مقاله علمی پژوهشی/نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۳۱ شماره ۱/ سال ۱۴۰۰/ صفحات ۱ تا ۱۰

DOI: 10.22034/as.2021.30588.1467

ارزیابی تاثیر اضافه کردن نانوسلنیوم به رقیق کننده منی بر روی کیفیت اسپرم قوچ پس از فرآیند انجماد-ذوب کردن

سحر ناطق کندرود[۱]، غلامعلی مقدم*[۲]، صادق علیجانی[۲]، فرشید نظری[۳] و حدیثه قمری[۱]

تاریخ دریافت: ۹۷/۹/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱/۲۵

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

[۲] به ترتیب استاد و دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه تبریز

[۳] دانشجوی دکترای گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

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

چکیده

زمینه مطالعاتی : آنتی‌اکسیدان‌ها جهت حفظ سلامت سلول اسپرم در مقابل آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو ضروری هستند. **هدف:** این پژوهش به منظور افزایش خصوصیات کیفی منی قوچ توسط نانوسلنیوم طی فرآیند انجماد در نیتروژن مایع در مدت ۳۰ روز نگهداری انجام پذیرفت. **روش کار:** جمع‌آوری منی دو بار در هفته از ٤ راس قوچ نژاد قزل خالص که از هر قوچ ٦ بار اسپرم‌گیری صورت گرفت. منی جمع‌آوری شده با رقیق‌کننده‌ی بدون آنتی‌اکسیدان (شاهد) و نانوسلنیوم ۱ میکروگرم و نانوسلنیوم ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر رقیق شد. وپایوت‌ها پس از سردسازی به مدت ۹۰ دقیقه در یخچال و رسیدن به دمای۵ درجه‌ی سانتیگراد، به مدت ۸ الی ۱۰ دقیقه در ٤ سانتی‌متری بالای سطح نیتروژن مایع قرار گرفتند و سپس در داخل نیتروژن مایع غوطه‌ور گردیدند. خصوصیات کیفی اسپرم‌ها شامل زنده‌مانی، درصد تحرک کل و پیش-رونده، سلامت غشای پلاسمایی، درصد اسپرم‌های غیرطبیعی و غشای آکروزوم ناسالم در روزهای صفر و ۱۵ و ۳۰ فرآیند انجماد مورد بررسی قرار گرفتند. **نتایج:** درصد زنده‌مانی، تحرک کل و پیش‌رونده و سلامت غشای سیتوپلاسمی اسپرم‌ها در اثر گذر زمان کاهش معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۱$). همچنین درصد اسپرم‌های غیرطبیعی و اسپرم‌های با غشای آکروزوم ناسالم در طی آزمایش روند افزایشی داشتند ($p<۰/۰۱$). با این وجود، افزودن سطوح مختلف نانوسلنیوم به رقیق کننده سبب افزایش معنی‌دار درصد زنده‌مانی، درصد اسپرم‌های با حرکت کل و پیش‌رونده و غشای پلاسمایی سالم(هاست مثبت) در روزهای صفر و ۱۵و ۳۰ نسبت به تیمار شاهد شده ($P<۰/۰۱$) و سبب کاهش درصد اسپرم‌های با غشای پلاسمایی ناسالم و درصد اسپرم‌های غیرطبیعی نسبت به تیمار شاهد شد ($P<۰/۰۱$). **نتیجه گیری نهایی:** با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، افزودن مقادیر مختلف نانوسلنیوم خصوصا نانوسلنیوم ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر به رقیق‌کننده‌ی اسپرم قوچ سبب افزایش فراسنجه‌های کیفی اسپرم در طول مدت نگهداری می‌شود.

واژگان کلیدی: اسپرم، آنتی‌اکسیدان، نانوسلنیوم، قوچ قزل

مقدمه

انجماد شاخه ای از علم کرایوبیولوژی است که به حفظ و نگهداری طولانی مدت سلول در دمای بسیار پایین می پردازد. اسپرم زمان محدودی در خارج از بدن و در دمای محیط می تواند زنده بماند به این دلیل انجماد اسپرم بسیار حائز اهمیت است(دولتی دورباش و همکاران۲۰۱۶). از طرفی با استفاده از تکنیک انجماد اسپرم ها می توان بانک ژنوم حیوانات برتر ژنتیکی را محافظت کرد. اسپرم پستانداران سر شار از اسیدهای چرب‌اشباع و غیراشباع، فسفولیپیدها و استرول ها است که بسیار مستعد اثر انواع اکسیژن‌های فعال بوده و این امر سبب کاهش تحرک اسپرم، کاهش سریع ATP داخل سلولی و به وجود آمدن آسیب‌های ساختمانی می شود (لنزی و همکاران۱۹۹٤). عقیده بر این است که ROS[1] باعث القای پراکسیداسیون لیپیدی در غشای اسپرم شده و پراکسیداسیون اسیدهای چرب ناشی از آن دارای اثرات سمی بر روی اسپرم است که منتهی به کاهش عملکرد اسپرم می‌گردد (سانو کا و کورپیز ۲۰۰٤). آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که سبب کنترل، توقف و خنثی‌سازی مواد واسطه‌ی حاصل از فرآیند تولید انرژی در زنجیره‌ی انتقال الکترون سلول ها (فعالیت هوازی) می‌شوند که به انواع اکسیژن فعال معروف بوده و در گروه رادیکال های آزاد قرار می‌گیرند (زینی و همکاران ۲۰۰۰). افزودن آنتی‌اکسیدان به رقیق کننده‌ی منی در طول انجماد اسپرم باعث افزایش کیفیت و بهبود پارامترهای منی مانند تحرک، زنده‌مانی و سلامت‌غشای‌آکروزوم می‌شوند (میرونکزوک و همکاران ۲۰۱۸). سلنیوم یک عنصر جزیی و ریز مغذی ضروری برای سلامتی انسان است که در غلظت های بالا سمی می‌باشد. سلنیوم جز تشکیل دهنده‌ی سلنوپروتئین ها است که در بیوشیمی بدن نقش آنزیمی و ساختمانی دارند. سلنیوم جز اصلی سلنوآنزیم ها است که در مرکز همه‌ی این پروتئین‌ها، اسیدآمینه‌ی سلنوسیستئین وجود دارد که به عنوان عامل اکسایش-کاهش عمل می‌کند. با این حال، یکی از عوامل محدود کننده‌ی مصرف سلنیوم، دسترسی زیستی (سرعت ورود به گردش خون و بافت ها) و سمی بودن آن است (تارز و همکاران ۲۰۰۷). بنابراین، استفاده از فرم های دیگر سلنیوم که سمیت کمتر و سودمندی بیشتری داشته باشد، مناسب تر است. نانوذرات سلنیوم، ترکیباتی با سمیت پایین و دسترسی زیستی مناسب بوده و به طور چشمگیری تولید سلنوپروتئین ها را در بدن افزایش می‌دهند (پنگ و همکاران ۲۰۰۷) . سلنیوم کوفاکتور یا فعال کننده‌ی آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز است که یکی از قوی‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌باشد و تجزیه‌ی پراکسیدازهای لیپیدی و هیدروژن پراکسید را کاتالیز می‌کند (هیل و همکاران۱۹۹٦).

آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز رادیکال‌های آزاد درون سیتوپلاسم را نابود می‌کند (اوزبال و همکاران ۲۰۰۸).

به طور معمول، غلظت اکثر عناصر در کبد بالاتر از سایر اندام‌ها است اما در مورد سلنیوم، بیشترین غلظت آن در بیضه‌ها است. غلظت بالای سلنیوم در بیضه‌ها نشان دهنده‌ی نقش حفاظتی این عنصر و آنزیم‌های مرتبط با آن در اسپرماتوژنز می‌باشد (شامبرگر و همکاران ۱۹۸۳). کمبود سلنیوم به آسیب قطعه میانی اسپرم و کاهش تحرک آن و نیز افزایش ناهنجاری‌های مورفولوژیکی به خصوص در ناحیه‌ی سر اسپرم منجر می‌شود (آگاروال و سخون ۲۰۱۰). با توجه به اهمیت این آنتی‌اکسیدان‌ها در جلوگیری از اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد، هدف از پژوهش حاضر بررسی تاثیر افزودن سطوح مختلف نانوسلنیوم به محیط رقیق‌کننده‌ی اسپرم قوچ بر روی فراسنجه‌های کیفی اسپرم در زمان‌های مختلف نگهداری در حالت انجماد بود.

[1] . Reactive Oxygen Species

مواد و روش‌ها

این پژوهش در واحد گوسفندداری ایستگاه تحقیقاتی و پژوهشی خلعت پوشان دانشگاه تبریز انجام گرفت. برای انجام این آزمایش از ٤ راس قوچ نژاد قزل خالص ۳-۲ ساله استفاده شد و از هر قوچ ٦ بار اسپرم‌گیری در فصل تولیدمثلی صورت گرفت. قوچ‌ها در یک قسمت سرپوشیده به صورت دسته جمعی نگه داشته می‌شدند و به آب و غذا و نمک لیسیدنی دستر سی آزاد داشتند. اسپرم‌گیری توسط واژن مصنوعی در هر هفته ۲ بار انجام گرفت. نمونه‌های اسپرم بلافاصله پس از گرفته شدن به آزمایشگاه منتقل شدند. اسپرم‌ها از نظر حجم، غلظت، تحرک کل، زنده‌مانی و مورفولوژی بررسی شده و تنها نمونه‌هایی با غلظت بالای ۳ میلیارد اسپرم و تحرک کل بالای ۷۰ درصد جهت رقیق سازی استفاده شدند. به منظور رقیق سازی اسپرم‌ها رقیق‌کننده‌ی بر پایه تریس استفاده شد که شامل (تریس۲/۷۱ گرم، اسید سیتریک ۱ گرم، فروکتوز ۱/٤ گرم، استرپتومایسین ۱۰۰ میلی گرم و۱۰۰۰۰۰ واحد پنی سیلین) می‌باشند که در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطرمخلوط شدند و ۷۳ میلی لیتر از این رقیق کننده با میلی‌لیتر۲۰زرده تخم‌مرغ و۷ میلی لیترگلیسرول مخلوط شد. پس از آماده‌سازی رقیق‌کننده(قبل از نمونه‌گیری) مقدار ۲ میلی‌لیتر از محلول داخل ۳ لوله‌ی استریل ریخته شده و به هر لوله بر اساس گروه‌های آزمایشی آنتی‌اکسیدان اضافه گردید:

گروه شاهد:رقیق کننده‌ی معمولی بر پایه‌ی تریس

گروهNS_1: ۱ میلی‌لیتر رقیق‌کننده‌ی معمولی+۱ میکروگرم نانوسلنیوم

گروهNS_2: ۱ میلی‌لیتررقیق‌کننده‌ی معمولی+۲ میکروگرم نانوسلنیوم

پس از مخلوط‌سازی آنتی‌اکسیدان‌ها با رقیق‌کننده، نمونه-های منی به نسبت ۱ به ۱۰ به داخل هر لوله اضافه گردیده و از هر نمونه تعداد ۷ پایوت ۰/۲۵ میلی‌لیتری کشیده شده و به مدت ۹۰ دقیقه در یخچال نگهداری شدند تا به دمای ۵ درجه سانتی‌گراد برسند سپس به مدت ۱۰-۸ دقیقه در ٤ سانتی‌متری بالای ازت مایع قرار گرفته و سپس در داخل ازت مایع جهت نگهداری غوطه‌ور شدند. نمونه‌ها در روزهای صفر، ۱۵ و ۳۰ آزمایش ذوب شده و مورد ارزیابی قرار گرفتند. صفات مورد ارزیابی شامل درصد اسپرم‌های متحرک و پیش‌رونده، درصد اسپرم‌های زنده، آزمون سلامت غشای اسپرم، خصوصیات مورفولوژیکی اسپرم‌ها، سلامت غشای آکروزوم اسپرم‌ها در تمامی زمان‌ها مورد بررسی قرار گرفتند.

آزمایشات اسپرم:

تحرک: به منظور بررسی تحرک کل و حرکت پیش‌رونده ، نمونه‌ها با نسبت ۱ به ۱۰۰ با محلول سیترات سدیم ۲/۹ درصد رقیق شده و با استفاده از میکروسکوپ نوری فازکنتراست و با بزرگنمایی ٤۰۰× مورد ارزیابی قرار گرفتند و بر حسب درصد نمره‌دهی شدند.

زنده مانی:

برای ارزیابی درصد اسپرم‌های زنده و مرده از رنگ-آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد. برای این منظور یک قطره از رنگ ائوزین-نیگروزین که قبلا به دمای ۳۸ درجه سانتیگراد رسیده بود روی لام ۳۸ درجه‌ی سانتیگراد گذاشته شد و سپس ۱۰میکرولیتر از محلول رقیق شده‌ی اسپرم با سیترات سدیم ۲/۹٪ با نسبت ۱ به ۱۰۰ به آن اضافه شده و با لام دیگری گسترش تهیه شد. پس از خشک شدن، شمارش اسپرم‌ها در ۵ ناحیه با بزرگ نمایی ٤۰۰× میکروسکوپ نوری انجام گرفت. اسپرم‌هایی که رنگ را جذب نکرده و سر سفید داشتند زنده و اسپرم-هایی که رنگ جذب کرده و دارای سر صورتی بودند مرده تلقی شدند.

اسپرم‌های غیرطبیعی:

برای محاسبه‌ی درصد اسپرم‌های غیرطبیعی نیز از رنگ-آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد. گسترش تهیه شده با بزرگ‌نمایی ٤۰۰× میکروسکوپ نوری فازکنتراست در پنج ناحیه‌ی مختلف شمارش شد.

سلامت غشای اسپرم:

برای تعیین سلامت و یکپارچگی غشای اسپرم از محلول تست[۲]HOST استفاده گردید. بدین صورت که ۱۰µl از اسپرم با ۱۰۰µl محلول HOST (۹ گرم فروکتوز، ٤/۹ گرم سیترات سدیم در ۱ لیتر آب) رقیق شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شده و گسترش تهیه شد. گسترش‌ها با بزرگ‌نمایی ٤۰۰× مطالعه گردید و درصد اسپرم‌های سالم به دست آمد. اسپرم‌هایی که دارای غشای سالم هستند به هنگام قرار گرفتن در محیط با فشار اسمزی پایین آب جذب نموده و متورم می-شوند.

در این آزمایش، محلول هیپواسمول از غشای پلاسمایی اسپرم عبور کرده و سلول سعی می کند تا یک توازنی بین فضای داخلی و خارجی برقرار کند، بنابراین دم اسپرم-هایی که غشای پلاسمایی سالم و فعال دارند پیچ خورده و در نتیجه به آنها HOST مثبت اطلاق می‌شود ولی اسپرم‌هایی که غشای ناسالم دارند متورم نشده و دمشان حالت مستقیم دارد که به آنها HOST منفی اطلاق می-شود.

سلامت غشای آکروزوم:

برای تعیین سلامت غشای آکروزوم یک قطره رنگ ائوزین-نیگروزین ۳۸ درجه روی لام گذاشته و سپس یک قطره از نمونه‌ی رقیق شده‌ی اسپرم با سیترات سدیم ۲٪/۹ به آن اضافه و گسترش تهیه گردید. پس از خشک شدن، یک قطره روغن سدر روی آن گذاشته شده و با بزرگ نمایی ۱۲۵۰× تعداد ۲۰ اسپرم رنگ گرفته (مرده) بررسی شد از میان اسپرم های مرده،اسپرم هایی که دارای غشای دندانه دار در قسمت سر بودند جزو اسپرم های با غشای آکروزوم ناسالم محسوب شدند (سازمان بهداشت جهانی ۲۰۱۰).

تجزیه و تحلیل:

داده‌های به دست آمده از این آزمایش شامل تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی، سلامت غشا، اسپرم‌های غیرطبیعی و سلامت غشای آکروزوم نمونه‌ها توسط رویه‌های Glm و Mixed نرم افزار SAS9.2 آنالیز شدند. برای مقایسه‌ی میانگین‌ها از روش مقایسه میانگین حداقل مربعات(Ls means) و روش توکی-کرامر استفاده شد.

نتایج و بحث:

درصد تحرک کل و پیشرونده‌ی اسپرم‌ها در اثر افزایش مدت زمان نگهداری به صورت منجمد کاهش معنی‌داری داشت (جدول۱). میانگین درصد اسپرم‌های متحرک در نمونه‌هایی که در روز صفر انجماد، یخ‌گشایی شده بودند بیشتر از آنهایی بود که در روزهای ۱۵ و ۳۰ آزمایش ذوب شده بودند. با این وجود، افزایش معنی‌داری در درصد اسپرم‌های متحرک در هر سه زمان نگهداری در تیمارهای حاوی نانوسلنیوم ۱ و ۲ میکروگرم نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید ($p<۰/۰۱$). درصد اسپرم‌های با حرکت پیشرونده نیز بر اثر افزایش زمان نگهداری یعنی در روزهای صفر، ۱۵ و ۳۰ کاهش معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۱$). همچنین همه‌ی گروه‌های دریافت کننده‌ی آنتی-اکسیدان نانوسلنیوم خصوصا تیمار نانوسلنیوم ۱ میکروگرم تحرک پیشرونده‌ی بیشتری نسبت به گروه شاهد داشتند ($p<۰/۰۱$). افزایش معنی‌دار درصد تحرک اسپرم در نمونه‌های حاوی نانوسلنیوم نسبت به گروه شاهد، احتمالا ناشی از تاثیر نانوسلنیوم بر فسفوریلاسیون اکسیداتیو میتوکندری اسپرم باشد (نصری و همکاران۲۰۱٤).

[2]. Hypo osmotic swelling test

Table1-Least square means of sperm total motility (%) in Ghezel ram during cryopreservation

Treatment	Storage time (Day)			SEM
	0	15	30	
Control	65.95^{aC}	56.29^{bC}	46.41^{cC}	0.821
NS*(1µg/ml)	80.91^{aA}	74.95^{bA}	68.58^{Ca}	0.821
NS(2µg/ml)	73.2^{aB}	65.45^{bB}	57.6^{cB}	0.821
SEM	1.154	1.154	1.154	

*NS(Nano selenium)

a,b Values with different superscripts in each row indicate a difference (P<0.01) among treated groups during trail period (P<0.01) .
A,B Values with different superscripts in each column indicate significant difference (P<0.01) among groups at times of test(P<0.01) .

Table2-Least square means of sperm progressive motility (%) in Ghezel ram during cryopreservation

Treatment	Storage time (Day)			SEM
	0	15	30	
Control	60.19^{aC}	50.13^{bC}	41.66^{cC}	0.924
NS*(1µg/ml)	74.93^{Aa}	68.64^{bA}	62.17^{cA}	0.924
NS(2µg/ml)	67.35^{aB}	59.37^{bB}	52.63^{cB}	0.924
SEM	1.307	1.307	1.307	

*NS(Nano selenium)

a,b Values with different superscripts in each row indicate a difference (P<0.01) among treated groups during trail period (P<0.01) .
A,B Values with different superscripts in each column indicate significant difference (P<0.01) among groups at times of test(P<0.01) .

Table3-Least square means of sperm viability (%) in Ghezel ram during cryopreservation

Treatment	Storage time (Day)			SEM
	0	15	30	
Control	69^{aC}	59.58^{bC}	49.83^{cC}	0.808
NS*(1µg/ml)	83.95^{aA}	78.29^{bA}	71.66^{cA}	0.808
NS(2µg/ml)	76.25^{aB}	68.79^{bB}	60.83^{cB}	0.808
SEM	1.144	1.144	1.144	

*NS(Nano selenium)

a,b Values with different superscripts in each row indicate a difference (P<0.01) among treated groups during trail period (P<0.01) .
A,B Values with different superscripts in each column indicate significant difference (P<0.01) among groups at times of test(P<0.01) .

زنده‌مانی اسپرم‌ها در تمامی تیمارهای آزمایشی از روز صفر تا ۳۰ پس از انجماد کاهش معنی‌داری داشت (p<۰/۰۱). اما مقایسات تیمارها نشان می‌دهد که افزودن سطوح مختلف نانوسلنیوم به رقیق‌کننده‌ی اسپرم موجب افزایش معنی‌دار درصد زنده‌مانی در تمامی زمان‌ها می‌شود(p<۰/۰۱). به طوریکه بیشترین درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها مربوط به تیمار نانوسلنیوم ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر در تمامی زمان‌ها و کمترین درصد زنده‌مانی مربوط به گروه شاهد در تمامی زمان‌ها بود. با توجه به

خاصیت آنتی‌اکسیدانی این ماده، به نظر می‌رسد که افزودن نانوسلنیوم به محیط رقیق‌کننده‌ی اسپرم موجب کاهش تولید و فعالیت رادیکال‌های آزاد گشته که این امر باعث افزایش زنده‌مانی اسپرم‌ها گردیده است(میرزایی راد و همکاران۲۰۱۵).بررسی تاثیر متقابل نانوسلنیوم با زمان بر آسیب غشای آکروزوم اسپرم در جدول ٤ ارائه شده است. نتایج نشان می‌دهند که کمترین درصد آسیب غشای آکروزوم اسپرم پس از یخ‌گشایی مربوط به سطح ۱ میکروگرم نانوسلنیوم در زمان صفر و بیشترین درصد آسیب غشای آکروزوم مربوط به گروه شاهد در روز ۳۰ آزمایش است. به طور کلی، افزودن رقیق‌کننده‌ی حاوی سطوح مختلف نانوسلنیوم به اسپرم منجمد قوچ سبب کاهش آسیب غشای آکروزوم اسپرم در سه بازه‌ی زمانی روزهای صفر، ۱۵ و ۳۰ نسبت به گروه شاهد شد($p<۰/۰۱$). به طوریکه کمترین آسیب غشای آکروزوم مربوط به تیمار نانوسلنیوم ۱ میکروگرم و بیشترین درصد آسیب غشای آکروزوم مربوط به گروه شاهد در بین تیمارها بود. نانوسلنیوم فعالیت‌های فیزیولوژیکی خود را به عنوان اسیدآمینه‌ی سلنوسیستئین اعمال می‌کند که سلنوپروتئین‌ها باعث از بین بردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) از اسپرم‌ها شده و از غشای آکروزوم اسپرم محافظت می‌کند (محمدی و همکاران۲۰۰۸).

Table4-Least square means of sperm acrosome damage (%) in Ghezel ram during cryopreservation

Treatment	Storage time (Day)			SEM
	0	15	30	
Control	5.54^{aA}	7.54^{bA}	9.83^{cA}	0.339
NS*(1µg/ml)	3.83^{aB}	4.79^{bC}	6.33^{cC}	0.339
NS(2µg/ml)	4.66^{aAB}	6.04^{bB}	7.75^{cB}	0.339
SEM	0.354	0.354	0.354	

*NS(Nano selenium)

a,b Values with different superscripts in each row indicate a difference (P<0.01) among treated groups during trail period (P<0.01) .

A,B Values with different superscripts in each column indicate significant difference (P<0.01) among groups at times of test(P<0.01) .

Table5-Least square means of sperm abnormality (%) in Ghezel ram during cryopreservation

Treatment	Storage time (Day)			SEM
	0	15	30	
Control	5.87^{aA}	8.2^{bA}	11.62^{cA}	0.327
NS*(1µg/ml)	3.66^{aB}	4.83^{bC}	6.54^{cC}	0.327
NS(2µg/ml)	4.7^{aAB}	6.41^{bB}	8.58^{cB}	0.327
SEM	0.462	0.462	0.462	

*NS(Nano selenium)

a,b Values with different superscripts in each row indicate a difference (P<0.01) among treated groups during trail period (P<0.01) .

A,B Values with different superscripts in each column indicate significant difference (P<0.01) among groups at times of test(P<0.01) .

نتایج بررسی اثر متقابل نانوسلنیوم با زمان بر مورفولوژی اسپرم قوچ در جدول ٥ ارائه شده است. کمترین درصد اسپرم‌های غیرطبیعی به ترتیب در رقیق کننده‌های حاوی ۱ و ۲ میکروگرم نانوسلنیوم و در روز صفر و بیشترین درصد اسپرم‌های غیر طبیعی مربوط به گروه کنترل و در روز ۳۰ آزمایش بود که تفاوت معنی-داری بین این دو با سایر گروه‌ها مشاهده شد($p<۰/۰۱$). همچنین افزودن سطوح مختلف نانوسلنیوم به رقیق

کننده‌ی اسپرم قوچ به طور معنی‌داری باعث حفظ مورفولوژی طبیعی اسپرم پس از انجماد و یخ‌گشایی نسبت به گروه شاهد شد($p<۰/۰۱$). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که افزایش زمان انجماد اسپرم باعث افزایش درصد اسپرم‌های غیرطبیعی می‌شود که مطابق با یافته‌های (صفا و همکاران۲۰۱٦) می‌باشد. با توجه به نتایج جدول ٦ سلامت و یکپارچگی غشای اسپرم‌های رقیق شده با نانوسلنیوم ۱ میکروگرم بعد از ۳۰ روز بهترین عملکرد را در بین سایر تیمارها داشت و کمترین درصد سلامت و یکپارچگی غشای اسپرم در گروه کنترل و در روز ۳۰ آزمایش مشاهده شد و تفاوت معنی‌داری با همه‌ی گروه‌ها در هر سه بازه‌ی زمانی داشت ($p<۰/۰۱$). به طور کلی افزودن رقیق کننده‌ی حاوی سطوح مختلف نانوسلنیوم به اسپرم باعث افزایش معنی-دار عملکرد و یکپارچگی غشای اسپرم (HOST) در هر سه بازه‌ی زمانی نسبت به گروه شاهد شد که با نتایج (صفا و همکاران ۲۰۱٦) که روی اسپرم خروس انجام شده بود و(خرم‌آبادی و همکاران۲۰۱۷) روی اسپرم قوچ فراهانی و (رنگرز و همکاران۲۰۱٦) که روی قوچ قزل انجام شده بود مطابقت داشت.

Table6-Least square means of sperm plasma membrane integrity (%) in Ghezel ram during cryopreservation

Treatment	Storage time (Day)			SEM
	0	15	30	
Control	62.79^{aC}	52.87^{bC}	43.12^{cC}	0.812
NS*(1µg/ml)	77.66^{aA}	71.37^{bA}	65.2^{cA}	0.812
NS(2µg/ml)	70.12^{aB}	61.95^{bB}	54.58^{cB}	0.812
SEM	1.142	1.142	1.142	

*NS(Nano selenium)

[a,b] Values with different superscripts in each row indicate a difference (P<0.01) among treated groups during trail period (P<0.01) .

[A,B] Values with different superscripts in each column indicate significant difference (P<0.01) among groups at times of test(P<0.01) .

یکی از عوامل مهم در کاهش تحرک اسپرماتوزوئیدها در اثر گذر زمان، آسیب ساختاری ناشی از فشارهای اکسیداتیو بر یکپارچگی غشا است که به افزایش نفوذپذیری آن و کاهش توانایی تنظیم سطوح یونی در داخل سلول منجر می‌شود که به طور کلی برای سلامت و عملکرد غشای اسپرم زیان‌آور می‌باشند (بتریج ۲۰۰۰).

نتیجه‌گیری کلی: نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که افزودن مقادیر بالاتر از ۱ میکروگرم نانوسلنیوم به محیط رقیق کننده‌ی اسپرم قوچ، توانایی محافظتی کمتری نسبت به مقدار ۱ میکروگرم نانوسلنیوم دارد و بهتر است که از مقدار ۱ میکروگرم نانوسلنیوم استفاده گردد.

منابع مورد استفاده

Agarwal A and Sekhon LH, 2010. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. Human Fertility 3: 217-225.

Betteridge DJ, 2000. What is oxidative stress? Journal of Metabolism 49:3-8.

Dolati Doorbash P, Moghaddam GA and Ahmadian H, 2016. The influence of different trehalose concentration on sperm parameters of frozen-thawed semen of different rams during preservation in the reproductive season. Journal of Animal Science Researches (Agriculture Science) 26(3): 101-113.

Hill KE, Xia Y, Akesson B, Boeglin ME, Burk RF,1996. Selenoprotein P concentration in plasma is an index of selenium status in selenium-deficient and selenium-supplemented Chines subjects. Journal of Nutrition 126(1):138.

Khoram Abadi F, Khodaei Motlagh M and Moradi MH, 2017. Effect of in vitro selenium nanoparticles addition to the semen extender on the spermatozoa parameters after freezing in Farahani ram. Animal Researcher (Iranian Journal of Biology) 30(3): 301-307.

Lenzi A, Picardo M, Gandini L, Lombardo F, Terminali O, Passi S and Dondero F, 1994. Glutathione treatment of dyspermia: effect on the lipoperoxidation process. Human Reproduction 9(11): 2044-2050.

Mironczuk-chodakowska I, Maria witkowska A and Elzbieta zujko M, 2018. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. Medical Science 63:68-78.

Mirzaei Rad H, Eslami M and Gharnie A, 2015. Palmitoleate enhance quality of rooster semen during chilled storage. Animal Reproduction Science 165:38-45.

Mohammadi SH, Movahedin M and Mowla SJ, 2008. Antioxidant effects of selenium on sperm parameters and testicular structure in young and aged mice. Journal of Reproductive Infertility 9(3):229-237.

Nasri S, Amidi F and Rezaeian Z, 2014. Effect of selenium on the motility, morphology and viability of sperm cells after freezing and thawing procedure. Journal of Qazvin University of Medical Science 18(1):11-17.

Ozbal S, Erbil G, Kocdor H, Tugyan K and Pekcetin C, 2008. The effects of selenium against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. Neurosci Letters 438(3):265-269.

Peng D, Zhang J, Liu Q and Taylor E W, 2007. Size effect of elemental selenium nano particles(nano-se) at supranutritional levels on selenium accumulation and glutathione s-transferase activity. Journal of Inorganic Biochemistry 101:1457-1463.

Rangraz Tavakoli H, Moghaddam Gh, Daghigkia H and Rafat SA, 2016. The effect of hCG on serum and seminal plasma testosterone in Ghezel ram. Journal of Animal Science Researches (Agriculture Science) 26(2): 131-139.

Safa S, Moghaddam G, Jafari R, Daghighkia H, Janmohammadi H, 2016. Effect of vitamin E and Selenium nano particles on post-thaw variables and oxidative status of rooster semen. Animal Reproduction Science 174:100-106.

Sanocka D and Kurpisz M, 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. Reproductive Biology and Endocrinology 2: 12-19.

Shamberger R J,1983. Biological interactions of selenium with other substances. In biochemistry of selenium (Pp: 125-166), Springer.

Tarze A, Dauplais M, Grigoras I, Lazard M, Ha-Duong N T, Barbier F, Blanquet S and Plateau P, 2007. Extracellular production of hydrogen selenide accounts for thiolassisted toxicity of selenite against saccharomyces cerevisiae. Journal of Biological Chemistry 282:8759-8767.

World health organization, 2010. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth edition. Pp, 149.

Zini A, De lamirande E and Gagnon C, 1996. Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation in vitro. Journal of Andrology 16:424-431.

Effect of Nano selenium supplementation in semen extender on ram sperm quality following freezing-thawing process

S Nateq Kondroud[1], Gh Moghaddam[2*], S Alijani [2], F Nazari [3] and H Ghamari[1]

Received: December 2, 2018 Accepted: April 14, 2019
[1]MScStudent, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[3]Phd Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[*]Corresponding author: ghmoghaddam@tabrizu.ac.ir

پژوهش‌های علوم دامی Animal Science Research

Journal of Animal Science/vol.31 No.1/ 2021/pp 1-10
https://animalscience.tabrizu.ac.ir

OPEN ACCESS

© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)

DOI: 10.22034/as.2021.30588.1467

Introduction: Freezing is a branch of cryobiology that discuses about protecting and long term storage of cell in very low temperature. This technique commonly used in infertility centers, animal genomic banks and livestock industry. Freezing is so important one of influential destructive factors in reducing with creation of ROS duration of sperm storage. ROS needs very low, but its increasing has destructive effects on sperm (lenzi et al. 1994). Use of antioxidants in sperm extender have better results to deal with these reactive oxygen species. It is believed that ROS induces lipid peroxidation in the sperm membrane, and the peroxidation of produced fatty acids has toxic effects on the sperm and decrease in sperm function (Sanuka and Corps 2004). Antioxidants are compounds that control, stop and neutralize intermediates derived from the energy production process in the electron transport chain of cells (aerobic activity) known as active oxygen species, and in a group of free radicals (Zinee et al. 2000). Adding antioxidants to semen diluent during freezing of sperm improves the quality and improvement of semen parameters such as motility, viability and acrosome membrane integrity (Mironoksuk et al. 2018). Selenium is an essential micronutrient element to human and animals health which is toxic at high concentrations. Selenium is a constituent of selenoproteins that they have an enzymatic and structural role in biochemistry. Selenium is the main component of selenoenzymes in the center of all of these proteins, there is the amino acid of selenocysteine which acts as an oxidation-reducing agent. However, one of the limiting factors for selenium consumption is bioavailability (the rate of entry into circulation and tissues) and its toxicity (Tarz et al. 2007). Therefore, the use of other forms of selenium that is less toxic and more beneficial is more appropriate. Selenium nanoparticles are low toxicity compounds and bioavailable and effectively increase the production of selenoproteins in the body (Peng et al. 2007). Selenium is a cofactor or activator of the glutathione peroxidase enzyme which is one of the strongest antioxidants in the body and catalyzes the decomposition of lipid peroxides and hydrogen peroxide (Hill et al. 1996). The glutathione peroxidase enzyme destroys free radicals within the cytoplasm (Ozball et al. 2008). Typically, the concentration of most of the elements in the liver is higher than the other organs, but in the case of selenium, it has the highest concentration in the testis. High concentration of selenium in testis indicates the protective role of this element and

its related enzymes in spermatogenesis (Schumberger et al. 1983). The present study was designed to evaluate the effect of Nano selenium on improvement of ram semen parameters during cryopreservation.

Material and methods: Semen was collected with an artificial vagina twice a week from 4 adult Ghezel rams during reproductive season. Ejaculates were immediately evaluated primarily for parameters including volume, concentration, motility, viability and abnormal sperm, and if they had the required standards (high concentration of 3 billion sperm per ml, motility above 70% and volume greater than 0.5 ml), were selected as suitable samples for dilution. The semen was diluted with extender with no antioxidants (control) and containing 1 µg/ml nano selenium and 2 µg/ml nano selenium and then immediately aspirated to 0.25 ml freezing straw. Treated straws were packaged and refrigerated in 5°C for 1.5 hours. The packaged straws containing semen were placed on 4 cm above the liquid nitrogen, and then were immersed in liquid nitrogen immediately after 10 minutes. Qualitative parameters of sperm included viability, total motility (TM), progressive motility (PM), plasma membrane integrity (HOST), percentage of abnormal sperm and acrosome membrane damaged were studied in days 0, 15 and 30 of frozen storage.

Results and discussion: The percent of sperm viability, total motility and progressive motility as well as sperm plasma membrane integrity (HOST) significantly decreased during storage ($P<0.01$). Also sperm abnormality and acrosome membrane damage increased during experiment ($P<0.01$). However, addition of different levels of nano selenium to semen extender significantly improved the sperm viability, total motility, progressive motility and plasma membrane integrity (positive HOST) on days 0, 15 and 30 compared with control group ($P<0.01$). Also, the addition of different levels of nano selenium to extender significantly decrease abnormal sperm and acrosome membrane damaged percent on days 0, 15 and 30 compared with control group ($P<0.01$**).**

Conclusion: According to the results of this study, the addition of different levels of nano selenium, especially nano selenium 1 µg/ml to ram sperm extender increases the quality of sperm during storage.

Keywords: sperm, antioxidant, nano selenium, Ghezel ram