Iranian Journal of Animal Science
Vol 52, No 3, Autumn 2021 (177-188)
DOI: 10.22059/ijas.2021.324395.653830

علوم دامی ایران
دورۀ ۵۲، شمارۀ ۳، پاییز ۱۴۰۰ (ص ۱۸۸-۱۷۷)

مقاله پژوهشی:

بررسی آثار تغذیه‌ای لسیتین سویا و ویتامین E بر شاخص‌های کیفی اسپرم در خروس‌های اجداد هوبارد

شهرام شعبانی[۱]، مرتضی مهری [۲*]، فاطمه شیرمحمد[۲] و محسن شرفی[۳]
۱ و ۲. دانشجوی دکتری و استادیار، گروه علوم دامی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳. استادیار، گروه علوم دام و طیور، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۸ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۴/۱۵)

چکیده

با به‌کارگیری ۳۶ قطعه خروس اجداد هوبارد در سن ٤٥ هفتگی، آزمایشی با هدف بررسی اثر ویتامین E و لسیتین سویا در خوراک، بر برخی فراسنجه‌های کیفی و کمی اسپرم طراحی شد. آزمایش در طی ٦٠ روز و با چیدمان فاکتوریل (۲×۲) در قالب طرح کاملا تصادفی با دو سطح لسیتین (صفر و یک درصد در هر کیلوگرم خوراک) و دو سطح ویتامین E (صفر و ۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خوراک) انجام گرفت. اسپرم‌گیری در روزهای صفر، ۲۰، ٤٠ و ٦٠ آزمایش انجام شد. نتایج نشان داد بالاترین غلظت و بیشترین جنبایی کل در اسپرم خروس‌هایی مشاهده شد که جیره حاوی ویتامین E + لسیتین سویا دریافت کرده بودند (P<۰/۰۵). حجم اسپرم و صفات وابسته به جنبایی نیز تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. همچنین با اینکه تیمارهای آزمایشی اثری بر درصد مورفولوژی غیرنرمال، و درصد اسپرم با DNA آسیب‌دیده نداشت، اما یکپارچگی غشای پلاسمایی، و زنده‌مانی اسپرم تحت تأثیر تیمار حاوی لسیتین سویا + ویتامین E افزایش معنی‌داری یافت. کمترین میزان مالون‌دی‌آلدئید در منی خروس‌هایی یافت شد که همزمان لسیتین سویا و ویتامین E دریافت کرده بودند (P<۰/۰۵). بررسی اثر متقابل زمان× جیره در خصوص صفات جنبایی کل و پیش‌رونده، غلظت اسپرم، زنده‌مانی، یکپارچگی غشا و میزان مالون‌دی‌آلدئید نشان داد که این صفات در روزهای پایانی آزمایش، متأثر از تیمار حاوی ویتامین E + لسیتین سویا بهبود یافتند (P<۰/۰۵). بنظر می‌رسد به‌کارگیری همزمان ویتامین E و لسیتین سویا در جیره خروس‌های مسن، منجر به بهبود وضعیت کیفی اسپرم شود.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، خروس، لسیتین سویا، ویتامین E.

Evaluation of dietary effects of soybean lecithin and vitamin E on sperm quality parameters in Hubbard grandparent roosters

Shahram Shabani[1], Morteza Mehri[2*], Fatemeh Shirmohammad[2] and Mohsen Sharafi[3]
1, 2. Ph.D. Candidate and Assistant Professor, Department of Animal Science, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Assistant Professor, Department of Animal and Poultry Science, Faculty of Agriculture, University of Tarbiat Modares, Tehran, Iran
(Receieved: May 29, 2021 - Accepted: Jul. 6, 2021)

ABSTRACT

Using 36 Hubbard grandparent roosters at 45 weeks of age, the present study investigated the effects of supplementing vitamin E and soybean lecithin in the roosters' diet on their semen quality. The experiment was conducted in a completely randomized design with four treatments including basal diet, basal diet supplemented with vitamin E (300 mg/kg), basal diet supplemented with lecithin (1%), and basal diet supplemented with lecithin & vitamin E. Roosters were fed their diets for 60 days and semen collection was performed on days 0, 20, 40 and 60 of the experiment. The results showed that the treatment containing vitamin E + lecithin significantly improved total sperm motility and sperm concentration (P<0.05). The semen volume and sperm kinematic values were not affected by experimental diets (P>0.05). Although experimental treatments had no effect on abnormal morphology of sperm and DNA fragmentation, but membrane integrity and sperm viability were significantly increased in roosters fed diet supplemented with soybean lecithin and vitamin E (P<0.05). Malondialdehyde (MDA) concentration was also shown to be significantly lower in treatment containing vitamin E and soybean lecithin (P<0.05). The interaction effects of time× diet on total and progressive motility, sperm concentration, viability, membrane integrity and MDA content were significant (P<0.05) and these traits improved in the last days of the experiment due to diet supplemented with vitamin E+ soybean lecithin. Overall, it was concluded that supplementing aged roosters' diet with vitamin E and lecithin appears to improve sperm quality traits.

Keywords: Rooster, soybean lecithin, sperm, vitamin E.

* Corresponding author E-mail: mortezamehri@gmail.com

مقدمه

عوامل مختلفی از جمله ژنتیک، عوامل تنش‌زا، آفلاتوکسیکوزیس و بالا رفتن سن می‌تواند اسپرم را متأثر ساخته و باروری خروس را کاهش دهد (Fouad *et al.,* 2019). در سنین بالاتر از ۴۵ هفتگی، وزن بیضه، سطح تستوسترون، حجم مایع منی، غلظت اسپرم، زنده‌مانی، جنبایی، میزان اسیدهای چرب سیرنشده اسپرم و نیز غلظت آنتی‌اکسیدان‌های آن کاهش می‌یابد، درحالی‌که پراکسیداسیون لیپیدهای پلاسمای منی افزایش می‌یابد (Surai *et al.,* 2019). همسو با این تغییرات، کاهش عملکرد غشای اسپرم، کاهش فعالیت میتوکندری و در نتیجه کاهش باروری رخ می‌دهد (Cerolini *et al.,* 1997). عوامل تغذیه‌ای می‌تواند تأثیر مخرب افزایش سن بر اندام‌های تولید مثلی، صفات مایع منی و باروری خروس را تا حدی تعدیل کند (Fouad *et al.,* 2020).

وجود اکسیژن برای ارگانیسم‌های هوازی ضروری است، اما سبب تولید گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (Reactive Oxygen Species; ROS) از جمله رادیکال‌های آزاد همچون مولکول‌های سوپراکسید، رادیکال‌های هیدروکسیل، پراکسیدها و هیپوکلرو اسید می‌شود (Fulbert & Cals, 1992). گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن نقش مهمی در مسیرهای سیگنال‌دهی فرآیندهای متابولیکی دارند، با این حال، در سطوح بالا سبب اختلالاتی مانند پراکسیداسیون لیپید، شکست DNA، و یا تخریب پروتئین می‌شوند (Fulbert & Cals, 1992). سیستم آنتی‌اکسیدانی (آنزیمی و غیر آنزیمی)، سد دفاعی ارگانیسم‌ها در برابر این تغییرات است. آنزیم‌هایی همچون سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز در این سیستم فعال هستند (Surai *et al.,* 2002). فلاونوئیدها و سایر ترکیبات موجود در غذا از جمله ویتامین E و لسیتین، نیز می‌توانند از اجزای غیر آنزیمی این سیستم دفاعی باشند (Colares *et al.,* 2016; Surai *et al.,* 2019). با این حال، حتی در حضور این سیستم آنتی‌اکسیدانی، ROSها می‌توانند از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول فراتر رفته و منجر به ایجاد شرایطی شوند که از آن با عنوان تنش اکسیداتیو یاد می‌شود (Pruchniak *et al.,* 2016). سلول‌های اسپرم طی روند اسپرماتوژنز، بخش زیادی از سیتوپلاسم خود را به همراه مواد آنتی‌اکسیدانی موجود در آن از دست داده و در برابر تنش اکسیداتیو حساس می‌شوند (Zini *et al.,* 1993). قرارگیری اسپرم در معرض تنش اکسیداتیو، می‌تواند آغازگر روند مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی اسپرم یا آپوپتوزیس بوده و سبب افت صفات کیفی اسپرم شود (Partyka *et al.,* 2010).

یکی از راهکارهایی که می‌تواند سبب بهبود عملکرد تولیدمثل خروس شود، راهکار تغذیه‌ای است؛ دستکاری جیره، از جمله افزودن آنتی‌اکسیدان به جیره، به عنوان روشی برای افزایش کیفیت مایع منی خروس پیشنهاد شده است (Safari Asl *et al.,* 2018). از آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توان به منظور جمع‌آوری و خنثی‌سازی اکسیژن فعال در داخل و خارج سلول، پیشگیری از تولید ROS، و کاهش آپوپتوزیس بهره برد (Surai *et al.,* 2019). بسیاری از ترکیبات خوراکی واجد عملکرد آنتی‌اکسیدانی بوده و وقتی در جیره غذایی قرار می‌گیرند، بین تولید اکسیدان و دفاع آنتی‌اکسیدانی تعادل برقرار می‌کنند؛ لسیتین سویا که در مسیر فرآوری روغن سویا به دست می‌آید از جمله این ترکیبات خوراکی است (Jaldin *et al.,* 2006).

تجویز لسیتین سویا در جیره موش سبب کاهش روند التهابی روده و کاهش تنش اکسیداتیو از طریق کاهش قابل توجه در پراکسیداسیون لیپیدها شد و نیز در تقویت دفاع آنتی‌اکسیدانی مؤثر بود (Colares *et al.,* 2016). استفاده از لسیتین سویا به عنوان منبع لیپوپروتئین در رقیق‌کننده‌های منی مورد توجه قرار گرفته است (Papa *et al.,* 2010) زیرا به نظر می‌رسد استفاده از این منبع گیاهی سبب بهبود کیفیت اسپرم و باروری می‌شود (Akhter *et al.,* 2012). ویتامین E برای اولین بار در مایع منی بوقلمون و پس از آن در منی پرندگان دیگر مانند خروس شناسایی شد (Rengaraj *et al.,* 2015). ویتامین E رادیکال‌های آزاد درون سلولی را حذف نموده و با پیشگیری از تنش اکسیداتیو و مهار پراکسیداسیون لیپید در اسپرم موجب حفظ زنده‌مانی و سلامت غشای اسپرم در مدت‌های طولانی می‌گردد (Surai *et al.,* 2019). در پژوهش حاضر آثار تغذیه‌ای لسیتین سویا و ویتامین E

بر شاخص‌های کیفی اسپرم در خروس‌های اجداد هوبارد مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی تأثیر لسیتین سویا و ویتامین E بر فراسنجه‌های اسپرم خروس اجداد هوبارد، ۲۴ قطعه خروس M99 (خط A)، در سن ۴۵ هفتگی، با میانگین وزن ۴۴۸۰ گرم و ضریب تنوع برابر با ۱۰/۱ درصد به کار گرفته شدند. این آزمایش در طی ۶۰ روز و با چیدمان فاکتوریل (۲×۲) و در قالب طرح کاملا تصادفی، با دو سطح فاکتور لسیتین (صفر و یک درصد در هر کیلوگرم خوراک) و دو سطح فاکتور ویتامین E (صفر و ۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خوراک) انجام گرفت. خروس‌ها در قفس‌های انفرادی با ابعاد (۸۵×۷۰×۷۰ سانتی‌متر) در دمای ۱۸-۲۲ درجه سانتی‌گراد، و برنامه نوردهی ۱۵ ساعت روشنایی و ۹ ساعت خاموشی نگه‌داری شدند. چهار جیره آزمایشی عبارت بودند از جیره حاوی سطوح صفر ویتامین E و لسیتین سویا؛ جیره حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم ویتامین E در هر کیلوگرم خوراک و سطح صفر لسیتین سویا؛ جیره حاوی سطح صفر ویتامین E و یک درصد لسیتین سویا؛ و جیره حاوی یک درصد لسیتین سویا + ۳۰۰ میلی‌گرم ویتامین E در هر کیلوگرم خوراک. جیره‌های آزمایشی ایزوانرژی و ایزونیتروژن بوده و برای تأمین مواد مغذی پیشنهاد شده در راهنمای پرورش مربوطه تنظیم (جدول ۱) و آب به صورت آزاد در اختیار آنها قرار داشت.

خروس‌ها به مدت یک هفته برای جمع‌آوری منی عادت‌دهی شدند، سپس اسپرم‌گیری از خروس به روش ماساژ شکمی (Burrows & Quinn, 1937) در روزهای ۱، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ آزمایش انجام شد. حجم منی با استفاده از ست اندازه‌گیری منی در آزمایشگاه اندازه‌گیری شد. غلظت منی با آب مقطر به نسبت یک به ۲۰۰، به کمک لام نئوبار هموسایتومتر سنجش شد (Shahverdi *et al.,* 2015). اندازه‌گیری شاخص‌های حرکتی اسپرم با استفاده از سیستم آنالیز کامپیوتری اسپرم (CASA) صورت گرفت. برای این منظور ۵ میکرولیتر از منی روی لام مخصوص ریخته شد، لام مورد نظر با استفاده از میکروسکوپ CASA بررسی شد. پس از بررسی نمونه منی توسط نرم‌افزار CASA، داده‌های جنبایی و همچنین داده‌های وابسته به جنبایی توسط این برنامه ثبت گردید (Long *et al.,* 2010).

برای اندازه‌گیری زنده‌مانی اسپرم از کیت Annexin V-FITC برای تشخیص جابجا شدن فسفاتیدیل سرین از لایه داخلی به لایه بیرونی غشای پلاسمایی سلول به عنوان شاخص آپوپتوزیس اسپرم استفاده شد. به این منظور نمونه‌های منی با بافر کلسیم شستشو و غلظت به ۱×۱۰^{۶} اسپرم در هر میلی‌لیتر رسانده شد و ۱۰ میکرولیتر Annexin-V به ۱۰۰ میلی‌لیتر نمونه اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه که نمونه‌ها در دمای اتاق انکوبه شدند، ۱ میکرولیتر Propidium Iodide (PI) به هر نمونه اضافه شده و نمونه توسط دستگاه فلوسایتومتری خوانده شد (Lotfi *et al.,* 2017).

جدول ۱. اقلام خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره مصرفی خروس‌ها

Table 1. Ingredients and the chemical composition of diets fed to roosters

Ingredients	Basal diet (%)*	Diet with Lecithin (%)*
Corn	60	60
Soybean meal (44%)	7.28	7.15
Wheat	7.20	4.07
Barley	9	9
Wheat bran	12.65	14.89
Vitamin & Mineral permix**	0.6	0.6
Oyster shell	1.48	1.52
DCP	1.33	1.25
DL-methionine	0	0.05
Common salt	0.46	0.46
Lecithin	0	1
Contents by calculation		
ME (kcal/kg)	2800	2800
CP (%)	12.22	12.20
Calcium (%)	0.9	0.9
Available P (%)	0.39	0.39
Methionine (%)	0.26	0.26
Lysine (%)	0.49	0.49
TSAA (%)	0.46	0.46

* جهت تهیه جیره‌های حاوی ویتامین، ۳۰۰ میلی‌گرم ویتامین E به هر کیلوگرم از جیره‌های مندرج در جدول افزوده شد.

** مقدار ویتامین‌ها و مواد معدنی در هر کیلوگرم خوراک عبارت بود از: ویتامین آ، ۱۳۲۰۰ واحد بین‌المللی؛ ویتامین د ۳، ۴۲۰۰ واحد بین‌المللی؛ ویتامین ای، ۱۲۰ واحد بین‌المللی؛ ویتامین کا ۳، ۶ میلی‌گرم؛ نیاسین، ۶۶ میلی‌گرم؛ ریبوفلاوین، ۱۴/۴ میلی‌گرم؛ تیامین، ۳ میلی‌گرم؛ پانتوتنیک اسید، ۱۸ میلی‌گرم؛ اسید فولیک، ۲/۴ میلی‌گرم؛ پیریدوکسین، ۴/۸ میلی‌گرم؛ ب ۱۲، ۰/۰۴ میلی‌گرم، بیوتین، ۰/۳ میلی‌گرم؛ آهن (سولفات آهن)، ۶۰ میلی-گرم؛ منگنز (سولفات منگنز)، ۱۴۸ میلی‌گرم؛ روی (اکسید روی)، ۱۲۰ میلی-گرم؛ مس (سولفات مس)، ۱۲ میلی‌گرم؛ ید (یدید پتاسیم)، ۲/۴ میلی‌گرم؛ و سلنیوم (سلنیت سدیم)، ۰/۳۶ میلی‌گرم.

* To prepare the diets containing vitamin E, 300 mg of vitamin/kg was added to these diets.

** Supplied per kg of diet: vitamin A, 13,200 IU; vitamin D3, 4200 IU; vitamin E, 120 IU; vitamin K3, 6 mg; niacin, 66 mg; riboflavin, 14.4 mg; thiamin, 3.0 mg; pantothenic acid, 18 mg; folic acid, 2.4 mg; pyridoxine, 4.8 mg; vitamin B12, 0.04 mg, and biotin, 0.3 mg. Fe (FeSO4·H2O), 60 mg; Mn ($MnSO_4 \cdot H_2O$), 148 mg; Zn (ZnO), 120 mg; Cu ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), 12 mg; iodine (KI), 2.4 mg; and Se (Na_2SeO_3), 0.36 mg.

به منظور ارزیابی مورفولوژی اسپرم و تعیین درصد اسپرم‌های طبیعی و غیرطبیعی از روش رنگ‌آمیزی هانکوک استفاده شد (Najafi *et al.,* 2019). برای ارزیابی اسپرم‌های غیرطبیعی حداقل ۳ قطره از هر نمونه به میکروتیوب‌های حاوی ۱ سی‌سی محلول هانکوک (متشکل از ۶۲/۵ ml فرمالین ۳۷٪؛ ۱۵۰ ml بافر PBS؛ و ۵۰۰ ml آب دوبار تقطیر) افزوده شد و سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفته و توسط یک لامل پوشانده شد و با شمارش حداقل ۴۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگ‌نمایی ۴۰۰، درصد اسپرم‌های غیرطبیعی محاسبه شد. میانگین سه مشاهده به عنوان یک داده واحد در نظر گرفته شد.

از آزمایش هاس جهت بررسی یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم استفاده شد (Lotfi *et al.,* 2017). آزمایش هاس بر اساس اسمولاریتی محیطی که اسپرم در آن قرار می‌گیرد عمل می‌کند. اسمولاریتی محیط هاس ۱۰۰ میلی اسمولار و اسمولاریته مورد نیاز برای اسپرم ۴۲۵ میلی اسمولار است. بنابراین اسپرم زنده با قرار گرفتن در یک محیط با اسمولاریتی پایین به سرعت واکنش می‌دهد و انتهای دم آن‌ها گره می‌خورد. برای انجام این آزمایش۵µl منی با ۵۰µl محلول هایپواسمتیک (۱۰۰mOsm/l، ۵۷/۶mM فروکتوز و ۱۹/۲mM سیترات سدیم) مخلوط شد. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون، اسپرم‌ها در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست (E200، نیکون، توکیو، ژاپن) بررسی شدند.

غلظت مالون‌دی‌آلدهید (MDA) بعنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید منی، اندازه‌گیری شد. در این روش، یک ملکول MDA با دو ملکول تیوباربیتوریک اسید واکنش داده و فرآورده این واکنش که بیشترین جذب را در طول موج ۵۳۲ نانومتر دارد بوسیله اسپکتروفتومتر (UV-۱۲۰۰، Shimadzu، ژاپن) تعیین شد (Esterbauer *et al.,* 1991).

برای تشخیص شکست DNA از آزمون رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج و بر اساس نفوذ این رنگ به DNA شکسته شده اسپرم و از طریق میکروسکوپ فلورسنت (المپیوس؛ BX51؛ توکیو، ژاپن؛ بزرگنمایی ۴۰۰) استفاده شد. اکریدین اورنج نوعی رنگ انتخابی برای اسیدهای نوکلئیک است. این رنگ به DNA متصل شده و در اثر اتصال سبب انتشار رنگ سبز فلورسانس در طول موج ۵۲۵ نانومتر می‌شود. این روش برای جداسازی DNA سالم و دو رشته‌ای از DNA دی‌نیچر شده تک‌رشته‌ای به کار می‌رود. اسپرم با DNA سالم و اسپرم با DNA آسیب‌دیده بعد از رنگ‌آمیزی در زیر میکروسکوپ فلورسنت، به ترتیب به رنگ سبز و نارنجی مشاهده می‌شوند. تعداد اسپرم‌هایی که رنگ نارنجی را نشر می‌دهند به عنوان درصد شکست DNA شمارش می‌شوند (Chohan *et al.,* 2004).

داده‌های مربوط به فراسنجه‌های اسپرم در روزهای یک، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ گردآوری و اطلاعات مربوط به روز یک، به عنوان عامل کواریت در نظر گرفته شد. جهت بررسی نرمال بودن داده‌ها، پیش از آنالیز، آزمون شاپیرو-ویلک با استفاده از رویه UNIVARIATE انجام شد. همچنین در صورت نیاز، تبدیل arc-sine روی داده‌های درصدی انجام شد. سپس با استفاده از رویه MIXED برای اندازه‌گیری‌های تکرار شده و رویه GLM برای داده‌های تکی با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹,۱ (SAS Institute Inc., Cary, NC) آنالیز انجام گرفت. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون توکی-کرامر استفاده شد.

نتایج و بحث

در این پژوهش آثار افزودن لسیتین و/یا ویتامین E به جیره بر ویژگی‌های اسپرم خروس‌های اجداد هوبارد مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور لسیتین (دارای دو سطح صفر و ۱٪) و ویتامین E (با دو سطح صفر و ۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) با تکرار در زمان (چهار سطح روزهای ۱، ۲۰، ۴۰ و ۶۰) انجام شد. نتایج مربوط به متغیرهای حرکتی اسپرم شامل درصد اسپرم جنبا (Total motility)، درصد اسپرم جنبای پیش‌رونده (Progressive motility)، سرعت جنبایی در مسیر منحنی (Curvilinear Velocity; VCL)، درصد خطی‌بودن جنبایی (Linearity; LIN) و جنبایی عرضی سر اسپرم (Amplitude of Lateral Head Displacement; ALH) در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲. اثر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های حرکتی اسپرم خروس اجداد (میانگین± انحراف معیار)

Table 2. Effects of experimental diets on sperm motility characteristics of aged grandparent roosters (mean ± SD)

		Total motility (%)	Progressive motility (%)	VCL (μm/s)	LIN (%)	ALH (μm)
Treatments						
Lecithin	Vit E					
%0	0	85.90^{b}±1.85	40.82^{ab}±2.11	179.48±8.86	40.16±2.91	7.70±1.76
%0	300	87.25^{ab}±4.27	37.83^{b}±3.81	184.29±7.46	40.32±3.52	8.23±1.12
%1	0	86.40^{b}±2.63	38.44^{b}±3.35	189.29±7.18	39.84±2.40	7.83±1.29
%1	300	91.00^{a}±4.06	44.00^{a}±4.69	183.21±9.72	40.32±4.14	8.17±0.77
Main Effects						
Lecithin						
%0		86.50±3.13	38.56±3.33	181.88±8.71	40.45±3.30	7.97±1.49
%1		88.57±4.05	40.37±5.28	186.32±8.78	39.94±3.30	8.00±1.09
Vit E						
0		86.15^{b}±2.23	38.55±3.10	184.46±8.86	40.40±2.80	7.83±1.51
300		89.24^{a}±4.46	40.59±5.59	183.75±8.78	39.92±3.81	8.24±0.94
P-Value						
Lecithin		0.546	0.1090	0.076	0.894	0.437
Time		0.786	0.7774	0.001	0.386	0.026
Vit E		0.016	0.1093	0.616	0.447	0.066
Lecithin × Time		0.129	0.9705	0.313	0.702	0.552
Lecithin × Vit E		0.024	0.0002	0.052	0.150	0.855
Vit E × Time		0.335	0.2395	0.957	0.293	0.190
Lecithin × Vit E × Time		0.229	0.0587	0.808	0.775	0.841

a-b: حروف غیر مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد (P<۰/۰۵).

a-b: Different letters within the same column show significant differences among the groups (P<0.05).

نتایج نشان داد دریافت همزمان لسیتین و ویتامین E سبب افزایش جنبایی اسپرم نسبت به تیمار شاهد شد (P<۰/۰۵)، همین روند تا حدودی در خصوص جنبایی پیش‌رونده نیز مشاهده شد و تیمار حاوی ویتامین E + لسیتین، بالاترین جنبایی پیش‌رونده را سبب شد (P<۰/۰۵)، اگرچه تفاوت آن با تیمار شاهد معنی‌دار نبود. افزودن ویتامین E و لسیتین به جیره بر VCL، LIN و ALH اثر معنی‌داری نداشت. همچنین اثر متقابلی بین "لسیتین در زمان" و نیز "ویتامین در زمان" در خصوص فراسنجه‌های حرکتی اسپرم مشاهده نشد.

جنبایی اسپرم یکی از مهم‌ترین پارامترهای مرتبط با توانایی اسپرم در لقاح بوده (Tsakmakidis, 2010)، و حرکت پیش‌رونده اسپرم همبستگی قابل توجهی با لقاح مصنوعی دارد (Herrara *et al.,* 2004). رادیکال‌های آزاد با تشدید واکنش‌های پراکسیداسیون، سبب تخریب پروتئین‌های غشا و کروماتین اسپرم و سرانجام کاهش جنبایی و توان باروری آن می‌شوند (Zaniboni & Cerolini, 2009). قطعه میانی اسپرم ماکیان به طور قابل توجهی طویل‌تر از قطعه میانی اسپرم دیگر گونه‌ها است و این عامل باعث بیشتر شدن خمیدگی قطعه میانی اسپرم طیور در حضور عوامل مختلف محیطی از جمله رادیکال‌های آزاد می‌شود (Tsukunaga, 1987). افزایش سطح ROS طی یک سری از واکنش‌ها از جمله اکسیداسیون گروه‌های سولفیدریل (-SH) منجر به کاهش فسفریلاسیون پروتئین آکسونمال می‌گردد که این امر باعث کاهش تحرک اسپرم می‌شود (Aitken *et al.,* 2013). فرضیه دیگر این است که پراکسید هیدروژن (یکی از انواع ROS) می‌تواند وارد سیتوپلاسم اسپرم شده و فعالیت برخی از آنزیم‌ها از جمله گلوکز- ۶- فسفات دهیدروژناز (G6PD) که در کنترل ورود گلوکز به مسیر پنتوز فسفات نقش دارد را مهار می‌کند. در پی مهار آنزیم G6PD سطح سلولی NADPH کاهش یافته و در نهایت فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز، که در دفاع آنتی‌اکسیدانی نقش دارد، کاهش می‌یابد. بنابراین میزان پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشای اسپرم افزایش و در نتیجه سیالیت غشا کاهش پیدا می‌کند. نتیجه این تغییرات کاهش جنبایی اسپرم خواهد بود (Aitken *et al.,* 2013).

اگرچه تاکنون پژوهشی در خصوص افزودن لسیتین به جیره خروس انجام نشده است اما مقالات زیادی در زمینه تأثیر دیگر منابع چربی بر صفات تولید مثلی

خروس منتشر شده است. Behnamifar *et al.* (2020) سطوح مختلف آلفا لیپوئیک اسید را در جیره خروس‌های مسن گله مادر به کار گرفته و گزارش کردند که این ترکیب سبب بهبود جنبایی کل و جنبایی پیش‌رونده اسپرم شد. Safari Asl *et al.* (2018) نیز با استفاده از منابع مختلف روغن و برقراری نسبت‌های متفاوت اسید چرب امگا ۳ به امگا ۶ در جیره خروس‌های گله مادر گزارش کردند که نسبت ۰/۱۶ (n3/n6=۰/۱۶) سبب افزایش جنبایی کل اسپرم می‌شود. استفاده از ۶ درصد لسیتین سویا در جیره مرغ Gimmizah (یک سویه دو منظوره) سبب بهبود جوجه‌درآوری و باروری شد (Attia *et al.,* 2009). Attia & Kamel (2012) لسیتین سویا را به مدت ۱۲ هفته در چهار سطح صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد در جیره خرگوش‌های بالغ به کار گرفته و نشان دادند همه تیمارهای حاوی لسیتین نسبت به گروه شاهد، جنبایی کل اسپرم در خرگوش‌ها را به طور معنی‌داری افزایش دادند. همچنین مقالات بسیاری در خصوص آثار مثبت استفاده از رقیق‌کننده‌های بر پایه لسیتین سویا بر بهبود جنبایی اسپرم گونه‌های مختلف منتشر شده است (Akhter *et al.,* 2011، گاومیش؛ Crespilho *et al.,* 2012، گاو؛ Emamverdi *et al.,* 2013، قوچ زندی).

استفاده از مواد آنتی‌اکسیدانی مانند ویتامین E، رادیکال‌های آزاد را کاهش داده و در نتیجه از کاهش جنبایی اسپرم جلوگیری می‌کند. درصد بالای غلظت اسپرم‌های دارای جنبایی پیش‌رونده باعث افزایش میزان باروری در نمونه‌های منی می‌شود (Behnamifar *et al.,* 2020). در مطالعه Mohamad Asrol & Abdul Rashid (2017) گزارش شد که چهار هفته پس از افزودن ۲۰۰ و ۴۰۰ واحد بین‌المللی از ویتامین E به جیره خروس‌ها، جنبایی اسپرم تازه آنها هم‌سو با افزایش ویتامین E افزایش یافت. Khan *et al.* (2012) نیز بهبود باروری خروس‌هایی که ویتامین E دریافت کرده بودند را گزارش کردند. Tabatabaei *et al.* (2011) با بررسی اثر افزودن سطوح مختلف ویتامین E در رقیق‌کننده اسپرم خروس، گزارش کردند که ویتامین E سبب افزایش معنی‌دار جنبایی اسپرم شد.

تاکنون مطالعات متعددی نشان داده است که با افزایش سن خروس، میزان باروری کاهش می‌یابد (Sexton and Renden, 1989; Weil *et al.,* 1999; Hocking and Bernard, 2000). از طرفی افزایش نرخ متابولیک پرنده، سبب افزایش تنش اکسیداتیو شده و این امر به نوبه خود سبب کاهش تحرک اسپرم می‌شود (Rutkowska *et al.,* 2005)، با این حال مکمل ویتامین E از میزان این تنش می‌کاهد (Aydilek *et al.,* 2004). نقش آنتی‌اکسیدانی ویتامین E در مهار آثار زیان‌بار رادیکال‌های آزاد در بیضه و اسپرم مشاهده شده است. ویتامین E می‌تواند سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی سلول‌های بیضه و اسپرم را تقویت کند (Gallardo *et al.,* 2015). رادیکال‌های آزاد روی سلول‌های اسپرم‌ساز موش نر اثر گذاشته و باعث کاهش ساخت اسپرم می‌شود (El-Shenawy *et al.,* 2014). Min *et al.* (2016) در پژوهشی نشان دادند که ویتامین E رادیکال‌های آزاد را حذف و توان باروری خروس را افزایش می‌دهد. در مطالعه Ayinde *et al.* (2012) ویتامین E (۱۵۰mg به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) توانست سبب کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای اسپرم در رت‌های تحت تیمار با سرب شود.

ویژگی‌های ماکروسکوپی، شامل غلظت اسپرم و حجم مایع منی از صفات دیگری بودند که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۳). نتایج نشان داد استفاده همزمان از ویتامین E و لسیتین، سبب افزایش غلظت اسپرم نسبت به دیگر تیمارها شد ($P<۰/۰۵$)، اما در خصوص حجم اسپرم، تفاوتی بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد.

Cerolini *et al.* (2006) بیان داشتند افزودن ۳۰۰ میلی‌گرم ویتامین E به جیره خروس‌های گله مادر سویه کاب، سبب افزایش حجم و غلظت اسپرم می‌شود. Darestani *et al.* (2019) نیز همین نتیجه را با افزودن ۱۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین E به جیره خروس ورامینی گزارش کردند. Attia & Kamel (2012) اثر سطوح صفر، ۰/۵، ۱/۰ و ۱/۵ درصد لسیتین سویا را بر کیفیت منی خرگوش بررسی و گزارش کردند که در گروه‌های مربوط به سطوح ۱ و ۱/۵ درصد لستین سویا، حجم منی و غلظت اسپرم به طور معنی‌داری بیشتر بود.

جدول ۳. اثر تیمارهای آزمایشی بر برخی ویژگی‌های اسپرم خروس اجداد (میانگین± انحراف معیار)

Table 3. Effects of experimental diets on some sperm characteristics of aged grandparent roosters (mean ± SD)

		Semen volume (mL)	Sperm concentration (1×10^9/mL)	DNA Fragmentation (%)	Membrane Integrity (%)	Morphology (%)	Viability (%)	MDA (nmol/mL)
Treatments								
Lecithin	Vit E							
%0	0	0.52±0.24	2.79^{b}±0.22	6.90±2.47	83.60^{b}±4.13	12.53±2.11	84.20^{b}±5.39	2.69^{a}±0.31
%0	300	0.61±0.31	2.74^{b}±0.39	7.00±2.83	83.94^{b}±4.17	12.45±2.28	87.63^{ab}±1.70	2.35^{ab}±0.36
%1	0	0.70±0.25	2.78^{b}±0.25	7.70±1.95	85.16^{ab}±2.90	12.31±2.45	86.60^{ab}±1.90	2.75^{a}±0.34
%1	300	0.57±0.24	3.17^{a}±0.64	5.14±2.03	89.18^{a}±5.57	11.82±2.07	92.11^{a}±5.42	2.00^{b}±0.39
Main Effects								
Lecithin								
%0		0.56±0.32	2.77^{b}±0.30	6.94±2.55	83.78^{b}±4.08	12.49±2.14	85.99^{b}±5.133	2.52±0.38
%1		0.64±0.24	2.97^{a}±0.52	6.47±2.34	86.95^{a}±4.91	12.07±2.42	89.39^{a}±4.809	2.37±0.49
Vit E								
0		0.52±0.28	2.78±0.23	7.30±2.20	84.15±3.74	12.14±2.26	85.68^{b}±4.831	2.72^{a}±0.32
300		0.53±0.24	2.96±0.58	6.00±2.55	86.86±5.05	11.94±2.28	89.71^{a}±4.811	2.18^{b}±0.42
P-Value								
Lecithin		0.111	0.045	0.337	0.009	0.364	0.018	0.131
Time		0.152	0.075	0.998	0.095	0.475	0.295	0.066
Vit E		0.695	0.156	0.913	0.076	0.458	0.021	0.001
Lecithin × Time		0.113	0.266	0.054	0.032	0.065	0.014	0.127
Lecithin × Vit E		0.150	0.047	0.051	0.023	0.273	0.041	0.035
Vit E × Time		0.133	0.173	0.100	0.578	0.584	0.071	0.014
Lecithin × Vit E × Time		0.205	0.654	0.036	0.285	0.074	0.512	0.052

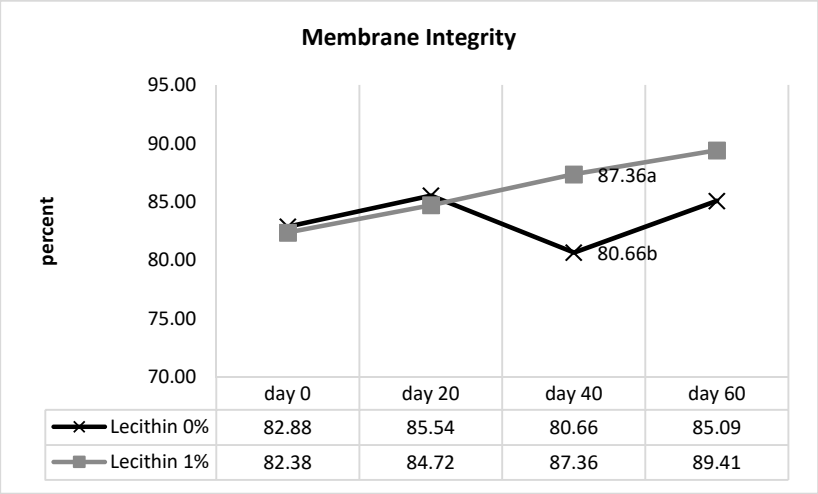
a-b: حروف غیر مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد (P<۰/۰۵).

a-b: Different letters within the same column show significant differences among the groups (P<0.05).

در پژوهش Comhaire *et al.* (2000)، گزارش شد که دریافت آنتی‌اکسیدان خوراکی همچون آلفا توکروفرول، غلظت اسپرم در افراد الیگواسپرم (تعداد یا غلظت کم اسپرم در هر انزال) را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد. بهبود صفات کیفی اسپرم به ارتقاء وضعیت ثبات اکسیداتیو آن مربوط می‌شود (Wang & Wang, 2008) که به نظر می‌رسد در اثر به کارگیری لسیتین سویا (Attia & Kamel, 2012) و ویتامین E (Safari Asl *et al.,* 2018) در جیره خروس‌ها ایجاد شده باشد. با اینحال در پژوهش‌هایی نیز نتایج متضادی حاصل شده است، از جمله Mohamad Asrol & Abdul Rashid (2017) گزارش دادند که افزودن ۲۰۰ و ۴۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین E به جیره خروس‌ها بر حجم و غلظت اسپرم تازه آن‌ها مؤثر نبود. Castellini *et al.* (2003) و Gliozzi *et al.* (2009) نیز در پژوهش‌هایی که روی خرگوش به انجام رساندند، گزارش کردند که ویتامین E بر غلظت و حجم اسپرم بی تأثیر بود.

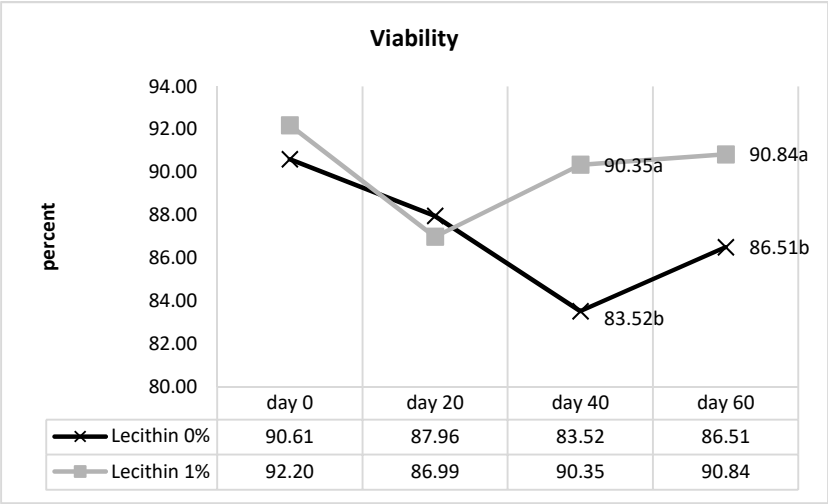
نتایج مربوط به صفات یکپارچگی غشای اسپرم، زنده‌مانی اسپرم، شکست DNA اسپرم، مورفولوژی غیرنرمال در اسپرم، و میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA) مایع منی در جدول ۳ آمده است. بالاترین درصد زنده‌مانی و یکپارچگی غشاء سلولی، و نیز کمترین میزان MDA در اسپرم خروس‌هایی که با جیره حاوی لسیتین+ ویتامین E، تغذیه شدند مشاهده شد (P<۰/۰۵). همچنین داده‌های مربوط به اثر متقابل "زمان در لسیتین" (شکل‌های ۱ و ۲) بیانگر تاثیر مثبت افزودن لسیتین بر افزایش یکپارچگی غشای سلولی در روز ۴۰، و بر درصد زنده‌مانی در روزهای ۴۰ و ۶۰ آزمایش بود (P<۰/۰۵). شکل ۳ نیز بیانگر وجود اثر متقابل "زمان در ویتامین" بر میزان MDA مایع منی در روز پایانی آزمایش بود (P<۰/۰۵). درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیر نرمال و درصد اسپرم‌های دارای DNA آسیب‌دیده تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت.

پژوهش‌ها نشان می‌دهد که زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی از فراسنجه‌های تأثیرگذار در توانایی لقاح اسپرم است، زیرا در صورت تخریب غشای پلاسمایی اسپرم، تغییرات در سطح DNA و پروتئین‌های اسپرم رخ می‌دهد که می‌تواند منجر به عدم توانایی اسپرم برای شرکت در فرآیند لقاح شود (Emamverdi *et al.,* 2013). روند نتایج به دست آمده در این بخش با نتایج به دست آمده از بخش جنبایی هم‌خوانی خوبی دارد که نشان می‌دهد بین جنبایی، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی رابطه مثبتی یافت می‌شود (Shahverdi *et al.,* 2015).



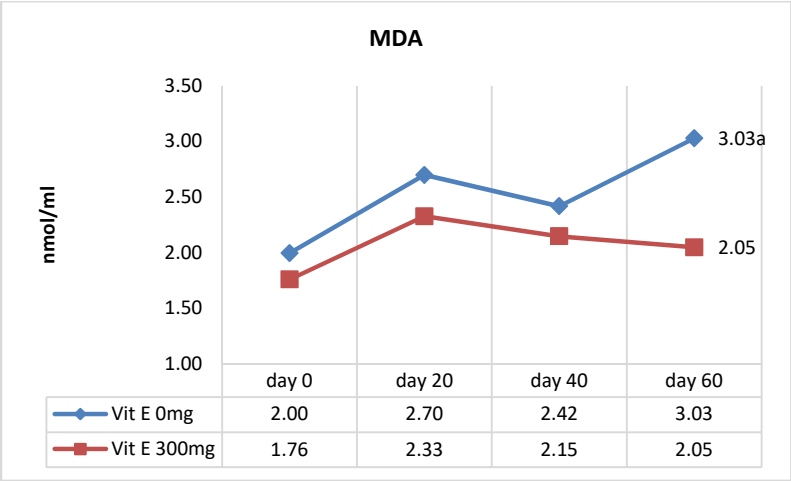
شکل ۱. اثر متقابل زمان × لسیتین بر یکپارچگی غشای اسپرم

Figure 1. Interaction effect of time × lecithin on membrane integrity



شکل ۲. اثر متقابل زمان × لسیتین بر زنده‌مانی اسپرم

Figure 2. Interaction effect of time × lecithin on viability



شکل ۳. اثر متقابل زمان × ویتامین E بر میزان MDA مایع منی

Figure 3. Interaction effect of time × vitamin E on seminal MDA

از عوامل تأثیرگذار در یکپارچگی غشای پلاسمایی، جنس غشای اسپرم می‌باشد که در پرندگان به دلیل وجود مقادیر زیاد اسیدهای چرب سیرنشده (PUFA)، یکپارچگی غشای پلاسمایی حساسیت بالاتری به پراکسیداسیون دارد (Surai *et al.,* 2002). جهت کاهش آسیب‌های ناشی از پراکسیداسیون لیپیدی به غشای اسپرم، علاوه بر آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی موجود در مایع منی، بهتر است از آنتی‌اکسیدان‌هایی با منشأ خارجی استفاده شود (Bansal & Bilaspuri, 2011).

شکست DNA اسپرم با اختلالات مورفولوژیک اسپرم مرتبط بوده و یکی از رایج‌ترین ارزیابی‌ها جهت بررسی سلامت اسپرم، بررسی میزان شکست DNA است (Avendano *et al.,* 2009). در مطالعه حاضر افزودن ویتامین E و لسیتین سویا در جیره غذایی خروس‌ها اثر معنی‌داری بر میزان شکست DNA و نیز درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیر طبیعی نداشت. Adabi *et al.* (2011) با افزودن ۱۵۰ میلی‌گرم ویتامین E در جیره بلدرچین گزارش دادند درصد اسپرم‌های غیرطبیعی و مرده کاهش یافت و دلیل آن را افزایش غلظت آلفاتوکوفرول در منی و کاهش سه برابری پراکسیداسیون لیپیدی آن دانستند. Sanocka & Kurpisz (2004) نشان داد که اضافه کردن ویتامین E به نمونه‌های منی باعث کاهش درصد اسپرم‌های غیرنرمال و افزایش میزان باروری شد. در پژوهش Mohamad Asrol & Abdul Rashid (2017) مشخص شد که افزودن ویتامین E به نمونه‌های منی باعث کاهش اسپرم‌های با دم غیر طبیعی شد. همچنین افزودن لسیتین سویا به جیره خرگوش سبب افزایش زنده‌مانی اسپرم و کاهش اسپرم‌های غیر طبیعی شد (Attia & Kamel, 2012).

بررسی میزان غلظت مالون‌دی‌آلدهید در مایع منی خروس‌ها نشان داد که کمترین غلظت MDA مربوط به خروس‌هایی بود که همزمان لسیتین و ویتامین E دریافت کردند (P<۰/۰۵). مولکول‌های MDA با نفوذ به ساختار غشای سلول، موجب عدم تقارن در توزیع اجزای لیپیدی غشا شده و نیز با ایجاد پیوندهای محکم با DNA سلول، موجب بروز آسیب و شکستگی‌هایی در کروموزوم می‌شوند (Ernster, 1993). براساس نتایج پژوهش حاضر غلظت مالون‌دی‌الدهید مایع منی خروس‌هایی که به جیره‌ی آنها ویتامین E افزوده شده بود، به طور محسوسی از تیمارهای اول و سوم کمتر بود (P<۰/۰۵) با این‌حال همراهی لسیتین و ویتامین E در جیره سبب تشدید کاهش میزان MDA شد (P<۰/۰۵). در مطالعه Surai (2002) بین پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم و میزان غلظت ویتامین E در مایع منی خروس همبستگی منفی وجود داشت، به طوری که افزایش میزان ویتامین E با کاهش پراکسیداسیون در اسپرم همراه بود. Teymouri Zadeh *et al.* (2020) با به‌کارگیری روغن ماهی و روغن ذرت و پودر برگ رزماری در جیره غذایی خروس‌ها نتیجه گرفتند استفاده از پودر برگ رزماری (۵ گرم در کیلوگرم) به همراه روغن ماهی و جیره روغن ماهی/ روغن زیتون (به نسبت ۵۰:۵۰)، منجر به کاهش معنی‌دار غلظت MDA منی شد. Behnamifar *et al.* (2020) با استفاده از سطوح مختلف اسید آلفالیپوئیک (صفر، ۱۵، ۴۰، ۷۰، ۹۵، ۱۲۰ و ۱۴۵ میلی‌گرم) در جیره غذایی، گزارش دادند که سطح ۴۰ میلی‌گرم اسید آلفالیپوئیک و بیشتر، سبب کاهش قابل توجه غلظت MDA منی، بهبود یکپارچگی غشا و افزایش زنده‌مانی اسپرم شد.

نتیجه‌گیری کلی

بررسی نتایج این آزمایش نشان داد که به کارگیری همزمان ویتامین E و لسیتین سویا در جیره خروس‌های مسن، موجب بهبود برخی پارامترهای حرکتی اسپرم و برخی صفات کیفی منی خروس به ویژه زنده‌مانی و یکپارچگی غشای اسپرم شد. همچنین با توجه به تشدید اثر مثبت لسیتین در همراهی با ویتامین E درکاهش میزان MDA، به نظر می‌رسد به کارگیری آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی همچون ویتامین E همراه با منابع حاوی اسیدهای چرب سیرنشده همچون لسیتین، منجر به بهبود وضعیت کیفی اسپرم در خروس‌های مسن شود.

REFERENCES

1. Adabi, S., Cooper, R., Kamali, M. & Hajbabaei, A. (2011). The influence of inclusions of vitamin E and corn oil on semen traits of Japanese quail (Coturnix coturnix japonica). *Animal Reproduction Science*, 123(1-2), 119-125.
2. Aitken, R., Smith, T., Lord, T., Kuczera, L., Koppers, A., Naumovski, N., Connaughton, H., Baker, M. & De Iuliis, G. (2013). On methods for the detection of reactive oxygen species generation by human spermatozoa: analysis of the cellular responses to catechol oestrogen, lipid aldehyde, menadione and arachidonic acid. *Andrology,* 1(2), 192-205.
3. Akhter, S., Ansari, M.S., Rakha, B.A., Ullah, N., Andrabi, S.M. & Khalid. M. (2011). In vitro evaluation of liquid stored buffalo semen at 5c diluted in soya lecithin-based extender (Bioxcell), tris-citric egg yolk, skim milk and egg yolk-citrate extenders. *Journal of Reproduction Domestic Animal*, 46(1), 45-49.
4. Attia, Y.A., Hussein, A.S., TagEl-Din, A.E., Qota, E.M., Abed El-Ghany, A.I. & El-Sudany, A.M. (2009). Improving productive and reproductive performance of dualpurpose crossbred hens in the tropics by lecithin supplementation. *Tropical Animal Health Production*, 41, 461-475.
5. Attia, Y.A. & Kamel, K.I. (2012). Semen quality, testosterone, seminal plasma biochemical and antioxidant profiles of rabbit bucks fed diets supplemented with different concentrations of soybean lecithin. *Animal*, 6(5), 824-833.
6. Avendano, C., Franchi, A., Taylor, S., Morshedi, M., Bocca, S. & Oehninger, S. (2009). Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. *Fertility & Sterility,* 91(4), 1077-84.
7. Aydilek, N., Aksakal, M. & Karakilcik, A.Z. (2004). Effects of testosterone and vitamin E on the antioxidant system in rabbit testis. *Andrologia,* 36, 277-281.
8. Ayinde, O.C., Ogunnowo, S. & Ogedegbe, R.A. (2012). Influence of Vitamin C and Vitamin E on testicular zinc content and testicular toxicity in lead exposed albino rats. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 13(2), 1-8.
9. Bansal, A.K. & Bilaspuri, G.S. (2011). Impacts of oxidative strees and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*, 686137, 1-7.
10. Behnamifar, A., Rahimi, S.H., Karimi Torshizi, M.A., Sharafi, M. & Grimes, J.L. (2020). Effects of dietary alpha-lipoic acid supplementation on the seminal parameters and fertility potential in aging broiler breeder roosters, *Poultry Science,* 100(2), 1221-1238.
11. Burrows, W.H. & Quinn, J.P. (1937). The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry Science*, 16, 19–24.
12. Castellini, C., Lattaioli, P., Dal Bosco, A., Minelli, A. & Mugnai, C. (2003). Oxidative status and semen characteristics of rabbit buck as affected by dietary vitamin E, C and n-3 fatty acids. *Reproduction Nutrition Development,* 43(1), 91-103.
13. Cerolini, S., Zaniboni, L., Maldjian, A. & Gliozzi, T. (2006). Effect of docosahexaenoic acid and a-tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. *Theriogenology,* 66, 877-886.
14. Cerolini, S., Kelso, K.A., Noble, R.C., Speake, B.K., Pizzi, F. & Cavalchini, L.G. (1997). Relationship between spermatozoan lipid composition and fertility during aging of chickens. *Biology of Reproduction*, 57(5), 976-980.
15. Chohan, K.R., Griffin, J.T. & Carrell, D.T. (2004). Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation. *Andrologia*, 36(11), 321-326.
16. Colares, J.R., Schemitt, E.G., Hartmann, R.M., Moura, R.M., Morgan-Martins, M.I., Fillmann, H.S., Fillmann, L. & Marroni, N.P. (2016). Effect of lecithin on oxidative stress in an experimental model of rats colitis induced by acetic acid. *Journal of Coloproctology*, 36(2), 97-103.
17. Comhaire, F.H., Christophe, A.B., Zalata, A.A., Dhooge, W.S., Mahmoud, A.M. & Depuydt, C.E. (2000). The effects of combined conventional treatment, oral antioxidants and essential fatty acids on sperm biology in subfertile men. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids,* 63(3), 159-165.
18. Crespilho, A. M., SaFilho, M. F., Dell'Aqua, J. A., Nichi, M., Monteiro, G. A., Avanzi, B. R., Martins, A. & Papa, F.O. (2012). Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. *Livestock Science,* 149(1), 1-6.
19. Darestani, A., karimi, K., Zand, K. & Khodaei motlagh, M. (2019). Effect of vitamins C and E on some sperm characteristics in Varamini rooster in cold conditon. *Research on Animal Production,* 10(24), 66-75.
20. Devasagayam, T.P.A., Tilak, J.C., Boloor, K.K., Sane Ketaki, S., Ghaskadbi Saroj, S. & Lele, R.D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. *Journal of Association of Physicians of India,* 52, 794-804.

21. EI-Shenawy, N.S., AL-Harbi, M.S. & Hamza, R.Z. (2014).Effect of vitamin E and selenium separately and in combination onbiochemical, immunological and histological changes induced bysodium azide in male mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 67, 65-76.
22. Emamverdi, M., Zhandi, M., Zare Shahneh, A., Sharafi, M. & Akbari-Sharif, A. (2013). Optimization of ram semen cryopreservation using a chemically defined soybean lecithin-based extender. *Reproduction Domestic Animal*, 48(1), 899-904.
23. Ernster, L. (1993). Lipid peroxidation in biological membranes: mechanisms and implications. In: K. Yagi (Ed), *Active oxygen, lipid peroxides and antioxidants*. (pp. 1-38.) CRC Press, Boca Raton.
24. Esterbauer, H., Schaur, R.J. & Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine,* 11, 81-128.
25. Fouad, A.M., Senousey, H.K., Ruan, D., Xia, W., Chen, W., Wang, S. & Zheng, C. (2020). Nutritional modulation of fertility in male poultry. *Poultry Science*, 99 (11), 5637-5646.
26. Fouad, A.M., Ruan, D., El-Senousey, H.K., Chen, W., Jiang, S. & Zheng, C. (2019). Harmful effects and control strategies of aflatoxin B1 produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* strains on poultry: Review. *Toxins*, 11(3), 176.
27. Fulbert, J.C. & Cals, M.J. (1992). Free radicals in clinical biology. Origin, pathogenic effect and defense mechanisms. *Pathologie Biologie,* 40, 66–77.
28. Gallardo, M., Pérez, D., Strobel, P., Cárcamo, J. & Leighton, F. (2015). Cholesterol and vitamin E determination in broiler chickens fed canola oil. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 47(2), 221-224.
29. Gliozzi, T.M., Zaniboni, L., Maldjian, A., Luzi, F., Maertens, L. & Cerolini, S. (2009). Quality and lipid composition of spermatozoa in rabbits fed DHA and vitamin E rich diets. *Theriogenology,* 71(6), 910-919.
30. Herrara, C., Brogliatti, G., Cavia, R., Conde, P., Revora, M. & Pasqualini, R. S. (2004). CASA sperm parameters and their relation with in vitro fertilization. In: Proceedings of the 15th *International Congress on Animal Reproduction,* 8-12 Aug., Porto Seguro, Brazil, pp. 411-415.
31. Hocking, P. & Bernard, R. (2000). Effects of the age of male and female broiler breeders on sexual behaviour, fertility and hatchability of eggs. *British Poultry Science*, 41, 370-376.
32. Jaldin, R.G., Falcão, H.A., Sequeira, J.L. & Yoshida, W.B. (2006). O processo aterosclerótico em artérias de coelhos submetidos à dieta suplementada com gema de ovo: modelo experimental de baixo custo. *Jornal Vascular Brasileiro*, 5, 247-256.
33. Judde, A., Villeneuve, P., Rossignol-Castera, A. & Le Guillou, A. (2003). Antioxidant effect of soy lecithins on vegetable oil stability and their synergism with tocopherols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80, 1209-1215.
34. Khan, R.U., Rahman, Z.U., Javed, I. & Muhammad, F. (2012). Effect of vitamins, probiotics and protein on semen traits in post-molt male broiler breeders. *Animal Reproduction Science,* 135(1–4), 85-90.
35. Long, J.A., Bongalhardo, D.C., Pelaez, J., Saxena, S., Settar, P., O'Sullivan, N.P. & Fulton, J.E. (2010). Rooster semen cryopreservation: effect of pedigree line and male age on postthaw sperm function. *Poultry Science,* 89, 966-973.
36. Lotfi, S., Mehri, M., Sharafi, M. & Masoudi, R. (2017). Hyaluronic acid improves frozen-thawed sperm quality and fertility potential in rooster. *Animal Reproduction Science*, 184, 204–210.
37. Min, Y., Sun, T., Niu, Z. & Liu, F. (2016). Vitamin C and vitamin E supplementation alleviates oxidative stress induced by dexamethasone and improves fertility of breeder roosters. *Animal Reproduction Science,* 171, 1-6.
38. Mohamad Asrol, K. & Abdul Rashid, B. (2017). Effect of vitamin E supplementation on semen quantity and quality of Local Kampong roosters. *Malaysian Journal of Animal Science*, *20*(1), 37-43.
39. Najafi, A., Taheri, R.A., Mehdipour, M., Martínez-Pastor, F., Rouhollahi, A. & Nourian, M.R. (2019). Improvement of post-thawed sperm quality in broiler breeder roosters by ellagic acid-loaded liposomes. *Poultry Science*, 98(1), 440–446.
40. Papa, F.O., Felicio, G.B., Melo-Ona, C.M., Avarenga, M.A., De.Vita, B., Trinque, C., Puoli-Filhob, J.N.D. & Dell Aqu, J.A. (2010). Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen. *Journal of Animal Reproduction Science,* 129, 73-77.
41. Partyka, A., Niżański, W. & Łukaszewicz, E. (2010). Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl semen by flow cytometry. *Theriogenology,* 74, 1019-1027.
42. Pruchniak, M.P., Arzna, M. & Demkow, U. (2016). Biochemistry of oxidative stress. *Advances in Experimental Medicine and Biology,* 878, 9–19.
43. Rengaraj, D. & Hong, Y.H. (2015). Effects of dietary vitamin E on fertility functions in poultry species. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5), 9910-9921.
44. Rutkowska, J., Cichon, M., Puerta, M. & Gil, D. (2005). Negative effects of elevated testosterone on female fecundity in zebra finches. *Hormones and Behavior*, 47, 585-591.

45. Safari Asl, R., Shariatmadari, F., Sharafi, M., Karimi Torshizi, M.A. & Shahverdi, A. (2018). Improvements in semen quality, sperm fatty acids, and reproductive performance in aged Ross breeder roosters fed a diet supplemented with a moderate ratio of n-3: n-6 fatty acids. *Poultry Science*, 97(11), 4113-4121.
46. Sanocka, D. & Kurpisz, M. (2004). Reactive oxygen species and cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2(12), 1-7.
47. Sexton, K.J. and Renden J.A. (1988). Effects of feeding regimen during early development on body composition, gastro-intestinal tract size and semen quality of broiler breeder cockerels after maturation. *Poultry Science,* 67, 835-841.
48. Shahverdi, A., Sharafi, M., Gourabi, H., Amiri Yekta, A., Esmaeili, V., Sharbatoghli, M., Janzamin, E., Hajnasrollahi, M. & Mostafayi, F. (2015). Fertility and flow cytometric evaluations of frozen-thawed rooster semen in cryopreservation medium containing low-density lipoprotein. *Theriogenology,* 83, 78-85.
49. Surai, P.F., Fujihara, N., Speake, B.K., Brillard, J.P., Wishart, G.J. & Sparks, N.H.C. (2002). Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semen. *Asian-Australas Journal of Animal Science*, 14, 1024–1050.
50. Surai, P.F., Kochish, I.I., Romanov, M.N. & Griffin, D.K. (2019). Nutritional modulation of the antioxidant capacities in poultry: the case of vitamin E. *Poultry science*, 98(9), 4030-4041.
51. Tabatabaei, S., Batavani, R.A. & Ayen, E. (2011). Effects of vitamin e addition to chicken semen on sperm quality during in vitro storage of semen. *Veterinary Research Forum*, 2(2), 103-111.
52. Teymouri Zadeh, Z., Shariatmadari, F., Sharafi, M. & Amir Torshizi, M.M. (2020). Amelioration effects of n-3, n-6 sources of fatty acids and rosemary leaves powder on the semen parameters, reproductive hormones, and fatty acid analysis of sperm in aged Ross broiler breeder roosters. *Poultry Science,* 99(2), 708-718.
53. Tsakmakidis, I.A. (2010). Ram semen evaluation: development and efficiency of modern techniques. *Small Ruminants Research,* 92(1), 126-130.
54. Tsukunaga, S. (1987). Morphological evidence of osmotic and thermal shock of fowl sperm in relation to infertility of sperm. *Bulletin of the Hiroshima Agricultural College*, 8, 257-303.
55. Wang, G. and Wang, T. (2008). Oxidative stability of egg and soy lecithin as affected by transition metal ions and pH in emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 56, 11424-11431.
56. Weil, S., Rozenboim, I., Degen, A., Dawson, A., Friedländer, M. & Rosenstrauch, A. (1999). Fertility decline in aging roosters is related to increased testicular and plasma levels of estradiol. *General and Comparative Endocrinology,* 115, 23-28.
57. Zaniboni, L. & Cerolini, S. (2009). Liquid storage of turkey semen: Changes in quality parameters, lipid composition and susceptibility to induced in vitro peroxidation in control, n-3 fatty acids and alphatocopherol rich spermatozoa. *Animal Reproduction Science,* 112, 51-65.
58. Zanussi, H.P., Shariatmadari, F., Sharafi, F. & Ahmadi, H. (2019). Dietary supplementation with flaxseed oil as source of Omega-3 fatty acids improves seminal quality and reproductive performance in aged broiler breeder roosters. *Theriogenology*, 130, 41-48.
59. Zini, A., de Lamirande, E. & Gagnon, C. (1993). Reactive oxygen species in the semen of infertile patients: Levels of superoxide dismutase and catalase-like activities in seminal plasma. *International Journal of Andrology*, 16, 183-188.