نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان
جلد هشتم، شماره سوم، ۱۳۹۹
http://ejrr.gau.ac.ir
٤٥-٦٢
DOI: 10.22069/ejrr.2020.17812.1743

اثر مکمل‌سازی جیره با سلنیوم و کروم آلی بر کیفیت منی قوچ‌های نژاد مهربان هنگام نگهداری به صورت مایع در دمای ۴ سانتی‌گراد

پوریا صارمی شهاب[۱]، *عباس فرح‌آور[۲]، خلیل زابلی[۲]، احمد احمدی[۲] و مرتضی یاوری[۳]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد و [۲]استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینای همدان،
[۳] استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینای همدان

تاریخ دریافت: ۹۹/۱/٤؛ تاریخ پذیرش: ۹۹/٤/٤

چکیده

سابقه و هدف: پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند که افزودن ویتامین‌ها و عناصر معدنی به جیره، قابلیت نگهداری منی حیوانات را هنگام ذخیره‌سازی سرد به صورت مایع و یا منجمد افزایش می‌دهد. بنابراین هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر افزودن سلنیوم و کروم آلی به جیره غذایی قوچ‌های نژاد مهربان بر کیفیت منی هنگام نگهداری در دمای ٤ سانتی‌گراد بود.

مواد و روش‌ها: در فصل تولیدمثلی، تعداد ١٦رأس قوچ نژاد مهربان با دامنه سنی ۲ تا ٤ سال و میانگین وزن زنده ٦٩/٧٥±١٠/٤٤ کیلوگرم به چهار گروه چهارتایی تقسیم و با یک جیره پایه که دارای ۷۰ درصد علوفه و ۳۰ درصد کنسانتره بود تغذیه شدند. طرح آزمایشی به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی بود. آزمایش به‌مدت ٦٠روز به‌طول انجامید. عامل‌ها شامل: دو سطح سلنیوم (صفر و٦٠٠میکروگرم سلنیوم به‌شکل سلنیوم-مخمر در روز به ازای هر راس قوچ)، دو سطح کروم (صفر و١٠٠٠میکروگرم کروم به‌شکل کروم-متیونین در روز به ازای هر راس قوچ) و ٤ سطح زمان (صفر، ٢٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت پس از ذخیره‌سازی اسپرم) بودند. کروم به کمک پوکه‌های کپسول خوراکی و سلنیوم پس از حل کردن در آب مقطر، به کمک مایع‌خوران به قوچ‌ها خورانده شد. در سه هفته پایانی آزمایش، از قوچ‌ها سه بار اسپرم‌گیری شد. نمونه‌های منی پس از اسپرم‌گیری، با رقیق کننده بر پایه تریس-زرده تخم‌مرغ رقیق‌سازی و به درون یخچال با دمای٤ سانتی‌گراد منتقل و به‌مدت ۷۲ ساعت نگهداری شد. درصد زنده‌مانی، سلامت غشا، ریخت‌شناسی غیرطبیعی و برخی از فراسنجه‌های حرکتی اسپرم‌ها به وسیله سامانه تحلیل‌گر رایانه‌ای منی (کاسا) در زمان‌های صفر، ٢٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت پس از ذخیره‌سازی، تعیین گردید.

یافته‌ها: اثر کروم، زمان و اثر متقابل آن‌ها و همچنین اثر متقابل سلنیوم×کروم، اثر متقابل سلنیوم×کروم×زمان بر زنده‌مانی و سلامت غشاء اسپرم‌ها معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). اثر سلنیوم و اثر متقابل سلنیوم×زمان بر زنده‌مانی معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵) اما اثر کروم، سلنیوم و زمان و همچنین اثر متقابل آن‌ها بر سلامت غشاء اسپرم‌ها معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). میزان زنده‌مانی با گذشت زمان به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵) و اسپرم قوچ‌های دریافت کننده جیره حاوی١٠٠٠ میکروگرم کروم پس از ٤٨ و ۷۲ ساعت ذخیره‌سازی در دمای٤ سانتی‌گراد، میزان زنده‌مانی بیشتری نسبت به جیره بدون کروم داشت (P<۰/۰۵). همچنین

*نویسنده مسئول: a.farahavar@basu.ac.ir; farahavar@gmail.com

میزان زنده‌مانی اسپرم قوچ‌های دریافت کننده جیره حاوی سلنیوم پس از ٤٨ ساعت ذخیره‌سازی، نسبت به جیره بدون سلنیوم بیشتر بود (P<۰/۰۵). افزودن کروم به جیره حاوی سلنیوم باعث افزایش معنی‌دار میزان زنده‌مانی پس از ٤٨ و ٧٢ ساعت ذخیره‌سازی شد (P<۰/۰۵). میزان سلامت غشاء با گذشت زمان به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵)و میزان سلامت غشاء اسپرم قوچ‌های دریافت کننده جیره حاوی کروم و سلنیوم پس از ٢٤و ٤٨ ساعت ذخیره‌سازی در دمای ٤ سانتی‌گراد نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود (P<۰/۰۵). اثر کروم، سلنیوم و همچنین اثر متقابل آن‌ها برای فراسنجه‌های تعیین شده توسط کاسا معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). اثر متقابل سلنیوم و کروم برای ریخت‌شناسی غیرطبیعی معنی‌دار بود (P<۰/۰۵) اما اثر کروم، سلنیوم و زمان و اثر متقابل آن‌ها برای این صفت معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). میزان جنبایی کل، سرعت در مسیر منحنی، سرعت در مسیر مستقیم، سرعت در مسیر میانگین در طول مدت ذخیره‌سازی اسپرم کاهش یافت (P<۰/۰۵)و افزودن کروم و سلنیوم به جیره تغییری در این فراسنجه‌ها هنگام ذخیره‌سازی ایجاد نکرد. میزان جنبایی پیشرونده، ریخت‌شناسی غیرطبیعی، معیار مستقیم‌الخط بودن حرکت تحت تاثیر زمان، سلنیوم و کروم قرار نگرفت (P>۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی افزودن سلنیوم و کروم آلی به جیره قوچ‌ها منجر به افزایش قابلیت زنده‌مانی و سلامت غشاء پلاسمایی اسپرم‌ها در طول مدت نگهداری به‌صورت سرد می‌شود. افزودن کروم و سلنیوم به جیره تغییری در فراسنجه‌های تعیین شده توسط کاسا هنگام ذخیره‌سازی مایع منی ایجاد نکرد. بنابراین ممکن است استفاده از سلنیوم و کروم آلی در جیره قوچ‌ها قابلیت نگهداری اسپرم برای تلقیح مصنوعی را افزایش دهد.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، سلنیوم، قوچ، کروم

مقدمه

امروزه به‌دلیل توسعه روش‌های نگهداری اسپرم در حیوانات مزرعه‌ای، فرایند تلقیح مصنوعی به‌طور قابل توجهی گسترش یافته است. اما به‌دلیل آسیب‌های فراوانی که هنگام نگهداری منی به سلول‌های اسپرم وارد می‌شود، تلقیح مصنوعی با منی نگهداری شده به‌صورت سرد و یا یخ زده، باعث کاهش نرخ آبستنی می‌شود. به‌منظور استفاده گسترده‌تر از قابلیت اسپرم سرد و یا منجمد در تلقیح مصنوعی گوسفند، به‌کارگیری راه‌بردهای مختلف جهت جلوگیری از وارد آمدن آسیب به سلول اسپرم هنگام نگهداری امری ضروری است. پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند که کیفیت اسپرم قبل از انزال، تحت تاثیر تغذیه حیوان قرار می‌گیرد؛ همچنین تغذیه تاثیر قابل توجهی بر کیفیت اسپرم پس از نگهداری به‌صورت سرد و یا منجمد دارد (١٧).

برای به حداکثر رساندن بازده تولید مثلی در حیوان نر، تغذیه برخی عناصر کم‌مصرف مانند روی، منگنز، کبالت، مس، سلنیوم و کروم ضروری است (٢٤). گزارش شده است که مکمل‌سازی جیره با برخی ویتامین‌ها و عناصر کمیاب، بر سلول‌های اسپرم در هنگام نگهداری به‌صورت مایع و یا یخ زده اثرات محافظتی دارد (٢و١٣). فسفولیپیدهای غشای اسپرم پستانداران، غنی از اسیدهای چرب غیراشباع است و پراکسیداسیون آنها هنگام نگهداری منی به‌صورت مایع و یا یخ زده افزایش می‌یابد که به‌نوبه خود منجر به کاهش قابلیت زنده‌مانی، یکپارچگی غشایی و در نهایت افت فراسنجه‌های حرکتی و باروری اسپرم‌ها می‌شود (٢، ٨). گزارش شده است که افزودن برخی ویتامین‌ها و برخی عناصر معدنی کم‌مصرف به جیره، احتمالاً می‌تواند با بهبود توان آنتی‌اکسیدانتی سلول‌های اسپرم، قابلیت نگهداری اسپرم‌ها را پس از انزال به‌طور مثبت تحت تاثیر قراردهد (٨ و ١٣).

نشان داده شده است که در بزهای دریافت کننده عناصر روی و مس به‌عنوان مکمل غذایی، شاخص‌های تنش اکسیداتیو در قبل و پس از انجماد، در سلول‌های اسپرم کاهش پیدا می‌کند و میزان زنده‌مانی، جنبایی، یکپارچگی غشایی و آکروزمی اسپرم‌ها پس از فرایند انجماد-یخگشایی بهبود می‌یابد (۲).

سلنیوم ماده معدنی کمیابی است که از طریق بیان طیف گسترده‌ای از سلنوپروتئین‌ها، نقش‌های فیزیولوژیکی متنوعی در بدن حیوانات دارد. این عنصر به‌عنوان کوفاکتور آنزیم‌های مهم آنتی‌اکسیدانتی مانند گلوتاتیون پراکسیداز، نقش مهمی در جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدهای غیراشباع غشای اسپرم در برابر رادیکال‌های آزاد دارد (۸ و ۱۳). کمبود سلنیوم جیره با کاهش کیفیت اسپرم قوچ، گاو نر و خروس در ارتباط است (۱۹ و ۲۱). گزارش شده است که افزودن سلنیوم آلی به جیره غذایی، بر اسپرم خوک و خروس در هنگام نگهداری به‌صورت سرد اثرات محافظتی دارد (۸ و ۱۳).

عنصر کروم سه ظرفیتی، ماده معدنی ضروری و کم‌مصرفی است که برای عملکرد طبیعی انسولین و همچنین متابولیسم کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و چربی‌ها ضروری است (۲۵). مستندات علمی در مورد تاثیر کروم بر فعالیت‌های تولید مثلی در حیوان نر بسیار اندک است. در یک پژوهش مشخص گردید در موش‌های صحرایی تغذیه شده با جیره‌ای حاوی کروم کمتر از ۱۰۰ میکروگرم در هر کیلوگرم خوراک، تعداد سلول‌های اسپرم ۵۰ درصد و باروری ۲۵ درصد کمتر از موش‌های تغذیه شده با جیره طبیعی (که میزان کروم جیره بالاتر از ۱۰۰ میکروگرم در هر کیلوگرم خوراک بود) است (۱). پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند که کروم علاوه بر این که به‌عنوان یک لیگاند برای گیرنده‌های انسولین عمل می‌کند، دارای خواص آنتی‌اکسیدانتی نیز است و از پراکسیداسیون لیپیدها جلوگیری می‌کند (۷ و ۱۶). از کروم به‌عنوان یک راهبرد درمانی موثر برای به حداقل رساندن تنش‌های اکسیداتیو در بیماران دیابتی نوع-۲ نیز استفاده می‌شود (۷). سازوکاری که کروم به عنوان آنتی‌اکسیدانت عمل می‌کند هنوز به‌طور کامل شناخته نشده است؛ اما نتایج تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که افزودن کروم به جیره غذایی باعث کاهش میزان مالون دی‌آلدهید سرم (شاخص پراکسیداسیون لیپید) خون می‌گردد (۷). با وجود این، در خصوص اثرات محافظتی مکمل‌سازی جیره با کروم و سلنیوم آلی بر سلول‌های اسپرم قوچ در طی فرایند نگهداری سرد مستندات علمی بسیار کمی وجود دارد. بنابراین هدف از این پژوهش بررسی اثرات محافظتی افزودن سلنیوم و کروم آلی به جیره غذایی قوچ‌ها بر ویژگی‌های کیفی اسپرم قوچ هنگام نگهداری به روش سرد در دمای ٤ سانتی‌گراد بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۱۳۹٦ در مزرعه آموزشی و تحقیقاتی گروه علوم دامی دانشگاه بوعلی سینای همدان انجام شد. در این آزمایش از تعداد ۱٦ راس قوچ سالم نژاد مهربان، با دامنه سنی ۲ تا ٤ سال و میانگین وزن زنده ۱۰/٤٤±٦۹/۷۵ کیلوگرم استفاده شد. قوچ‌ها به‌صورت تصادفی به چهار گروه چهارتایی تقسیم و با یک جیره پایه که بر اساس توصیه‌های انجمن ملی تحقیقات[1] (۲۰۰۷) متعادل شده بود تغذیه شدند. جیره غذایی در دو وعده صبح (ساعت ۹:۰۰) و عصر (ساعت ۱۷:۰۰) در اختیار قوچ‌ها قرار می‌گرفت. درصد هر یک از اقلام جیره پایه و همچنین ترکیب شیمیایی آن در جدول ۱ نشان داده شده است.

1. National Research Council

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی اجزای خوراک و جیره پایه[1]

Table 1. Chemical composition of feed ingredient and basal diet

جیره پایه Basal diet	سبوس گندم Wheat bran	کنجاله سویا Soybean meal	دانه جو Barely grain	کاه جو Barely Straw	یونجه خشک Alfalfa hay	اجزاء جیره (بر حسب درصد ماده خشک) Feed Ingrediant (as % of Dry Matter)
93.20	89.1	91.00	91.00	95.23	93.1	ماده خشک (درصد) Dry Matter (%)
13.30	16.5	44.00	11.3	4.41	14.5	پروتئین خام (درصد) Crude Protein (%)
2.18	2.50	3.1	3.00	1.5	2.1	انرژی قابل متابولیسم (مگاکالری بر کیلوگرم)[2] Metabolizable Energy (Mcal/Kg)[2]
32.20	46.00	9.00	20.86	7.75	43.86	الیاف نامحلول در محلول شوینده خنثی (درصد ماده خشک) Neutral Detergent Fiber (% of Dry Matter)
20.31	13.00	6.00	7.00	53.00	32.56	الیاف نامحلول در محلول شوینده اسیدی (درصد ماده خشک). Acid detergent fiber (% of Dry Matter)
2.03	0.05	0.28	0.063	0.06	1.8	کلسیم (درصد) Calcium (%)
0.24	0.24	0.70	0.38	0.07	0.19	فسفر (درصد) Phosphorus (%)
324.3	471.89	74.42	471.92	78.26	492.48	آهن (پی‌پی‌ام) Iron (ppm)
2.65	18.70	16.74	18.82	7.15	20.13	روی (پی‌پی‌ام) Zinc (ppm)
7.09	2.90	2.87	2.8	5.20	15.55	مس (پی‌پی‌ام) Copper (ppm)
0.06						سلنیوم (پی‌پی‌ام) Selenium (ppm)
1.61						کروم (پی‌پی‌ام) Chromium (ppm)

۱-جیره پایه حاوی: یونجه (٤٢ درصد)، کاه جو(۲۸ درصد)، دانه جو (۱۹/۲۰ درصد)، کنجاله سویا (۳ درصد)، سبوس گندم (۷/۵ درصد)، نمک طعام (۰/۳ درصد) است؛ ۲- انرژی قابل متابولیسم بر اساس مگاکالری بر کیلوگرم ماده خشک است که با استفاده از جداول NRC (۲۰۰۷) برآورد شده است.

1. Basal diet contains: Alfalfa hay (42%), Barely straw (28%), Barely grain (19.20%), Soybean meal (3%), Wheat Bran (7.5%), NaCl (0.3%); 2. Metabolizable energy as Mcal/Kg was estimated by using NRC (2007).

در طول آزمایش قوچ‌ها در یک سالن سر پوشیده و مجهز به قفس‌های انفرادی به ابعاد ۲×۱ متر با کف سیمانی نگه داری شدند. قبل از ورود قوچ‌ها به سالن، عملیات شستشو و ضد عفونی شامل شعله افکنی و آهک‌پاشی انجام شده بود. هر قفس به یک آخور و آب‌خوری پلاستیکی جهت عرضه آب و خوراک مجهز بود. خوراک و آب تازه به‌راحتی و به‌صورت انفرادی در اختیار قوچ‌ها قرار می‌گرفت. قبل از شروع آزمایش دوره عادت‌پذیری به‌مدت ۱۲ روز و طول دوره آزمایش اصلی ٦٠ روز به طول انجامید. درصد ماده خشک و پروتئین خام اقلام خوراک بر اساس روش انجمن رسمی شیمی‌دانان کشاورزی (۱۰) و درصد الیاف نامحلول در شوینده خنثی و درصد الیاف نامحلول در شوینده اسیدی با استفاده از روش ون سوست تعیین شد (۲۳). انرژی قابل متابولیسم جیره‌های آزمایشی نیز با استفاده از جداول انجمن ملی تحقیقات (۲۰۰۷) برآورد شد (۱۸). برای اندازه‌گیری غلظت مواد معدنی موجود در خوراک‌ها، از روش هضم خشک استفاده شد (٢٦).

در این آزمایش عامل‌ها شامل: دو سطح سلنیوم (صفر و ٦٠٠ میکروگرم سلنیوم به‌شکل سلنیوم-مخمر در روز به ازای هر راس قوچ)، دو سطح کروم (صفر و ١٠٠٠ میکروگرم کروم به‌شکل کروم-متیونین در روز به ازای هر راس قوچ) و ٤ سطح زمان (صفر، ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت پس از ذخیره‌سازی اسپرم) بودند. کروم و سلنیوم به‌صورت روزانه و قبل از وعده غذایی صبح به قوچ‌ها داده می‌شد. مکمل کروم به شکل کروم-متیونین با نام تجاری آویلا کروم-١٠٠٠ بود که از شرکت سنا دام پارس تهیه شد. مکمل سلنیوم آلی به شکل مخمر سلنیوم با نام تجاری سلماکس-٢٠٠٠ بود که از شرکت بیوریجین برزیل تهیه شد. در این آزمایش مکمل کروم توزین و درون پوکه‌های کپسول خوراکی، به دام‌ها خورانده شد. مکمل سلنیوم نیز پس از توزین و حل کردن در آب مقطر به کمک مایع‌خوران (درنچر) به قوچ‌ها خورانده شد.

قبل از شروع آزمایش، قوچ‌ها برای اسپرم‌گیری به کمک واژن مصنوعی عادت‌دهی شدند. پس از آن که قوچ‌ها برای یک دوره تقریبی اسپرماتوژنز (که در قوچ حدود ٤٧ روز است) تیمار خوراکی دریافت کردند، از ٤ رأس قوچ در هر تیمار اسپرم‌گیری صورت گرفت. عملیات اسپرم‌گیری از قوچ‌ها ٣ بار (هر هفته یک بار) تکرار شد. مایع منی استحصال شده از قوچ‌ها ابتدا ارزیابی اولیه شد. برای این منظور نمونه‌های با حجم بالاتر از ٠/٧٥ میلی‌لیتر، غلظت بیشتر از $٢/٥\times١٠^{٩}$ در هر میلی‌لیتر، جنبایی کل بیشتر از ٨٠ درصد و اسپرم‌های غیرطبیعی کمتر از ١٠ درصد انتخاب شدند. مایع منی استحصال شده از قوچ‌های هر تیماربه نسبت مساوی باهم مخلوط سپس با استفاده از رقیق کننده گرم (٣٧ درجه سانتی‌گراد)، که شامل تریس، فروکتوز، اسید سیتریک، زرده تخم مرغ، پنی‌سیلین، استرپتومایسین و آب مقطر (جدول٢) بود، رقیق شد تا غلظت نهایی اسپرم به ٢٠٠×١٠^{٦} اسپرم در هر میلی‌لیتر برسد (٥).

جدول ٢. ترکیبات رقیق کننده برای نگهداری مایع منی قوچ‌ها در شرایط سرد در دمای ٤ °C (٥).

Table 2. The basic extender ingredients to store ram semen in chilled condition at 4°C

ترکیبات Composition	مقدار (در ١٠٠ میلی‌لیتر) Amount (in 100 ml)
تریس (گرم)؛ Tris (g)	2.71
فروکتوز (گرم)؛ Fructose (g)	1.00
اسید سیتریک (گرم)؛ Citric Acid (g)	1.4
پنی‌سیلین (واحد بین المللی)؛ Penicilin (IU)	100000
استرپتومایسین (میکروگرم)؛ Streptomycin (µg)	100000
زرده تخم مرغ (درصد)؛ Egg Yolk (%)	20

اسمولاریته: ٣٢٠ میلی‌اسمول در لیتر؛ pH=٧/٠٠

Osmolarity: 320 milliosmole per liter pH=7.00

نمونه‌های منی مربوط به هر گروه تیماری، بعد از رقیق‌سازی در درون ظرف حاوی آب ٣٧°C قرار گرفت و سپس به‌درون یخچال با دمای ٤ درجه سانتی‌گراد منتقل و به‌مدت ٧٢ ساعت نگهداری شدند. درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها، درصد یکپارچگی غشای اسپرم و فراسنجه‌های حرکتی در زمان‌های صفر، ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت بعد از ذخیره‌سازی مورد ارزیابی قرار گرفت. در هر یک از زمان‌های ذکر شده، ابتدا کل نمونه به‌طور کامل و به آرامی مخلوط شد. سپس بخشی از نمونه منی به درون میکروتیوپ منتقل و در آب ٣٥ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ١٥ دقیقه قرار گرفت و سپس فراسنجه‌های کیفی منی ارزیابی شدند.

برای تعیین درصد زنده‌مانی اسپرم و درصد اسپرم-های با ریخت‌شناسی غیرطبیعی، از روش رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده گردید (۵). ارزیابی و شمارش اسپرم‌های رنگ‌آمیزی شده با استفاده از میکروسکوپ نوری (Genus, China) و با بزرگنمایی ٤٠٠x صورت گرفت. در هر لام حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های زنده و درصد اسپرم‌های با ریخت‌شناسی غیرطبیعی تعیین شد.

یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم با استفاده از آزمون تورم هایپواسموتیک (تست هاس) ارزیابی شد. محلول هاس شامل ۰/۹ گرم فرکتوز و ۰/٤۹ گرم سیترات سدیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر بود (٦). برای این منظور ۱۰ میکرولیتر از منی ذخیره شده به ۵۰۰ میکرولیتر محلول هاس اضافه و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از انکوباسیون، نمونه با ملایمت مخلوط و یک قطره از آن روی لامی که قبلا در دمای $37\ ^{\circ}C$ گرم شده بود قرار گرفت و با لامل پوشانده شد. اسپرم‌های با دم متورم و گره خورده به‌عنوان اسپرم دارای غشای سالم و اسپرم‌هایی که دم آن‌ها صاف بود به‌عنوان اسپرم دارای غشای آسیب دیده و ناسالم در نظر گرفته شد. ارزیابی و شمارش اسپرم با استفاده از میکروسکوپ نوری فاز کنتراست (Genus, China) و با بزرگنمایی ٤٠٠x صورت گرفت. در هر لام حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های با غشای سالم تعیین شد.

به منظور ارزیابی الگوی سینماتیک سلول‌های اسپرم، مانند جنبایی کل اسپرم، جنبایی پیش‌رونده، مسیرهای حرکتی اسپرم و سرعت آن در هر یک از مسیرها از سامانه کامپیوتری ارزیابی اسپرم (کاسا) مجهز به نرم‌افزار Sperm VideoTest (St, Petersburg, Russia) (نسخه ۳/۱) استفاده شد. برای این منظور ابتدا ۵۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم ذخیره شده با ۹۵۰ میکرولیتر محیط پایه رقیق‌کننده (جدول ۲) رقیق می-شد (به نسبت ۱ به ۲۰) و پس از ۱۵ دقیقه، ۷ میکرولیتر از آن بر روی لام از پیش گرم شده قرار داده شد و با یک لامل (۲۲×۲۲ میلی‌متر) پوشانده شد. سپس به کمک میکروسکوپ فازکنتراست (Labomed LX400 Labo America Inc., Fremont, USA) مجهز به صفحه گرم، فراسنجه‌های حرکتی ارزیابی گردید. جهت بررسی فراسنجه‌های حرکتی اسپرم‌ها، از هر فیلد میکروسکوپی توسط کاسا به‌مدت دو ثانیه با سرعت ۲۵ فریم در ثانیه فیلم‌برداری شد. فراسنجه-های حرکتی مورد بررسی در این پژوهش شامل جنبایی کل[1]، جنبایی پیشرونده[2]، سرعت در مسیر منحنی[3]، سرعت در مسیر مستقیم[4]، سرعت در مسیر میانگین[5] و میزان معیار مستقیم‌الخط بودن حرکت[6] بودند.

این پژوهش به‌صورت آزمایش فاکتوریل ٤×۲×۲ در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام شد. داده‌های مربوط به صفات مورد بررسی در این پژوهش با استفاده از نرم افزار SAS (نسخه ۹/٤) و رویه GLM تجزیه و تحلیل شد. مدل آماری استفاده شده به صورت ذیل بود:

$$Y_{ijklm}= \mu+B_l + Se_i + Cr_i + T_k + Se_iCr_i + Se_iT_k + Cr_iT_k + Se_iCr_iT_k+e_{ijklm}$$

که در مدل آماری فوق مولفه‌ها به ترتیب از چپ به راست شامل میانگین، هفته آزمایش، سطح سلنیوم، سطح کروم، زمان، برهمکنش سلنیوم و کروم، سلنیوم و زمان، کروم و زمان، سلنیوم وکروم و زمان، خطای آزمایشی می‌باشند.

نتایج

نتایج اثر افزودن مکمل‌های کروم و سلنیوم به جیره، بر میزان زنده‌مانی، یکپارچگی غشا و

1. Total Motility
2. Progresive Motlility
3. Velocity in Curvilinear Line: VCL
4. Velocity in Straight Line: VSL
5. Velocity in Straight Line: VSL
6. Straightness: STR

ریخت‌شناسی غیر طبیعی اسپرم‌ها و همچنین فراسنجه‌های حرکتی تعیین شده توسط کاسا پس از ذخیره‌سازی در دمای ٤ °C در جدول ۳ نشان داده شده است.

زنده‌مانی اسپرم‌ها: برهم کنش سطوح مختلف سلنیوم × کروم برای زنده‌مانی اسپرم‌ها معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). بنابراین اثرات اصلی باهم مقایسه نشد. در مقایسه ترکیب تیماری سطوح مختلف سلنیوم × کروم، کمترین میزان زنده‌مانی مربوط به سلنیوم صفر× کروم صفر (شاهد) بود (P<۰/۰۵). افزودن ٦۰۰ میکروگرم سلنیوم و یا ۱۰۰ میکروگرم کروم به جیره شاهد، میزان زنده‌مانی را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش داد (P<۰/۰۵). تاثیر کروم بر حفظ قابلیت زنده‌مانی اسپرم‌ها بیشتر از سلنیوم بود (P<۰/۰۵). استفاده توام سلنیوم و کروم قابلیت زنده‌مانی اسپرم‌ها را نسبت به سلنیوم تنها بیشتر حفظ کرد اما تفاوت معنی‌داری با کروم تنها نداشت (P>۰/۰۵). پس می‌توان نتیجه گرفت که افزودن کروم و سلنیوم به جیره در این پژوهش در حفظ زنده‌مانی اسپرم‌ها موثر است اما نقش کروم از سلنیوم بیشتر است.

زنده‌مانی اسپرم‌ها با گذشت زمان به‌طور معنی‌داری از زمان صفر تا ۷۲ ساعت پس از ذخیره-سازی کاهش یافت (P<۰/۰۵). برهم کنش سطوح مختلف سلنیوم × زمان، برای صفت زنده‌مانی معنی-داری نبود (P>۰/۰۵) اما برهم کنش سطوح مختلف کروم × زمان معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). علاوه بر آن برهم کنش سطوح مختلف سلنیوم × کروم× زمان نیز معنی‌دار بود. بنابراین ترکیب تیماری آنها باهم مقایسه شده است. در مقایسه ترکیب تیماری سطوح مختلف سلنیوم × کروم × زمان، تفاوت معنی‌داری ٢٤ پس از ذخیره‌سازی اسپرم‌ها بین تیمارها وجود نداشت اما در زمان ٤٨، کمترین میزان زنده‌مانی مربوط به سلنیوم صفر× کروم صفر (شاهد) بود (P<۰/۰۵). افزودن ٦۰۰ میکروگرم سلنیوم و یا ۱۰۰ میکروگرم کروم به جیره شاهد، میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها را ٤٨ ساعت پس از ذخیره‌سازی در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش داد (P<۰/۰۵). تاثیر کروم بر حفظ قابلیت زنده‌مانی اسپرم‌ها ٤٨ ساعت پس از ذخیره‌سازی بیشتر از سلنیوم بود (P<۰/۰۵). استفاده توام سلنیوم و کروم قابلیت زنده‌مانی اسپرم‌ها را ٤٨ ساعت پس از ذخیره‌سازی نسبت به سلنیوم تنها در همین زمان بیشتر حفظ کرد اما تفاوت معنی‌داری با کروم تنها نداشت (P>۰/۰۵). پس می‌توان نتیجه گرفت که افزودن ۱۰۰۰ میکروگرم کروم و ٦۰۰ میکروم سلنیوم به جیره قوچ‌ها باعث می‌شود تعداد اسپرم‌های کمتری در طی فرایند ذخیره‌سازی سرد بمیرند و بنابراین باعث می شود میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها ٤٨ ساعت پس از ذخیره‌سازی در دمای ٤ درجه سانتی گراد بالاتر از تیمار شاهد باشد.

میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها ۷۲ ساعت پس از ذخیره‌سازی در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در تیمار حاوی سلنیوم تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت (P>۰/۰۵). میزان اسپرم‌های زنده در تیمار حاوی کروم، ۷۲ ساعت پس از ذخیره‌سازی، بیشتر از سلنیوم بود (P<۰/۰۵). استفاده توام سلنیوم و کروم، زنده‌مانی اسپرم‌ها را ۷۲ساعت پس از ذخیره‌سازی نسبت به کروم تنها در همین زمان افزایش نداد (P>۰/۰۵). بطور کلی می‌توان نتیجه گرفت که اگر چه افزودن کروم و سلنیوم به جیره قوچ‌ها باعث می‌شود تعداد اسپرم‌های کمتری در طی فرایند ذخیره‌سازی سرد از بین بروند اما قابلیت زنده‌مانی آنها با گذشت زمان، در تیمار کروم بهتر از تیمار سلنیوم حفظ می‌شود.

جدول ۳- قابلیت زنده مانی، سلامت غشاء، ریخت‌شناسی غیر طبیعی و فراسنجه های تعیین شده توسط کاسا در اسپرم‌های ذخیره شده در دمای ۴°C[1].

Table 3. Viability, membrane integrity, abnormal morphology and CASA detected parameters in sperm cells stored at 4°C[1]

STR (%)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	PM (%)	TM (%)	abMOR (%)	HOST (%)	Viab (%)	عامل‌ها Factors	
									Selenium (ppm) سلنیوم (پی‌پی‌ام)؛	اثر مستقل سلنیوم
67.45	66.70	46.94	166.71	51.43	91.47	11.73	78.81 ^{b}	88.32	0	
67.85	64.93	38.96	166.68	51.83	90.35	11.78	79.67^{a}	88.66	600	
1.30	1.81	3.15	5.45	2.27	0.83	0.03	0.22	0.23	SEM	
0.83	0.49	0.07	0.96	0.90	0.34	0.23	0.01	0.30	P Value	
									Chromium (ppm) کروم (پی‌پی‌ام)؛	اثر مستقل کروم
68.43	65.95	40.15	166.55	53.3	90.97	11.72	78.72^{b}	86.47^{b}	0	
66.87	65.67	45.75	166.88	49.95	90.85	11.79	79.76^{a}	90.50^{a}	1000	
1.30	1.81	3.15	5.45	2.27	0.83	0.03	0.22	0.38	SEM	
0.40	0.91	0.21	0.96	0.30	0.91	0.17	0.01	0.01	P Value	
									Time (h) زمان (ساعت)؛	اثر مستقل زمان
64.25	77.15^{a}	51.71^{a}	186.22^{a}	49.25	96.04^{a}	11.81	85.72^{a}	95.98^{a}	0	
68.87	77.18^{a}	46.45^{a}	172.70^{ab}	55.70	93.33^{a}	11.78	81.26^{b}	92.89^{b}	24	
68.91	61.44^{b}	40.72^{ab}	154.18^{b}	53.08	89.25^{b}	11.73	76.70^{c}	86.39^{c}	48	
68.58	53.48^{c}	32.73^{b}	153.79^{b}	48.50	85.04^{c}	11.70	73.28^{d}	78.68^{d}	72	
1.85	2.55	4.04	7.71	3.21	1.18	0.04	0.32	0.32	SEM	
0.23	0.01	0.03	0.01	0.36	0.05	0.43	0.01	0.01	P Value	
									Se×Cr intraction ؛ ترکیب Se×Cr	
68.62	67.21	48.02	166.58	53.87	92.12	11.65^{b}	78.76^{b}	85.93^{c}	$Se_0 \times Cr_0$	اثر متقابل سلنیوم و کروم
66.29	66.18	32.29	166.53	52.75	89.83	11.81^{a}	78.68^{b}	87.01^{b}	$Se_{600} \times Cr_0$	
68.25	64.69	45.86	166.94	49.00	90.83	11.80^{a}	78.86^{b}	90.71^{a}	$Se_0 \times Cr_{1000}$	
67.45	65.17	45.63	166.83	50.91	90.87	11.77^{ab}	80.67^{a}	90.30^{a}	$Se_{600} \times Cr_{1000}$	
1.85	2.55	4.40	7.71	3.21	1.18	0.04	0. 32	0.53	SEM	
0.67	0.76	0.08	0.99	0.63	0.32	0.04	0.01	0.02	P Value	
									Se×T intraction؛ ترکیب Se×T	
64.58	78.22	51.45	188.72	48.50	95.91	11.76	86.03	96.00	$Se_0 \times T_0$	اثر متقابل سلنیوم و زمان
68.25	72.03	52.05	173.10	55.08	93.50	11.73	80.71	92.92	$Se_0 \times T_{24}$	
69.33	64.69	48.73	158.64	54.66	90.66	11.70	75.66	85.84	$Se_0 \times T_{48}$	
67.66	51.84	35.53	146.79	47.50	85.83	11.72	72.85	78.42	$Se_0 \times T_{72}$	
63.91	76.09	51.94	183.74	50.00	96.16	11.86	85.43	95.97	$Se_{600} \times T_0$	
69.50	70.32	40.85	172.30	56.33	93.16	11.83	81.81	92.87	$Se_{600} \times T_{24}$	
68.50	58.19	32.70	149.90	51.50	87.83	11.76	77.74	86.85	$Se_{600} \times T_{48}$	
69.50	55.12	30.32	160.79	49.50	84.25	11.69	73.71	78.94	$Se_{600} \times T_{72}$	

ادامه جدول ۳ : **Countinued from table 3**

										ترکیب Cr×T؛ Cr×T intraction
	2.44	3.48	6.08	10.24	4.30	1.58	0.06	0.51	0.90	SEM
	0.95	0.61	0.57	0.74	0.93	0.79	0.71	0.11	0.66	P Value
اثر متقابل کروم و زمان	65.91	78.12	55.03	183.72	52.91	95.66	11.88	85.86^{a}	95.73^{a}	$Cr_0 \times T_0$
	68.66	59.68	39.46	169.42	54.66	92.50	11.71	80.56^{b}	92.37^{b}	$Cr_0 \times T_{24}$
	69.83	62.09	36.24	151.50	55.00	89.66	11.74	75.44^{d}	84.14^{d}	$Cr_0 \times T_{48}$
	69.33	55.00	29.94	161.59	50.66	86.08	11.66	73.03^{e}	73.64^{e}	$Cr_0 \times T_{72}$
	62.58	76.19	48.40	188.73	45.58	96.41	11.83	85.59^{a}	96.24^{a}	$Cr_{1000} \times T_0$
	69.08	73.76	53.48	175.99	56.75	94.16	11.85	81.96^{b}	93.41^{b}	$Cr_{1000} \times T_{24}$
	68.00	60.79	45.19	156.86	51.16	88.83	11.72	77.97^{c}	88.64^{c}	$Cr_{1000} \times T_{48}$
	67.83	51.96	35.92	145.98	46.33	84.00	11.76	73.53^{e}	83.73^{e}	$Cr_{1000} \times T_{72}$
	2.43	3.47	6.25	10.28	4.26	1.51	0.06	0.49	0.53	SEM
	0.91	0.66	0.40	0.70	0.77	0.68	0.61	0.05	0.01	P Value
										ترکیب تیماری Se×Cr×T؛ Se×Cr×T intraction
اثر متقابل سلنیوم، کروم و زمان	65.16	80.17	52.74	191.33	50.83	96.16	11.66	86.99^{a}	96.22^{a}	$Se_0 \times Cr_0 \times T_0$
	66.66	76.07	56.26	176.11	55.00	95.16	11.91	84.73^{bc}	95.23^{bc}	$Se_{600} \times Cr_0 \times T_0$
	64.00	76.027	49.16	186.08	49.16	95.66	11.86	85.02^{bc}	95.78^{a}	$Se_0 \times Cr_{1000} \times T_0$
	61.16	76.11	47.68	191.38	45.00	97.16	11.80	86.15^{ab}	96.07^{a}	$Se_{600} \times Cr_{1000} \times T_0$
	69.33	68.94	51.16	166.03	56.66	93.00	11.62	80.59^{d}	92.03^{c}	$Se_0 \times Cr_0 \times T_{24}$
	68.00	68.24	27.68	172.80	52.66	92.00	11.80	80.53^{d}	92.73^{c}	$Se_{600} \times Cr_0 \times T_{24}$
	67.16	75.12	52.94	180.16	53.50	94.00	1.84	80.82^{d}	93.83^{bc}	$Se_0/Cr_{1000}/T_{24}$
	71.00	72.40	54.04	171.81	60.00	94.33	11.86	83.09^{c}	93.01^{c}	$Se_{600}/Cr_{1000} \times T_{24}$
	70.66	63.70	47.79	152.99	56.33	91.66	11.69	74.65^{f}	82.46^{f}	$Se_0 \times Cr_0 \times T_{48}$
	69.00	60.49	24.70	150.00	53.66	87.66	11.80	76.23^{ef}	85.83^{e}	$Se_{600} \times Cr_0 \times T_{48}$
	68.00	65.69	49.69	163.92	53.00	89.66	1.72	76.68^{e}	89.41^{d}	$Se_0 \times Cr_{1000} \times T_{48}$
	68.00	55.89	40.71	149.80	49.33	88.00	11.72	79.26^{d}	87.87^{d}	$Se_{600} \times Cr_{1000} \times T_{48}$
	69.33	56.05	39.36	155.96	51.66	87.66	11.63	72.80^{g}	73.03^{g}	$Se_0 \times Cr_0 \times T_{72}$
	69.33	53.96	20.52	147.73	49.66	84.50	11.69	73.25^{g}	74.27^{g}	$Se_{600} \times Cr_0 \times T_{72}$
	66.00	47.64	31.69	137.62	43.33	84.00	11.82	72.90^{g}	83.82^{f}	$Se_0 \times Cr_{1000} \times T_{72}$
	66.69	56.28	40.15	154.35	49.33	84.00	11.69	74.16^{g}	83.92^{f}	$Se_{600} \times Cr_{1000} \times T_{72}$
	3.69	5.11	8.81	15.43	6.43	2.35	0.09	0.64	0.64	SEM
	0.81	0.65	0.59	0.83	0.79	0.99	0.87	0.02	0.02	P Value

۱. Viab (زنده‌مانی)، HOST (تست تورم هیپواسموتیک)، abMOR (ریخت شناسی غیرطبیعی)، TM (جنبایی کل)، PM (جنبایی پیشرونده)، VCL(سرعت در مسیر منحنی)، VSL (سرعت در مسیر مستقیم)، VAP (سرعت در مسیر میانگین)، STR (میزان معیار مستقیم‌الخط بودن حرکت) و SEM (انحراف استاندارد میانگین‌ها). حروف متفاوت در هر ستون در هر بخش نشان دهنده تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

1. Viab (viability), HOST (Hyposmotic soweling test), abMOR (abnormal morphology), Total motility (TM), Progresive motility (PM), Velocity in Curvilinear Line (VCL), Velocity in Straight Line (VSL), Velocity in Average Path (VAP), Straightness (STR), SEM (standard error of means). Different letters in each column and each part show statistically significant difference at 5%.

سلامت غشاء اسپرم‌ها: برهم کنش سطوح مختلف سلنیوم × کروم برای سلامت غشاء اسپرم‌ها معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). بنابراین فقط ترکیب تیماری این دو مقایسه شده است. در ترکیب تیماری سطوح مختلف سلنیوم × کروم، بیشترین میزان سلامت غشاء مربوط به سلنیوم ۶۰۰ × کروم ۱۰۰۰ بود (P<۰/۰۵). افزودن ۶۰۰ میکروگرم سلنیوم تنها و یا ۱۰۰ میکروگرم کروم تنها به جیره شاهد، میزان سلامت غشاء را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد تحت تاثیر قرار نداد (P<۰/۰۵) اما استفاده توام سلنیوم و کروم میزان

سلامت غشاء اسپرم‌ها را نسبت به سایر تیمارها بیشتر حفظ کرد (P<۰/۰۵). پس می‌توان نتیجه گرفت که ۱۰۰۰ میکروگرم کروم و ٦۰۰ میکروم سلنیوم به تنهایی در حفظ سلامت غشاء اسپرم‌ها نقش نداشت اما استفاده توام سلنیوم و کروم میزان سلامت غشاء اسپرم‌ها را افزایش داد.

میزان سلامت غشاء اسپرم‌ها با گذشت زمان به‌طور معنی‌داری از زمان صفر تا ۷۲ ساعت پس از ذخیره‌سازی کاهش یافت (P<۰/۰۵). برهم کنش سطوح مختلف سلنیوم × زمان، برای این صفت معنی‌داری نبود (P>۰/۰۵) اما برهم کنش سطوح مختلف کروم × زمان معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). علاوه بر آن برهم کنش سطوح مختلف سلنیوم × کروم× زمان نیز معنی‌دار بود بنابراین ترکیب تیماری آنها باهم مقایسه شده است. در مقایسه ترکیب تیماری سطوح مختلف سلنیوم × کروم × زمان، میزان سلامت غشاء اسپرم‌ها ٢٤ پس از ذخیره سازی، در تیمار کروم ۱۰۰۰× سلنیوم ٦۰۰ بالاتر از سایر تیمارها بود. در زمان ٤٨، کمترین میزان سلامت غشاء مربوط به سلنیوم صفر× کروم صفر (شاهد) بود اما افزودن ٦۰۰ میکروگرم سلنیوم به جیره شاهد، میزان سلامت غشاء اسپرم‌ها را ٤٨ ساعت پس از ذخیره‌سازی در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش نداد (P<۰/۰۵). تاثیر کروم بر میزان سلامت غشاء اسپرم‌ها ٤٨ ساعت پس از ذخیره‌سازی بیشتر از شاهد بود اما تفاوتی با سلنیوم نداشت (P<۰/۰۵). استفاده توام سلنیوم و کروم میزان سلامت غشاء اسپرم‌ها را ٤٨ ساعت پس از ذخیره‌سازی نسبت به سلنیوم تنها و کروم تنها بیشتر حفظ کرد (P<۰/۰۵). پس می‌توان نتیجه گرفت که افزودن کروم به تنهایی به جیره قوچ‌ها باعث می‌شود آسیب غشایی اسپرم‌ها با گذشت زمان طی فرایند ذخیره‌سازی سرد کاهش یابد اما زمانی که همراه با سلنیوم استفاده می‌شود آسیب غشایی اسپرم‌ها بطور معنی‌داری کمتر می‌شود. میزان سلامت غشاء اسپرم‌ها ۷۲ ساعت پس از ذخیره‌سازی در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد تفاوت معنی‌داری بین تیمارها نشان نداد (P>۰/۰۵). بطور کلی می‌توان نتیجه گرفت که اگر چه افزودن کروم و سلنیوم به جیره قوچ‌ها باعث می‌شود سلامت غشاء اسپرم‌ها در طی فرایند ذخیره‌سازی افزایش یابد اما کروم و سلنیوم با طولانی‌تر شدن زمان ذخیره‌سازی نمی‌توانند سلامت غشاء اسپرها را حفظ نمایند.

ریخت شناسی غیرطبیعی اسپرم‌ها: برهم کنش سطوح مختلف سلنیوم × کروم برای ریخت‌شناسی غیرطبیعی اسپرم‌ها معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). بنابراین فقط ترکیب تیماری این دو عامل مقایسه شده است. در ترکیب تیماری سطوح مختلف سلنیوم × کروم، میزان ریخت‌شناسی غیرطبیعی اسپرم‌ها در تیمار سلنیوم صفر × کروم صفر به‌طور معنی داری کمتر از تیمار سلنیوم ٦۰۰ × کروم صفر و تیمار سلنیوم صفر × کروم ۱۰۰۰ بود (P<۰/۰۵). اما استفاده توام سلنیوم و کروم تاثیر معنی‌داری بر میزان ریخت‌شناسی غیرطبیعی اسپرم‌ها در مقایسه با سایر تیمارها نداشت (P>۰/۰۵). پس می‌توان نتیجه گرفت که ممکن است استفاده از که ۱۰۰۰ میکروگرم کروم و ٦۰۰ میکروم سلنیوم به تنهایی در جیره قوچ‌ها بر ریخت‌شناسی غیرطبیعی اسپرم‌ها هنگام ذخیره‌سازی سرد موثر باشد.

ریخت شناسی غیرطبیعی اسپرم‌ها با گذشت زمان از زمان صفر تا ۷۲ ساعت پس از ذخیره‌سازی تحت تاثیر زمان قرار نگرفت (P>۰/۰۵). علاوه بر آن برهم کنش سطوح مختلف سلنیوم × زمان، همچنین برهم کنش سطوح مختلف کروم × زمان و برهم کنش سطوح مختلف سلنیوم × کروم× زمان برای صفت میزان ریخت شناسی غیرطبیعی اسپرم‌ها معنی‌داری نبود (P>۰/۰۵، جدول ۳).

فراسنجه‌های حرکتی تعیین شده توسط کاسا: در بررسی فراسنجه‌های حرکتی تعیین شده توسط کاسا، مشخص گردید که میزان جنبایی کل، سرعت در مسیر منحنی، سرعت در مسیر مستقیم و سرعت در مسیر میانگین با گذشت زمان به‌طور معنی‌داری از زمان صفر تا ۷۲ ساعت پس از ذخیره‌سازی کاهش می‌یابد (P<۰/۰۵) اما جنبایی پیشرونده و میزان معیار مستقیم‌الخط بودن حرکت تحت زمان قرار نگرفت. اثر مستقل سطوح مختلف سلنیوم و کروم برای فراسنجه‌های مذکور معنی‌دار نبود. برهم کنش سطوح مختلف سلنیوم × زمان، کروم × زمان و سطوح مختلف کروم× سلنیوم × زمان برای فراسنجه‌های مذکور معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).

بحث

سلنیوم از طریق بیان طیف گسترده‌ای از سلنوپروتئین‌ها، نقش‌های متنوع فیزیولوژیک در بدن حیوانات دارد. این عنصر به‌عنوان کوفاکتور آنزیم‌های مهم آنتی‌اکسیدانتی، مانند گلوتاتیون پراکسیداز نقش مهمی در جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدهای غیراشباع غشاء اسپرم در برابر رادیکال‌های آزاد دارد (۸ و۱۳). کمبود تغذیه‌ای سلنیوم و یا اختلال در جذب آن از دستگاه گوارش، موجب کاهش توان آنتی‌اکسیدانتی در مایع منی و سلول‌های اسپرم می‌شود که علاوه بر کاهش کیفیت مایع منی تازه انزال شده، ممکن است قابلیت آن را برای نگهداری (سرد یا منجمد) کاهش دهد. بنابراین غشاء این نوع اسپرم‌ها طی فرایند نگهداری زودتر آسیب دیده و جنبایی اسپرم و نقص‌های مرفولوژیکی افزایش یافته و باروری آن پس از تلقیح کاهش می‌یابد (۸ و۲۱). در بررسی پژوهش‌های پیشین، در مورد اثر مکمل‌سازی جیره با سلنیوم و کروم آلی بر خصوصیات کیفی سلول‌های اسپرم قوچ پس از نگهداری سرد در دمای ٤ °C مستندات علمی یافت نشد. در یک مطالعه، افزودن ۰/۱ پی‌پی‌ام سلنیوم به جیره گاوهای نر برانگوس به‌مدت ٦۰ روز، بر فراسنجه‌های اسپرم تازه انزال شده و یخگشایی شده پس از انجماد، موثر نبود (۲۱). در مطالعه دیگری افزودن ۰/۵ پی‌پی‌ام سلنیوم آلی از نوع سلینوم مخمر، باعث افزایش سطح گلوتاتیون سلول‌های اسپرم خوک نر شد اما درصد زنده‌مانی اسپرم‌های ذخیره شده در دمای ۱۵ درجه‌سانتی‌گراد را پس از ۷۲ ساعت بهبود نداد (۱۳) که با نتایج این پژوهش مغایرت داشت. علت این مغایرت ممکن است به نوع گونه حیوانی و دمای نگهداری اسپرم مربوط شود. تغذیه بوقلمون‌های نر با سلینوم آلی و نگهداری اسپرم آن‌ها در دمای ٤ °C، میزان جنبایی سلول‌های اسپرم‌ها را پس از نگهداری افزایش داد (۸). در پژوهش دیگری نیز افزودن نانوذرات سلنیوم به جیره خروس‌های نژاد لگهورن، خصوصیات کیفی مایع منی را بهبود بخشید و آسیب‌های اکسیداتیو را کاهش داد (۱۹). افزودن سلنیوم به جیره خرگوش در سطحی بالاتر از احتیاجات، باعث افزایش غلظت گلوتاتیون پراکسیداز در گلبول قرمز، سلول‌های اسپرم و پلاسمای منی شد اما، هنگامی که اسپرم‌های تیمار دریافت کننده سلنیوم برای مدت ٢٤ ساعت در دمای ٥°C نگهداری شد، درصد زندمانی اسپرم‌ها پس از ٢٤ ساعت نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد (٦) و با نتایج پژوهش حاضر مغایر بود.

برای توضیح علل نتایج متناقض در پژوهش‌های مختلف، چندین فاکتور را می‌توان در نظر گرفت. در ابتدا مهم‌ترین عامل تاثیرگذار را می‌توان میزان نیاز بدن به سلنیوم دانست. مطالعاتی که اثرات مثبتی بر زنده‌مانی، مرفولوژی، میزان جنبایی اسپرم، فعالیت آنتی‌اکسیدانتی و قابلیت باروری گزارش کرده‌اند عمدتاً در حیواناتی بود که دارای کمبود سلنیوم

بوده‌اند. در برخی مطالعات، با وجود عدم کمبود سلنیوم در حیوان، بهبود کیفیت مایع منی گزارش شده است. به‌عنوان مثال افزودن سلنیوم به جیره قوچ‌هایی که جیره پایه آن‌ها کمبود سلنیوم نداشت موجب بهبود کیفیت مایع منی شد (۱۲). نتایج مشابهی نیز در خروس گزارش شده است (۲۰). مطالعات مختلف علت آن را تفاوت گونه‌ای در متابولسیم سلنیوم پیشنهاد کرده‌اند (۱۲و ٤). با وجود کمبود مستندات علمی، پیشنهاد شده است که نیاز برخی گونه‌های حیوانی مانند خرگوش به سلنیوم، کم بوده (٤) و نیاز برخی گونه‌ها مانند قوچ بالا (۱۲) است. بر این اساس ممکن است افزودن سلنیوم به جیره قوچ‌ها بتواند اثرات منفی کمبودهای حاشیه‌ای سلنیوم بر کیفیت منی و قابلیت آن برای ذخیره‌سازی را کاهش دهد. بنابراین بهبود زنده‌مانی اسپرم‌ها در این پژوهش را می‌توان به اثر مثبت افزودن سلنیوم آلی به جیره قوچ‌ها ارتباط داد.

سازوکار اثر کروم بر تولید مثل به‌طور واضح مشخص نیست. گزارش شده است که کروم می‌تواند به‌واسطه تغییر در حساسیت سلول‌های هدف نسبت به هورمون انسولین، سامانه تولید مثلی را تحت تاثیر قرار دهد (۲۲). اکثر پژوهش‌های انجام شده در مورد کروم، بیشتر بر تولید مثل در جنس ماده متمرکز بوده است. مستندات علمی در رابطه با اثر کروم بر تولید مثل در گاو نر، قوچ و بز موجود نیست. گزارش شده است که مکمل‌سازی جیره موش‌های نر با کروم منجر به افزایش تعداد اسپرم و همچنین افزایش در میزان باروری می‌گردد (۱). در پژوهشی در خوک نشان داده شد که افزودن کروم پیکولینات به جیره خوک نر تاثیری بر غلظت اسپرم و جنبایی آن ندارد، اما باعث کاهش حجم انزال می‌شود و کروم ممکن است اثر مثبت خود را به صورت کاهش تعداد اسپرم‌های غیر نرمال نشان دهد (۱۱). در پژوهش دیگری افزودن ۷۵۰ پی‌پی‌ام کروم پیکولینات به جیره بوقلمون‌های نر، غلظت، جنبایی، زنده‌مانی و باروری اسپرم‌ها را به‌طور معنی‌داری افزایش داد. در حالی‌که حجم انزال تحت تاثیر قرار نگرفت (۳). گزارش شده است که افزودن کروم به جیره قوچ‌ها میزان ناهنجاری اسپرم‌های تازه انزال شده را نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد (١٤). در پژوهش حاضر نشان داده شد که افزودن ۱۰۰۰ میکروگرم کروم به جیره غذایی قوچ‌ها به‌طور معنی‌داری باعث افزایش درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها ۷۲ ساعت پس از نگهداری در دمای $٤\ ^{\circ}C$ نسبت به سطح صفر کروم می‌شود.

پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند که کروم علاوه بر اینکه به‌عنوان یک لیگاند برای رسپتورهای انسولین عمل می‌کند دارای خواص آنتی اکسیدانتی نیز است و از پراکسیداسیون لیپیدها جلوگیری می‌کند (۷ و ١٦). از کروم به‌عنوان یک استراتژی درمانی موثر برای به حداقل رساندن تنش‌های اکسیداتیو در بیماران دیابتی نوع-۲ استفاده می‌شود (۷). مکانیسمی که کروم به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت عمل می‌کند. هنوز به‌طور کامل شناخته نشده است. با این وجود نتایج تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که افزودن کروم به جیره غذایی باعث کاهش میزان مالون دی‌آلدهید سرم (شاخص پراکسیداسیون لیپید) خون می‌گردد (۷). گزارش شده است که مصرف مکمل کروم در قوچ‌ها به‌طور معنی‌داری باعث کاهش غلظت مالون‌دی‌آلدهید در پلاسما خون نسبت به تیمار شاهد می‌شود (١٤). نشان داده شده است که اختلال در عملکرد انسولین باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود، احتمالاً کروم اثر آنتی‌اکسیدانتی خود را از طریق تنظیم عملکرد انسولین اعمال می‌کند (۷).

در مطالعه‌ای نشان داده شد که غلظت پلاسمایی گلوکز در قوچ‌های تغذیه شده با کروم، ۱۵ دقیقه پس

از تزریق درون رگی گلوکز، کمتر از تیمار شاهد است که نشان دهنده بهبود متابولیسم گلوکز توسط مکمل کروم است (١٤). ممکن است مکانیسم تاثیر کروم بر کیفیت اسپرم را به‌توان این‌گونه توجیه کرد که، کمبود کروم از طریق اختلال در عملکرد انسولین باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدها می‌گردد و کیفیت مایع منی انزالی را برای نگهداری کاهش می‌دهد اما زمانی که حیوان کمبود کروم نداشته باشد، احتمالاً اختلالی در میزان تولید اسپرم و کیفیت آن مشاهده نمی‌شود. در این پژوهش ممکن است مکمل کروم از طریق بهبود عملکرد انسولین، اثرات مثبت خود را بر کیفیت اسپرم‌های تولید شده اعمال کرده است.

در این پژوهش استفاده توأم کروم و سلنیوم در جیره قوچ‌ها نسبت به استفاده سلنیوم و کروم به تنهایی، تاثیر معنی‌داری بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم پس از ذخیره سازی آن در دمای ٤ درجه سانتیگراد نداشت. در مورد استفاده توام سلنیوم و کروم بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم مستندات علمی بسیار کمی وجود دارد. همچنین در مورد تاثیر استفاده توأم سلنیوم و کروم در جیره قوچ، بر قابلیت نگهداری مایع منی در شرایط سرد مستندات علمی یافت نشد.

نشان داده شده است که افزودن توأم سلنیوم و کروم به جیره قوچ‌های نژاد مهربان تاثیر مثبتی بر برخی فراسنجه‌های کیفی اسپرم بلافاصله پس از انزال دارد (١٤). در آزمایشی نشان داده شد که در بره‌های در حال رشد نژاد رامبویه، با افزودن کروم به جیره حاوی سلنیوم (سطوح صفر و ٠/٣ پی‌پی‌ام سلنیوم به شکل سلنیوم مخمر)، سبب کاهش خطی اوره و افزایش خطی انسولین و تری‌گلیسرید پلاسمای خون گردید اما غلظت گلوکز، کورتیزول، هورمون‌های تیروئیدی تحت تاثیر قرار نگرفت (٩). در مطالعه دیگری نیز گزارش شده است که مکمل‌سازی جیره میش‌ها با کروم-متیونین و سلنیوم-متیونین موجب کاهش معنی‌داری در غلظت مالون دی‌آلدهید پلاسمای خون میش‌ها می‌شود (١٥). به‌هر حال استفاده توام کروم و سلنیوم دارای اثرات ناشناخته بر تولیدمثل حیوان نر است که نیازمند تحقیقات بیشتر است.

نتیجه‌گیری کلی

افزودن کروم و سلنیوم به جیره قوچ‌ها باعث شد تعداد اسپرم‌های کمتری در طی فرایند ذخیره‌سازی سرد از بین بروند و سلامت غشاء آنها بیشتر حفظ شود اما فراسنجه‌های حرکتی تعیین شده توسط کاسا تحت تاثیر قرار نگرفت. همچنین قابلیت زنده‌مانی اسپرم‌ها با گذشت زمان، در تیمار کروم بهتر از تیمار سلنیوم حفظ شد. استفاده توام سلنیوم و کروم میزان سلامت غشاء اسپرم‌ها را نسبت به استفاده تنها از کروم و سلنیوم افزایش داد و اثر متقابل هم‌افزایی مثبتی بین سلنیوم و کروم برای حفظ سلامت غشاء در طول مدت نگهداری منی وجود دارد. به‌طور کلی ممکن است استفاده از سلنیوم و کروم آلی در جیره قوچ‌ها قابلیت نگهداری اسپرم برای تلقیح مصنوعی را افزایش دهد.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

منابع

1. Anderson, R.A. and Polansky, M.M. 1981. Dietary chromium deficiency effect on sperm count and fertility in rats. Biological Trace Element Research. 3(1):1-5.
2. Arangasamy, A., Krishnaiah, M.V., Manohar, N., Selvaraju, S., Rani, G.P., Soren, N.M., Reddy, I.J. and Ravindra, J.P. 2018. Cryoprotective role of organic Zn and Cu supplementation in goats (*Capra hircus*) diet. Cryobiology. 81:117-24.

3. Biswas, A., Divya, S., Mandal, A.B., Majumdar, S. and Singh, R. 2014. Effects of dietary supplementation of organic chromium (picolinate) on physical and biochemical characteristics of semen and carcass traits of male turkeys. Animal Reproduction Science. 151(3-4):237-43.
4. Blas, C. and Wiseman, J., editors. 2010. Nutrition of the Rabbit. CABI.
5. Bucak, M.N., Bodu, M., Başpınar, N., Güngör, Ş., İli, P., Acibaeva, B., Topraggaleh, T.R. and Dursun, Ş. 2019. Influence of Ellagic Acid and Ebselen on sperm and oxidative stress parameters during liquid preservation of ram semen. Cell Journal (Yakhteh). 12(1):7-13.
6. Castellini, C, Lattaioli, P., Dal Bosco, A. and Beghelli, D. 2002. Effect of supranutritional level of dietary α-tocopheryl acetate and selenium on rabbit semen. Theriogenology. 58(9):1723-32.
7. Cheng, H.H., Lai, M.H., Hou, W.C. and Huang, C.L. 2004. Antioxidant effects of chromium supplementation with type 2 diabetes mellitus and euglycemic subjects. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52(5):1385-9.
8. Dimitrov, S.G., Atanasov, V.K., Surai, P.F. and Denev, S.A. 2007. Effect of organic selenium on turkey semen quality during liquid storage. Animal Reproduction Science. 100(3-4):311-7.
9. Domínguez-Vara, I.A., González-Muñoz, S.S., Pinos-Rodríguez, J.M., Bórquez-Gastelum, J.L., Bárcena-Gama, R., Mendoza-Martínez, G., Zapata, L.E. and Landois-Palencia, L.L. 2009. Effects of feeding selenium-yeast and chromium-yeast to finishing lambs on growth, carcass characteristics, and blood hormones and metabolites. Journal of Animal Feed Science and Technology. 152(1-2):42-9.
10. Helrich, K. 1990. Official methods of analysis of the AOAC International. Association of Official Analytical Chemists.
11. Horký, P., Jančíková, P. and Zeman, L. 2013. The effect of a supplement of chromium (picolinate) on the level of blood glucose, insulin activity and changes in laboratory evaluation of the ejaculate of breeding boars. Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis. 60(1):49-56.
12. Kendall, N.R., McMullen, S., Green, A. and Rodway, R.G. 2000. The effect of a zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus on trace element status and semen quality of ram lambs. Animal Reproduction Science. 62(4):277-83.
13. Martins SM, De Andrade AF, Zaffalon FG, Bressan FF, Pugine SM, Melo MP, Chiaratti MR, Marino CT, Moretti AS, Arruda RP. 2015. Organic selenium supplementation increases PHGPx but does not improve viability in chilled boar semen. Andrologia. 47(1):85-90.
14. Mehranfrooz, A.H., Farahavar, A., Ahmadi, A. and Yavari, M. 2018. Effect of selenium and chromium supplementation on semen characteristics, glucose metabolism and some blood parameters in Mehraban rams. Bu-Ali Sina University. MSc Thesis.
15. Mousaie, A., Valizadeh, R., Naserian, A.A., Heidarpour, M. and Mehrjerdi, H.K. 2014. Impacts of feeding selenium-methionine and chromium-methionine on performance, serum components, antioxidant status, and physiological responses to transportation stress of Baluchi ewe lambs. Biological Trace Element Research. 162(1-3):113-23.
16. Onderci, M., Sahin, N., Sahin, K. and Kilic, N. 2003. Antioxidant properties of chromium and zinc. Biological trace element research. 92(2):139-49.
17. Ramachandran, N., Singh, N.P., Ranjan, R., Singh, M.K., Shinde, A.K. 2016. Assessment of rearing systems and seasons on nutrient intake and semen freezability in Jamunapari bucks. Indian Journal of Animal Science. 86:1259-62.
18. National Research Council (US). 2007. Committee on Nutrient Requirements of Small Ruminants, Board on Agriculture, Division on Earth, Life Studies. Nutrient Requirements of small Ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids.

19. Safa, S., Moghaddam, G., Jozani, R.J. and Daghigh Kia, H. 2016. Janmohammadi H. Effect of vitamin E and selenium nanoparticles on post-thaw variables and oxidative status of rooster semen. Animal Reproduction Science. 174:100-6.
20. Surai, P., Kostjuk, I., Wishart, G., Macpherson, A., Speake, B., Noble, R., Ionov, I. and Kutz, E. 1998. Effect of vitamin E and selenium supplementation of cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testes, and liver. Biological Trace Element Research. 64(1-3):119-32.
21. Tsuneda, P.P., Tsuneda, B.H., Hatamoto-Zervoudakis, L.K., Zervoudakis, J.T., Marinho, W.A., Júnior, D., Ferreira, M., Araújo, E.B., Motheo, T.F. and Silva, L.E. 2019. Suplementação de selênio na dieta e qualidade espermática do sêmen de touros brangus. Ciência Animal Brasileira. 20.
22. Tuormaa, T.E. 2000. Chromium, selenium and copper and other trace minerals in health and reproduction. Journal of Orthomolecular Medicine.15(3):145-56.
23. Van Soest, P.V., Robertson, J.B. and Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science. 74(10):3583-97.
24. Vázquez-Armijo, J.F., Rojo, R., López, D., Tinoco, J.L., González, A., Pescador, N. and Domínguez-Vara, I.A. 2011. Trace elements in sheep and goats reproduction: A review. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 14(1):1-3.
25. Vincent, J. 2018. The nutritional biochemistry of chromium (III). Elsevier.
26. Zhang, W., Wang, R., Kleemann, D.O., Lu, D., Zhu, X., Zhang, C. and Jia, Z. 2008. Effects of dietary copper on nutrient digestibility, growth performance and plasma copper status in cashmere goats. Small Ruminant Research. 74(1-3): 188-193.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Ruminant Research, Vol. 8(3), 2020
http://ejrr.gau.ac.ir

The effect of dietary supplementation of organic selenium and chromium on Mehraban ram semen quality during liquid storage at 4°C

P. Saremi shahab[1], *A. Farahavar[2], K. Zaboli[2], A. Ahmadi[2] and M. Yavari[3]
[1]M.Sc. Graduated, [2]Assistant Prof., Dept. of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran, [3]Assistant Prof., Dept. of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
Received: 03/23/2020; Accepted: 06/24/2020

Abstract

Background and objective: Some previous researches have shown that dietary supplementation with some vitamins and trace elements can increase the ability of animals semen preservation during liquid storage or freezing. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of dietary supplementation of organic selenium and chromium on ram semen quality during liquid storage at 4°C.

Material and methods: Numbers of 16 Mehraban rams, with ages ranging from 2-4 years and 69.75 ± 10.44 kg average body weight, were divided into four groups of four and were fed by a basal diet consist of 70% forage and 30% concentrate. The experimental design was 2 × 2 × 4 factorial experiment based on randomized complete block design. The experiment lasted for 60 days. In this experiment, three factors were including selenium at two levels (0 and 600 µg/day/ram selenium as yeast-selenium), chromium at 2 levels (0 and 1000 µg/day/ram chromium as chromium-methionin) and time at 4 levels (0, 24, 48 and 72 hours after storage). Chromium was fed to rams using edible capsule shells and also selenium by drencher after dissolving in distilled water. In the last three weeks of the experiment, semen samples were collected three times. Semen samples after collection was diluted with tirs-egg yolk base extender and stored at 4°C for 72 h. Sperm cells viability, membrane integrity, abnormal morphology, total motility and progressive motility and some motion parameters is detected by computer-assisted sperm analysis at 0, 24, 48, and 72 hours after storage.

Results: The effects of chromium, time and their interaction and also selenium × chromium interaction, selenium × chromium × time interaction were significant for sperm viability and membrane integrity ($P<0.05$). The effect of selenium and selenium × chromium interaction was not significant for viability ($P>0.05$) but, the effect of chromium, selenium and time and also their interaction for membrane integrity was significant ($P<0.05$). The viability reduced over time significantly ($P<0.05$) and sperm viability in rams receiving the diet contained 1000 µg chromium, was higher than diet without chromium after storage at 4°C for 48 and 72 hours ($P<0.05$). In addition, sperm viability in rams receiving the diet contained 600 µg selenium was higher than diet without selenium after storage at 4°C for 48 hours ($P<0.05$). Adding 1000 µg chromium to diet containing 600 µg selenium, increased significantly sperm viability after storage at 4°C for 48 and 72 hours ($P<0.05$). The membrane integrity reduced over time significantly ($P<0.05$) and sperm membrane integrity in rams receiving the diet contained 1000 µg chromium was higher than other groups after storage at 4°C for 24 and 48 hours ($P<0.05$). The effect of selenium and chromium and also their interaction was not significant for computer detected parameters ($P<0.05$). Interaction of selenium and chromium for abnormal morphology was significant ($P<0.05$) but the effects of chromium, selenium, time and their interaction was not significant ($P>0.05$). Total motility, velocity in curvilinear line, velocity in straight line,

*Corresponding author; a.farahavar@basu.ac.ir; farahavar@gmail.com

velocity in average path decreased over time during semen storage at 4°C ($P<0.05$) and diet supplementation of selenium and chromium did not change these parameters ($P>0.05$). Progressive motility, abnormal morphology and straightness did not affected by time, selenium and chromium.

Conclusion: Generally, dietary supplementation of organic selenium and chromium in rams leads to increased sperm viability and membrane integrity during chilled liquid storage. Dietary supplementation of selenium and chromium did not change computer detected parameters during semen storage at 4°C. In general, the use of organic selenium and chromium in the diet of rams may increase the ability of sperm storage for artificial insemination.

Keywords: Chromium, Ram, Selenium, Sperm