The University of Tehran Press

Iranian Journal of Animal Science

Online ISNN: 2008-4773

Homepage: http:// ijas.ut.ac.ir/

Effect of selenium nanoparticles on quantitative and qualitative parameters of dog sperm after storage in the refrigerator

Mostafa Panahi[1], Ali Soleimanzadeh[2]✉, Ali Shalizar-Jalali[3], Esmail Ayen[4], Rahim Molaie[5]

1. Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. Email: mostafapanahi235@gmail.com
2. Corresponding author, Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.. Email: a.soleimanzadeh@urmia.ac.ir
3. Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. Email: a.shalizar@urmia.ac.ir
4. Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. Email: ayenesmail@gmail.com
5. Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. Email: r.molaie@urmia.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 24 October 2022

Received in revised form: 7 December 2022

Accepted: 7 January 2023

Published online: 23 September 2023

Keywords:

dog,

sperm,

Antioxidants,

selenium nano-particles.

ABSTRACT

Sperm cryopreservation has become an indispensable tool in reproductive biology. However, maintaining fertility in frozen sperm is very important. The aim of this study is to investigate the effects of selenium nano-particles on the storage of dog semen at 4 ˚C during a period of 48 hours. In this study, 20 ejaculates were collected from 4 mix dogs and diluted in a Tris-based diluent. Then, they were divided into 4 parts in control and treated with 0.5, 1 and 1.5 µg selenium nano-particles groups. Sperm parameters including evaluation of total and progressive motility sperm, motility characteristics and viability of sperm were evaluated for 48 hours. The obtained results showed that in concentrations of 1 µg [progressive sperm (27.03±1.48), total motility (49.48±1.27) and viability (41.40±1.03)] and 0.5 µg [progressive sperm (30.76±1.67), total motility (53.18±1.54) and viability (43.15±1.58)] of selenium nanoparticles compared to the control group, but in the concentration of 1.5 µg was lower than the control group ($p< 0.05$). As a result, the present study showed that adding selenium nanoparticles in concentrations of 0.1 and 0.5 µg to dog semen can improve the parameters of dog semen after liquid storage, but in concentrations of 1.5 µg it causes toxic effects and overall agitation. And it reduces sperm viability.

Cite this article: Panahi, M., Soleimanzadeh, A., Shalizar-Jalali, A., Ayen, E., & Molaie, R. (2023). Effect of selenium nanoparticles on quantitative and qualitative parameters of dog sperm after storage in the refrigerator. *Iranian Journal of Animal Science*, 54 (4), 379-390. DOI: http//doi.org10.22059/IJAS.2023.350293.653914

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.
DOI: http//doi.org10.22059/IJAS.2023.350293.653914

Extended Abstract

Introduction

Artificial insemination (AI) has become feasible and accessible worldwide due to developments in canine semen technology and advances in our understanding of canine physiology. Although AI has been used extensively in cattle for many years, dog breeders have only recently begun to use it. It is becoming increasingly popular as a management tool in dog breeding due to its ability to increase the gene pool of dog breeds whose numbers are limited. A management tool for dog breeding, semen collection, and preservation is a response to

the growing demand for AI among dog breeders and owners. Even if they die or reach old age, the sperm of invaluable dogs can be preserved and stored in sperm banks for use by future generations. The semen is kept in the cold to slow down metabolism and preserve sperm viability for a long time. However, during this long storage period, the quality of the semen decreases. Reactive oxygen species (ROS), particularly superoxide anion radicals ($O2^{-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2), which are produced by the cellular components of seminal fluid, are primarily responsible for this decline. Antioxidants must be included in the extender to reduce oxidative stress and improve gamete survival and functional integrity. The aim of this study is to investigate the effects of selenium nano-particles on the storage of dog semen at 4 ˚C during a period of 48 hours.

Materials and Methods

In this study, 20 ejaculates were collected from 4 mixed dogs and diluted in a Tris-based diluent. Then, they were divided into 4 parts in control and treated with 0.5, 1, and 1.5 µg selenium nano-particles groups. Sperm parameters including evaluation of total motility, progressive motility, motility characteristics, and sperm viability were evaluated for 48 hours.

Results and discussion

The purpose of this study is to investigate how storage of selenium nanoparticles affects dog semen stored at 4°C for 48 hours. According to current findings, dog semen with sperm samples containing selenium nanoparticles significantly improves its qualitative properties after storage and thus increases its fertility potential. During the preservation process, sperm motility and viability as well as the amount of free radicals are increased. According to previous research, the fertility rate is positively correlated with the integrity and quality of the sperm plasma membrane. The results showed that selenium nanoparticles improved progressive sperm (27.03±1.48), total motility (49.48±1.27) and viability (41.40±1.03) at concentrations of 1 µg and 0.5 µg [progressive sperm (30.76±1.67), total motility (53.18±1.54) and viability (43.15±1.58)] compared to the control group, but at a concentration 1.5 µg lower than in the control group ($p < 0.05$).

Conclusion

The results of the current study suggest that the addition of selenium nanoparticles to dog semen at concentrations of 0.1 and 0.5 µg can improve its parameters after storage in liquid media. However, at concentrations of 1.5 µg, it reduces sperm viability and has toxic effects.

نشریه علوم دامی ایران، دوره ۵۴، شماره ۴

انتشارات دانشگاه تهران

شاپا الکترونیکی: ۷۹۴۹-۲۴۲۳

Homepage: http://ijas.ut.ac.ir//

تأثیر نانو ذرات سلنیوم بر فراسنجه‌های کمی و کیفی اسپرم سگ پس از نگهداری در یخچال

مصطفی پناهی[۱] | علی سلیمان‌زاده[۲]✉ | علی شالیزار جلالی[۳] | اسماعیل آین[۴] | رحیم مولایی[۵]

۱. گروه مامایی و طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: mostafapanahi235@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، گروه مامایی و طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: a.soleimanzadeh@urmia.ac.ir

۳. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: a.shalizar@urmia.ac.ir

۴. گروه مامایی و طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: ayenesmail@gmail.com

۵. گروه بهداشت و مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: r.molaie@urmia.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۰۲

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۹/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۷

تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۷/۰۱

کلیدواژه‌ها:

اسپرم ، سگ، آنتی‌اکسیدان، نانو ذرات سلنیوم.

چکیده

انجماد اسپرم به ابزاری ضروری در بیولوژی تولیدمثل تبدیل‌شده است. بااین‌حال، حفظ توان باروری در اسپرم منجمد شده دارای اهمیت بسیار بالایی است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثرات نانو ذرات سلنیوم بر فراسنجه‌های کمی و کیفی منی سگ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در طی دوره ۴۸ ساعته است. در این مطالعه، ۲۰ انزال از ۴ سگ نژاد میکس گرفته شد و در یک رقیق‌کننده بر پایه تریس رقیق شدند. سپس، به ۴ قسمت در گروه‌های کنترل، و آزمایش‌شده با ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میکروگرم نانو ذرات سلنیوم تقسیم شدند. فراسنجه‌های اسپرم شامل، ارزیابی تحرک کلی، حرکت پیشرونده اسپرم، فراسنجه‌های تحرک و قدرت زنده ماندن اسپرم به مدت ۴۸ ساعت ارزیابی شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که در غلظت ۱ میکروگرم{ تحرک کلی (۱/۲۷ ± ۴۹/۴۸) و پیشرونده اسپرم (۱/۴۸ ± ۲۷/۰۳) و قدرت زنده ماندن اسپرم (۱/۰۳ ± ۴۱/۴۰) } و غلظت ۰/۵ میکروگرم{ تحرک کلی (۱/۵۴ ± ۵۵/۱۸) و پیشرونده اسپرم (۱/۶۷ ± ۳۰/۷۶) و قدرت زنده ماندن اسپرم (۱/۵۸ ± ۴۳/۱۵) } نانو ذرات سلنیوم در طی ۴۸ ساعت ذخیره‌سازی در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) بالاتر بود، ولی در غلظت ۱/۵ میکروگرم کمتر از گروه کنترل بود ($p >۰/۰۵$). درنتیجه، مطالعه حاضر نشان داد که افزودن نانو ذرات سلنیوم در غلظت ۱ و ۰/۵ میکروگرم به منی سگ، می‌تواند فراسنجه‌های منی سگ را پس از ذخیره‌سازی به‌صورت مایع، بهبود بخشد اما در غلظت ۱/۵ باعث اثرات سمی شده و تحرک کلی و قدرت زنده ماندن اسپرم را کاهش داد.

استناد: پناهی، مصطفی؛ سلیمان‌زاده، علی؛ شالیزار جلالی، علی، آین، اسماعیل؛ و مولایی، رحیم (۱۴۰۲). تأثیر نانو ذرات سلنیوم بر فراسنجه‌های کمی و کیفی اسپرم سگ پس از نگهداری در یخچال. *نشریه علوم دامی ایران*، ۵۴ (۴)، ۳۹۰-۳۷۹. DOI: http//doi.org10.22059/IJAS.2023.350293.653914

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: http//doi.org10.22059/IJAS.2023.350293.653914

مقدمه

حفاظت از انجماد منی روشی مناسب جهت نگهداری اسپرم به شمار می‌آید، لیکن در طی فرآیند انجماد و یخ‌گشایی، سلول اسپرم با خطراتی مواجه بوده و مراحل اصلی حفاظت از انجماد مثل سردسازی، انجماد و یخ‌گشایی ازنظر فراساختاری، عملکردی و بیوشیمیایی اثرات مضری روی آن دارد (Bailey et al., 2000). بااین‌حال، منی منجمد/ذوب‌شده سگ به دلیل از دست دادن یکپارچگی اسپرم در طی فرآیندهای سرد شدن، انجماد و ذوب شدن، طول عمر کوتاهی دارند (Alhaider & Watson, 2009). علاوه بر این، تعیین زمان دقیق تخمک‌گذاری جهت لقاح ممکن است با ۲ تا ۳ روز اختلاف صورت گیرد، و این امر نیازمند بالا بودن قدرت زنده‌مانی اسپرم بعد از فرایند انجامد–ذوب را نیاز دارد (Alhaider & Watson, 2009; Farstad, 2012). به‌طورکلی، کاهش قدرت زنده‌مانی اسپرم ذوب‌شده به دلیل تغییرات در غشای سلولی است که مشابه تغییرات ظرفیت‌سازی است یا به یک فرآیند دژنراتیو سلولی نسبت داده می‌شود (Sokolowska *et al*., 2009; Ortega-Ferrusola *et al*., 2017). پر اکسیداسیون لیپید غشای پلاسما یک رویداد فیزیولوژیکی است که در آن رادیکال‌های آزاد اکسیژن (گونه‌های فعال اکسیژن) با لیپیدهای غشایی در یک فرآیند اکسیداتیو واکنش می‌دهند که اسپرم را برای لقاح آماده می‌کند. بااین‌حال، سطوح بالای گونه‌های فعال اکسیژن باعث تخریب ساختار ماتریکس لیپیدی می‌شود، که درنهایت منجر به از دست دادن یکپارچگی غشاء اسپرم می‌شود. در منی منجمد/ذوب‌شده سگ، پراکسیداسیون لیپید غشای پلاسما، سطح پراکسید هیدروژن درون‌سلولی و تکه‌تکه شدن DNA را در مقایسه با منی تازه افزایش می‌دهد (Kim *et al*., 2010).

رقیق‌کننده‌هایی که دارای مواد آنتی‌اکسیدانی هستند می‌توانند تاثیر تنش اکسیداتیو در طول فرآیند ذخیره‌سازی اسپرم را کاهش دهند و درنتیجه کیفیت مایع منی سرد را بهبود ببخشند. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که آنتی‌اکسیدان‌ها برای تحرک و یکپارچگی اسپرم ضروری هستند و همچنین نقش مهمی در متابولیسم و عملکرد اسپرم دارند (Sheikholeslami *et al*., 2020; Shakouri *et al*., 2021). تحقیقات همچنین نشان داده است که آنتی‌اکسیدان‌ها از سلول‌ها در برابر تنش‌های اکسیداتیو محافظت می‌کنند. ازاین‌رو، افزودن آنتی‌اکسیدان به منی می‌تواند ظرفیت لقاح و حفظ آن را بهبود بخشد (El-Sheshtawy *et al*., 2008; Sheikholeslami *et al*., 2020; Shakouri *et al*., 2021). مواد مختلفی مانند پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی یا طبیعی در نظر گرفته می‌شوند. از آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی یا مصنوعی می‌توان اسید اسکوربیک، کاروتنوئیدها، ویتامین E، سلنیوم، کوآنزیم Q و روی را نام برد (Kefer *et al*., 2009). همچنین در مطالعات مختلفی، اثرات چندین نوع آنتی‌اکسیدان بر مایع منی انسان، گاو، گراز، خرگوش و اسب موردبررسی قرارگرفته است و مؤثر بودن آن‌ها به اثبات رسیده است (Alvarez & Storey, 1983; Kessopoulou *et al*., 1995; Aurich *et al*., 1997; Donnelly *et al*., 1999; Bilodeau *et al*., 2001; Pena *et al*., 2003).

سلنیوم یک آنتی‌اکسیدان قوی است که برای سیستم آنتی‌اکسیدانی داخل سلولی به‌عنوان کو فاکتور آنزیم پراکسیداز عمل نموده و این آنزیم نیز اثرات ویتامین ای را تکمیل می‌نماید (Burk *et al*., 2003). نانو ذرات سلنیوم به دلیل قابلیت دسترسی بالا و کاهش اثرات سمی، توجه زیادی را به خود جلب نموده است. نتایج مطالعات پیشین نشان می‌دهند که نانو ذرات سلنیوم می‌توانند به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان با کاهش خطر سمیت عمل کنند (Zhang *et al*., 2005). مطالعه‌ای تأثیر مثبت تجویز مقدار مناسب سلنیوم را بر فراسنجه اسپرم گاو را نشان می‌دهد (Siegel *et al*., 1980). نشان داده‌شده است که تجویز میزان مناسب آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند تحرک و مورفولوژی و درصد اسپرم زنده را افزایش دهد (Agarwal *et al*., 2005). در مطالعه‌ای گزارش‌شده است که افزودن سلنیوم به جیره دام‌هایی که با کمبود این عنصر مواجه بودند، سبب بهبودی در باروری آن‌ها شد (Carbone *et al*., 1998). مطالعات دیگری نشان‌دهنده بهبود تحرک اسپرم در مردان ناباروری است که میزان مناسب سلنیوم دریافت کرده‌اند (MacPherson *et al*., 1993). در مطالعه‌ای دیگر نشان داده‌شده است که کاهش کیفیت مایع منی درنتیجه کاهش میزان آنتی‌اکسیدان‌ها، موجب کاهش تحرک اسپرم می‌شود (Kidd *et al*., 2001). از طرف دیگر، مقدار زیاد سلنیوم نیز اثرات نامطلوبی بر کیفیت اسپرم می‌گذارد. در مطالعه‌ای گزارش نمودند که دریافت میزان ۸

ppm سلنیوم که حدود ۴ برابر بیشتر از میزان موردنیاز است به مدت ۶ هفته باعث کاهش وزن بیضه و افزایش مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم می‌شود (Kaur *et al*., 1994). بنابراین، با توجه به اهمیت این آنتی‌اکسیدان‌ها در جلوگیری از اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد بر اسپرم، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر متقابل سطوح مختلف نانو ذرات سلنیوم و زمان‌های مختلف نگهداری منی بر خصوصیات کیفی اسپرم سگ تحت شرایط مایع بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری مایع منی و آماده‌سازی نمونه‌ها: در این مطالعه از ۴ قلاده سگ نر نژاد مخلوط سن ۶-۳ ساله برای جمع‌آوری اسپرم مورداستفاده قرار گرفت. نحوه اخذ منی در این مطالعه به‌صورت دستی بود. در این روش بعد از پس از تحریک شدن دام نر و بروز رفتار و حرکات جنسی، آلت تناسلی دام نر معمولاً با دست راست فرد عامل گرفته می‌شود و با به عقب راندن غلاف قضیب حدود ۲ الی ۵ سانتی‌متر عقب‌تر از پیاز پیش آبراهی و پس‌ازآن با تحریک آلت تناسلی و ماساژ ملایم انزال دام گرفته می‌شود (Linde-Forsberg, 2001). در این بررسی از قسمت دوم انزال که بخش غنی از اسپرم می‌باشد، استفاده گردید. نمونه‌های بالای ۲۰۰×۱۰^{۶} برای انجام آزمایش مورداستفاده قرار گرفت. نمونه‌گیری در هفته دومرتبه انجام پذیرفت و برای از بین بردن تنوع بین نمونه‌ها، هر بار تمامی مایع منی انزالی سگ‌ها با یکدیگر مخلوط گشتند. منی ادغام‌شده، توسط سانتریوفوژ با دور ۷۰۰ به مدت ۶ دقیقه سانتریوفوژ و پلاسمای منی دور ریخته شدند (Linde-Forsberg, 2001).

گروه‌بندی اسپرم‌ها: در این مطالعه از رقیق‌کننده بر پایه تریس (۲/۴ گرم تریس هیدروکسی‌متیل، ۱/۴ گرم اسیدسیتریک، ۰/۸ گرم گلوکز، ۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی بنزیل پنی‌سیلین، ۰/۱ گرم استرپتومایسین سولفات، ۲۰ میلی‌لیتر زرده تخم‌مرغ، ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر) استفاده گردید و غلظت نهایی با رقیق‌کننده به ۱۳۴×۱۰^{۶} رسانده شد. سپس نمونه‌ها به‌طور مساوی به چهار گروه مساوی تقسیم گردیدند (جدول ۱). نمونه‌ها پس از جمع‌آوری در یخچال نگهداری و در زمان‌های صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت موردبررسی قرار گرفتند.

جدول ۱. ویژگی‌های گروه‌های مورد آزمایش

شماره	گروه ها	محتوا
۱	گروه ۱ (کنترل)	اکستندر بر پایه تریس (بدون آنتی اکسیدان)
۲	گروه ۲	۰/۵ **µg/ml** نانوذرات سلنیوم + اکستندر بر پایه تریس
۳	گروه ۳	۱ **µg/ml** نانوذرات سلنیوم + اکستندر بر پایه تریس
۴	گروه ۴	۱/۵ **µg/ml** نانوذرات سلنیوم + اکستندر بر پایه تریس

بررسی تحرک اسپرم‌ها: جهت بررسی تحرک و شاخص‌های تحرک، از سیستم آنالیز اسپرم کاسا (Test Sperm 3.2; Videotest, St. Petersburg, Russia) استفاده شد (جدول ۲). در این بررسی ۵ میکرولیتر از هر گروه بر روی لام قرارگرفته بر روی صفحه گرم میکروسکوپ نوری (Olympus, BX41, Tokyo, Japan) ریخته و در زمان‌های صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از نگهداری در دمای یخچال، تحرک کلی، تحرک پیشرونده و شاخصه‌های حرکتی اسپرم شامل: سرعت در مسیر میانگین (VCL)، سرعت در مسیر مستقیم (VSL[2])، تناوب عرضی زنش (BCF[3])، راستی مسیر طی شده (STR[4]) و سرعت در مسیر منحنی (VAP[5]) مورد ارزیابی قرار گرفتند (تعداد ۵۰۰ اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفت).

1 Curvilinear Velocity
2 Straight – line Velocity
3 Beat Cross Frequency
4 Sperm Track Straightness
5 Average Path Velocity

جدول ۲. تنظیمات فراسنجه‌های نرم‌افزار کاسا

شاخص	تنظیمات
تعداد فریم	f/s ۵۰
مدت زمان عکس گرفتن	۱ ثانیه
سطح دما	°C ۳۷
حداقل اندازه سلول	µm² ۲۵
حداکثر اندازه سلول	µm² ۷۰
نوع چمبر	اسلاید ۲۲ در ۲۲
حجم در هر اسلاید	µl ۷
عمق چمبر	حدود ۲۰ µm
حداقل تعداد تحلیل در میدان	۷
حداقل تعداد تحلیل در میدان	۴۰۰ سلول
مقدار آستانه	۹۲
غلظت سلول برای کاسا	m/mL ۱۰
نوع تصویر	فازکنتراست

بررسی قدرت زنده‌مانی اسپرم‌ها: جهت بررسی میزان قدرت زنده‌مانی اسپرم رنگ‌آمیزی ائوزین- نگروزین مورداستفاده قرار گرفت. مبنای تشخیص اسپرم زنده از اسپرم مرده در این روش رنگ‌آمیزی بر این اصل استوار است که در اثر آسیب به غشاء پلاسمایی، اسپرم در برابر رنگ مذکور نفوذپذیر می‌گردند. بنابراین آن دسته از سلول‌های اسپرم که رنگ گرفته بودند به‌عنوان اسپرم مرده در نظر گرفته شدند. در این مطالعه، تعداد ۲۰۰ اسپرم موردبررسی قرار گرفت و نتایج حاصل در قالب درصد بیان شدند (Wyrobek *et al*., 1983).

روش ارزیابی آماری

داده‌ها با اســتفاده نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۶ با در نظر گرفتن زمان‌های ارزیابی، با رویه داده‌های تکرارشونده در زمان و با آزمون تعقیبی Tukey-Kramer test مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. سطح معنی‌داری $p <$ ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

تحرک کلی اسپرم: نتایج به‌دست‌آمده از بررسی تحرک کلی اسپرم‌ها مشخص کرد که در ساعت صفر آزمایش هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی وجود نداشت (جدول ۳). نتایج حاصل از بررسی در ساعت ۲۴ آزمایش، نشان داد که بیشترین تحرک کلی اسپرم در بین گروه‌های آزمایشی به ترتیب مربوط به گروه‌های حاوی ۰/۵ و ۱ میکروگرم نانو ذرات سلنیوم ($p <$ ۰/۰۵) نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی بود (جدول ۳). بررسی نتایج در ساعت ۴۸ آزمایش نشان داد که گروه حاوی ۰/۵ میکروگرم نانو ذرات سلنیوم دارای بیشترین تحرک کلی ($p <$ ۰/۰۵) نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی بود (جدول ۳).

تحرک پیشرونده: نتایج به‌دست‌آمده تحرک پیشرونده در جدول ۳ آورده شده است. نتایج نشان داد که با افزایش زمان نگهداری اسپرم در دمای یخچال به‌طور معنی‌داری ($p <$ ۰/۰۵) تحرک پیشرونده کاهش می‌یابد (جدول ۳). در ساعت ۲۴ و ۴۸ پس از آزمایش نشان داده شد که تحرک پیشرونده گروه‌های حاوی ۱ و ۰/۵ میکروگرم نانو ذرات سلنیوم به‌طور معنی‌داری ($p <$ ۰/۰۵) بیشتر از سایر گروه‌های آزمایشی است (جدول ۳).

جدول۳. میانگین (±**SEM**) تحرک کلی و پیشرونده اسپرم سگ به مدت ۴۸ ساعت پس از افزودن غلظت‌های مختلف نانو ذرات سلنیوم در رقیق‌کننده منی

پارامتر	زمان نگهداری (hr)	کنترل	نانوذرات سلنیوم µg/ml ۰/۵	نانوذرات سلنیوم µg/ml ۱	نانوذرات سلنیوم µg/ml ۱/۵
TM (%)	۰	۷۳/۱۸ ± ۲/۵۵ ^{aA}	۷۴/۰۰ ± ۲/۵۲ ^{aA}	۷۴/۴۴ ± ۲/۷۲ ^{aA}	۷۳/۰۱ ± ۲/۶۸ ^{aA}
	۲۴	۶۱/۷۹ ± ۲/۷۹ ^{bB}	۷۰/۳۲ ± ۲/۸۱ ^{bA}	۶۸/۲۸ ± ۱/۳۵ ^{aA}	۶۴/۴۷ ± ۲/۳۴ ^{bB}
	۴۸	۳۹/۷۷ ± ۱/۸۹ ^{cD}	۵۳/۱۸ ± ۱/۵۴ ^{cA}	۴۹/۴۸ ± ۱/۲۷ ^{cB}	۴۴/۲۰ ± ۱/۳۱ ^{cC}
PM (%)	۰	۳۹/۳۵ ± ۱/۱۰ ^{aA}	۴۱/۴۳ ± ۱/۹۱ ^{aA}	۴۰/۲۶ ± ۱/۵۱ ^{aA}	۴۰/۷۸ ± ۱/۰۸ ^{aA}
	۲۴	۳۱/۸۵ ± ۱/۶۴ ^{bB}	۳۹/۰۶ ± ۱/۵۳ ^{aA}	۳۶/۳۰ ± ۱/۴۶ ^{bA}	۳۲/۳۱ ± ۱/۳۴ ^{bB}
	۴۸	۲۲/۲۱ ± ۱/۷۳ ^{cB}	۳۰/۷۶ ± ۱/۶۷ ^{bA}	۲۷/۰۳ ± ۱/۴۸ ^{cA}	۲۲/۲۰ ± ۱/۴۰ ^{cB}

TM: تحرک کلی؛ **PM**: تحرک پیشرونده. حروف مختلف (**a-c**) در یک ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری درمان در هر دوره ذخیره‌سازی است (***p*** < ۰/۰۵). حروف مختلف (**A-B**) در یک ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری درمان در هر دوره ذخیره‌سازی است (***p*** < ۰/۰۵).

شاخص‌های تحرک اسپرم

شاخص سرعت در مسیر میانگین (VCL): بررسی شاخص VCL نشان داد که در ساعت صفر آزمایش هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی وجود ندارد (جدول ۴). در ساعت ۲۴ پس از آزمایش مشخص شد که گروه حاوی ۰/۵ میکروگرم نانو ذرات سلنیوم به‌طور معنی‌داری (p <۰/۰۵) دارای بالاترین میزان این شاخص نسبت به سایر گروه‌های می‌باشد (جدول ۴). در ساعت ۴۸ پس از آزمایش همچنین مشخص شد که گروه حاوی ۰/۵ و ۱ میکروگرم نانو ذرات سلنیوم دارای بالاترین (p <۰/۰۵) میزان شاخص VCL نسبت به سایر گروه‌های را به خود اختصاص داده بودند (جدول ۴).

شاخص سرعت در مسیر مستقیم (VSL): بررسی شاخص VSL نشان داد که در ساعت صفر آزمایش هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های درمانی وجود ندارد. بررسی در ساعت ۲۴ پس از آزمایش گروه حاوی ۰/۵ میکروگرم نانو ذرات سلنیوم دارای بالاترین (p <۰/۰۵) میزان این شاخص نسبت به سایر گروه‌های درمانی بود (جدول ۴). در ساعت ۴۸ پس از آزمایش گروه حاوی ۰/۵ و ۱ میکروگرم نانو ذرات سلنیوم دارای بالاترین (p <۰/۰۵) میزان این شاخص نسبت به سایر گروه‌های درمانی بود (جدول ۴). همچنین بررسی شاخص VSL نشان داد که با افزایش زمان نگهداری اسپرم در داخل یخچال این شاخص به‌طور معنی‌داری (p <۰/۰۵) کاهش پیدا می‌کند (جدول ۴).

شاخص سرعت در مسیر منحنی (VAP): بررسی شاخص VAP نشان داد که با افزایش زمان نگهداری اسپرم در داخل یخچال این شاخص به‌طور معنی‌داری (p <۰/۰۵) کاهش پیدا می‌کند (جدول ۴). بررسی این شاخص نشان داد که در ساعت صفر آزمایش هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های درمانی وجود ندارد. بررسی در ساعت ۲۴ پس از آزمایش گروه حاوی ۰/۵ و ۱ میکروگرم نانو ذرات سلنیوم دارای بالاترین (p <۰/۰۵) میزان این شاخص نسبت به سایر گروه‌های درمانی بود (جدول ۴). در ساعت ۴۸ پس از آزمایش گروه حاوی ۰/۵ میکروگرم نانو ذرات سلنیوم دارای بالاترین (p <۰/۰۵) میزان این شاخص نسبت به سایر گروه‌های درمانی بود (جدول ۴).

شاخص راستی مسیر طی شده (STR): در بررسی این شاخص نشان داده شد، که با افزایش زمان نگهداری اسپرم در داخل یخچال، این شاخص بین گروه‌های درمانی هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری ندارد (جدول ۴). همچنین در این بررسی مشخص شد که در ساعت صفر، ۲۴ و ۴۸ پس از آزمایش نیز بین گروه‌های درمانی هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری نسبت به هم وجود ندارد (جدول ۴).

شاخص تناوب عرضی زنش (BCF): بررسی شاخص BCF نشان داد که در ساعت صفر و ۲۴ آزمایش هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های درمانی وجود ندارد. بررسی در ساعت ۴۸ پس از آزمایش بین گروه‌های ۱ و ۰/۵ میکروگرم

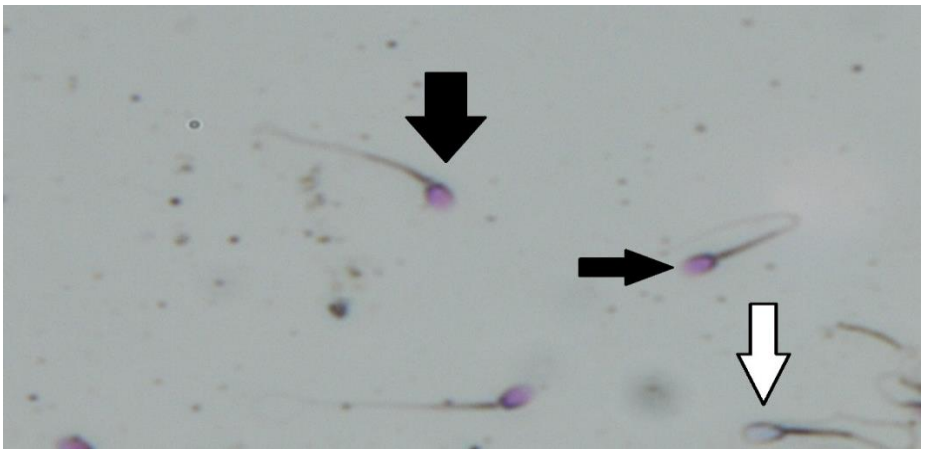
نانو ذرات سلنیوم دارای بالاترین ($p <$ ۰/۰۵) میزان این شاخص نسبت به سایر گروه‌های درمانی بود و این گروه‌ها نسبت به سایر گروه‌های درمانی دارای بالاترین ($p <$ ۰/۰۵) میزان این شاخص بودند (جدول ۴).

جدول۴. میانگین (±SEM) تغییرات شاخص‌های تحرک اسپرم سگ به مدت ۴۸ ساعت پس از افزودن غلظت‌های مختلف نانو ذرات سلنیوم در رقیق‌کننده منی

پارامتر	زمان نگهداری (hr)	کنترل	نانوذرات سلنیوم µg/ml ۰/۵	نانوذرات سلنیوم µg/ml ۱	نانوذرات سلنیوم µg/ml ۱/۵
VCL (µm/S)	۰	۹۵/۵۹ ± ۲/۳۵ ^{aA}	۹۶/۵۵ ± ۲/۸۸ ^{aA}	۹۵/۹۳ ± ۲/۰۳ ^{aA}	۹۴/۱۳ ± ۲/۴۸ ^{aA}
	۲۴	۷۳/۳۴ ± ۲/۶۴ ^{bC}	۸۶/۲۹ ± ۲/۴۰ ^{bA}	۸۵/۱۳ ± ۱/۶۲ ^{bB}	۸۲/۵۵ ± ۲/۱۳ ^{bBC}
	۴۸	۶۵/۱۹ ± ۲/۹۰ ^{bB}	۶۹/۶۸ ± ۱/۳۵ ^{cA}	۶۹/۰۸ ± ۱/۴۰ ^{cA}	۶۴/۶۱ ± ۱/۲۴ ^{cB}
VSL (µm/S)	۰	۶۹/۵۳ ± ۱/۰۸ ^{aA}	۶۹/۱۷ ± ۱/۱۳ ^{aA}	۶۸/۲۰ ± ۲/۳۱ ^{aA}	۶۹/۳۸ ± ۱/۸۱ ^{aA}
	۲۴	۵۹/۷۴ ± ۱/۰۵ ^{bB}	۶۶/۵۳ ± ۱/۶۱ ^{bA}	۶۲/۰۹ ± ۲/۴۵ ^{bB}	۵۹/۲۳ ± ۱/۹۴ ^{bB}
	۴۸	۴۵/۷۶ ± ۱/۳۵ ^{cB}	۵۲/۷۹ ± ۱/۷۸ ^{cA}	۴۹/۴۸ ± ۱/۵۷ ^{cA}	۴۳/۴۱ ± ۱/۵۳ ^{cB}
VAP (µm/S)	۰	۷۸/۴۱ ± ۲/۷۲ ^{aA}	۷۸/۹۰ ± ۲/۳۶ ^{aA}	۷۹/۱۴ ± ۲/۴۴ ^{aA}	۷۸/۰۵ ± ۱/۶۷ ^{aA}
	۲۴	۶۹/۱۸ ± ۱/۱۸ ^{bB}	۷۴/۰۲ ± ۱/۵۰ ^{bA}	۷۲/۲۱ ± ۱/۰۴ ^{bA}	۶۷/۳۳ ± ۲/۱۶ ^{bB}
	۴۸	۵۱/۵۸ ± ۱/۲۶ ^{cC}	۶۳/۳۳ ± ۱/۴۴ ^{cA}	۵۹/۰۵ ± ۲/۹۵ ^{cB}	۵۲/۳۵ ± ۱/۳۹ ^{cC}
STR (%)	۰	۷۶/۲۰ ± ۲/۳۷ ^{aA}	۷۷/۰۴ ± ۱/۱۹ ^{aA}	۷۷/۹۳ ± ۱/۰۱ ^{aA}	۷۶/۸۲ ± ۱/۱۱ ^{aA}
	۲۴	۷۵/۱۹ ± ۱/۵۰ ^{aA}	۷۶/۶۵ ± ۲/۵۵ ^{aA}	۷۷/۵۱ ± ۱/۶۶ ^{aA}	۷۶/۵۱ ± ۱/۱۷ ^{aA}
	۴۸	۷۳/۲۴ ± ۱/۲۱ ^{aA}	۷۶/۵۱ ± ۱/۰۴ ^{aA}	۷۶/۴۷ ± ۱/۲۸ ^{aA}	۷۴/۲۷ ± ۱/۲۳ ^{aA}
BCF (Hz)	۰	۲۳/۸۵ ± ۱/۴۵ ^{aA}	۲۳/۲۲ ± ۱/۹۸ ^{aA}	۲۳/۴۷ ± ۱/۹۳ ^{aA}	۲۳/۶۸ ± ۱/۹۰ ^{aA}
	۲۴	۱۸/۰۳ ± ۱/۷۴ ^{bA}	۲۱/۵۵ ± ۱/۱۹ ^{abA}	۲۱/۲۲ ± ۱/۸۷ ^{aA}	۱۹/۴۰ ± ۱/۴۵ ^{bA}
	۴۸	۱۴/۲۲ ± ۲/۵۵ ^{cB}	۱۹/۴۲ ± ۱/۰۸ ^{bA}	۱۷/۶۳ ± ۱/۶۹ ^{bA}	۱۴/۱۹ ± ۱/۰۲ ^{cB}

VCL: میانگین سرعت اسپرم درحرکت منحنی شکل؛ **VSL**: سرعت اسپرم درحرکت مستقیم؛ **VAP**: سرعت متوسط اسپرم در مسیر میانگین؛ **STR**: مستقیم‌الخط بودن مسیر میانگین حرکت اسپرم؛ **BCF**: فرکانس حرکت جانبی اسپرم. حروف مختلف (**a-c**) در یک ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری درمان در هر دوره ذخیره‌سازی است ($p <$ ۰/۰۵). حروف مختلف (**A-C**) در یک ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری درمان در هر دوره ذخیره‌سازی است ($p <$ ۰/۰۵).

قدرت زنده‌مانی: در این مطالعه نشان داده شد که درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها در ساعت صفر آزمایش هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های درمانی وجود ندارد. در ساعت ۲۴ و ۴۸ پس از آزمایش گروه حاوی ۰/۵و ۱ میکروگرم نانو ذرات سلنیوم دارای بالاترین ($p <$ ۰/۰۵) درصد زنده‌مانی نسبت به سایر گروه‌های درمانی را به خود اختصاص داده بود (جدول ۵). همچنین در این مطالعه نشان داده شد با افزایش زمان نگهداری اسپرم در داخل یخچال درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها به‌طور معنی‌داری ($p <$ ۰/۰۵) در تمامی گروه‌های درمانی کاهش پیدا می‌کند (جدول ۵؛ شکل ۱).



شکل ۱. قدرت زنده‌مانی اسپرم؛ فلش سیاه‌رنگ: اسپرم‌های مرده (قرمز)، فلش سفیدرنگ: اسپرم زنده (بدون رنگ)

جدول۵. درصد قدرت زنده‌مانی اسپرم در مایع منی سگ سرد شده پس از افزودن غلظت‌های مختلف نانو ذرات سلنیوم در رقیق‌کننده مایع منی

پارامتر	زمان نگهداری (hr)	کنترل	نانوذرات سلنیوم µg/ml ۰/۵	نانوذرات سلنیوم µg/ml ۱	نانوذرات سلنیوم µg/ml ۱/۵
قدرت زنده مانی (٪)	۰	۷۹/۹۰ ± ۳/۳۸ ^{aA}	۷۹/۰۵ ± ۳/۴۱ ^{aA}	۸۰/۴۸ ± ۳/۵۲ ^{aA}	۷۹/۷۲ ± ۳/۲۸ ^{aA}
	۲۴	۶۵/۴۴ ± ۲/۹۴ ^{bB}	۶۸/۶۶ ± ۱/۹۵ ^{bA}	۶۷/۶۸ ± ۲/۱۴ ^{bA}	۶۳/۸۱ ± ۲/۸۰ ^{bB}
	۴۸	۳۴/۱۶ ± ۱/۲۵ ^{cB}	۴۳/۱۵ ± ۱/۵۸ ^{cA}	۴۱/۴۰ ± ۱/۰۳ ^{cA}	۳۳/۵۲ ± ۱/۷۳ ^{cB}

– حروف مختلف (a-c) در یک ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری درمان در هر دوره ذخیره‌سازی است ($p<$ ۰/۰۵). حروف مختلف (A-B) در یک ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری ذخیره‌سازی در هر تیمار است ($p<$ ۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه، اثرات افزودن نانو ذرات سلنیوم در رقیق‌کننده اسپرم سگ در طی نگهداری در دمای یخچال موردمطالعه قرار گرفت. سلول‌های اسپرم به دلیل محتوای نسبتاً بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع در غشای پلاسمایی خود به‌راحتی اکسیده می‌شوند، و به تنش اکسیداتیو حساس هستند. افزایش غلظت رادیکال‌های آزاد در پلاسمای منی یا در رقیق‌کننده در طول نگهداری، مسئول آسیب غشای سلولی و زوال مایع منی در گونه‌های مختلف ازجمله سگ است (Tselkas *et al*., 2000; Michael *et al*., 2009). برای جلوگیری از این تنش اکسیداتیو و برای افزایش بقا و یکپارچگی اسپرم، باید به وجود آنتی‌اکسیدان‌ها در رقیق‌کننده توجه شود. نتایج این مطالعه نشان داد که گروه‌های آزمایشی حاوی ۰/۵و ۱ میکروگرم نانو ذرات سلنیوم به‌طور قابل‌توجهی فراسنجه‌های کیفی اسپرم سگ را بعد از نگهداری در یخچال بهبود می‌بخشد، بنابراین می‌تواند به‌طور بالقوه باروری را نیز به‌احتمال‌زیاد، افزایش دهد.

نشان داده‌شده است که نگهداری اسپرم به‌صورت منجمد درصد اسپرم متحرک را کاهش می‌دهد، اما مکانیسم دخیل در کاهش تحرک مشخص نیست (Nijs *et al*., 2009). یک همبستگی قوی بین درصد اسپرم بی‌تحرک و نقایص پس از ذوب وجود دارد (Ozkavukcu *et al*., 2008). باید توجه داشت که الگوهای حرکتی غیر پیشرونده رسیدن اسپرم به محل لقاح را دشوارتر می‌کند (Shalgi *et al*., 1992). تحرک اسپرم، که یک معیار مهم در ارزیابی کیفیت مایع منی سگ محسوب می‌شود، به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای به مواد افزودنی به رقیق‌کننده در طی ذخیره‌سازی منی بستگی دارد (Linde-Forsberg *et al*., 1991). مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از نانو سلنیوم به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان بیولوژیک همانند سایر آنتی‌اکسیدان‌های مورداستفاده شده در رقیق‌کننده‌ها می‌تواند به‌طور قابل‌توجهی کیفیت اسپرم را با افزایش تحرک اسپرم‌ها گردید (Domoslawska *et al*., 2015; Khoram Abadi *et al*., 2017; Hozyen *et al*., 2019). همسو بامطالعه حاضر نشان داده شد است که استفاده از ۱ میکروگرم سلنیوم در رقیق‌کننده مایع منی گاو سبب بهبود تحرک اسپرم در گاو در شرایط آزمایشگاهی می‌شود (Siegel *et al*., 1980). همچنین در مطالعه‌ای دیگر نشان داده‌شده است که افزودن سلنیوم در محیط رقیق‌کننده منی گاومیش می‌تواند موجب بهبود تحرک کلی و پیشرونده اسپرم‌های گاومیش می‌شود (Dorostkar *et al*., 2012). در مطالعه‌ای بر روی شاخص‌های تحرک اسپرم نشان داده‌اند که بین سرعت انحنای خطی، سرعت خط مستقیم، دامنه‌ی جابجایی و فرکانس ضربان متقاطع با نرخ لقاح پس از تلقیح مصنوعی همبستگی مثبت وجود دارد (İnanç *et al*., 2018). در مطالعه حاضر هم‌راستا بامطالعه قبل نشان داده شد که می‌تواند باعث بهبود شاخص‌های تحرک اسپرم به‌جز شاخص مستقیم‌الخط بودن مسیر میانگین حرکت اسپرم (VSL) شود. در مطالعه‌ای دیگر نشان داده‌شده است که استفاده از نانو ذرات سلنیوم در رقیق‌کننده خروس می‌تواند سبب بهبود شاخص‌های تحرک می‌شود (Safa *et al*., 2016).

یکپارچگی ساختاری و عملکرد غشای پلاسمای اسپرم در لقاح نقش اساسی دارد (Flesch & Gadella, 2000). در مطالعه‌ای همبستگی مثبتی بین سلامت غشای پلاسمایی اسپرم و پتانسیل باروری اسپرم را نشان داده‌اند (Perez-Llano *et al*., 2001). در مطالعه‌ای نشان دادند که افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند باعث بهبود قدرت زنده‌مانی اسپرم سگ طی نگهداری

در یخچال می‌شود (Sheikholeslami *et al*., 2020). در مطالعه حاضر نشان داده شد که نانو ذرات سلنیوم می‌تواند با بهبود عملکرد غشاء پلاسمایی اسپرم سبب زنده‌مانی اسپرم سگ بعد از نگهداری در یخچال شود. سلنیوم، به‌عنوان یک عنصر کمیاب ضروری، نقش مهمی در بیولوژی پستانداران دارد. شناخته‌شده‌ترین نقش سلنیوم به حضور آن در پراکسیداز و سلنوپروتئین‌ها نسبت داده می‌شود (Wang *et al*., 2007; Allmang & Krol, 2006)، که زنده ماندن اسپرم و همچنین محافظت در برابر گونه‌های فعال اکسیژن را تضمین می‌کند (Ahsan *et al*., 2014). همچنین در مطالعه حاضر نشان داده شد که دوزهای بالاتر از نانوذرات سلنیوم می‌تواند اثرات مخرب بر زنده‌مانی اسپرم‌ها داشته باشد. در مطالعه‌ای نشان داده‌شده است که نانوذرات سلنیوم می‌تواند از این نظریه حمایت کند که دوزهای بالای افزودنی‌های آنتی‌اکسیدانی یکپارچگی عملکردی آکسوزوم و میتوکندری سلول‌های اسپرم را به خطر می‌اندازد (Bucak *et al*., 2010).

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه، اثرات مثبت وابسته به دوز نانو ذرات سلنیوم بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم سگ در طول نگهداری در یخچال نشان داده شد. با توجه به اثرات مثبت نانو ذرات سلنیوم ، در مطالعه حاضر استفاده از نانو ذرات سلنیوم را در رقیق‌کننده منی سگ را تأیید می‌کند. بااین‌حال، تحقیقات بیشتری در جهت میزان باروری برای تأیید اثرات محافظتی آن موردنیاز است.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه که با تصویب و حمایت مالی امکان انجام مطالعه را فراهم آوردند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

REFERENCES

Agarwal, A., Gupta, S., & Sharma, R. K. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3(1), 1-21.

Ahsan, U., Kamran, Z., Raza, I., Ahmad, S., Babar, W., Riaz, M. H., & Iqbal, Z. (2014). Role of selenium in male reproduction—A review. *Animal Reproduction Science*, 146(1-2), 55-62.

Alhaider, A. K., & Watson, P. F. (2009). Cryopreservation of dog semen: the effects of Equex STM paste on plasma membrane fluidity and the control of intracellular free calcium. *Animal Reproduction Science*, 110(1-2), 147-161.

Allmang, C., & Krol, A. (2006). Selenoprotein synthesis: UGA does not end the story. *Biochimie*, 88(11), 1561-1571.

Alvarez, J. G., & Storey, B. T. (1983). Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biology of Reproduction*, 29(3), 548-555.

Aurich, J. E., Schönherr, U., Hoppe, H., & Aurich, C. (1997). Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology*, 48(2), 185-192.

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

Bilodeau, J. F., Blanchette, S., Gagnon, C., & Sirard, M. A. (2001). Thiols prevent H2O2-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, 56(2), 275-286.

Bucak, M. N., Sarıözkan, S., Tuncer, P. B., Sakin, F., Ateşşahin, A., Kulaksız, R., & Çevik, M. (2010). The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (Capra hircus ancryrensis) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Research*, 89(1), 24-30.

Burk, R. F., Hill, K. E., & Motley, A. K. (2003). Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for selenoprotein P. *The Journal of nutrition*, 133(5), 1517S-1520S.

Carbone Jr, D. J., Shah, A., Thomas Jr, A. J., & Agarwal, A. (1998). Partial obstruction, not antisperm antibodies, causing infertility after vasovasostomy. *The Journal of Urology*, 159(3), 827-830.

Domosławska, A., Zduńczyk, S., Niżański, W., Jurczak, A., & Janowski, T. (2015). Effect of selenium and vitamin E supplementation on semen quality in dogs with lowered fertility. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 59, 85-90.

Donnelly, E. T., McClure, N., & Lewis, S. E. (1999). Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. *Fertility and Sterility*, 72(3), 484-495.

Dorostkar, K., Alavi-Shoushtari, S. M., & Mokarizadeh, A. (2012). Effects of in vitro selenium addition to the semen extender on the spermatozoa characteristics before and after freezing in water buffaloes (Bubalus bubalis). *Veterinary Research Forum*, 3 (4), 263.

El-Sheshtawy, R. I., El-Sisy, G. A., & El-Nattat, W. S. (2008). Use of selected amino acids to improve buffalo bull semen cryopreservation. *Global Veterinaria*, 2(4), 146-150.

Farstad, W. (2012). Customizing semen preservation protocols for individual dogs and individual species: sperm preservation beyond the state of the art. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 269-273.

Flesch, F. M., & Gadella, B. M. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1469(3), 197-235.

Hozyen, H. F., El-Shamy, A. A., & Farghali, A. A. (2019). In vitro supplementation of nano selenium minimizes freeze-thaw induced damage to ram spermatozoa. *International Journal of Veterinary Science*, 8(4), 249-254.

Inanç, M. E., Cil, B., Tekin, K., Alemdar, H., & Daşkin, A. (2018). The combination of CASA kinetic parameters and fluorescein staining as a fertility tool in cryopreserved bull semen. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 42(5), 452-458.

Kaur, R., & Parshad, V. R. (1994). Effects of dietary selenium on differentiation, morphology and functions of spermatozoa of the house rat, Ratuus rattus L. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 309(1), 29-35.

Kefer, J. C., Agarwal, A., & Sabanegh, E. (2009). Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *International journal of Urology*, 16(5), 449-457.

Kessopoulou, E., Powers, H. J., Sharma, K. K., Pearson, M. J., Russell, J. M., Cooke, I. D., & Barratt, C. L. (1995). A double-blind randomized placebo cross-over controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility. *Fertility and sterility*, 64(4), 825-831.

Khoram, A. F., KHODAEI, M. M., & Moradi, M. H. (2017). Effect of in vitro selenium nanoparticles addition to the semen extender on the spermatozoa parameters after freezing in Farahani ram. *Journal of Animal Research*, 30, 3.

Kidd, S. A., Eskenazi, B., & Wyrobek, A. J. (2001). Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertility and Sterility*, 75(2), 237-248.

Kim, S. H., Yu, D. H., & Kim, Y. J. (2010). Apoptosis-like change, ROS, and DNA status in cryopreserved canine sperm recovered by glass wool filtration and Percoll gradient centrifugation techniques. *Animal Reproduction Science*, 119(1-2), 106-114.

Linde-Forsberg, C. (1991). Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 21(3), 467-485.

Linde-Forsberg, C. (2001). *Regulations and recommendations for international shipment of chilled and frozen canine semen. In Recent advances in small animal reproduction* (Vol. 1209). International Veterinary Information Service (www. ivis. org), Document.

MacPherson, A., Scott, R., & Yates, R. (1993). The effect of selenium supplementation in subfertile males. *Trace Elements in Man and Animals (TEMA8). Anke M, Meissner D, Mills CF (Editors). Media Touristik, Gersdorf*, 19(6), 566-70.

Martínez, A. P. (2004). Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Science*, 82, 209-224.

Michael, A. J., Alexopoulos, C., Pontiki, E. A., Hadjipavlou-Litina, D. J., Saratsis, P., Ververidis, H. N., & Boscos, C. M. (2009). Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 112(1-2), 119-135.

Nijs, M., Creemers, E., Cox, A., Janssen, M., Vanheusden, E., Castro-Sanchez, Y., Thijs, H. & Ombelet, W. (2009). Influence of freeze-thawing on hyaluronic acid binding of human spermatozoa. *Reproductive Biomedicine Online*, 19(2), 202-206.

Ortega-Ferrusola, C., Anel-Lopez, L., Martin-Munoz, P., Ortiz-Rodriguez, J. M., Gil, M. C., Alvarez, M., ... & Peña, F. J. (2017). Computational flow cytometry reveals that cryopreservation induces spermptosis but subpopulations of spermatozoa may experience capacitation-like changes. *Reproduction*, 153(3), 293-304.

Ozkavukcu, S., Erdemli, E., Isik, A., Oztuna, D., & Karahuseyinoglu, S. (2008). Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 25(8), 403-411.

Pena, F. J., Johannisson, A., Wallgren, M., & Martinez, H. R. (2003). Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Animal Reproduction Science*, 78(1-2), 85-98.

Perez-Llano, B., Lorenzo, J. L., Yenes, P., Trejo, A., & Garcia-Casado, P. (2001). A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology*, 56(3), 387-398.

Safa, S., Moghaddam, G., Jozani, R. J., Kia, H. D., & Janmohammadi, H. (2016). Effect of vitamin E and selenium nanoparticles on post-thaw variables and oxidative status of rooster semen. *Animal Reproduction Science*, 174, 100-106.

Shakouri, N., Soleimanzadeh, A., Rakhshanpour, A., & Bucak, M. N. (2021). Antioxidant effects of supplementation of 3, 4-dihydroxyphenyl glycol on sperm parameters and oxidative markers following cryopreservation in canine semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 56(7), 1004-1014.

Shalgi, R., Smith, T. T., & Yanagimachi, R. (1992). A quantitative comparison of the passage of capacitated and uncapacitated hamster spermatozoa through the uterotubal junction. *Biology of Reproduction*, 46(3), 419-424.

Sheikholeslami, S. A., Soleimanzadeh, A., Rakhshanpour, A., & Shirani, D. (2020). The evaluation of lycopene and cysteamine supplementation effects on sperm and oxidative stress parameters during chilled storage of canine semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(9), 1229-1239.

Siegel, R. B., Murray, F. A., Julien, W. E., Moxon, A. L., & Conrad, H. R. (1980). Effect of in vitro selenium supplementation on bovine sperm motility. *Theriogenology*, 13(5), 357-367.

Sokolowska, A., García, B. M., Fernández, L. G., Ortega-Ferrusola, C., Tapia, J. A., & Peña, F. J. (2009). Activated caspases are present in frozen–thawed canine sperm and may be related to post thaw sperm quality. *Zygote*, 17(4), 297-305.

Tselkas, K., Saratsis, P. H., Karagianidis, A., & Samouilidis, S. (2000). Extracellular presence of reactive oxygen species (ROS) in fresh and frozen-thawed canine semen and their effects on some semen parameters. *DTW. Deutsche Tierarztliche Wochenschrift*, 107(2), 69-72.

Wang, H., Zhang, J., & Yu, H. (2007). Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: comparison with selenomethionine in mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(10), 1524-1533.

Wyrobek, A. J., Gordon, L. A., Burkhart, J. G., Francis, M. W., Kapp Jr, R. W., Letz, G., ... & Whorton, M. D. (1983). An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm tests in nonhuman mammals: A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 115(1), 1-72.

Zhang, J., Wang, H., Yan, X., & Zhang, L. (2005). Comparison of short-term toxicity between Nano-Se and selenite in mice. *Life Sciences*, 76(10), 1099-1109.