فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال یازدهم، شماره چهارم، زمستان ۱۴۰۲

مقاله پژوهشی

اثرات نانوذرات سلنیوم بر برخی آنزیم‌ها و فراسنجه‌های بیوشیمایی مایع اسپرمی مولدین نر قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

جواد مهدوی جهان‌آباد[۱]*، ابوالحسن راستیان‌نسب[۲]، سید حسین مرادیان[۱]، محمد میثم صلاحی اردکانی[۳]، سید عبدالحمید حسینی[۱]، اسماعیل کاظمی[۱]

DOI: 10.22124/japb.2023.22882.1481
تاریخ دریافت: شهریور ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۴۰۱

چکیده

در پژوهش حاضر، تاثیر سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم بر آنزیم‌های مایع اسپرمی شامل آسپارات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آلکالین فسفاتاز (ALP)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز، لیزوزیم، مالون دی‌آلدهید (MDA) و آلبومین در مولدین نر قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی شد. تعداد ۸۴ قطعه ماهی مولد نر سه ساله به چهار گروه آزمایشی با سه تکرار تقسیم شدند. ماهیان با جیره‌های حاوی ۰ (شاهد)، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم نانوذرات سلنیوم در کیلوگرم جیره به مدت ۶۰ روز تغذیه شدند. نتایج بررسی مایع اسپرمی ماهیان تیمارهای مختلف از نظر میزان ALP، ALT و لیزوزیم مایع اسپرمی اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵). بیشترین میزان آنزیم ALT، در تیمار ۲ میلی‌گرم نانوذرات سلنیوم بود و میزان MDA، ALT و ALP مایع اسپرمی در تیمارهای دیگر نسبت به تیمار شاهد به صورت معنی‌داری بالاتر بود (P<۰/۰۵). بر اساس نتایج به دست آمده برای افزایش بازده تکثیر مولدین نر قزل‌آلای رنگین‌کمان و بهبود شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و ایمنی مایع اسپرمی، می‌توان افزودن مقدار ۲ میلی‌گرم نانوذرات سلنیوم در کیلوگرم را به جیره غذایی توصیه کرد.

واژگان کلیدی: *قزل‌آلای رنگین‌کمان، فراسنجه‌های بیوشیمیایی، نانوذرات سلنیوم، مایع اسپرمی.*

۱- کارشناس ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران.
۲- استادیار بخش ژنتیک و بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران.
۳- دکتری بخش بهداشت و بیماری‌ها، مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران.
* نویسنده مسئول: mahdavejavad60@yahoo.com

مقدمه

کنترل تولیدمثل ماهیان موضوعی کلیدی در آبزی‌پروری است. کیفیت گامت ماهیان یکی از شاخص‌های محدود کننده موفقیت تولیدمثلی است. علاوه بر این، کیفیت گامت ماهیان می‌تواند بسیار متغیر باشد و تحت تاثیر تعداد زیادی از شاخص‌های خارجی قرار بگیرد (Koprucu et al., 2015). از این رو، موضوع کیفیت گامت توجه زیادی را به خود جلب کرده است. با وجود تلاش‌های فراوان برای درک بهتر شاخص‌های مربوط به کنترل کیفیت گامت، وضع موجود با وضع مطلوب فاصله دارد و کنترل کیفیت گامت یک مسئله در آبزی‌پروری باقی مانده است (Koprucu et al., 2015). کنترل کیفیت اسپرم به دلیل اهمیت آن در تولید گونه‌های تجاری و همچنین معرفی گونه‌های جدید با سود تجاری بالا، یکی از مباحث اصلی صنعت آبزی‌پروری است (Cabrita et al., 2014). ارزیابی کیفیت اسپرم موجب درک بهتر مکانیسم‌هایی می‌شود که اسپرم را تحت تاثیر قرار می‌دهند و همچنین مرتبط با کنترل برخی از شاخص‌هایی است که بر کیفیت گامت اثرگذار هستند. بیشتر این شاخص‌هایی مرتبط با عملکرد مولد نر، تاریخچه زندگی، محیط اجتماعی و یا شرایط پرورش مانند تغذیه مولدین، دستکاری محیطی و روش‌های القای تخم‌ریزی یا دستکاری اسپرم و مدیریت هستند (Cabrita et al., 2014). حد مطلوب شاخص‌های تولید و کیفیت اسپرم باید بر اساس گونه‌های مختلف، سرنوشت اسپرم یا راهکارهای تولیدمثلی مانند لقاح مصنوعی، انجماد، بانکداری ژن یا حجم تولید تعیین شوند (Cabrita et al., 2014). مطالعات در این زمینه به توسعه روش‌های مناسب ارزیابی کیفی و همچنین توسعه بیومارکرهای موفقیت تولیدمثلی با پتانسیل کاربرد صنعتی برای پیش‌بینی کیفیت گامت کمک می‌کند.

شاخص‌هایی مانند تغذیه مولدین، اپی‌ژنتیک (Epigenetics) و انجماد در بهبود کیفیت اسپرم نقش دارند (Cabrita et al., 2014). تغذیه مناسب به منظور دستیابی به میزان رشد مطلوب و حفظ سلامت ماهیان ضروری است. در دهه‌های گذشته تلاش‌هایی برای درک ارتباط بین تغذیه و عملکرد تولیدمثلی در ماهیان پرورشی صورت گرفته و مواد مغذی مختلفی برای بهبود کیفیت گامت استفاده شده است. در میان مواد مغذی مختلف، یکی از مهم‌ترین اجزای جیره غذایی آبزیان مواد معدنی است. وجود مواد معدنی کمیاب در جیره

ضروری است، حتی تغییرات جزئی سطوح این مواد اثرات معنی‌داری بر سلامت و عملکرد تولیدمثلی دارد (Hedaoo et al., 2008). از سوی دیگر سلنیوم یک ماده معدنی کمیاب ضروری است که در بسیاری از عملکردهای فیزیولوژیکی جانوران نقش دارد. سلنیوم به عنوان جزء سازنده آنزیم‌هایی مانند گلوتاتیون پراکسیدازها و همچنین سلنوپروتئین‌ها، نقش مهمی در فرایندهای زیستی مختلف شامل دفاع آنتی‌اکسیدانی، باروری نرها و ماده‌ها، متابولیسم تیروئید، عملکرد ایمنی، عملکرد غدد درون‌ریز، بیماری‌های قلبی- عروقی و تکامل و عملکرد ماهیچه ایفا می‌کند (Ahsan et al., 2014). سلنیوم یک تقویت کننده تغذیه‌ای قوی برای سیستم ایمنی و آنتی‌اکسیدانی است که موجب افزایش فعالیت فنول اکسیداز، انفجار تنفسی، فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز (GPx)، گلوتاتیون ردوکتاز (GR) و گلوتاتیون S- ترانسفراز (GST)، فعالیت بیگانه‌خواری و مقاومت در برابر عامل بیماری‌زا می‌شود (Chiu et al., 2010). با توجه به این که در اغلب ماهیان لقاح خارجی است، بنابراین ممکن است گامت‌ها تحت تاثیر قرار گرفته و عملکرد تولیدمثلی تحت الشعاع قرار بگیرد. در نتیجه شاخص‌های بیوشیمیایی اسپرم ممکن است بر توانایی تولیدمثلی اثرگذار باشند (Johari, 2014).

سلنیوم برای تولیدمثل جنس نر اهمیت زیادی دارد و کمبود شدید آن بر باروری دام‌ها، جانوران آزمایشگاهی و انسان اثرات منفی دارد (Turanov et al., 2011). کمبود سلنیوم یا سطوح پایین آن ممکن است منجر به اختلالات مختلف تولیدمثلی مانند باروری ضعیف، عدم تکامل جنین (سقط جنین) و نگهداشتن (از دست ندادن) جفت شود (Shi et al., 2010). نتایج مطالعه Behne و همکاران (۱۹۹۶) نشان داد که ریخت‌شناسی بیضه و عملکردهای آن در رت تحت تاثیر کمبود شدید سلنیوم قرار می‌گیرد و سلنیوم برای بیوسنتز تستوسترون و تشکیل و تکامل طبیعی اسپرماتوزوآ ضروری است.

انحراف از مقادیر مطلوب سلنیوم جیره، بالاتر یا پایین‌تر، ممکن است سبب تولید اسپرماتوزوآ غیرطبیعی شود و تحرک و باروری را تحت تاثیر قرار دهد. بنابراین به منظور حفظ عملکرد تولیدمثلی نرها و جلوگیری از ناباروری باید سلنیوم جیره در حد مطلوب باشد (Ahsan et al., 2014).

در دهه‌های اخیر، ترکیب مایع اسپرمی و پروفایل آنزیمی اسپرم مورد توجه خاصی قرار گرفته است که بیشتر مطالعات در آزادماهیان (Lahnsteiner et al., 1998) و کپورماهیان (Billard et al., 1995) صورت گرفته است. بررسی پلاسما شامل اجزای غیرآلی (K^+، Na^+، Ca^{2+}، Mg^{2+}) که در فرایند بازداری و یا فعال‌سازی تحرک اسپرم دخیل هستند (Morisawa et al., 1983a,b,c)، ترکیبات آلی که در متابولیسم انرژی نقش دارند (تری گلیسریدها، گلیسرول، اسیدهای چرب، گلوکز، لاکتات؛ Lahnsteiner et al., 1993) و چندین آنزیم (اسید فسفاتاز، آلکالین فسفاتاز، بتا-دی-گلوکورونیداز، پروتئاز، مالات دهیدروژناز، لاکتات دهیدروژناز، آدنوزین تری‌فسفاتاز، آسپارتات آمینوترانسفراز) است (Lahnsteiner et al., 1996). مهم‌ترین سوبستراها و متابولیت‌های مسیرهای متابولیک اسپرماتوزوآ که مورد مطالعه قرار گرفته‌اند شامل ATP، ADP، AMP، NADH، چربی‌ها، اسیدهای چرب، گلوکز، لاکتات، پیروات و کراتین فسفات هستند (Lahnsteiner et al., 1998). آنزیم‌های کراتین کیناز، مالیک، گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز، ایزوسیترات دهیدروژناز، مالات دهیدروژناز و لاکتات دهیدروژناز نیز در برخی از ماهیان از جمله هرینگ (Gronczewska et al., 2003)، گربه‌ماهی و کپور (Rurangwa et al., 2002) به منظور ارزیابی کیفیت اسپرم سنجش می‌شوند. ویژگی‌های کلی اسپرم که در بالا توضیح داده شد به عنوان یک دیدگاه جهانی از کیفیت اسپرم مطرح است، ولی در توصیف پتانسیل اسپرماتوزوآ در موفقیت لقاح دچار اشکال است. با توجه به ناهمگنی آشکار در سلول‌های اسپرماتوزوآ، ایده توسعه بررسی اسپرم به منظور در نظر گرفتن شاخص‌های اسپرم به صورت جداگانه مطرح است. در ماهیان مانند دیگر مهره‌داران، نخستین بافتی که سلنیوم در آن تجمع پیدا می‌کند، کبد است و این اندام مکان اصلی ساخت سلنوپروتئین‌ها است (Sato et al., 1980). با توجه به این که سلنیوم به عنوان سلنومتیونین و سلنوسیستئین در پروتئین‌ها حضور دارد، می‌تواند در تمامی بافت‌ها و اندام‌ها به مقدار متفاوتی تجمع یابد. در ماهیان، اندام و بافتی که به طور اختصاصی سلنیوم در آن تجمع پیدا می‌کند در مطالعه‌ای روی اردک‌ماهی (*Esox lucius*) بالغ بررسی شد. نتایج نشان داد که کبد و کلیه بیشترین میزان غلظت سلنیوم را داشتند و پس از آن در تخمدان (تخم)، عضله و استخوان‌ها به ترتیب تجمع بالاتری از سلنیوم

در مقایسه با بافت‌های دیگر مشاهده شد (Muscatello et al., 2006).

برخی از آنتی‌اکسیدان‌ها به صورت چرخه‌های زیستی متشکل از اجزای متعددی از جمله آنزیم، کوفاکتور و ویتامین عمل می‌کنند. کوفاکتورها گروهی از مواد هستند که به آنزیم‌ها متصل می‌شوند و کار آنها را تسهیل می‌کنند. مهم‌ترین نمونه این سیستم‌ها، سیستم گلوتاتیون است که از چند مرحله تشکیل شده است و اساسا هیدروژن پراکسید را کاتالیز می‌کند. این سیستم شامل گلوتاتیون، گلوتاتیون- دی‌سولفید- ردوکتاز (Glutathione-disulfide-reductase) و گلوتاتیون پراکسیداز است (Hashida et al., 2000). گلوتاتیون در بیشتر سلول‌ها وجود دارد و از مهم‌ترین مولکول‌های دفاعی درون سلول در برابر آسیب‌های ناشی از گونه‌های اکسیژن فعال است. گلوتاتیون مولکولی است پپتیدی که از سه اسید آمینه گلوتامین، سیستئین و گلایسین تشکیل شده است (Forni and Willson, 1986). گلوتاتیون پراکسیدازها، به عنوان بخشی از سیستم گلوتاتیون در جایگاه فعال خود یک سلنوسیستئین دارند که در آن سلنیوم جایگزین گوگرد شده است. این آنزیم‌ها تجزیه هیدروژن پراکسید را بر عهده دارند. گلوتاتیون پراکسیدازها همچنین باعث کاهش پراکسیدهای آلی به الکل می‌شوند و مسیر دیگری را برای از بین بردن اکسیدان‌های سمی به وجود می‌آورند (Decker and Van Holde, 2010).

از آنزیم‌های دیگر برای ارزیابی کیفیت مایع اسپرمی، بررسی آنزیم‌هایی مانند گلوتامیک اکسالواستیک ترانس‌آمیناز (GOT) یا آسپارتات ترانس‌آمیناز (AST)، گلوتامیک پیروات ترانس‌آمیناز (GPT) یا آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، لاکتات دهیدروژناز (LDH) و آلکالین فسفاتاز (ALP) است. این آنزیم‌ها در متابولیسم سلولی اسپرماتوزوئیدها نقش دارند و عمدتا در داخل سلول‌های اسپرم قرار دارند. با اندازه‌گیری میزان حضور این آنزیم‌ها در مایع اسپرمی می‌توان درصد سلول‌های اسپرماتوزوئید زنده، متحرک و بارور را محاسبه کرد (Miura et al., 1991). فعالیت آنزیم‌ها در مایع اسپرمی می‌تواند به عنوان یک شاخص استرس مورد استفاده قرار گیرد. لاکتات دهیدروژناز آنزیمی است که تبدیل پیرووات (محصول نهایی گلیکولیز) به لاکتات را کاتالیز می‌کند و در نتیجه در طی گلیکولیز ATP تولید می‌کند که نیاز به آن در هنگام استرس افزایش پیدا می‌کند. مواجهه ماهی با استرس‌های زیاد در طی دوره

پرورش طبیعی است. در این حالت یک آنتی‌اکسیدان مناسب می‌تواند استرس‌های اکسیداتیو را کاهش دهد و از غشای اسپرمی در برابر پراکسیداسیون چربی محافظت کند و یا حتی آزاد شدن آنزیم‌هایی همچون AST، ALP و LDH را به درون مایع اسپرمی کاهش دهد. فعالیت خارج سلولی ترانس‌آمینازها به دلیل نشت آنها به درون مایع اسپرمی ناشی از آسیب به اسپرم است، بنابراین ترانس‌آمینازهای مایع اسپرمی به عنوان شاخصی برای اندازه‌گیری آسیب‌های متحمل شده توسط اسپرم طی شرایط مختلف ارزیابی می‌شوند (Lahnsteiner et al., 1998).

مایع اسپرمی نقش حیاتی در متابولیسم اسپرم، عملکرد، بقا و تحرک آن دارد. یون‌هایی همچون سدیم، پتاسیم و کلر در مایع اسپرمی ایجاد تعادل اسمزی می‌کنند، در حالی که عناصر کمیاب ضروری اجزای بسیاری از آنزیم‌های مهم هستند. بنابراین ارزیابی بیوشیمیایی مایع اسپرمی یک معیار مهم برای ارزیابی کیفیت اسپرم و توانائی آن است. ساختار اسپرم و ترکیب بیوشیمیایی مایع اسپرمی ممکن است درون خانواده‌ها بیشترین یا کمترین تنوع را داشته باشد. هدف از انجام این پژوهش افزایش بازده تکثیر مولدین نر قزل‌آلای رنگین‌کمان و بهبود شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و ایمنی مایع اسپرمی است.

مواد و روش‌ها

ماهیان و شرایط پرورش

این پژوهش در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج، وابسته به موسسه تحقیقات شیلات ایران، واقع در ۲۶ کیلومتری جنوب شهر یاسوج، اجرا شد. تعداد استخرهای مورد نیاز برای اجرای پژوهش ۱۲ استخر با ابعاد ۳۰ متر (طول)، ۱ متر (عرض) و ۱ متر (ارتفاع) بود. آب استخرها از یک چشمه که در فاصله حدود ۵۰۰ متری از مرکز قرار دارد، تهیه شد.

استخرهای مورد نظر قبل از معرفی ماهیان شسته شده و نکات بهداشتی و ضدعفونی برای آنها اعمال شد. بعد از شستشو، استخرها به مدت ۲۴ ساعت به وسیله مواد ضدعفونی کننده رایج از جمله ترکیبی از سولفات مس، فرمالین و نمک ضدعفونی شدند. سپس ۸۴ قطعه مولد نر قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) از بین گله مولدین بهگزینی شده مرکز انتخاب شد. برای انتخاب مولدین معیارهایی همچون سلامت ظاهری ماهی مد نظر قرار گرفت. ماهیان مورد استفاده سه ساله بودند و

تلاش شد از ماهیان با وزن مشابه و هم‌سن استفاده شود.

ماهیان انتخاب شده به طور تصادفی در ۱۲ استخر توزیع شدند. پس از سازگاری، ماهیان بر اساس جیره به چهار تیمار آزمایشی تقسیم شدند که هر تیمار شامل ۲۱ قطعه مولد نر و دارای سه تکرار بود. میانگین وزن ماهیان در تیمار اول (شاهد) ۱۹۹/۱۹±۲۲۱۹ گرم، تیمار دوم ۲۱۷/۵۱±۲۲۳۷ گرم، تیمار سوم ۲۱۸/۲۱±۲۲۲۱ گرم و تیمار چهارم ۲۲۱/۳۵±۲۲۵۲ گرم بود (میانگین ± انحراف معیار).

گروه‌بندی بر اساس میزان نانوذرات سلنیوم (American Elements، آمریکا) استفاده شده در تیمارهای مختلف انجام شد که شامل تیمار ۱ (شاهد) فاقد نانوذرات سلنیوم، تیمار ۲ حاوی ۰/۵ میلی‌گرم سلنیوم، تیمار ۳ حاوی ۱ میلی‌گرم سلنیوم و تیمار ۴ حاوی ۲ میلی‌گرم سلنیوم در کیلوگرم جیره بود.

مراحل ساخت جیره و غذادهی

جیره تجاری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (EXB2، کیمیاگران تغذیه، ایران) به عنوان جیره پایه مورد استفاده قرار گرفت. ترکیب تغذیه‌ای جیره پایه دارای ۳۹ درصد پروتئین، ۱۳/۵ درصد چربی، ۳/۵ درصد فیبر، ۱۰ درصد رطوبت و همچنین اندازه خوراک ۱۰ میلی‌متر بود. طی دوره سازگاری (دو هفته)، ماهیان با جیره تجاری EXB2 تغذیه می‌شدند.

برای آماده‌سازی جیره‌های آزمایشی، در هر تیمار، مقدار محاسبه شده نانوذرات سلنیوم برای دست‌یابی به مقدار مورد نظر، ابتدا در آب مقطر حل شده و سپس به صورت جداگانه بر روی جیره پایه اسپری شد. جیره گروه شاهد بدون اضافه کردن نانوذرات سلنیوم آماده شد. به منظور یکسان‌سازی شرایط، در تیمار شاهد مقدار مساوی آب مقطر (فاقد نانوذرات سلنیوم) بر روی غذا اسپری شد (Ramsden et al., 2009). جیره‌های آماده شده به مدت ۳ ساعت در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. سپس برای محافظت از جیره‌ها و جلوگیری از رها شدن نانوذرات و ورود آنها به محیط آب، جیره‌ها توسط لایه‌ای از ژلاتین گاوی پوشانده شدند (Ramsden et al., 2009). بدین منظور، ابتدا محلول ۱۰ درصد ژلاتین گاوی در آب مقطر تهیه شد و سپس بر روی هر یک از انواع جیره‌ها به میزان ۵۰ میلی‌لیتر از محلول ژلاتین به صورت یکنواخت اسپری شد. در پایان جیره‌ها به مدت ۳ ساعت دیگر در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. البته باید توجه داشت

که فرایند آماده‌سازی جیره به منظور جلوگیری از فساد و در دسترس بودن مواد افزودنی در هر هفته انجام شد.

غذادهی به صورت روزانه، در دو نوبت (۹ صبح و ۶ عصر) و به میزان ۱ درصد وزن بدن به مدت دو ماه انجام شد.

شاخص‌های کیفیت آب طی دوره پرورش ماهیان به صورت منظم ثبت شد. آب چشمه با دمای ۱۱±۱/۵ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن ۷/۹±۰/۶ میلی‌گرم در لیتر و pH ۷/۶±۰/۳ تامین شد. مقدار خطرناکی برای غلظت آمونیاک ثبت نشد. میزان آمونیاک کمتر از ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر بود و با استفاده از کیت سنجش آمونیاک (Insta-Test® Analytic، آلمان) اندازه‌گیری شد. از دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در طول دوره پرورش استفاده شد.

نحوه اسپرم‌گیری

نمونه‌گیری اسپرم از مولدین نر ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در پایان دوره آزمایش انجام گرفت. مولدین نر پس از معاینه و بیهوشی با پودر گل میخک (۱۵۰ ppm) زیست‌سنجی شدند و طول و وزن آنها تعیین شد. سپس با ماساژ شکمی اقدام به اسپرم‌کشی شد. اسپرم هر ماهی به طور جداگانه استحصال شد و در مجموع از هر کدام از ماهی‌های صید شده حدود ۱۰ میلی‌لیتر اسپرم به دست آمد (Dreanno et al., 1998). اسپرم‌های جمع‌آوری شده در سانتریفیوژ (XK 700 Palm Series، Zeint، تایوان) قرار داده شد تا مایع اسپرمی آنها جداسازی شود. مایع اسپرمی به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد و پس از انجماد به منظور انجام آزمایش‌های مورد نظر به دانشگاه شهید چمران اهواز فرستاده شد.

ارزیابی کمیت و کیفیت اسپرم

به منظور سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی اسپرم از سه مولد نر در هر تکرار و در مجموع ۹ مولد در هر تیمار حدود ۱۰ میلی‌لیتر اسپرم استحصال و شاخص‌های بیوشیمیایی آن ارزیابی شد.

فراسنجه‌های بیوشیمیایی مایع اسپرمی

آلکالین‌فسفاتاز

برای سنجش آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) از روش DGKC (۱۹۷۲) بر اساس تبدیل نیتروفنیل‌فسفات به فسفات استفاده شد. این آزمایش با استفاده از کیت تشخیصی (پارس آزمون، ایران) انجام شد و جذب نمونه‌ها با

دستگاه اتوآنالایزر در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

سوپراکسید دیسموتاز

برای ارزیابی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) بر اساس روش Marklund و Marklund (۱۹۷۴) اندازه‌گیری شد.

پراکسیداسیون لیپید

برای ارزیابی سیستم دفاع آنتی اکسیدانی، میزان پراکسیداسیون لیپید با استفاده از سنجش MDA با روش کالریمتری اندازه‌گیری شد.

آسپارتات‌آمینوترانسفراز

برای سنجش آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) از روش IFCC بر اساس تبدیل آسپارتات به گلوتامات و در نهایت به مالات استفاده شد (Moss and Henderson, 1999). این آزمایش با استفاده از کیت تشخیصی (پارس آزمون، ایران) انجام شد و جذب نمونه‌ها با دستگاه اتوآنالایزر و در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

آلانین‌آمینوترانسفراز

برای سنجش آنزیم آلانین‌آمینوترانسفراز (ALT) از روش IFCC بر اساس تبدیل آلانین به پیرووات و در نهایت به لاکتات استفاده شد (Moss and Henderson, 1999). انجام این آزمایش با استفاده از کیت تشخیصی (پارس آزمون، ایران) انجام شد و جذب نمونه‌ها با دستگاه اتوآنالایزر و در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

آلبومین

سنجش این شاخص بیوشیمیایی با استفاده از کیت‌های تشخیصی (پارس آزمون، ایران) و توسط دستگاه اتو آنالایزر (Roche Hitachi 911 Chemistry Analyzer، Hitachi، ژاپن) انجام شد.

لیزوزیم

میزان فعالیت لیزوزیم مایع اسپرمی از طریق جذب نوری و با استفاده از دستگاه بیوفتومتر (Sartorius، آلمان) و طبق روش توصیه شده توسط Ellis (۱۹۹۰) اندازه‌گیری شد.

کاتالاز

در نمونه‌های مایع اسپرمی برای ارزیابی فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)، اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری کاتالاز بر اساس روش Goth (۱۹۹۱) صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

هر استخر به عنوان یک واحد آزمایشی در نظر گرفته شد و داده‌های آماری به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد. در این مطالعه کلیه محاسبات آماری توسط نرم‌افزار SPSS 17 انجام شد. ابتدا نرمال‌بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk بررسی شد و داده‌های غیرنرمال توسط لگاریتم نرمال شدند. بعد از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و برای مشخص شدن تفاوت بین میانگین‌ها از پس‌آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

نتایج

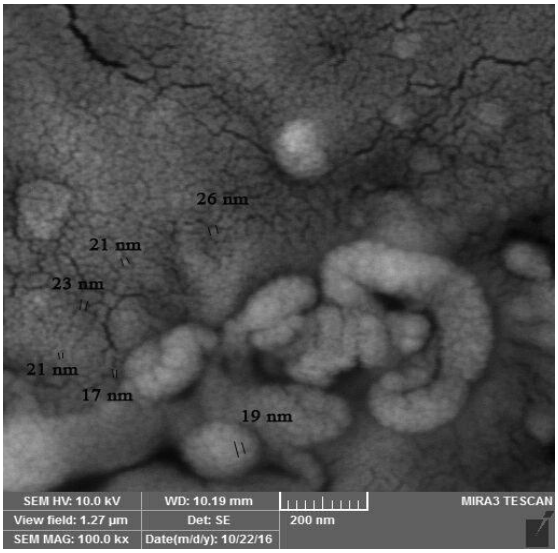
زیست‌سنجی مولدین نر

با زیست‌سنجی مولدین نر قزل‌آلای رنگین‌کمان مشخص شد که طول کل آنها از ۵۴/۳±۳/۰ سانتی‌متر در گروه تغذیه شده با ۰/۵ میلی‌گرم نانوسلنیوم تا ۵۸/۱±۲/۱ سانتی‌متر در گروه شاهد متغیر بود، ولی اختلاف معنی‌داری میان طول کل مولدین نر آزمایشی وجود نداشت (P>۰/۰۵). وزن ماهیان نیز از ۲/۲۸۰±۰/۳۰۵ کیلوگرم در گروه تغذیه شده با ۲ میلی‌گرم نانوذرات سلنیوم تا ۲/۴۷۰±۰/۲۴۵ کیلوگرم در گروه تغذیه شده با ۱ میلی‌گرم نانوذرات سلنیوم متغیر بود، ولی اختلاف معنی‌داری میان وزن مولدین نر وجود نداشت (جدول ۱). شکل ۱ تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (SEM) نانوذرات سلنیوم را نشان می‌دهد.

جدول ۱: مقایسه طول کل و وزن مولدین نر (میانگین ± انحراف معیار)

تیمارهای آزمایشی	طول کل (سانتی‌متر)	وزن (کیلوگرم)
شاهد	۵۸/۱±۲/۱	۲/۴۵۵±۰/۲۵۵
۰/۵ میلی‌گرم نانوسلنیوم	۵۴/۳ ± ۳/۰	۲/۳۰۰±۰/۲۸۰
۱ میلی‌گرم نانوسلنیوم	۵۷/۲±۲/۷	۲/۴۷۰±۰/۲۴۵
۲ میلی‌گرم نانوسلنیوم	۵۶/۱±۳/۲	۲/۲۸۰±۰/۳۰۵

اختلاف معنی‌داری بین هیچ کدام از تیمارها در هیچ یک از شاخص‌ها مشاهده نشد (P>۰/۰۵).



شکل ۱: تصویر نانوذرات سلنیوم میکروسکوپ الکترونی SEM

فراسنجه‌های بیوشیمیایی مایع اسپرمی

در میزان آلبومین اختلاف معنی‌داری در تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد مشاهده نشد (P>۰/۰۵) و میزان آن از ۳/۷۹ گرم در دسی‌لیتر در گروه تغذیه شده با ۰/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات سلنیوم تا ۴/۴۳ گرم در دسی‌لیتر در گروه تغذیه شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات سلنیوم متغیر بود. تغییرات میزان آلبومین روند مشخصی نداشت (جدول ۲).

میزان آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) نیز در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵). میزان این آنزیم از ۰/۶۴ در تیمار شاهد تا ۰/۵۸ در گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات سلنیوم متغیر بود (جدول ۲).

مقادیر آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) نیز از ۶/۴۲ در گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات سلنیوم تا ۲۳/۴۰ در گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات سلنیوم متغیر بود. میزان ALT درگروه تغذیه شده با ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم اختلاف معنی‌داری با گروه‌های دیگر داشت (P<۰/۰۵؛ جدول ۲).

جدول ۲: شاخص‌های بیوشیمیایی مایع اسپرمی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی مقادیر مختلف نانوذرات سلنیوم (میانگین ± انحراف معیار)

تیمارها / شاخص‌ها	مقدار نانوذره سلنیوم در جیره (mg/kg)			
	۰ (شاهد)	۰/۵	۱	۲
آلبومین (g/dL)	۴/۰۰±۰/۳۹ a	۳/۷۹±۰/۰۸ a	۴/۴۳±۱/۵۸ a	۳/۸۴±۰/۰۶ a
AST (U/L)	۰/۶۴±۰/۰۲ a	۰/۶۳±۰/۰۶ a	۰/۶۱±۰/۱۶ a	۰/۵۸±۰/۰۳ a
ALT (U/L)	۷/۴۲±۲/۱۰ a	۶/۴۲±۰/۳۴ a	۶/۸۲±۰/۴۷ a	۲۳/۴۰±۴/۶۰ b
ALP (U/L)	۲۵/۰۶±۱/۱۵ a	۲۴/۶۶±۱/۰۹ a	۳۰/۱۳±۲/۷۰ a	۳۸/۳۰±۱/۰۲ b

AST: آسپارتات آمینوترانسفراز ؛ ALT: آلانین آمینوترانسفراز ؛ ALP: آلکالین فسفاتاز.
حروف متفاوت در هر ردیف اختلاف معنی‌دار را بین تیمارها نشان می‌دهد (P<۰/۰۵).

تیمارهای مختلف از لحاظ میزان آلکالین فسفاتاز (ALP) اختلاف معنی‌داری را با هم نشان دادند (P<۰/۰۵). میزان ALP از ۳/۸۳ در گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات سلنیوم تا ۲۴/۶۶ در گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات سلنیوم متغیر بود (جدول ۲).

شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی

جدول ۳ نتایج تاثیر سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم را بر فعالیت آنزیم کاتالاز در مایع اسپرمی مولدین نر قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان می‌دهد. بر اساس این نتایج کمترین فعالیت کاتالاز در گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات سلنیوم مشاهده شد (۵۰/۰۵ واحد در میلی‌گرم پروتئین) که اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد (۸۸/۳۲ واحد در میلی‌گرم پروتئین) و گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات سلنیوم (۵۸/۵۳ واحد در میلی‌گرم پروتئین) نداشت (P>۰/۰۵). بیشترین میزان این آنزیم نیز در گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات سلنیوم بود که به طور معنی-داری بیشتر از گروه‌های دیگر بود (P<۰/۰۵).

نتایج تاثیر سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در مایع اسپرمی مولدین نر قزل‌آلای رنگین‌کمان در جدول ۳ آمده است. بر اساس این نتایج کمترین میزان سوپراکسید دیسموتاز در گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۱ میلی‌گرم

در کیلوگرم نانوذرات سلنیوم مشاهده شد (۹۲/۱۳ واحد در میلی‌گرم پروتئین) که با گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات سلنیوم (۱۱۰/۵۹ واحد در میلی‌گرم پروتئین) اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵)، ولی به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد (۱۳۹/۷۴ واحد در میلی‌گرم پروتئین) و گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات سلنیوم (۱۳۷/۶۴ واحد در میلی‌گرم پروتئین) بود (P<۰/۰۵). گروه شاهد و تیمارهای دوم و چهارم نیز اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند (P>۰/۰۵).

میزان مالون دی آلدهید در گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات سلنیوم (۳۶۹۱/۶۴ نانومول در میلی‌گرم پروتئین) به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد (۶۲/۳۷ نانومول در میلی‌گرم پروتئین) و گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات سلنیوم (۶۱/۶۰ نانومول در میلی‌گرم پروتئین) بود (P<۰/۰۵)، ولی اختلاف معنی‌داری با گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات سلنیوم (۶۰۰/۵۴ نانومول در میلی‌گرم پروتئین) نشان نداد (P>۰/۰۵؛ جدول ۳).

فعالیت آنزیم لیزوزیم در سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم جیره غذایی در مایع اسپرمی مولدین نر قزل‌آلای رنگین‌کمان متغیر بود. بر اساس آن می‌توان گفت فعالیت لیزوزیم در تیمارهای تغذیه شده با نانوذرات سلنیوم یک روند افزایشی داشت.

جدول ۳: شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و ایمنی مایع اسپرمی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی مقادیر مختلف نانوذرات سلنیوم (میانگین ± انحراف معیار)

تیمارها / شاخص‌ها	مقدار نانوذره سلنیوم در جیره (mg/kg)			
	۰ (شاهد)	۰/۵	۱	۲
کاتالاز (U/mg Protein)	۸۸/۳۲±۶/۷۳ [a]	۱۸۱/۰۵±۳۰/۹۱ [b]	۵۸/۵۳±۲/۴۹ [a]	۵۰/۰۵±۲/۲۰ [a]
SOD (U/mg Protein)	۱۳۹/۷۴±۲۱/۳۵ [b]	۱۱۰/۵۹±۳۱/۶۵ [ab]	۹۲/۱۳±۱۱/۵۰ [a]	۱۳۷/۶۴±۲۶/۴۷ [b]
MDA (nmol/mg Protein)	۶۲/۳۷±۱۷/۸۵ [a]	۶۱/۶۰±۱۲/۱۳ [a]	۶۰۰/۵۴±۶۰/۵۴ [ab]	۳۶۹۱/۶۴±۱۳۶/۶۴ [b]
لیزوزیم (U/L)	۸۸/۸۰±۱۸/۶۴ [a]	۸۷/۳۰±۱۷/۶۷ [a]	۸۷/۳۲±۱۷/۹۵ [a]	۸۹/۵۰±۱۹/۹۴ [a]

SOD: سوپراکسید دیسموتاز؛ MDA: مالون دی آلدهید.

حروف متفاوت در هر ردیف اختلاف معنی‌دار را بین تیمارها نشان می‌دهد (P<۰/۰۵).

کمترین میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم در تیمار ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم (۸۷/۳۰ واحد در لیتر) و بیشترین میزان فعالیت در تیمار ۲ میلی-گرم در کیلوگرم (۸۹/۵۰ واحد در لیتر) مشاهده شد. نتایج کلی به دست آمده از فعالیت این آنزیم اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵؛ جدول ۳).

بحث

اثر سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی مایع اسپرمی

در مطالعه انجام شده، میزان آلبومین مایع اسپرمی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با افزودن نانوذرات سلنیوم به جیره غذایی یک روند افزایشی را نشان داد، اما در نهایت اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. وجود آلبومین و گلوکز در مایع اسپرمی ماهیان به انرژی زیاد مصرفی بیضه‌ها در طی تولید اسپرماتوزوا یا تولید لپیدهای غشای پلاسمایی اسپرم مرتبط است (Soengas et al., 1996). در مطالعه‌ای، Bunglavan و همکاران (۲۰۱۴) دریافتند که سنجش آلبومین و گلوکز ارزش تشخیصی قابل توجهی در وضعیت ایمنی و سلامت ماهیان دارد و ترکیب نانوذرات سلنیوم و ویتامین E اثرات زیانبخش را در تراکم‌های بالا از بین می‌برد. میزان گلوکز و آلبومین در مطالعه حاضر با نتایج مطالعه‌ای که روی ماهی حوض (*Carassius auratus*) انجام شد، همخوانی دارد (Imanpoor and Zad Majid, 2009).

از آنجا که در مرور منابع انجام شده، موضوعی مشابه با مطالعه حاضر مشاهده نشد که بتوان یافته‌های این مطالعه را با آنها مطابقت داد و به همسو یا غیرهمسو بودن آنها با مطالعات دیگر دست یافت، به ناچار شاخص‌های اندازه‌گیری شده در تیمار شاهد با یافته‌های دیگر مطالعاتی که این شاخص‌ها را در مایع اسپرمی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان اندازه‌گیری و بررسی کرده بودند، مقایسه شد. تفاوت‌های مشاهده شده در مقایسه میزان شاخص‌های اندازه‌گیری شده در این مطالعه و مطالعات دیگر می‌تواند ناشی از عوامل متعددی باشد که ترکیبات مایع اسپرمی را در ماهی‌ها تنظیم می‌کند. عواملی مانند تغذیه مولدین، مدت زمان و نحوه بیهوشی مولدین و همچنین راهکارهای مختلف در روند تکثیر و القای مصنوعی و مکانیسم‌های هورمونی تنظیم کننده بلوغ نهایی طی فصل تکثیر (Soengas et al., 1996).

در مطالعه Sheikhzadeh و همکاران (۲۰۱۰) میزان آنزیم ALP اندازه‌گیری شده در مایع اسپرمی قزل‌آلای رنگین‌کمان در یک دامنه

بسیار گسترده، به ترتیب ۳۳۷ و ۱۱ واحد در لیتر و میزان آنزیم AST ۷۲۲ و ۳۳/۵۶ واحد در لیتر گزارش شده است. در حالی که در مطالعه حاضر میزان این آنزیم‌ها در تیمار شاهد به ترتیب ۲۵/۰۶ و ۰/۶۴ واحد در لیتر اندازه‌گیری شد. در مطالعه Khadjeh و Peyghan (۲۰۰۷) میزان ALT اندازه‌گیری شده در مایع اسپرمی قزل‌آلای رنگین‌کمان ۲۹ واحد در لیتر گزارش شده است و در مطالعه حاضر این آنزیم ۷/۴۲ واحد در لیتر اندازه‌گیری شد. از آنجایی که میزان آنزیم‌ها تحت تاثیر دستکاری به سرعت تغییر می‌کند وجود دامنه گسترده در اعداد گزارش شده در مطالعات مختلف طبیعی بوده و قابل قبول است. Vesely و همکاران (۲۰۰۶) در مطالعه‌ای که بر روی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) انجام دادند، بیان کردند که مقدار ALT و AST سرم در زمان تخم‌ریزی ماهی افزایش می‌یابد. AST و همچنین LDH به عنوان آنزیم‌هایی که از سلول‌های آسیب دیده خارج می‌شوند، در نظر گرفته می‌شوند. بنابراین، افزایش سطح آنها در مایع اسپرمی می‌تواند کاهش کیفیت آن را نشان دهد. در حالی که در پژوهش حاضر میزان AST سرم در گروه شاهد بیشتر از تیمارهای دیگر بود و می‌توان جیره‌های غنی شده با نانوذرات سلنیوم را در شرایط بهینه‌تری قرار داد و از این جهت با مطالعه بالا همخوانی دارد. مشابه این پژوهش توسط خاکشور و همکاران (۱۳۹۴)، بر مولدین ماهی کاراس طلایی انجام گرفت.

از سوی دیگر، فعالیت آنزیم‌ها در مایع اسپرمی می‌تواند به عنوان یک شاخص استرس مورد استفاده قرار گیرد. لاکتات دهیدروژناز آنزیمی است که تبدیل پیرووات (محصول نهایی گلیکولیز) را به لاکتات کاتالیز می‌کند و در نتیجه در طی گلیکولیز ATP تولید می‌کند که نیاز به آن در هنگام استرس افزایش پیدا می‌کند. بیشتر انرژی مورد نیاز برای تحرک اسپرم از اکسیداسیون فروکتوز در فرایند بی‌هوازی گلیکولیز تامین می‌شود که محصول لاکتیک اسید است و در عبور آن از طریق غشای سلولی، لاکتات دهیدروژناز نقش ایفا می‌کند. مواجهه ماهی با استرس‌های زیاد در طی دوره پرورش طبیعی است. در این حالت یک آنتی‌اکسیدان مناسب می‌تواند استرس‌های اکسیداتیو را کاهش دهد و از غشای اسپرمی در برابر پراکسیداسیون چربی محافظت کند و یا حتی آزاد شدن آنزیم‌هایی همچون AST و ALP را به درون مایع اسپرمی کاهش دهد.

آنزیم‌های پلاسمایی هرچند نشانه دقیقی از عملکرد بافت‌ها نیستند، اما به عنوان شاخص

بسیار بااهمیتی در نشان دادن ضایعات متعدد بافتی مورد استفاده قرار می‌گیرند. با توجه به این که تمامی مواد پس از وارد شدن به بدن به کبد می‌روند و در آنجا متابولیزه شده و متابولیت‌های آنها به کلیه حمل می‌شود، از این رو این دو اندام بیشترین تاثیر را از جذب مواد می‌گیرند. آسیب‌های کبدی به دنبال تاثیر مواد سمی، منجر به افزایش پلاسمایی سطح آمینوترانسفرازها می‌شود.

آلکالین فسفاتاز ترشح اصلی اپیدیدیم است، اندامی که نقش حیاتی در بلوغ سلول اسپرم ایفا می‌کند، تعیین فعالیت این آنزیم در سیتوپلاسم سلول‌های اسپرم، ارتباط آنها را با متابولیسم گلیکوژن در اپیتلیوم اپیدیدیم نشان می‌دهد. بنابراین، امکان بلوغ اسپرم دارای انرژی کافی را فراهم می‌کند. همچنین ALP در تولید فروکتوز آزاد مایع اسپرمی نقش دارد. پس از تولید فروکتوز، انرژی ضروری برای تحرک سلول اسپرم فراهم می‌شود. سطوح متغیر فعالیت ALP در مایع اسپرمی انسان، گربه، گاو، خرگوش، موش، قوچ، بز، بوفالو، خروس، بوقلمون، گراز و شتر گزارش شده است (Al-Daraji and Tahir, 2013). اعتقاد بر این است که ALP در واکنش‌های گلیکولیتیکی و تشکیل فروکتوز درگیر است.

فعالیت خارج سلولی ترانس‌آمینازها به دلیل نشت آنها به درون مایع اسپرمی ناشی از آسیب به اسپرم است. بنابراین ترانس‌آمینازهای مایع اسپرمی به عنوان شاخصی برای اندازه‌گیری آسیب‌های متحمل شده توسط اسپرم طی شرایط مختلف ارزیابی می‌شوند. آنزیم‌های رها شده از اسپرم به طور کلی به عنوان آسیب سلولی در نظر گرفته می‌شوند، در نتیجه غشا با تغییر نفوذپذیری یا تخریب در نتیجه خروج مواد از آنها غیرفعال می‌شود. آسیب اسپرم از طریق استرس اکسیداتیو منجر به نفوذپذیری غشا نسبت به آنزیم‌ها و مواد دیگر می‌شود و بنابراین، فعالیت متابولیکی اسپرم کاهش می‌یابد.

نتایج مطالعه حاضر بیشترین تاثیر نانوذرات سلنیوم را بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی مایع اسپرمی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمار ۲ میلی‌گرم نانوذرات سلنیوم نشان داد. آنزیم‌های AST و ALT در مایع اسپرمی ماهیان تغذیه شده با تیمار ۲ میلی‌گرم نانوذرات سلنیوم و ۰/۵ میلی‌گرم نانوذرات سلنیوم افزایش یافت. این امر می‌تواند به نقش آنتی‌اکسیدانی نانوذرات سلنیوم و جلوگیری آن از پراکسیداسیون غشا فسفولیپیدی در شرایط مختلف پراکسیداسیون از طریق مکانیسم تولید نیتریک اکسید اشاره کند. این مکانیسم از

تمامیت ساختار و عملکرد اسپرم‌ها محافظت می‌کند و با کاهش پراکسیداسیون لیپیدی، منجر به افزایش اسپرم‌های غیرطبیعی در طول ذخیره‌سازی می‌شود و بقا و سلامتی اسپرم را طولانی می‌کند.

تاثیر سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم بر شاخص‌های آنتی‌اکسدانی و ایمنی مایع اسپرمی

در این مطالعه با افزودن نانوذرات سلنیوم به جیره میزان آنزیم کاتالاز در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم افزایش پیدا کرد که نشان دهنده افزایش تولید رادیکال‌های آزاد است. بنابراین، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی برای حذف گونه‌های اکسیژن فعال افزایش پیدا کرده است که با نتایج مطالعه Naderi و همکاران (۲۰۱۷)، همخوانی دارد. در استرس اکسداتیو القا شده به وسیله گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، وجود آنزیم‌های سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی شامل، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز، و سوپراکسید دیسموتاز برای حذف گونه‌های اکسیژن فعال ضروری به نظر می‌رسد (Hanrahan et al., 2011).

در مطالعات انجام شده درباره ترکیبات آلی مایع اسپرمی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان توسط Naderi و همکاران (۲۰۱۷) نتایج به دست آمده از دامنه وسیعی برخوردار بود و نه تنها با نتایج مطالعه حاضر بلکه با یکدیگر نیز هیچ تشابهی نداشت. دلیل این عدم تشابهات را می‌توان هم ناشی از شرایط آزمایش، اهداف مطالعات، روش‌های سنجش شاخص‌ها، تفاوت در اندازه ماهیان، شرایط پرورش و تغذیه و غیره دانست و هم می‌توان آنها را تحت تاثیر استرس‌هایی دانست که ماهی در زمان دستکاری برای اسپرم‌گیری تحمل می‌کند و می‌تواند باعث تغییر در ترکیبات بالا شود (Sheikhzadeh, et al., 2010).

نتایج تاثیر سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در مایع اسپرمی مولدین نر قزل‌آلای رنگین‌کمان تغییرات محسوسی را در سطوح مختلف نشان داد. نقش آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تجزیه یون منفی سوپراکسید به هیدروژن پراکسید است که به عنوان سوبسترای آنزیم‌های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز مورد استفاده قرار می‌گیرد (Armstrong et al., 1996). در این مطالعه با افزودن نانوذرات سلنیوم به جیره میزان آنزیم سوپراکسید دسموتاز بویژه در تیمار ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم افزایش پیدا کرد که نشان دهنده افزایش تولید رادیکال‌های آزاد است. بنابراین،

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی برای حذف گونه‌های اکسیژن فعال افزایش پیدا کرده است که با نتایج مطالعه Naderi و همکاران (۲۰۱۷) همخوانی دارد.

نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم جیره غذایی یک روند افزایشی بر فعالیت شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی مایع اسپرمی مولدین نر قزل‌آلای رنگین‌کمان داشت. با این وجود، میزان آنزیم-های آنتی‌اکسیدانی در گروه‌های تغذیه شده با جیره حاوی نانوذرات سلنیوم بیشتر از گروه شاهد بود.

همزمان با افزایش غلظت نانو ذرات سلنیوم در جیره غذایی مولدین نر قزل‌آلای رنگین‌کمان، میزان فعالیت مالون دی‌آلدهید و گلوتاتیون پراکسیداز مایع اسپرمی یک روند افزایشی داشته و اختلاف معنی‌داری را با تیمارهای دیگر داشت که نشان می‌دهد نانوسلنیوم نقش مهمی در فعال‌سازی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ایفا می‌کند، چون سلنیوم موجب تشکیل سلنوسیستئین می‌شود که قسمتی از مرکز فعال گلوتاتیون پراکسیداز است (Ugochukwu and Cobourn, 2003). به طور مشابه، Ashouri و همکاران (۲۰۱۵)، گزارش کردند که بالاترین فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز در کپور ماهیان تغذیه شده با ۲ میلی‌گرم نانوسلنیوم در کیلوگرم جیره مشاهده شد. Naderi و همکاران (۲۰۱۷) دریافتند که بالاترین فعالیت گلوتاتیون پراکسداز می‌تواند نشان دهنده این باشد که ماهیان تغذیه شده با جیره تکمیل شده با نانوسلنیوم در معرض استرس اکسیداتیو نیستند که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد. از نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر می‌توان اینطور بیان کرد که نقش سلنیوم در بهبود بخشیدن میزان گلیکولیز است که باعث مصرف گلوکز در چرخه کربس و افزایش نرخ آدنوزین تری‌فسفات و تولید لاکتات در اسپرم می‌شود و به این وسیله نانوذرات سلنیوم امکان دسترسی به انرژی را برای اسپرم فراهم می‌کند و در نتیجه تحرک اسپرم را بهبود می‌دهد (Ashouri et al., 2015). در مطالعه حاضر با افزایش درصد سلنیوم در تیمارهای غذایی میزان فعالیت آنزیم‌های اکسیدانی افزایش پیدا کرده و از اسپرم‌ها در برابر رادیکال-های آزاد اکسیژن محافظت می‌کند.

لیزوزیم از مهم‌ترین اجزای ایمنی غیراختصاصی ماهی محسوب می‌شود که موجب تخریب جداره باکتری‌ها، فعال‌سازی کمپلمان و افزایش فعالیت بیگانه‌خواری در ماهی می‌شود. افزایش میزان فعالیت لیزوزیم سرم گویای بهبود

وضعیت ایمنی ماهی است و افزایش آن به مقابله بهتر سیستم ایمنی ماهی در برابر شاخص‌های عفونی و استرس زا کمک می‌کند. بنابراین، در مطالعه حاضر افزایش میزان لیزوزیم در تیمار ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم ممکن است یک پاسخ سازشی برای بالا بردن مقاومت به استرس باشد. Alishahi و همکاران (۲۰۱۰) افزایش فعالیت لیزوزیم را به دنبال تجویز برخی محرک‌های ایمنی، واکسن‌ها و برخی پربیوتیک‌ها در ماهی مشاهده کردند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزودن سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم تاثیر معناداری در میزان فعالیت لیزوزیم نداشته است، اما روند افزایشی میزان فعالیت لیزوزیم را نشان داد. Naderi و همکاران (۲۰۱۷) دریافتند که افزایش میزان فعالیت لیزوزیم در گروه متراکم مقاومت به استرس را بالا می‌برد که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد.

در مجموع، بر اساس نتایج به دست آمده، می‌توان نتیجه گرفت که با توجه به افزایش شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و ایمنی مایع اسپرمی مولدین نر در تیمار ۲ میلی‌گرم نانوذرات سلنیوم در کیلوگرم می‌توان این مقدار مصرفی را برای بهبود کیفیت اسپرم و شاخص‌های بیوشیمیایی مایع اسپرمی در مولدین نر ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان به منظور افزایش بازده تکثیر این ماهیان به جیره غذایی توصیه کرد.

تشکر و قدردانی

از کلیه همکاران محترم مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح‌نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج که در روند اجرای این پژوهش همکاری مستمر داشتند، کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

Ahsan U., Kamran Z., Raza I., Ahmad S., Babar W., Riaz M.H. and Iqbal Z. 2014. Role of selenium in male reproduction- A review. Journal of Animal Reproduction Science, 146: 55–62. doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.01.009

Al-Daraji H.J. and Tahir A.O. 2013. Effect of L-carnitine supplementation on seminal plasma quality of Iraqi drakes. Indian Journal of Applied Research, 3: 10–14.

Alishahi M., Ranjbar M.M., Ghorbanpour M., Peyghan R., Mesbah M. and Razi Jalali M. 2010. Effects of dietary *Aloe vera* on some specific and nonspecific immunity in the common carp (*Cyprinus carpio*). Iranian Journal of Veterinary Medicine, 4(3): 189–195. doi: 10.22059/IJVM.2010.21352

Armstrong A.M., Chestnutt J.E., Gormly M.Y. and Young I.S. 1996. The effect of dietary treatment on lipid peroxidation and antioxidant status in newly diagnosed on-insulin dependent diabetes. International Society for Free Radical Research, 21: 719–726. doi: 10.1016/08915849(96)00169-4

Ashouri S., Keyvanshokooh S., Salati A.P., Johari S.A. and Pasha-Zanoosi H. 2015. Effects of different levels of dietary selenium nanoparticles on growth performance, muscle composition, blood biochemical profiles and antioxidant status of common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Aquaculture, 446: 25–29. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.04.021

Behne D., Weiler H. and Kyriakopoulos A. 1996. Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. Journal of Reproduction and Fertility, 106: 291–297. doi: 10.1530/jrf.0.1060291

Billard R., Cosson J., Crim L.W. and Suquet M. 1995. Sperm physiology and quality. P: 25–52. In: Bromage N. and Roberts R. (Eds.). Broodstock Management and Egg and Larval Quality. Blackwell, UK.

Bunglavan S.J., Garg A.K., Dass R.S. and Shrivastava S. 2014. Effect of supplementation of different levels of selenium as nanoparticles/sodium selenite on blood biochemical profile and humoral immunity in male Wistar rats. Journal of Veterinary World, 7(12): 1075–1081. doi: 10.14202/vetworld.2014.1075-1081

Cabrita E., Martinez-Paramo S., Gavaia P.J., Riesco M., Valcarce D., Sarasquete C., Herraez M. and Robles V. 2014. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis.

Journal of Aquaculture, 432: 389–401. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.04.034

Chiu S.T., Hsieh S.L., Yeh S.P., Jian S.J., Cheng W. and Liu C.H. 2010. The increase of immunity and disease resistance of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* by feeding with selenium enriched-diet. Journal of Fish and Shellfish Immunology, 29: 623–629. doi: 10.1016/j.fsi.2010.06.012

Decker H. and Van Holde K.E. 2010. Oxygen and the Evolution of Life. Springer Science and Business Media, Germany. 169P. doi: 10.1007/978-3-642-13179-0

Dreanno C., Suquet M., Desbruyeres E., Cosson J., Le Delliou H. and Billard R. 1998. Effect of urine on semen quality in turbot (*Psetta maxima*). Journal of Aquaculture, 169: 247–262. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00262-2

Ellis A.E. 1990. Lysozyme assays. P: 101–103. In: Stolen J.S., Fletcher T.C., Anderson D.P. and Van Muiswinkel W.B. (Eds.). Techniques in Fish Immunology, Vol. 1. SOS Publications, USA.

Forni L.G. and Willson R.L. 1986. Thiyl and phenoxyl free radicals and NADH direct observation of one-electron oxidation. Biochemical Journal, 240: 897– 903. doi: 10.1042/bj2400897

Goth L. 1991. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. International Journal of Clinical Chemistry, 196: 143–151. doi: 10.1016/0009-8981(91)90067-m

Gronczewska J., Zietara M.S., Biegniewska A. and Skorkowski E.F. 2003. Enzyme activities in fish spermatozoa with focus on lactate dehydrogenase isoenzymes from herring (*Clupea harengus*). Journal of Comparative Biochemistry and Physiology, 134: 399–406. doi: 10.1016/S1096-4959(02)00192-6

Hanrahan J.R., Chebib M. and Johnston G.A. 2011. Flavonoid modulation of GABA (A) receptors. British Journal of Pharmacology, 163: 234–45. doi: 10.1111/j.14765381.2011.01228.x

Hashida K., Sasaki K. and Makino N. 2000. Interactions of nitric oxide and oxygen in cytotoxicity: Proliferation and antioxidant enzyme activities of endothelial cells in culture. International Society for Free Radical Research, 33: 147–156. doi: 10.1080/10715760000300701

Hedaoo M., Khllare K., Meshram M., Sahatpure S. and Patil M. 2008. Study of some serum trace minerals in cyclic and non-cyclic surti buffaloes. Journal of Veterinary World, 1: 71–72.

Imanpoor M.R. and Zad Majid V. 2009. Introduction on

Reproduction of Fishes (In Persian). Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources Publishing, Iran. 190P.

Johari S. 2014. Toxicity effect of colloidal silver nanoparticles on fertilization capacity and reproduction success of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Nanomedicine Research, 1(1): 1–4. doi: 10.15406/jnmr.2014.01.00001

Khadjeh G.H. and Peyghan R. 2007. Evaluation of some blood serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in earthen ponds. Journal of Veterinary Research, 62(2): 197–207.

Koprucu K., Yonar M.E. and Ozcan S. 2015. Effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on antioxidant defense and sperm quality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under regular stripping conditions. Journal of Animal Reproduction Science, 163: 135–143. doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.10.008

Lahnsteiner F., Berger B. and Weismann T. 1998. Determination of semen quality of the rainbow trout by sperm motility, seminal plasma parameters and spermatozoal metabolism. Journal of Aquaculture, 163: 163–181. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00243-9

Lahnsteiner F., Patzner R.A. and Weismann T. 1993. Energy resources of spermatozoa of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Pisces, Teleostei). Journal of Reproduction Nutrition Development, 33: 349–360. doi: 10.1051/rnd:19930404

Lahnsteiner F., Berger B., Weismann T. and Patzner R.A. 1996. Physiological and biochemical determination of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, semen quality for cryopreservation. Journal of Applied Aquaculture, 6(4): 47–73. doi: 10.1300/J028v06n04_05

Marklund S.L. and Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the auto oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. European Journal of Biochemistry, 47(3): 469–474. doi: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x

Miura T., Yamauchi K., Takahashi H. and Nagahama Y. 1991. The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish. Journal of Experimental Zoology, 261: 359–363. doi: 10.1002/jez.1402610316

Morisawa M., Okuno M., Suzuki K., Morisawa S. and Ishida K. 1983a. Initiation of sperm motility in teleosts. Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology. 15: 61–65.

Morisawa M., Suzuki K. and Morisawa S. 1983b. Effects of potassium and osmolality on spermatozoan motility of salmonid fishes. Journal of Experimental Biology, 107: 105–113. doi: 10.1242/jeb.107.1.105

Morisawa M., Suzuki K., Shimizu H., Morisawa S. and Yasuda K. 1983c. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. Journal of Experimental Biology, 107: 95–103. doi: 10.1242/jeb.107.1.95

Moss D.V. and Henderson A.R. 1999. Clinical enzymology. P: 617–721. In: Burtis C.A. and Ashwood E.R. (Eds.). Tietz Textbook of Clinical Chemistry. Saunders Company, USA. doi: 10.1515/cclm.2000.37.11-12.1136

Muscatello J.R., Bennett P.M., Himbeault K.T., Belknap A.M. and Janz D.M. 2006. Larval deformities associated with selenium accumulation in northern pike (*Esox lucius*) exposed to metal mining effluent. Journal of Environmental science and technology, 40: 6506–6512. doi: 10.1021/es060661h

Naderi M., Keyvanshokooh S., Salati A.P. and Ghaedi A. 2017. Effects of dietary vitamin E and selenium nanoparticles supplementation on acute stress responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) previously subjected to chronic stress. Aquaculture, 473: 215–222. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.02.020

Ramsden S.R., Smith T.J., Shaw B.J. and Handy R.D. 2009. Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): No effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain. Journal of Animal Nutrition, 2: 1–11. doi: 10.1007/s10646-009-0357-7

Rurangwa E., Biegniewska A., Slominska E., Skorkowski E.F. and Ollevier F. 2002. Effect of tributyltin on adenylate content and enzyme activities of teleost sperm: A biochemical approach to study the mechanisms of toxicant reduced spermatozoa motility. Journal of Comparative Biochemistry and Physiology, 131: 335–344. doi: 10.1016/S1532-0456(02)00019-4

Sato T., Ose Y. and Sakai T. 1980. Toxicological effect of selenium on fish. Journal of Environmental Pollution, 21: 217–224. doi: 10.1016/0143-1471(80)90166-X

Sheikhzadeh N., Asadpour R., Jafari Jozani R.A. and Tayefi-Nasrabadi H. 2010. Effect of Ergosan on semen quality of male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstock. Journal of Animal Reproduction Science, 122: 183–188. doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.08.008

Shi L., Zhang C., Yue W., Shi L., Zhu X. and Lei F. 2010. Short-term effect of dietary selenium-enriched yeast on semen parameters, antioxidant status and Se concentration in goat seminal plasma. Journal of Animal Feed Science and Technology, 157: 104–108. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2010.02.006

Soengas J.L., Agra-Lago M.J., Carballo B. and Veira J.A.R. 1996. Effect of an acute exposure to sublethal concentrations of cadmium on liver carbohydrate metabolism of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 57(4): 625–631. doi: 10.1007/s00128990023610.1016/

Turanov A.A., Malinouski M. and Gladyshev V.N. 2011. Selenium and male reproduction. P: 409–417. In: Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health. Springer, USA. doi: 10.1007/978-1-4614-1025-6_32

Ugochukwu N.H. and Cobourn M.K. 2003. Modification of renal oxidative stress and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats treated with extracts from *Gongronema latifolium* leaves. Clinica Chimica Acta, 336: 73–81. doi: 10.1016/S0009-8981(03)00325-5

Vesely T., Reschova S., Pokorova D., Hulova J. and Nevorankova Z. 2006. Production of monoclonal antibodies against immunoglobulin heavy chain in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Journal of Veterinarni Medicina, 51(5): 296–302. doi: 10.17221/5549-VETMED

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 11, No. 4, Winter 2024

Research Paper

The effects of selenium nanoparticles on some enzymes and biochemical parameters of sperm fluid of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) male breeders

Javad Mahdavi Jehanabad[1]*, Abolhassan Rastiyannasab[2], Sayed Hossein Moradyan[1], Mohmmad Meysam Salahi Ardakani[3], Sayed Abdolhamid Hosseini[1], Esmaeil Kazemi[1]

DOI: 10.22124/japb.2023.22882.1481
Received: September 2022 Accepted: February 2023

Abstract

In this study, the effect of different levels of selenium nanoparticles was investigated on sperm fluid enzymes including aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), superoxide dismutase (SOD), catalase, lysozyme, malondialdehyde (MDA) and albumin in male breeders of rainbow trout. A number of 84 three-year-old male breeding fish were divided into four experimental groups with three replications. Fish were fed with diets containing 0 (control), 0.5, 1 and 2 mg of selenium nanoparticles per kg of diet for 60 days. The results of the analysis of the sperm fluid in different treatments did not show any significant difference in the amount of ALP, ALT and lysozyme in the sperm fluid ($P>0.05$). The highest amount of ALT enzyme was in the treatment of 2mg of selenium nanoparticles, and the amount of MDA, ALT and ALP of sperm fluid in other treatments was significantly higher than the control treatment ($P<0.05$). Based on the obtained results, in order to increase the reproductive efficiency of rainbow trout males and improve the antioxidant indices and immunity of sperm fluid, it is recommended to add 2mg of selenium nanoparticles per kg to the diet.

Key words: *Rainbow Trout, Biochemical Parameters, Selenium Nanoparticles, Sperm Fluid.*

1- M.Sc. in Reproduction and Breeding of Aquatic Animals, Yasouj Shahid Motahari Coldwater Fish Genetics and Breeding Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Yasouj, Iran.
2- Assistant Professor in Genetics and Biotechnology Department, Yasouj Shahid Motahari Coldwater Fish Genetics and Breeding Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Yasouj, Iran.
3- Ph.D. in Department of Health and Diseases, Yasouj Shahid Motahari Coldwater Fish Genetics and Breeding Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Yasouj, Iran.

*Corresponding Author: mahdavejavad60@yahoo.com