای پلاسمایی اسپرم می‌باشند. لیپیدها در پلاسمای اسپرم ویژگی‌های حیاتی داشته و جزئی از ساختار غشای سلول می‌باشند. اسیدهای چرب بلند زنجیر و غیر اشباع اسپرم یا PUFA نقش مهمی در تحرک اسپرم ایفا می‌کنند (سرولینی و همکاران ۲۰۰۳). ترکیب لیپیدهای غشای اسپرم، عامل اصلی تعیین کننده تحرک، حساسیت به سرما و زنده‌مانی می‌باشد (هامرستد و همکاران ۱۹۹۰). لیپیدهای غشای اسپرم به شدت نسبت به اکسیداسیون حساس می‌باشند. اکسیداسیون اسیدهای چرب منجر به تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) می‌شود. این رادیکال‌ها در شرایط نرمال جهت برخی فعالیت‌ها و پروسه‌های فیزیولوژیکی اسپرم ضروری بوده اما تولید

بیش از حد ROS‌ها در اسپرم موجب کاهش سیالیت غشاء، شکست DNA، آسیب پروتئین‌ها و نهایتاً کاهش تحرک و باروری اسپرم‌ها می‌شود (سانوکا و کارپایسز ۲۰۰۴ و محفوظ و همکاران ۲۰۱۰).

اسپرم پرندگان حاوی سیستم آنتی‌اکسیدانی پیشرفته‌ای بوده که شامل آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیماتیک نظیر ویتامین‌های E، C و گلوکاتینون و آنتی‌اکسیدان‌های آنزیماتیک نظیر گلوکاتینون پراکسیداز و سوپراکسید دسموتاز می‌باشد (سورای ۱۹۹۹). حفظ تعادل بین تولید ROS و سیستم آنتی‌اکسیدانی جهت حفظ زنده مانی اسپرم ضروری بوده که با نگهداری و انجماد اسپرم این تعادل بر هم می‌خورد (بریکو و همکاران ۲۰۰۳).

جهت جلوگیری از افزایش اکسیداسیون لیپیدهای اسپرم و افزایش مدت زمان نگهداری اسپرم در محیط آزمایشگاه، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در محیط رقیق کننده اسپرم ضروری به نظر می‌رسد. از بهترین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و موثر در جلوگیری از اکسیداسیون لیپیدهای اسپرماتوزوآ می‌توان به ویتامین E و سلنیوم اشاره کرد. ویتامین E به عنوان مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان غشایی در داخل بدن مطرح می‌باشد و ضمن تقویت سیستم ایمنی بدن، از بیماری‌های عروق کرونری بدن جلوگیری می‌کند. از مهمترین اثرات این ویتامین می‌توان در محافظت غشای سلول‌ها در مقابل آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از پروسه‌های التهابی بوسیله تنظیم سیگنال‌های سلولی جهت کنترل ترجمه و تحریک سیستم ایمنی نام برد (بریون و همکاران ۲۰۰۳). تحقیقات نشان داده‌اند که افزودن ویتامین E به رقیق کننده اسپرم (بلسبویس و همکاران ۱۹۹۳ و امینی و همکاران ۲۰۱۵) منجر به بهبود خصوصیات مرفولوژیکی منی و نهایتاً افزایش باروری طیور می‌گردد.

سلنیوم یکی از مینرال‌های ضروری بدن بوده که اعمال فیزیولوژیکی زیادی دارد. مثلاً به عنوان یکی از اجزای سلنوپروتئین‌ها در گلوکاتینون پراکسیدازها (GPx) و

دارای ۳۱۷۰ کیلو کالری انرژی و ۱۲٪ پروتئین در هر کیلوگرم ماده خشک داشت، تغذیه شدند. اسپرم‌گیری به روش مالش پشتی-شکمی بر اساس روش باروز و کوئین (۱۹۳۷) و به مدت سه هفته و در هر هفته ۲ بار انجام پذیرفت. نمونه‌های اسپرم بلافاصله پس از اخذ توسط فلاسک حاوی آب گرم ۳۷°C به آزمایشگاه منتقل شدند (شاهوردی و همکاران ۲۰۱۴). پس از رسیدن نمونه‌ها به آزمایشگاه، ابتدا اسپرم‌ها از نظر حجم، غلظت، رنگ و مرفولوژی بررسی شده و تنها نمونه‌هایی با حجم بین ۰/۲ تا ۰/۵ میلی‌لیتر و غلظت $\leq 1 \times 10^6$ اسپرم در هر میلی‌لیتر و تحرک بیش از ۸۰٪ مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور از بین بردن اثرات انفرادی، نمونه‌های تایید شده با یکدیگر تجمع شده و به صورت یک نمونه‌ی واحد درآمدند. به منظور رقیق سازی اسپرم‌ها از رقیق‌کننده‌ی بلستویل اصلاح شده (امینی و همکاران، ۲۰۱۵) با کمی تغییرات استفاده گردید (جدول ۱). پس از آماده سازی رقیق‌کننده (قبل از نمونه‌گیری)، مقدار ۳ میلی‌لیتر از محلول داخل ۶ لوله‌ی استریل ریخته شده و به هر لوله بر اساس گروه‌های آزمایشی، آنتی‌اکسیدان مورد نظر (ویتامین E و یا نانوسلنیوم) افزوده گردید:

گروه شاهد: رقیق‌کننده معمولی (Beltsville)

گروه E5: رقیق‌کننده معمولی + ۵ µg/ml ویتامین E

گروه E10: رقیق‌کننده معمولی + ۱۰ µg/ml ویتامین E

گروه NS0.5: رقیق‌کننده معمولی + ۰/۵٪ نانوسلنیوم

گروه NS1: رقیق‌کننده معمولی + ۱٪ نانوسلنیوم

گروه NS2: رقیق‌کننده معمولی + ۲٪ نانوسلنیوم

ویتامین E مورد استفاده از شرکت سیگما و نانوسلنیوم نیز از شرکت نانوشل تهیه شده بودند. پس از مخلوط-سازی آنتی‌اکسیدان‌ها با رقیق‌کننده، نمونه‌ی اسپرم به نسبت ۱ به ۴۰ به داخل هر لوله اضافه گردیده و پس از بستن درب لوله‌ها به داخل یخچال با دمای ۴°C منتقل شدند. سپس در زمان‌های صفر (شاهد)، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مخلوط سازی، نمونه‌های مورد نظر مورد

تیور دوکسین ردوکتاز (TrxR) حضور داشته که هردوی این‌ها نقش‌های بیولوژیکی مختلفی دارند (احسن و همکاران ۲۰۱۴). آسیب‌های اکسیداتیو یکی از عوامل موثر در باروری نرها بوده که سلنیوم نقش مهمی در محافظت از این آسیب‌ها و حفظ باروری نرها دارد. افزایش نرخ پراکسیداسیون لیپیدها، میزان مالون‌دی‌آلدهید و رادیکال-های آزاد اکسیژن در موش‌های نر دارای کمبود یا مسمومیت سلنیوم مشاهده شده است. متعاقباً، کاهش خصوصیات کیفی منی نظیر کاهش اسپرم‌های جنبا، کاهش غلظت اسپرم و افزایش درصد اسپرم‌های نابهنجار نیز در این موش‌ها مشاهده شده است (کائوشال و بانسال ۲۰۰۹). با این حال، یکی از عوامل محدودکننده‌ی مصرف سلنیوم، دسترسی زیستی (سرعت ورود به گردش خون و بافت‌ها) و سمی بودن آن است (تارز و همکاران، ۲۰۰۷). بنابراین، استفاده از فرم‌های دیگر سلنیوم که سمیت کمتر و سودمندی بیشتری داشته باشد، مناسب‌تر است. نانو ذرات سلنیوم (Nano-selenium) ترکیباتی با سمیت پایین و دسترسی زیستی مناسب بوده و به طور چشمگیری تولید سلنوپروتئین‌ها را در بدن افزایش می‌دهند (پنگ و همکاران ۲۰۰۷ و وانگ و همکاران ۲۰۰۷). با توجه به خواص ویتامین E و نانوسلنیوم در کاهش آسیب‌های اکسیداتیو، به نظر می‌رسد که افزودن این دو آنتی‌اکسیدان به محیط رقیق‌کننده، موجب حفظ خصوصیات کیفی منی خروس در دمای ۴°C گردد.

مواد و روش‌ها

حیوانات و طراحی آزمایش

این پژوهش در واحد مرغداری ایستگاه تحقیقاتی و پژوهشی خلعت پوشان دانشگاه تبریز انجام پذیرفت. به منظور این آزمایش از ۲۰ خروس بالغ نژاد لگه‌ورن با سن ۴۲ هفته استفاده شد. خروس‌ها در قفس‌های انفرادی به ابعاد ۷۰×۷۰×۸۵ و تحت شرایط ۱۵ ساعت روشنایی و ۹ ساعت تاریکی قرار داشته و دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. تمامی خروس‌ها با جیره بر پایه ذرت و سویا که

آزمایشات اسپرم

تحرك به منظور بررسی میزان تحرك اسپرم‌ها در زمان-های مختلف، سه قطره از نمونه‌ی هر یک از گروه‌ها بر روی سه لام قرار گرفته و پس از قرار دادن لام بر روی نمونه، توسط میکروسکوپ نوری فاز کنتراست (Labomed LX400; Labomed Inc., Culver City, CA, USA) با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ و در دمای ۳۷°C درصد اسپرم‌های متحرك و همچنین اسپرم‌های دارای حرکات پیش رونده تعیین گردیدند (اخلاقی و همکاران ۲۰۱۴).

ارزیابی قرار گرفتند. صفات مورد ارزیابی شامل درصد اسپرم‌های متحرك، درصد اسپرم‌های زنده، تست سلامت غشای اسپرم، خصوصیات مرفولوژیکی اسپرم‌ها در تمامی زمان‌ها و همچنین سنجش مقادیر مالون‌دی‌آلدهید نمونه‌ها جهت تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشای پلاسمایی اسپرم پس از ۷۲ ساعت نگهداری اسپرم‌ها بودند.

جدول ۱- اجزاء و مقادیر رقیق کننده‌ی بلستویل اصلاح شده
Table 1- Composition of the modified Beltsville extender

Amount	Compound	نام ماده
7.59 g	Potassium Phosphate, Dibasic, Trihydrate	پتاسیم دی فسفات سه آبه
3.1 g	Sodium acetate trihydrate	سدیم استات سه آبه
8.67 g	Sodium-L-glutamate	سدیم ال-گلوتمات
0.64 g	Potassium citrate tribasic monohydrate	پتاسیم سیترات
0.7 g	Potassium phosphate monobasic	پتاسیم مونوفسفات
0.34 g	Magnesium chloride hexahydrate	منیزیم کلراید ۶ آبه
5 g	D-(-)-Fructose	فروکتوز
2.71 g	N-[Tris (hydroxymethyl) methyl]-2	تریس
1 %	Glycerol	گلیسرول
1 %	Soybean lecithin	لسیتین
1 L	Purified water	آب مقطر دو بار تقطیر

برگرفته از امینی و همکاران، ۲۰۱۵.

زنده مانی

برای ارزیابی میزان اسپرم‌های زنده و مرده از رنگ آمیزی حیاتی ائوزین- نیگروزین استفاده گردید. مواد تشکیل دهنده این محیط شامل رنگ ائوزین (۱۶/۷ گرم در لیتر)، رنگ نیگروزین (۱۰۰ گرم در لیتر) و سیترات سدیم (۲۹ گرم در لیتر) می‌باشند. بدین منظور و در هر یک از زمان‌های ذکر شده، ۱۰۰ μl نمونه‌ی اسپرم رقیق شده از هر گروه بر روی یک لام قرار گرفته و با ۲۰ μl از رنگ ائوزین- نیگروزین مخلوط گردید. سپس توسط یک لام دیگر،

نمونه‌ی رنگ شده بر روی لام گسترش یافته و پس از خشک شدن، توسط میکروسکوپ فاز کنتراست (Labomed LX400; Labomed Inc., Culver City, CA, USA) با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ و شمارش ۲۰۰ اسپرم، درصد اسپرم‌های زنده (رنگ نشده) و مرده (رنگ شده) تعیین شدند. (ایوانز و مکس ول ۱۹۷۸).

سلامت غشای اسپرم

در این آزمایش از تست هایپواسموتیک (HOST) به منظور بررسی سلامت غشای پلاسمایی اسپرم‌ها بر

¹hypo-osmotic swelling test

پراکسیداسیون لیپیدها)، به عنوان شاخصی از میزان پراکسیداسیون لیپیدها از طریق واکنش با تیوباربیتوریک اسید اندازه‌گیری می‌شود. بدین منظور، ابتدا به منظور رسوب پروتئین‌ها میزان ۱ ml از محلول هر گروه در زمان ۷۲ ساعت پس از نگهداری در یخچال با ۲ ml اسید تری کلرواستیک در یک لوله‌ی استریل مخلوط شده و سپس جهت جلوگیری از وقوع پراکسیداسیون لیپیدی در طی زمان انجام این آزمایش، مقدار ۱ ml از محلول هیدروکسی تولوئن بوتیل شده یا BHT^۳ (۲٪ در اتانول) به همراه ۱ میلی لیتر EDTA به محلول مورد نظر افزوده گردیدند. سپس لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه و با دور ۱۲۰۰×g سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ، ۱ ml از محلول بالای هر لوله با ۱ ml تیوباربیتوریک اسید ۰/۶۷ درصد در یک میکروتیوب مخلوط شده و به مدت ۲۰ دقیقه در آب ۱۰۰°C قرار گرفتند. پس از سرد شدن نمونه‌ها، میزان جذب نور نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (سه تکرار برای هر گروه در نظر گرفته شد) (استربار و کیزمان ۱۹۹۰).

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های بدست آمده از این آزمایش شامل تحرک کل، تحرک پیش رونده، زنده مانی، سلامت غشاء و ناهنجاری به صورت طرح کاملاً تصادفی با ۶ تیمار و ۴ تکرار در قالب طرح اندازه‌گیری‌های مکرر در واحد زمان (repeated measurements) با رویه‌ی GLM نرم افزار SAS 9.1 آنالیز شدند. بدین منظور ابتدا تمامی داده‌ها جهت سنجش میزان معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی در زمان‌های مختلف، توسط آنالیز واریانس یکطرفه (1-way ANOVA) مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس جهت ارزیابی سطوح معناداری بین تیمارها در داخل هر یک از زمان‌های آزمایش (صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت)، داده‌های مذکور توسط متد تجزیه‌ی واریانس اندازه‌گیری‌های مکرر در واحد زمان (Repeated Measure ANOVA) مورد

اساس روش سانتیاگو-مورنو و همکاران (۲۰۰۹) استفاده شد. در این آزمایش از محلولی با فشار اسمزی ۱۰۰ میلی اسمولار شامل فروکتوز (۹ g/l) و سیترات سدیم (۴/۹ g/l) استفاده گردید. با توجه به این‌که فشار اسمزی مورد نیاز برای اسپرم خروس ۳۱۰ میلی اسمولار بوده، بنابراین قرار گرفتن در محیطی با فشار اسمزی پایین‌تر (هایپو اسمول) موجب می‌شود تا اسپرم‌هایی که غشای سالم دارند، از اسپرم‌هایی با غشای آسیب دیده متمایز گردند. بدین صورت که دم اسپرم‌های سالم پس از مواجهه با این محیط متورم شده و به شکل پیچ خورده در می‌آید. به منظور انجام این آزمایش، ۱۰ μl از نمونه‌ی اسپرم هر گروه در طی زمان‌های مختلف (صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) با ۱۰۰ μl از محلول هایپواسمول فوق درون یک میکروتیوب مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۸°C انکوبه شدند. سپس ۵ μl از محلول فوق بر روی یک لام قرار گرفته و درصد اسپرم‌های با دم متورم و پیچ‌خورده با شمارش ۲۰۰ اسپرم و بزرگ‌نمایی ۴۰۰ میکروسکوپ فاز کنتراست تعیین گردیدند (اخلاقی و همکاران ۲۰۱۴).

مرفولوژی

جهت ارزیابی مرفولوژی اسپرم‌ها و تعیین درصد اسپرم‌های ناهنجار، ۱۰ μl از نمونه اسپرم هر گروه را در زمان‌های مختلف با ۱۵۰ μl محلول هانکوک شامل فرمالین ۳٪، محلول سالین و محلول بافر در یک میکروتیوب ریخته و سه قطره از مخلوط بدست آمده توسط میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ درصد و شمارش ۲۰۰ اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفتند (شافر و هولزمان ۲۰۰۰).

تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدهای اسپرم

به منظور تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدهای اسپرم از تست TBARS^۱ استفاده شد. در این تست، میزان مالون دی آلدید یا MDA^۲ (یکی از محصولات نهایی

^۳Butylated hydroxytoluene

^۱Thiobarbituric acid reaction substances assay

^۲Malondialdehyde

آنالیز قرار گرفتند. همچنین داده‌های مربوط به میزان مالون دی آلدئید سمینال پلاسما (MDA) نیز توسط رویه‌ی GLM نرم افزار SAS و در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفت. مقایسات میانگین تیمارها با آزمون میانگین حداقل مربعات (Least Square Means) انجام شده و نتایج به صورت میانگین مربعات خطا در سطح ۵ درصد ($P < 0.05$) گزارش شدند.

نتایج و بحث

زنده‌مانی اسپرم‌ها در تمامی تیمارهای آزمایشی از زمان صفر تا ۷۲ ساعت پس از سرد سازی کاهش معنی‌داری ($P < 0.05$) داشته است (جدول ۲). به نحوی که در زمان صفر میانگین درصد زنده‌مانی برابر با $92.44 \pm 1.02\%$

درصد بوده اما این مقادیر در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب برابر با $47.0 \pm 4.7\%$ ، $45.68 \pm 3.13\%$ و $44.59 \pm 3.76\%$ بوده است. اما مقایسات تیمارها نشان می‌دهد که افزودن سطوح مختلف ویتامین E و نانوسلنیوم به اسپرم موجب افزایش معنی‌دار ($P < 0.05$) درصد زنده‌مانی در تمام زمان‌ها (به غیر از زمان صفر) می‌شود. با توجه به خاصیت آنتی اکسیدانی این دو ماده، به نظر می‌رسد که افزودن ویتامین E و نانوسلنیوم به محیط نگهدارنده‌ی اسپرم‌ها موجب کاهش تولید و فعالیت رادیکال‌های آزاد شده که این امر به نوبه‌ی خود سبب افزایش زنده‌مانی اسپرم‌ها گردیده است (میرزایی راد و همکاران ۲۰۱۵).

جدول ۲- حداقل میانگین مربعات درصد زنده‌مانی اسپرم خروس طی نگهداری در دمای ۴°C

Table 2- Least square means of rooster sperm viability (%) during cooling storage at 4°C

SEM	زمان‌های نگهداری (ساعت) Storage time (hour)				تیمار Treatment
	72	48	24	0	
1.73	38.55 ^{Bd}	60.06 ^{Bc}	67.03 ^{Cb}	91.70 ^{Aa}	Control
1.73	45.59 ^{Ad}	65.70 ^{Ac}	74.51 ^{Bb}	92.74 ^{Aa}	E ₅
1.73	46.05 ^{Ad}	69.31 ^{Ac}	79.45 ^{Ab}	92.59 ^{Aa}	E ₁₀
1.73	45.34 ^{Ad}	67.55 ^{Ac}	79.18 ^{Ab}	91.32 ^{Aa}	NS _{0.5}
1.73	44.15 ^{Ad}	65.37 ^{Ac}	75.47 ^{ABb}	92.09 ^{Aa}	NS ₁
1.73	47.82 ^{Ad}	66.60 ^{Ac}	78.47 ^{ABb}	94.23 ^{Aa}	NS ₂

حروف بزرگ (A,B) در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) بین تیمارها در هر یک از زمان آزمایشی می‌باشد.

حروف کوچک (a,b) در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) بین تیمارها در کل آزمایش می‌باشد.

^{a,b} Values with different superscripts indicate a difference ($P < 0.05$) over time within experimental groups. Values with different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$) among groups at each time point.

درصد تحرک کل و پیش‌رونده نیز در اثر افزایش مدت زمان سردسازی کاهش معنی‌داری داشته است (جدول ۳ و ۴). میانگین درصد اسپرم‌های جنبا یا متحرک در زمان صفر ($92.44 \pm 1.02\%$) بیشتر از زمان‌های ۲۴ ($47.0 \pm 4.7\%$)، ۴۸ ($45.68 \pm 3.13\%$) و ۷۲ ($44.59 \pm 3.76\%$) ساعت سردسازی بوده است. با این وجود، افزایش معنی‌داری در درصد اسپرم‌های متحرک در زمان ۴۸ ساعت در تیمارهای E₅ و E₁₀ (به ترتیب ۶۷/۹۱٪ و ۶۹/۸۴٪) و در زمان ۷۲ ساعت در تیمار E₁₀ (۵۶/۷۳٪)

نسبت به سایر تیمارها مشاهده گردید ($P < 0.05$). هرچند که سایر تیمارها نیز به طور معنی‌داری درصد جنبایی بیشتری نسبت به تیمار شاهد داشتند ($P < 0.05$). درصد اسپرم‌های با جنبایی پیش‌رونده نیز بر اثر افزایش زمان نگهداری یعنی در زمان‌های ۲۴ ($58.09 \pm 2.72\%$)، ۴۸ ($48.74 \pm 3.99\%$) و ۷۲ ($36.82 \pm 5.01\%$) ساعت نسبت به زمان صفر ($78.09 \pm 0.59\%$) کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$)

جدول ۳- حداقل میانگین مربعات درصد تحرک اسپرم خروس طی نگهداری در دمای ۴°C

Table 3- Least square means of rooster sperm total motility (%) during cooling storage at 4°C

SEM	زمان‌های نگهداری (ساعت) Storage time(hour)				تیمار Treatment
	72	48	24	0	
1.79	42.62 ^{Cd}	58.03 ^{Cc}	67.56 ^{Bb}	86.81 ^{Aa}	Control
1.79	52.40 ^{ABd}	67.91 ^{Ac}	76.73 ^{Ab}	88.74 ^{Aa}	E ₅
1.79	56.73 ^{Ad}	69.84 ^{Ac}	80.68 ^{Ab}	89.32 ^{Aa}	E ₁₀
1.79	48.52 ^{Bd}	61.18 ^{Bc}	79.33 ^{Ab}	88.39 ^{Aa}	NS _{0.5}
1.79	50.89 ^{Bd}	62.83 ^{Bc}	78.76 ^{Ab}	89.03 ^{Aa}	NS ₁
1.79	51.29 ^{Bd}	63.32 ^{Bc}	80.74 ^{Ab}	89.88 ^{Aa}	NS ₂

حروف بزرگ (A,B) در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) بین تیمارها در هر یک از زمان آزمایشی می‌باشد. حروف کوچک (a,b) در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) بین تیمارها در کل آزمایش می‌باشد.

^{A,B} Values with different superscripts indicate a difference ($P < 0.05$) over time within experimental groups. ^{a,b} Values with different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$) among groups at each time point.

جدول ۴- حداقل میانگین مربعات درصد تحرک پیشرونده اسپرم خروس طی نگهداری در دمای ۴°C

Table 4- Least square means of rooster sperm progressive motility (%) during cooling storage at 4°C

SEM	زمان‌های نگهداری (ساعت) Storage time (hour)				تیمار Treatment
	72	48	24	0	
2.13	32.17 ^{Cd}	42.04 ^{Cc}	55.09 ^{Bb}	77.00 ^{Aa}	Control
2.13	40.68 ^{Bd}	47.54 ^{Bc}	56.47 ^{Bb}	78.13 ^{Aa}	E ₅
2.13	41.84 ^{ABd}	48.71 ^{Bc}	57.53 ^{Bb}	78.52 ^{Aa}	E ₁₀
2.13	42.73 ^{ABd}	49.63 ^{Bc}	58.22 ^{Bb}	78.18 ^{Aa}	NS _{0.5}
2.13	43.36 ^{ABd}	50.28 ^{ABc}	58.13 ^{Bb}	78.00 ^{Aa}	NS ₁
2.13	45.17 ^{Ad}	54.26 ^{Ac}	63.12 ^{Ab}	78.72 ^{Aa}	NS ₂

حروف بزرگ (A,B) در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) بین تیمارها در هر یک از زمان آزمایشی می‌باشد. حروف کوچک (a,b) در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) بین تیمارها در کل آزمایش می‌باشد.

^{A,B} Values with different superscripts indicate a difference ($P < 0.05$) over time within experimental groups. ^{a,b} Values with different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$) among groups at each time point.

جدول ۵- حداقل میانگین مربعات درصد یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم خروس طی نگهداری در دمای ۴°C

Table 5- Least square means of rooster sperm plasma membrane integrity (%) during cooling storage at 4°C

SEM	زمان‌های نگهداری (ساعت) Storage time (hour)				تیمار Treatment
	72	48	24	0	
1.58	32.43 ^{Bd}	49.61 ^{Bc}	58.13 ^{Bb}	80.02 ^{Aa}	Control
1.58	37.10 ^{Ad}	54.61 ^{Ac}	63.06 ^{Ab}	79.68 ^{Aa}	E ₅
1.58	37.98 ^{Ad}	55.37 ^{Ac}	63.54 ^{Ab}	82.04 ^{Aa}	E ₁₀
1.58	34.71 ^{ABd}	54.11 ^{Ac}	61.65 ^{ABb}	80.25 ^{Aa}	NS _{0.5}
1.58	36.06 ^{ABd}	55.76 ^{Ac}	62.97 ^{ABb}	79.69 ^{Aa}	NS ₁
1.58	37.61 ^{Ac}	58.14 ^{Ab}	61.20 ^{ABb}	82.98 ^{Aa}	NS ₂

حروف بزرگ (A,B) در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) بین تیمارها در هر یک از زمان آزمایشی می‌باشد. حروف کوچک (a,b) در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) بین تیمارها در کل آزمایش می‌باشد.

^{A,B} Values with different superscripts indicate a difference ($P < 0.05$) over time within experimental groups. ^{a,b} Values with different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$) among groups at each time point.

تیمارهای دریافت‌کننده ویتامین E و سطوح ۰/۵٪ و ۱٪ نانوسلنیوم به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود ($P < ۰/۰۵$). افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و یا کاهش ظرفیت و فعالیت آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها هر دو از عوامل اصلی بوجود آمدن تنش اکسیداتیو و آسیب‌های ناشی از آن می‌باشند.

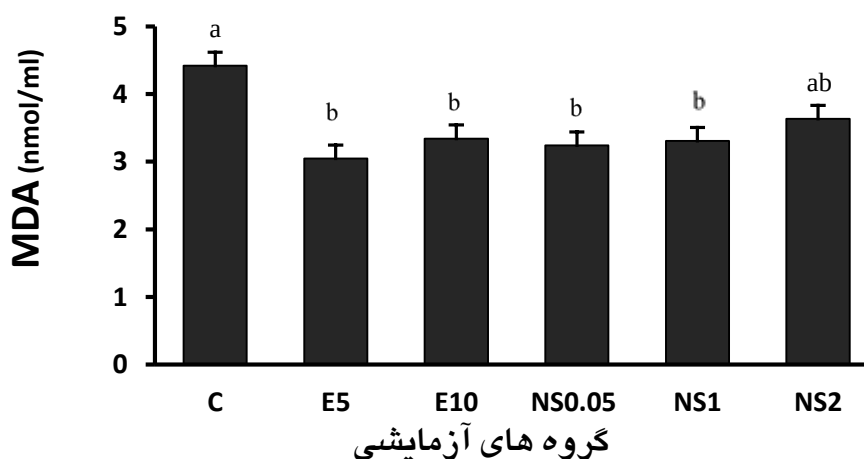
ترکیب لیپیدی غشای اسپرم خروس نقش تعیین‌کننده‌ای در کیفیت و میزان باروری آن ایفا می‌کند (بلسبویز و همکاران ۲۰۱۱). اسپرم خروس نسبت به پستانداران دارای اسیدهای چرب غیراشباع بیشتری در غشای خود بوده که این امر موجب افزایش حساسیت اسپرم خروس به پراکسیداسیون لیپیدها شده است (بلسبویز و همکاران ۱۹۹۷). این امر نیز سبب افزایش آسیب‌هایی نظیر کاهش زنده‌مانی، تحرک و قابلیت باروری طی فرآیندهای نگهداری اسپرم می‌شود (ویشارت ۲۰۰۴ و سورای و همکاران ۱۹۹۸). این در حالیست که افزودن آنتی‌اکسیدان‌های مناسب به محیط نگهداری اسپرم طیور می‌تواند تا حدی از شدت آسیب‌های وارده به اسپرم کاسته و کیفیت اسپرم را طی فرآیندهایی نظیر سردسازی و انجماد افزایش دهد (امینی و همکاران ۲۰۱۵ و میرزایی راد و همکاران ۲۰۱۵).

همچنین تمامی گروه‌های دریافت‌کننده آنتی‌اکسیدان درصد جنبایی پیش‌رونده‌ی بیشتری نسبت به تیمار شاهد (خصوصاً تیمار NS2) داشتند ($P < ۰/۰۵$). یکپارچگی غشای پلاسمایی یکی از فراسنجه‌های تشخیص سلامت اسپرم بوده و در نرخ باروری موثر می‌باشد.

نتایج این آزمایش (جدول شماره ۵) نشان می‌دهند که درصد اسپرم‌های با غشای سالم در طی فرآیند سردسازی در تمامی تیمارها کاهش معنی‌داری داشته است ($P < ۰/۰۵$). البته افزودن آنتی‌اکسیدان‌های ویتامین E و نانوسلنیوم در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت موجب افزایش نرخ اسپرم‌های با غشای سالم نسبت به گروه شاهد شده است.

درصد اسپرم‌های ناهنجار نیز در اثر گذر زمان، یعنی در زمان ۲۴ ($۱۴/۱۰ \pm ۱\%$) و خصوصاً در زمان‌های ۴۸ ($۱۵/۸۲ \pm ۰\%$) و ۷۲ ($۱۹/۰۹ \pm ۱\%$) افزایش معنی‌داری نسبت به زمان صفر ($۱۱/۷۹ \pm ۰\%$) داشته است. هرچند که تیمار NS2 موجب افزایش درصد اسپرم‌های ناهنجار نسبت به تیمارهای شاهد، E5 و E10 شده است ($P < ۰/۰۵$).

میزان مالون‌دی‌آلدهید به عنوان شاخصی از پراکسیداسیون غشای اسپرم‌ها در پایان آزمایش، در



شکل ۱- حداقل میانگین مربعات میزان مالون‌دی‌آلدهید موجود در پلاسمای منی پس از ۷۲ ساعت سرد سازی

Figure 1- Mean ($\pm$ SEM) seminal plasma malondialdehyde after 72h of chilled storage

ویتامین E به اسپرم خروس در طی فرآیند سردسازی به مدت ۲۴ ساعت، تاثیری بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم-ها نداشته، اما موجب افزایش نرخ باروری اسپرم‌ها شده است. همچنین مشابه با نتایج ما، شهبازی و همکاران (۱۳۹۰) نشان دادند که افزودن ویتامین E به اسپرم قوچ، موجب بهبود صفات کیفی طی فرآیند سردسازی به مدت ۷۲ ساعت شده است.

نتایج این آزمایش نشان دادند که افزودن ویتامین E و نانوسلنیوم به محیط رقیق کننده‌ی اسپرم خروس موجب افزایش زنده‌مانی، تحرک، سلامت غشایی و همچنین کاهش درصد اسپرم‌های ناهنجار می‌گردد. نتایج ما مشابه با نتایج امینی و همکاران (۲۰۱۵) بود که نشان دادند افزودن ویتامین E به رقیق کننده‌ی اسپرم موجب بهبود خصوصیات کیفی اسپرم‌ها شده است. هرچند که بلسبویز و همکاران (۱۹۹۳) بیان داشتند که افزودن

جدول ۶- حداقل میانگین مربعات درصد ناهنجاری اسپرم خروس طی نگهداری در دمای ۴°C
Table 6- Least square means of rooster sperm abnormality (%) during cooling storage at 4°C

SEM	زمان‌های نگهداری (ساعت) Storage time (hour)				تیمار Treatment
	72	48	24	0	
0.89	18.22 ^{BCa}	16.53 ^{Aab}	15.41 ^{Ab}	12.04 ^{Ac}	Control
0.89	17.92 ^{Ca}	15.43 ^{Ab}	13.53 ^{ABbc}	12.29 ^{Ac}	E ₅
0.89	17.99 ^{Ca}	14.65 ^{Ab}	12.00 ^{Bbc}	11.68 ^{Ac}	E ₁₀
0.89	18.66 ^{BCa}	15.27 ^{Ab}	14.31 ^{ABb}	11.19 ^{Ac}	NS _{0.5}
0.89	20.26 ^{Aba}	16.92 ^{Ab}	15.17 ^{Ab}	12.08 ^{Ac}	NS ₁
0.89	21.53 ^{Aa}	16.14 ^{Ab}	15.20 ^{Ab}	11.47 ^{Ac}	NS ₂

حروف بزرگ (A,B) در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) بین تیمارها در هر یک از زمان آزمایشی می‌باشد. حروف کوچک (a,b) در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) بین تیمارها در کل آزمایش می‌باشد.

A,B Values with different superscripts indicate a difference ($P < 0.05$) over time within experimental groups. a,b Values with different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$) among groups at each time point.

خروس‌ها در اثر مصرف سلنیوم افزایش داشته است. همچنین میزان مالون‌دی‌آلدهید در خون و بیضه‌ی خروس‌های مصرف کننده‌ی سلنیوم کاهش معنی‌داری نشان داده است. بر اساس نتایج این محققین و نتایج این آزمایش، افزودن نانوسلنیوم به اسپرم خروس از طریق کاهش پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم‌ها و احتمالاً افزایش سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر گلوکاتایون پراکسیداز، موجب افزایش خصوصیات کیفی اسپرم طی فرآیند سردسازی شده است. نتایج ما مشابه با نتایج کامران و همکاران (۲۰۱۲) بود که در آزمایشی نشان دادند افزودن سلنیوم در محیط رقیق کننده‌ی منی گاومیش موجب افزایش کیفیت اسپرم پس از انجماد و اسپرم تازه می‌شود.

مطالعات متعددی به نقش محافظتی ویتامین E از سلول‌ها در مقابل پراکسیداسیون لیپیدها و آسیب‌های اکسیداتیو پرداخته‌اند (اوتسوکا و همکاران ۱۹۹۸، اید و همکاران ۲۰۰۶؛ هاشم و همکاران ۲۰۱۳). بر اساس یافته‌های این محققین، ویتامین E از طریق غیر فعال کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن موجب کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء سلول می‌شود. بنابر این و با توجه به نتایج این آزمایش، استفاده از ویتامین E از طریق تاثیر کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشای اسپرم موجب بهبود صفات کیفی اسپرم طی فرآیند سردسازی گردیده است. در آزمایشی که توسط شی و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام پذیرفت، میزان گلوکاتایون پراکسیداز به عنوان یکی از آنتی اکسیدان‌های مهم سلولی در خون و بیضه‌ی

نتیجه‌گیری

آسیب‌های اکسیداتیو به اسپرم شده و متعاقباً خصوصیات کیفی اسپرم مانند زنده‌مانی، جنبایی، سلامت غشای سیتوپلاسمی را طی نگهداری در دمای ۴ درجه‌ی سانتیگراد افزایش می‌دهند.

کاربرد ویتامین E و نانوسلنیوم در محیط رقیق‌کننده‌ی منی خروس موجب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و

منابع مورد استفاده

- شهبازی م، محیط ا، محمدی م، ۱۳۹۰. اثر سطوح مختلف ویتامین‌های E و C بر کیفیت اسپرم رقیق شده قوچ تالشی در ذخیره سازی در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد. مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۶۶، شماره ۲، ۱۶۴-۱۶۱.
- غضنفرپور ح، طالبی ا، قاسمی ف، حقیقت جهرمی م، ۱۳۹۳. تأثیر آنتی اکسیدانی نانو ذرات سلنیوم بر پارامترهای اسپرمی بیضه‌ی موشهای جوان و مسن. مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا. جلد ۴، شماره ۱، ۱۱۹-۱۱۱.
- Akhlaghi A, Jafari Ahangari Y, Zhandi M and Peebles ED, 2014. Reproductive performance, semen quality, and fatty acid profile of spermatozoa in senescent broiler breeder roosters as enhanced by the long-term feeding of dried apple pomace. *Anim Reprod Sci* 147: 64-73.
- Ahsan U, Kamran Z, Raza I, Ahmad S, Babar W, Riaz M H, and Iqbal Z, 2014. Role of selenium in male reproduction—A review. *Animal Reproduction Science*. 146 (1-2): 55-62.
- Amini MR, Kohram H, Zare Shahaneh A, Zhandi M, Sharideh H, Nabi MM. 2015. The effects of different levels of vitamin E and vitamin C in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. *Cell Tissue Bank*. DOI 10.1007/s10561-015-9506-9
- Blesbois E, Grasseau I and Blum JC, 1993. Effects of Vitamin E on fowl semen storage at 4°C. *Theriogenology* 39: 771-779.
- Blesbois E, Lessire M, Grasseau I, Hallouis JM and Hermier D, 1997. Effect of dietary fat on the fatty acid composition and fertilizing ability of fowl semen. *Biol Reprod* 56: 1216-1220.
- Blesbois E, 2011. Freezing avian semen. *Avian biology research*, 4(2): 52-58. DOI: 10.3184/175815511X13069413108523.
- Breque C, Surai P and Brillard JP. 2003. Roles of antioxidants on prolonged storage avian spermatozoa in vivo and in vitro. *Mol. Reprod. Dev*. 66: 314-323.
- Bucak MN, Sariözkan S, Tuncer PB, Sakin F, Ateşşahin A, Kulaksiz R and Çevik M, 2010. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Rumin Res* 89: 24-30.
- Burrows WH and Quinn JP, 1937. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and Turkey. *Poult Sci* 16: 19-24.
- Cerolini S, Pizzi F, Gliozzi T, Maldjian A, Zaniboni L and Parodi L, 2003. Lipid manipulation of chicken semen by dietary means and its relation to fertility: a review. *World's Poult Sci J* 59: 65-76.
- Donoghue AM and Wishart GJ, 2000. Storage of poultry semen. *Animal reproduction science* 62(1): 213-232.
- Edens FW and Sefton AE, 2009. Sel-Plex® Improves Spermatozoa Morphology in Broiler Breeder Males. *International Journal of Poultry Science* 8: 853-861.
- Eid Y, Ebeid T and Younis H, 2006. Vitamin E supplementation reduces dexamethasone-induced oxidative stress in chicken semen. *British Poultry Science*, 47(3): 350-356. DOI: 10.1080/00071660600753912.
- Esterbauer H and Cheeseman KH, 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186: 407-421.
- Evans G and Maxwell WMC, 1987. Handling and examination semen. In: Maxwell WMC, editor. *Salamon's artificial insemination of sheep and goat*. Sydney: Butterworths, PP: 93-106.
- Hammerstedt RH, Graham JK, and Nolan JP, 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 11:73-88.

- Hashem NM, Abd El-Hady A and Hassan O, 2013. Effect of vitamin E or propolis supplementation on semen quality, oxidative status and hemato-biochemical changes of rabbit bucks during hot season. *Livestock Science* 157: 520–526.
- Kamran D, Alavi-Shoushtari SM 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*). *Veterinary Research Forum* 3:263-268.
- Kaushal N and Bansal MP, 2009. Diminished reproductive potential of male mice in response to selenium-induced oxidative stress: involvement of HSP70, HSP70-2, and MSJ1. *J Biochem Mol Toxicol* 23:125–136.
- Kumar S, 2003. Management of infertility due to mineral deficiency in dairy animals. In: *Proceedings of ICAR summer school on “Advance diagnostic techniques and therapeutic approaches to metabolic and deficiency diseases in dairy animals”*, IVRI, Izatnagar, UP, pp. 128–137.
- Mahfouz R, Sharma R, Thiyagarajan A, Kale V, Gupta S, Sabanegh E, and Agarwal A, 2010. Semen characteristics and sperm DNA fragmentation in infertile men with low and high levels of seminal reactive oxygen species. *Fertil. Steril* 94 (6): 2141–2146.
- Mirzaei Rad H, Eslami M and GhanieA, 2015. Palmitoleate enhances quality of rooster semen during chilled storage. *Animal Reproduction Science*. 165: 38–45.
- Ommati MM, Zamiri MJ, Akhlaghi A, Atashi H, Jafarzadeh MR, Rezvani MR, and Saemi F, 2013. Seminal characteristics, sperm fatty acids, and blood biochemical attributes in breeder roosters orally administered with sage (*Salvia officinalis*) extract. *Anim Prod Sci* 53:548–554.
- Parthasarathy S, Santanam N, Ramachaandra S and Meilhac O, 1999. Oxidants and antioxidants in atherogenesis: an appraisal. *J Lipid Res* 40:2143– 2157.
- Peng D, Zhang J, Liu Q and Taylor EW, 2007. Size effect of elemental selenium nanoparticles (nano-Se) at supranutritional levels on selenium accumulation and glutathione S-transferase activity. *J. Inorg. Biochem*, 101: 1457–1463.
- Rezvanfar M Amin, Rezvanfar M Ali, Shahverdi AR, Ahmadi A, Baeeri M, Mohammadirad A and Abdollahi M, 2013. Protection of cisplatin-induced spermatotoxicity, DNA damage and chromatin abnormality by selenium nano-particles. *Toxicology and Applied Pharmacology* 266: 356–365.
- Sanocka D and Kurpisz M, 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod. Biol. Endocrinol* 2: 12–18.
- Shahverdi A, Sharafi M, Gourabi H, Amiri Yekta A, Esmaeili V, Sharbatoghli M, Janzamin E, Hajnasrollahi M, Mostafayi F, 2014. Fertility and Flow Cytometric Evaluations of Frozen-thawed Rooster Semen in Cryopreservation Medium containing Low Density Lipoprotein. *Theriogenology* 83 (1): 78-85.
- Shi L, Zhao H, Ren Y, Yao X, Song R and Yue W, 2014. Effects of different levels of dietary selenium on the proliferation of spermatogonial stem cells and antioxidant status in testis of roosters. *Animal Reproduction Science* 149: 266–272.
- Surai PF, Cerolini S, Wishart GJ, Spake BK, Noble RC and SparksNHC, 1998. Lipid and antioxidant composition of chicken semen and its susceptibility to peroxidation. *Poult. Avian Biol. Rev* 9(1): 11-23.
- Schafer S and Holzmann A, 2000. The use of transmigration and spermatic stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 59: 201–211.
- Tarze A, Dauplais M, Grigoros I, Lazard M, Ha-Duong NT, Barbier F, Blanquet S and Plateau P. 2007. Extracellular production of hydrogen selenide accounts for thiolassisted toxicity of selenite against *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 282: 8759–8767.
- Wang HL, Zhang S, and Yu HQ, 2007. Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: comparison with selenomethionine in mice. *Free Radic Bio. Med* 42, 1524–1533.

Evaluation the effects of different levels of vitamin E and Nano Selenium on sperm quality parameters of Leghorn rooster during chilled storage on 4°C

S Safa¹, Gh Moghaddam², R Jafari Jozani³, H Daghigh Kia², H Janmohammadi² and Z Nemati⁴

Received: March 20, 2016 Accepted: October 18, 2016

¹PhD Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

²Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

³Assistant Professor, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

⁴Associate Professor, Department of Animal Science, Ahar Faculty of Agriculture, University of Tabriz Ahar, Iran

*Corresponding Author: Email: ghmoghaddam@tabrizu.ac.ir

Abstract

BACKGROUND: Using antioxidants can diminish sperm damages during chilled storage.

OBJECTIVES: The present study was designed to evaluate the effect of vitamin E and Nano-selenium on improvement parameters of rooster semen during chilled storage. **METHODES:** Semen was collected from twenty White Leghorn roosters and diluted with extender containing with no antioxidants (control), or containing 5 (E1), 10 (E2) µg/mL vitamin E or containing 0.5% (NS1), 1% (NS2) and 2% (NS3) Nano-selenium and then chilled in 4°C. Sperm viability, total motility, Progressive motility, plasma membrane integrity and abnormality were evaluated at 0, 24, 48 and 72 h after storage. Also, amount of malondialdehyde (MDA) was assessed in seminal plasma at the end of experiment. **RESULTS:** Sperm viability (%), total and progressive sperm motility (%) as well as sperm plasma membrane integrity significantly decreased among the time ($P<0.05$). Also, sperm abnormality (%) increased during experiment ($P<0.05$). However, adding different levels of vitamin E and Nano-selenium in this study significantly improved sperm viability (%), progressive sperm motility (%), sperm plasma membrane integrity (%) at 24, 48 and 72 h after storage in compare with control group ($P<0.05$). Moreover, total motile sperms percentage at 48 h in E1 and E2 extenders (67.91% and 69.84, respectively) and at 72 h in E2 extender (56.73%) was greater in compare with other extenders ($P<0.05$). NS3 extender had more abnormal sperms at 72 h (21.53%) compared to other extenders ($P<0.05$). MDA production was lower in E1, E2, NS1 and NS2 extenders (3.4, 3.34, 3.24, 3.30 nmol/ml; respectively) compared to control extender (4.41 nmol/ml; $P<0.05$). **CONCLUSIONS:** With regard to these results, addition of 5 and 10 µg/mL vitamin E as well as 0.5 and 1% Nano-selenium can be improved sperm quality and decreased sperm oxidative damages during chilled storage.

Keywords: Antioxidant, Oxidative stress, Vitamin E, Nano-selenium, Rooster sperm