Veterinary Clinical Pathology, Vol.13, No. 52, Winter 2020

"Research article" **DOI: 10.30495/JVCP.2020.670356**

Investigating the effect of diluents containing EDTA and Propylene glycol on survival of frozen semen of Ghezel ram

Shafaati Alishah, P.[1], Moghaddam, Gh.[2]*, Daghighkia, H.[2], Alijani, S.[3]

1- MSc Student of Animal Physiology, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
2- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
3- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
*Corresponding author's email: ghmoghaddam@tabrizu.ac.ir
(Received: 2018/12/26 Accepted: 2019/6/26)

Abstract

Sodium editate protect sperm from freezing with chelatation of calcium and prevention of entrance of the extracellular calcium into cell. Propylene glycol does this function with prevention of ice crystal formation. The present study was performed to evaluate the effect of adding different levels of EDTA (ethylene diamine tetra acetate) and propylene glycol on quality and survival of Ghezel ram frozen semen. After primary evaluations on fresh semen for parameters including total motility, progressive motility, non-progressive motility, viability, abnormal sperm, and acrosome integrity in total cell and acrosome integrity in dead cells, samples with a concentration of 2.5 billion sperm and a progressive motility of over 70% and a volume greater than 0.5 ml were diluted with 1, 1.5, 2 and 2.5 mM EDTA and 1, 2 and 3% propylene glycol as an additive and propylene glycol 7% as a constitute. Straws (250 µl) were filled and after cooling and reaching to temperature of 5^{oC} they were placed in 4-5 cm above nitrogen for 8-10 minutes and ultimately were immersed in liquid nitrogen. qualitative parameters of sperm included viability, total motility, progressive and non-progressive motility, HOST, percentage of acrosome integrity in all and dead cells were investigated in 0, 20, 40 and 60 days of freezing processes. The results of this experiment showed that diluent with 1% propylene glycol concentration in comparison with other groups and control improved total and progressive motility, percentage of viability, acrosome integrity and HOST test (p<0/05). Among EDTA groups, ED2.5 had the best function, but there was no significant difference with the control group. Propylene glycol 7% is not a suitable constitute to glycerol. The results showed that dilutions of EDTA and propylene glycol could improve quantitative parameters of ram semen.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Ethylene diamine tetra acetate, Freezing, Ghezel ram, Propylene glycol, Sperm cryopreservation.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2020.670356

بررسی تأثیر افزودن رقیق‌کننده‌های حاوی ادیتات سدیم و پروپیلن گلیکول بر ماندگاری اسپرم منجمد قوچ قزل

پریسا شفاعتی‌علیشاه[۱]، غلامعلی مقدم[۲*]، حسین دقیق‌کیا[۲]، صادق علیجانی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۲- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۳- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: ghmoghaddam@tabrizu.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۷/۱۰/۵ پذیرش نهایی: ۹۸/٤/۵)

چکیده

ادیتات سدیم با کلات‌کردن کلسیم و ممانعت از ورود کلسیم خارج‌سلولی به داخل سلول و پروپیلن گلیکول با ممانعت از تشکیل بلورهای یخ داخل‌سلولی، از اسپرم در برابر فرآیند انجماد محافظت می‌کنند. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثر افزودن سطوح مختلف ادیتات و پروپیلن‌گلیکول بر کیفیت و ماندگاری اسپرم منجمد قوچ قزل انجام پذیرفت. پس از ارزیابی‌های اولیه منی ۵ رأس قوچ نژاد قزل از لحاظ غلظت، حجم و رنگ نمونه، سلامت آکروزوم، حرکت موجی، تحرک کل و پیشرونده، درصد زنده‌مانی و درصد اسپرم‌های غیرطبیعی، نمونه‌های با غلظت ۲/۵ میلیارد اسپرم، حرکت پیشرونده‌ی بالای ۷۰ درصد و حجم بیش از ۰/۵ میلی‌لیتر در گروه شاهد با مخلوط تریس، گلیسرول و زرده تخم‌مرغ و در گروه‌های تیمار با استفاده از ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌مولار EDTA (ethylenediaminetetraacetate) و ۱، ۲، ۳ و ۷ درصد پروپیلن‌گلیکول رقیق شدند. سپس داخل پایت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری کشیده شده و بعد از سردسازی در دمای ۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰-۸ دقیقه، ابتدا در فاصله ۵-٤ سانتی‌متری بالای سطح نیتروژن مایع قرار گرفته و در نهایت در داخل آن غوطه‌ور شدند. خصوصیات کمّی اسپرم شامل زنده‌مانی، درصد تحرک کل، حرکت پیشرونده و درجا، تست یکپارچگی غشای پلاسمایی، درصد اسپرم‌های غیرطبیعی، سلامت آکروزوم در کل سلول‌ها و در سلول‌های مرده در روزهای صفر، ۲۰، ٤۰ و ٦۰ فرآیند انجماد بررسی شدند. تیمار ۱درصد پروپیلن‌گلیکول با سایر گروه‌های تیمار پروپیلن‌گلیکول و گروه شاهد در میزان تحرک‌کل، درصد زنده‌مانی، آکروزوم سالم، تست یکپارچگی غشای پلاسمایی و حرکت پیشرونده تفاوت معنی‌دار داشت ($p<۰/۰۵$). در بین تیمارهای EDTA نیز تیمار با ۲/۵ میلی‌مولار EDTA بهترین عملکرد را دارا بود ولی تفاوت معنی‌داری با سایر گروه‌های تیمار EDTA و گروه شاهد نداشت. بنابراین نتایج بررسی حاضر نشان داد که رقیق‌کننده‌های حاوی پروپیلن‌گلیکول و EDTA می‌توانند پارامترهای کیفی اسپرم قوچ را بهبود بخشند.

کلیدواژه‌ها: انجماد، پروپیلن گلیکول، ماندگاری اسپرم، قوچ قزل، ادیتات سدیم.

مقدمه

حفاظت انجمادی منی توسط دامداران از زمانی که تلقیح مصنوعی برای اولین بار مطرح شد، مورد توجه قرار گرفته است. تلاش‌های اولیه در زمینه تلقیح مصنوعی لزوماً فقط شامل زمان کوتاه وابسته به جمع‌آوری منی و انتقال به ماده‌های دریافت‌کننده بود، چراکه اسپرم تنها برای زمان محدودی در خارج از مجرای تولیدمثلی در دمای محیط می‌تواند زنده بماند. برنامه تلقیح مصنوعی دام‌های اهلی بزرگ جثه در قرن بیستم وابسته به نگه‌داری انجمادی اسپرم تحت شرایط مصنوعی و طولانی مدت است که می‌تواند به وسیله روش‌هایی که متابولیسم اسپرم را متوقف می‌کنند و بدین وسیله عمر باروری آن‌ها را افزایش می‌دهند به دست آید. نگه‌داری اسپرم راه مفیدی برای حفظ منابع ژنتیکی برخی از گونه‌های حیوانی در حال انقراض و همچنین جهت تولیدمثل آن‌ها می‌باشد (Li *et al.*, 2005). اولین کوشش جهت نگه‌داری انجمادی اسپرم پستانداران در چند دهه قبل صورت گرفته است (Evans and Maxwell, 1987). زمانی که منی منجمدشده و در دمای بسیار پایین، یعنی در ازت مایع در ۱۹۶- درجه سلسیوس نگه‌داری شود، واکنش‌های متابولیکی اسپرماتوزوا متوقف می‌شود (Evans and Maxwell, 1987). نگه‌داری انجمادی اسپرماتوزوا برای مدت طولانی در تولیدمثل بسیاری از گونه های حیوانات مورد استفاده قرار گرفته و ابزاری مؤثر برای نگه‌داری طولانی مدت ماده ژنتیکی حیوانات اهلی است که مزایای زیادی دارد. برای مثال خطر انتقال عفونت‌ها را کاهش داده، امکان تولید هیبریدها با ویژگی‌های مطلوب و ایجاد لاین‌های مفید برای پرورش را میسر می‌سازد (Ieropoli *et al.*, 2004) و مشکل حمل و نقل حیوانات یا منی تازه از فواصل دور یا در دوره‌های زمانی طولانی‌مدت را از بین می‌برد (Hu *et al.*, 2006). با این وجود نگه‌داری انجمادی اسپرم می‌تواند باعث آسیب اسپرماتوزوا شود که منجر به کاهش پتانسیل باروری می‌شود. در طول مرحله سردسازی تا ۵ درجه سلسیوس و در طی مدت نگه‌داری، اختلال در ساختار غشایی رخ داده (Wilhem *et al.*, 1996)، منجر به کاهش تحرک و زنده‌مانی اسپرم شده (Ozkavukcu *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2012) و همچنین تغییرات در مورفولوژی اسپرم مثل تغییر در غشای پلاسمایی و تغییرات آکروزومی را بعد از یخ‌گشایی نشان می‌دهد (Ozkavukcu *et al.*, 2008). نگه‌داری انجمادی منی باعث افزایش سطوح کلسیم داخل‌سلولی نیز می‌گردد که این امر منجر به اختلال عملکرد و مرگ سلول می‌شود (Bittencourt *et al.*, 2014). این فرآیند باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در سلول و منجر به دپلیمریزاسیون و ادغام غشاء می‌شود که نتیجه نهایی واکنش آکروزومی است (Keshtgar *et al.*, 2016).

EDTA (ethylenediaminetetraacetate) کلاتور یون‌های دوظرفیتی مهمی مثل Ca^{2+}، Mg^{2+}، Zn^{2+} و Cu^{2+} می‌باشد که اثر سمی مستقیمی روی اسپرم ندارد (Bourinbaiar and Lee, 1996). عملکرد اصلی EDTA کلات کردن کلسیم خارج‌سلولی است که ورود آن را به محیط داخل‌سلولی کاهش داده و اثر زیان‌بار کلسیم بر اسپرم را کاهش می‌دهد (Bittencourt *et al.*,

2014; Keshtgar *et al.*, 2016) و روی تحرک و قابلیت باروری اسپرم اثر می‌گذارد (Bourinbaiar and Lee, 1996). محافظت‌کننده‌های سرمایی فاکتورهای دیگری هستند که در طول نگه‌داری انجمادی اسپرم بر زنده‌مانی اسپرم مؤثر هستند (Li *et al.*, 2005). محافظت‌کننده‌های با وزن مولکولی پایین مثل EG (ethylene glycol)، گلیسرول و PG (1,2-propylene glycol) ممکن است باعث کاهش آسیب به اسپرماتوزوا شوند، زیرا وزن ملکولی پایین آن‌ها اجازه عبور بسیار آسان از غشای پلاسمایی را می‌دهد (Buyukleblebici *et al.*, 2014).

هدف از این مطالعه، بررسی اثر افزودن رقیق‌کننده‌های حاوی EDTA و پروپیلن گلیکول بر ماندگاری اسپرم منجمد قوچ‌های نژاد قزل بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان دانشگاه تبریز واقع در جاده باسمنج از اواخر دی ماه تا اواخر اسفند ماه انجام گرفت. محل نگه‌داری قوچ‌ها و میش در تمام دوره آزمایشی در یک سالن سرپوشیده بود. در این مطالعه از ۵ رأس قوچ نژاد قزل، ۲ تا ٤ ساله جهت اسپرم‌گیری استفاده شد. قوچ‌ها تحت شرایط نور طبیعی و جدا از میش‌ها نگه‌داری می‌شدند. اسپرم‌گیری در فصل غیرتولیدمثلی یک‌بار در هفته توسط واژن مصنوعی صورت می‌گرفت. بلافاصله بعد از جمع‌آوری اسپرم یکسری ارزیابی‌های اولیه شامل حجم نمونه، رنگ نمونه، حرکت موجی، تحرک کل و پیشرونده، درصد زنده‌مانی، درصد اسپرم‌های غیرطبیعی و سلامت آکروزوم و غلظت منی انجام می‌شد که در صورت دارا بودن استانداردهای لازم در هر نمونه (غلظت بالای ۲/۵ میلیارد اسپرم، حرکت پیشرونده بالای ۷۰ درصد و حجم بیش از ۰/۵ میلی‌لیتر)، به عنوان نمونه‌ای مناسب برای رقیق‌سازی در نظر گرفته شده و با تیمارهای موردنظر رقیق می‌شد. به منظور رقیق‌سازی از رقیق‌کننده پایه حاوی ۲/۷۱ گرم تریس (هیدروکسی‌متیل آمینو اتان، Merck 64271، آلمان)، ۱/٤ گرم فروکتوز (Daejung Chemicals 0043، کره)، ۱ گرم اسید سیتریک مونوهیدرات (Appli chem Gmbh 64291، آلمان)، ۱۰۰ میلی‌گرم استرپتومایسین و ۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی پنی‌سیلین بعد از توزین در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر (آب مقطر استریل) مخلوط شد. از محلول بافر آماده‌شده ۷۳ میلی‌لیتر برداشته‌شد و با ۲۰ میلی‌لیتر زرده تخم‌مرغ و ۷ میلی‌لیتر گلیسرول مخلوط شد. پس از آماده‌سازی رقیق‌کننده، اسپرم به میزان ۱ به ۱۰ با رقیق‌کننده‌های حاوی تیمارهای موردنظر به شرح زیر رقیق شد:

گروه شاهد: تیمارشده با رقیق‌کننده پایه (فاقد EDTA و پروپیلن گلیکول).

گروه ۱ میلی‌مولار EDTA: تیمارشده با رقیق‌کننده پایه + ۱ میلی‌مولار EDTA.

گروه ۱/۵ میلی‌مولار EDTA: تیمارشده با رقیق‌کننده پایه + ۱/۵ میلی‌مولار EDTA.

گروه ۲ میلی‌مولار EDTA: تیمارشده با رقیق‌کننده پایه + ۲ میلی‌مولار EDTA.

گروه ۲/۵ میلی‌مولار EDTA: تیمارشده با رقیق‌کننده پایه + ۲/۵ میلی‌مولار EDTA.

گروه پروپیلن‌گلیکول ۱ درصد: تیمارشده با رقیق‌کننده پایه + ۱ درصد پروپیلن گلیکول.

گروه پروپیلن‌گلیکول ۲ درصد: تیمارشده با رقیق‌کننده پایه + ۲ درصد پروپیلن گلیکول.
گروه پروپیلن‌گلیکول ۳ درصد: تیمارشده با رقیق‌کننده پایه + ۳ درصد پروپیلن گلیکول.
گروه پروپیلن‌گلیکول ۷ درصد: تیمارشده با رقیق‌کننده پایه + ۷ درصد پروپیلن گلیکول.

بعد از آماده‌سازی، محلول منی رقیق‌شده در داخل پایت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتر کشیده شد. سپس، پایت‌ها در داخل لوله‌های درپیچ‌دار گذاشته شدند. در ادامه قسمت بالایی لوله‌ها با پارافیلم بسته شد تا از ورود آب و بخار آب در طی مرحله سردسازی به داخل لوله‌ها جلوگیری شود. سپس در داخل آبی با دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. در ادامه این مجموعه جهت سردسازی به مدت ۱/۵ الی ۲ ساعت در یخچال قرار داده شد تا دما به‌تدریج به ۵ درجه سلسیوس برسد. بعد از اتمام مرحله سردسازی، لوله‌ها به مدت ۸ تا ۱۰ دقیقه در فاصله ٤ الی ۵ سانتی‌متری بالای سطح ازت مایع در قسمت حاوی بخار این ماده قرار گرفتند و بعد از آن به آرامی در ازت مایع غوطه‌ور شدند. نگه‌داری نمونه‌های منجمد به‌مدت ۲ ماه طول کشید و یخ‌گشایی‌ها در روزهای صفر، ۲۰، ٤۰ و ٦۰ بعد از انجماد انجام گرفت. عمل یخ‌گشایی در هر مرحله در دمای ۳۸ درجه سلسیوس و به مدت ۳۰ ثانیه انجام می‌گرفت. ارزیابی‌های پس از ذوب شامل بررسی تحرک (تحرک کل، پیشرونده و درجا)، درصد زنده‌مانی، درصد اسپرم‌های غیرطبیعی، درصد آکروزوم سالم و تست یکپارچگی غشای پلاسمایی (HOST test) بودند.

- **بررسی انواع جنبه‌های تحرک اسپرم‌ها (کل، پیشرونده، درجا):** بدین منظور ابتدا هر نمونه منی یخ‌گشائی‌شده به نسبت ۱ به ۱۰۰ با سیترات سدیم ۲/۹ درصد (Merck 64271، آلمان) و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس رقیق شد، و برای تعیین درصد تحرک کل، پیشرونده و درجای اسپرم، یک قطره ازآن را روی لام با دمای ۳۷ درجه سلسیوس گذاشته و سپس از میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگنمایی ×٤۰۰ استفاده گردید (World health organization, 2010).

- **درصد زنده‌مانی و درصد اسپرم‌های غیرطبیعی:** برای ارزیابی اسپرم‌های زنده و مرده و همچنین میزان اسپرم‌های غیرطبیعی از رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین استفاده شد. پس از رقیق‌سازی نمونه با سیترات سدیم ۲/۹ درصد با دمای ۳۷ درجه به نسبت ۱ به ۱۰۰، رنگ‌آمیزی صورت گرفت و حدود ۲۰۰ اسپرم در ۵ نقطه از لام شمرده شد. اسپرم‌های غیرطبیعی (بدون سر، بدون دم، دم دراز یا باریک، دم پیچ‌خورده، سر بزرگ یا کوچک و . . .) نیز در همین اسلاید قابل شمارش بودند (Zanganeh *et al*., 2013).

- **درصد سلامت آکروزوم (acrosome integrity):** برای تعیین سلامت آکروزوم هم از نمونه رنگ‌آمیزی شده با ائوزین- نیگروزین استفاده گردید. برای این کار از یک عدسی با بزرگنمایی ×۱۲۵۰ استفاده شد. اسپرم‌های زنده به عنوان اسپرم با آکروزوم سالم در نظر گرفته شدند و از بین اسپرم‌های مرده تعداد ۲۰ اسپرم شمرده شده و آکروزوم بررسی شده و نسبت اسپرم‌های با آکروزوم سالم محاسبه شد. در نهایت هم مقدار آکروزوم سالم در سلول‌های مرده با مقدار آن در سلول‌های زنده جمع شد که عدد حاصله درصد آکروزوم سالم در یک نمونه بود (World Health Organization, 2010).

- آزمایش یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم (HOST test): برای تعیین سلامت عملکرد غشاء، ۱۰ میکرولیتر از اسپرم یخ‌گشایی‌شده با ۱۰۰ میکرولیتر محلول HOST (۹ گرم فروکتوز، ٤/۹ گرم سیترات سدیم در ۱ لیتر آب) رقیق شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۸ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. ۱۰ میکرولیتر از نمونه به وسیله سمپلر روی لام گذاشته شده و گسترش داده شد. گسترش‌ها با بزرگنمایی ×٤۰۰ بررسی شده و درصد اسپرم‌های سالم به‌دست آمد. اسپرم‌های سالم از ناحیه دم متورم بوده ولی دم اسپرم‌های مرده حالت مستقیم داشت (Zanganeh *et al*., 2013).

تحلیل آماری داده‌ها: داده‌های به‌دست آمده به‌صورت Least Square)±SEM (standard error of the mean) LSmean (mean گزارش گردیدند. نتایج با استفاده از نرم‌افزار SAS9.2 و رویه GLM آنالیز شدند. برای مقایسه میانگین حداقل مربعات (Least Square mean) از آزمون دانکن (Duncan) استفاده شد. اختلافات آماری مشاهده‌شده با مقادیر کمتر از ۵ درصد معنی‌دار در نظر گرفته شدند (p<۰/۰۵).

یافته‌ها

ویژگی منی‌های جمع‌آوری شده و کیفیت اسپرم بعد از یخ‌گشایی شامل درصد اسپرم‌های زنده، درصد تحرک، درصد حرکت پیشرونده، درصد اسپرم‌های غیرطبیعی و غلظت اسپرم در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- توصیف آماری صفات کمی و کیفی منی قوچ‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر، قبل از رقیق‌سازی

متغیر بررسی‌شده	تعداد نمونه	میانگین	بیشترین	کمترین	انحراف معیار	ضریب تغییرات
حجم (میلی‌لیتر)	۱۵	۱/۷۰	۳/۵	۰/۹	۰/۷۵	٤۳/۹۲
غلظت ($\times 10^9$)	۱۵	٤/٤٦	٦/۲۷	۲/٦۸	۰/۹۲	۲۰/۲۸
رنگ نمونه (۵-۱)	۱۵	٤/۳۸	۵	۳	۰/۷۱	۱٦/۲۳
حرکت موجی (۵-۱)	۱۵	٤/۳۰	۵	٤	۰/٤٦	۱۰/۷۲
تحرک کل (درصد)	۱۵	۸۵	۹۲	۷۵	٤,۹۷	۵/۸٤
حرکت پیشرونده (درصد)	۱۵	۷۸/۳٦	۸٦	۷۱/۱۱	٤/۷٤	٦/۰۵
زنده‌مانی (درصد)	۱۵	۸٦/۷۰	۹۳/۱	۷٦/۲٦	٤/۹۲	۵/٦۸
اسپرم‌های غیرطبیعی (درصد)	۱۵	۷/۹۸	۱۱/۱۱	۳/۵	۲/۰۸	۲٦/۰۷
سلامت آکروزم در کل سلول‌ها (درصد)	۱۵	۸۹/۸٦	۹٤/۹٤	۷۸/٤۳	٤/٦۰	۵/۱۲
سلامت آکروزوم درسلول‌های مرده (درصد)	۱۵	۲۹/٤۲	٦۵	۹/۱۳	۱٤/۹۵	۵۰/۸۲

*رنگ نمونه (کرم غلیظ ۵، کرم ٤، کرم رقیق ۳، شیری رنگ ۲، شفاف ۱، آبکی صفر)، حرکت موجی (غلیظ، حرکت موجی بسیار سریع، بیشتر از ۹۰٪ اسپرم‌ها فعال هستند (امتیاز ۵)، حرکت موجی سریع، حدوداً ۷۰ تا ۸۵٪ اسپرم‌ها فعال هستند (امتیاز ٤)، حرکت موجی نسبتاً آرام، می‌توان تک‌تک اسپرماتوزواها را دید، ٤۵ تا ٦۵٪ سلول‌های اسپرم فعال هستند (امتیاز ۳)، حرکت موجی شکل نگرفته است اما تحرک برخی اسپرماتوزواها پیدا است، ۲۰ تا ٤۰ ٪ سلول‌ها فعال هستند (امتیاز ۲)، فقط حدود ۱۰٪ اسپرماتوزواها علایم حیات را نشان می‌دهند (امتیاز ۱)، همه اسپرماتوزواها بی‌حرکت هستند (امتیاز صفر).

آمار توصیفی صفات مورد ارزیابی منی بعد از یخ‌گشایی روی پارامترهای تحرک کل، حرکت پیشرونده، حرکت درجا، زنده‌مانی، سلامت غشاء، اسپرم‌های غیرطبیعی، سلامت آکروزوم در کل

سلول‌های اسپرم و سلامت آکروزوم در سلول‌های مرده در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- توصیف آماری صفات کمی و کیفی منی قوچ‌های مورد مطالعه پس از یخ‌گشایی منی

متغیر بررسی‌شده	تعداد نمونه	میانگین	بیشترین	کمترین	انحراف معیار	ضریب تغییرات
تحرک کل (درصد)	۳۵۸	۵۵/۹۸۸	۷۸	۲۵	۱۱/۵۶۰	۲۰/۶۴۸
حرکت پیشرونده (درصد)	۳۵۸	۵۰/۵۰۲	۷۴/۹۰	۲۲/۷۸	۱۱/۳۷۹	۲۲/۵۳۲
حرکت درجا (درصد)	۳۵۸	۵/۵۰۴	۱۷/۳۳	۰/۸۸	۲/۸۹۶	۵۲/۶۱۳
زنده‌مانی (درصد)	۳۵۸	۵۸/۹۳	۸۱/۹۰	۲۵/۸۳	۱۱/۸۰۱	۲۰/۰۲۴
سلامت غشاء (درصد)	۳۵۰	۴۷/۸۵۵	۷۷/۱۴	۱۶/۲۴	۱۰/۰۵۲	۲۱/۰۰۵
اسپرم‌های غیرطبیعی (درصد)	۲۶۷	۱۳/۵۱۴	۴۰/۶۸	۲/۵۵	۷/۳۲۱	۵۴/۱۷۹
سلامت آکروزوم در کل سلول‌ها (درصد)	۲۶۸	۶۱/۰۷۴	۸۷/۴۶	۲۹/۵۴	۱۱/۸۷۳	۱۹/۴۴۰
سلامت آکروزوم در سلول‌های مرده (درصد)	۲۶۹	۱۰/۱۶۷	۵۰	۰	۸/۷۳۹	۸۵/۹۵۵

جدول ۳ مقایسه تأثیر افزودن سطوح مختلف EDTA و پروپیلن گلیکول را بر پارامترهای ارزیابی‌شده بعد از یخ‌گشایی نشان می‌دهد. بر اساس نتایج ثبت‌شده در جدول۳، مشخص‌گردید که میزان تحرک کل اسپرم-ها در تمامی گروه‌های حاوی پروپیلن گلیکول با گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌داری دارد ($p<۰/۰۵$)، به‌طوری‌که تیمار پروپیلن‌گلیکول ۱ درصد بالاترین و تیمار پروپیلن گلیکول ۷ درصد پایین‌ترین میزان تحرک کل را دارا بودند. همچنین از این نظر نمونه‌های اسپرم در گروه پروپیلن گلیکول ۱ درصد تفاوت آماری معنی‌داری با گروه‌های تیمار ۱ میلی‌مولار EDTA، ۱/۵ میلی‌مولار EDTA، ۲ میلی‌مولار EDTA، ۲/۵ میلی‌مولار EDTA، پروپیلن گلیکول ۷ درصد و گروه شاهد داشت ($p<۰/۰۵$) ولی در مقایسه با تیمارهای پروپیلن گلیکول ۲ درصد و پروپیلن‌گلیکول ۳ درصد تفاوت آماری معنی‌داری از این لحاظ مشاهده نگردید. همچنین بعد از تیمار گروه پروپیلن گلیکول ۱ درصد، تیمار پروپیلن گلیکول ۲ درصد بالاترین میانگین تحرک کل را داشت که از این نظر با گروه‌های تیمار ۱ میلی‌مولار EDTA، ۱/۵ میلی‌مولار EDTA، پروپیلن گلیکول ۷ درصد تفاوت آماری معنی‌دار مشاهده شد ($p<۰/۰۵$)، ولی تفاوت مذکور با گروه‌های تیمار ۲ میلی‌مولار EDTA، ۲/۵ میلی‌مولار EDTA و پروپیلن گلیکول ۳ درصد معنی‌دار نبود. این تفاوت بین گروه‌های تیمار ۲ میلی‌مولار EDTA و ۲/۵ میلی‌مولار EDTA با گروه تیمار پروپیلن گلیکول ۷ درصد نیز معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$) ولی با گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌دار نداشتند.

از طرف دیگر بررسی درصد حرکت پیش‌رونده در بین تیمارهای مختلف نشان داد که تیمار پروپیلن - گلیکول ۱ درصد دارای بالاترین میانگین درصد حرکت پیشرونده بود که با تمامی گروه‌های تیمار EDTA و همچنین گروه تیمار پروپیلن گلیکول ۷ درصد و گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌دار داشت ($p<۰/۰۵$). تیمار پروپیلن گلیکول ۲ درصد نیز با گروه‌های تیمار ۱ میلی‌مولار EDTA، ۱/۵ میلی‌مولار EDTA ، پروپیلن

گلیکول ۷ درصد و گروه شاهد اختلاف آماری معنی‌دار داشت ($p<۰/۰۵$)، ولی این اختلاف با گروه‌های تیمار ۲/۵ میلی‌مولار EDTA و پروپیلن‌گلیکول ۳ درصد معنی‌دار نبود. در گروه پروپیلن گلیکول ۳ درصد نیز در مقایسه با گروه‌های تیمار ۱ میلی‌مولار EDTA، پروپیلن گلیکول ۷ درصد و گروه شاهد تفاوت مذکور، از نظر آماری معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$) ولی گروه فوق در این خصوص، با بقیه گروه‌ها از نظر آماری تفاوت معنی‌دار نداشت.

همچنین مشخص گردید که زنده‌مانی اسپرم‌ها در تمامی تیمارها به جز گروه تیمار پروپیلن گلیکول ۷ درصد بالاتر از گروه شاهد بود. تفاوت مشاهده‌شده بین تیمارهای پروپیلن گلیکول ۱ درصد، پروپیلن گلیکول ۲ درصد و پروپیلن گلیکول ۳ درصد نیز از این نظر با گروه شاهد معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$)، ولی هیچ‌کدام از تیمارهای حاوی EDTA در این خصوص با گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌دار نداشتند.

یکپارچگی آکروزوم نیز در گروه‌های تیمارشده با پروپیلن گلیکول بالاترین میزان را در بین تیمارها نشان داد. البته تیمارهای پروپیلن گلیکول ۱ درصد و پروپیلن گلیکول ۲ درصد از این نظر با تیمارهای ۱ میلی‌مولار EDTA، ۱/۵ میلی‌مولار EDTA، پروپیلن گلیکول ۷ درصد و گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌داری داشتند ($p<۰/۰۵$)، ولی در این مورد تیمارهای ۱ میلی‌مولار EDTA، ۱/۵ میلی‌مولار EDTA، ۲ میلی‌مولار EDTA و پروپیلن گلیکول ۷ درصد با تیمار شاهد، تفاوت آماری معنی‌دار نداشتند. از این نظر تیمار پروپیلن گلیکول ۳ درصد نیز با گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌دار داشت ($p<۰/۰۵$).

بررسی عملکرد و سلامت غشای اسپرم (HOST test) در تیمارهای مختلف نشان داد که گروه‌های تیمار ۲ میلی‌مولار EDTA، پروپیلن گلیکول ۱ درصد، پروپیلن گلیکول ۲ درصد و پروپیلن گلیکول ۳ درصد با گروه پروپیلن گلیکول ۷ درصد تفاوت آماری معنی‌دار داشتند ($p<۰/۰۵$) ولی دراین مورد اختلاف آماری معنی‌داری با گروه شاهد نداشتند.

جدول ۳- مقایسه تأثیر سطوح مختلف EDTA و پروپیلن‌گلیکول بر صفات کمی و کیفی منی قوچ‌های مورد مطالعه پس از یخ‌گشائی منی

پارامتر / تیمار	تحرک کل (درصد)	حرکت پیشرونده (درصد)	زنده‌مانی (درصد)	سلامت آکروزوم (درصد)	یکپارچگی غشای پلاسمایی (درصد)
۱ میلی‌مولار EDTA	۵۱/۷۸±۱/۵۶^{cde}	۴۶/۹۱±۱/۷۷^{def}	۵۴/۵۴±۱/۶۲^{cde}	۵۷/۴۷±۱/۸۵^{bc}	۴۶/۷۹±۱/۵۱^{ab}
۱/۵ میلی‌مولار EDTA	۵۲/۲۶±۱/۵۶^{cde}	۴۷/۶۲±۱/۷۷^{cdef}	۵۵/۶۷±۱/۶۲^{cde}	۵۶/۱۹±۱/۸۵^{cd}	۴۷/۲۲±۱/۵۵^{ab}
۲ میلی‌مولار EDTA	۵۵/۴۳±۱/۵۶^{bcd}	۵۰/۵۳±۱/۷۷^{cde}	۵۸/۵۱±۱/۶۲^{bcde}	۶۱/۵۶±۱/۸۵^{abc}	۴۸/۶۶±۱/۵۳^{ab}
۲/۵ میلی‌مولار EDTA	۵۶/۶۱±۱/۵۶^{bcd}	۵۱/۴۲±۱/۷۷^{bcd}	۵۹/۸۸±۱/۶۲^{bcd}	۶۲/۱۳±۱/۸۵^{abc}	۴۶/۱۶±۱/۵۳^{ab}
پروپیلن‌گلیکول ۱درصد	۶۴/۷۱±۱/۵۶^{a}	۵۹/۶۹±۱/۷۷^{a}	۶۷/۴۷±۱/۶۲^{a}	۶۹/۱۷±۱/۸۵^{a}	۵۰/۳۸±۱/۵۳^{a}
پروپیلن‌گلیکول ۲درصد	۶۱/۶۸±۱/۵۶^{ab}	۵۷/۲۹±۱/۷۹^{ab}	۶۴/۲۹±۱/۶۴^{ab}	۶۶/۴۷±۱/۸۵^{a}	۵۰/۰۴±۱/۵۳^{a}
پروپیلن‌گلیکول ۳درصد	۵۸/۳۳±۱/۵۶^{abc}	۵۳/۷۶±۱/۷۷^{abc}	۶۱/۰۱±۱/۶۲^{abc}	۶۵/۰۴±۱/۸۵^{ab}	۵۰/۳۴±۱/۵۳^{a}
پروپیلن‌گلیکول ۷درصد	۴۶/۴۷±۱/۵۶^{e}	۴۰/۹۶±۱/۷۹^{f}	۴۹/۱۱±۱/۶۴^{e}	۵۱/۳۱±۱/۸۵^{d}	۴۰/۷۷±۱/۵۶^{b}

شاهد	٤٩/٩٧±١/٥٦^{de}	٤٤/١٠±١/٧٧^{ef}	٥٣/٥٤±١/٦٢^{de}	٥٥/٥٤±١/٨٥^{cd}	٤٤/٦٠±١/٥١^{ab}

abcd: حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد ($p<$٠/٠٥).

تأثیر زمان نگه‌داری بر پارامترهای بعد از یخ‌گشایی در جدول ٤ ارائه شده است. همان‌طور که نشان داده شده است، با افزایش مدت زمان نگه‌داری انجمادی درصد تحرک کل، حرکت پیشرونده، سلامت آکروزوم در کل سلول‌ها و یکپارچگی غشای پلاسمایی کاهش معنی‌داری داشتند ($p<$٠/٠٥). همچنین با افزایش مدت زمان نگه‌داری انجمادی درصد حرکت درجا و درصد اسپرم‌های غیرطبیعی افزایش معنی‌داری داشتند ($p<$٠/٠٥)، ولی درصد سلامت آکروزوم در سلول‌های مرده با افزایش زمان نگه‌داری تغییر معنی‌داری نکرد.

جدول ٤- تأثیر زمان نگه‌داری بر پارامترهای بعد از یخ‌گشایی

	مدت زمان نگه‌داری منی در انجماد تا مرحله یخ‌گشایی (روز)			
تیمار	صفر	٢٠	٤٠	٦٠
تحرک کل	٦١/٥٣±١/١١^{a}	٥٦/٧٧±١/١٠^{b}	٥٢/٧٥±١/١٠^{c}	٤٩/٩٧±١/١١^{c}
حرکت پیشرونده	٥٥/٠٩±١/١١^{a}	٥١/٩٩±١/١٠^{a}	٤٧/٩٩±١/١٠^{b}	٥٦٤٤±١/١١^{b}
حرکت درجا	٦/٤٣±٠/٣٠^{a}	٤/٧٨±٠/٣٠^{b}	٤/٨٢±٠/٣٠^{b}	٥/٤٨±٠/٣٠^{b}
زنده‌مانی	٦٥/٠٧±١/١٣^{a}	٥٩/٧٣±١/١٢^{b}	٥٥/٥٩±١/١٢^{c}	٥٢/٦٧±١/١٢^{c}
اسپرم غیرطبیعی	٨/٧٥±١/٣٤^{a}	١٤/٠٢±٠/٨١^{b}	١٣/٦٧±٠/٧٢^{b}	١٢/٣١±٠/٧٥^{b}
سلامت آکروزوم	٦٣/٧١±٢/٢١^{a}	٦٣/٢٠±١/٣٥^{a}	٦٠/٥٧±١/٢٢^{ab}	٥٧/١٢±١/٢٥^{b}
سلامت آکروزوم در سلول‌های مرده	٧/٨٢±١/٧٢^{a}	١٠/٠٢±١/٠٥^{a}	١١/٠٨±٠/٩٥^{a}	١٠/٠١±٠/٩٧^{a}
یکپارچگی غشای پلاسمایی	٥١/٢٢±١/٠٤^{a}	٤٥/٩٨±١/٠٣^{b}	٤٦/٣٧±١/٠٤^{b}	٤٥/٣١±١/٠٧^{b}

abcd: حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد($p<$٠/٠٥).

نتایج مربوط به مقایسه درصد تحرک کل اسپرم در روزهای مختلف بعد از یخ‌گشایی هم در جدول ٥ ارائه شده است. همان‌طور که جدول ٥ نشان می‌دهد، در مورد تحرک کل اسپرم، در روز صفر یخ‌گشایی، تفاوت آماری معنی‌داری بین تیمارهای مختلف وجود نداشت، اما مقایسه میانگین‌های مربوط به روز ٢٠ یخ‌گشایی در این خصوص نشان داد که بین تیمارهای پروپیلن گلیکول ١ درصد و پروپیلن گلیکول ٢ درصد با گروه شاهد و تیمار پروپیلن گلیکول ٧ درصد اختلاف آماری معنی‌دار وجود داشت ($p<$٠/٠٥)، ولی تفاوت آماری مشاهده‌شده در این مورد، بین بقیه تیمارها با گروه شاهد معنی‌دار نبود. همچنین در روز ٤٠ یخ‌گشایی، تیمار پروپیلن گلیکول ١ درصد با تیمارهای ١ میلی‌مولار EDTA، ١/٥ میلی‌مولار EDTA، ٢ میلی‌مولار EDTA، پروپیلن گلیکول ٧ درصد و گروه شاهد دراین خصوص اختلاف آماری معنی‌داری داشت ($p<$٠/٠٥). تیمار پروپیلن گلیکول ٢ درصد نیز در این مورد با تیمارهای ١ میلی‌مولار EDTA، ١/٥ میلی‌مولار EDTA، پروپیلن گلیکول ٧ درصد و گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌دار داشت ($p<$٠/٠٥). همچنین تیمارهای ٢/٥ میلی‌مولار EDTA و پروپیلن‌گلیکول ٣ درصد در این خصوص با تیمار پروپیلن گلیکول ٧ درصد تفاوت آماری معنی‌داری داشتند ($p<$٠/٠٥). در روز ٦٠ یخ‌گشایی هم، تیمار پروپیلن گلیکول ١ درصد با

تیمارهای ۱ میلی‌مولار EDTA، ۱/۵ میلی‌مولار EDTA، پروپیلن گلیکول ۷ درصد و گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌دار داشت ($p<۰/۰۵$). در این مورد، تیمار پروپیلن گلیکول ۲ درصد نیز نسبت به تیمار پروپیلن گلیکول ۷ درصد و گروه شاهد، اختلاف آماری معنی‌دار نشان داد ($p<۰/۰۵$)، اما در این خصوص، بقیه تیمارها با گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌دار نداشتند.

جدول ۵- مقایسه درصد تحرک کل اسپرم قوچ‌های مورد مطالعه در روزهای مختلف یخ‌گشایی

تیمار	مدت زمان نگه‌داری منی درانجماد تا مرحله یخ‌گشائی(روز)			
	صفر	۲۰	۴۰	۶۰
۱ میلی‌مولار EDTA	۵۸/۸۶±۲/۷۷	۵۳/۹۲±۳/۰۵^{bcd}	۵۰/۳۴±۳/۴۶^{cd}	۴۵/۱۳±۲/۸۰^{bc}
۱/۵ میلی‌مولار EDTA	۶۱/۸۶±۲/۷۷	۵۵/۰۲±۳/۰۵^{bcd}	۴۷/۷۵±۳/۴۶^{cd}	۴۵/۵۳±۲/۸۰^{bc}
۲ میلی‌مولار EDTA	۶۱/۶۶±۲/۷۷	۵۸/۰۲±۳/۰۵^{abc}	۵۳/۹۶±۳/۴۶^{bcd}	۴۹/۳۳±۲/۸۰^{abc}
۲/۵ میلی‌مولار EDTA	۶۲/۸۶±۲/۷۷	۵۸/۵۲±۳/۰۵^{abc}	۵۵/۷۵±۳/۴۶^{abc}	۵۰/۵۳±۲/۸۰^{abc}
پروپیلن‌گلیکول ۱درصد	۶۹/۶۶±۲/۷۷	۶۵/۹۲±۳/۰۵^{a}	۶۳/۸۶±۳/۴۶^{a}	۶۰/۵۳±۲/۸۰^{a}
پروپیلن‌گلیکول ۲درصد	۶۶/۱۶±۲/۷۷	۶۲/۹۲±۳/۰۵^{ab}	۶۲/۲۴±۳/۴۶^{ab}	۵۷/۲۳±۲/۸۰^{ab}
پروپیلن‌گلیکول ۳درصد	۶۴/۲۶±۲/۷۷	۵۹/۱۱±۳/۰۵^{abc}	۵۷/۰۸±۳/۴۶^{abc}	۵۴/۲۳±۲/۸۰^{abc}
پروپیلن‌گلیکول ۷درصد	۵۱/۸۶±۲/۷۷	۴۷/۲۲±۳/^{bc}	۴۴/۹۵±۳/۴۶^{d}	۴۲/۵۷±۲/۸۰^{c}
شاهد	۵۷/۸۶±۲/۷۷	۵۱/۵۲±۳/۰۵^{cd}	۴۸/۰۲±۳/۴۶^{cd}	۴۳/۵۳±۲/۸۰^{c}

abcd:حروف غیرمشابه در هرستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

جدول ۶ نیز مقایسه درصد حرکت پیشرونده اسپرم قوچ‌ها در روزهای مختلف یخ‌گشایی را نشان می‌دهد. مطابق جدول ۶ حرکت پیشرونده اسپرم در تمامی تیمارها، در روزهای مختلف یخ‌گشایی، با افزایش مدت زمان نگه‌داری منی، کاهش یافت. بر این اساس، در روز صفر یخ‌گشایی منی، تیمار پروپیلن گلیکول ۱ درصد بالاترین درصد حرکت پیشرونده اسپرم را دارا بود که از این نظر تفاوت آماری مشاهده شده با تیمار پروپیلن گلیکول ۷ درصد و گروه شاهد معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$) ولی بقیه گروه‌ها در این خصوص با گروه شاهد اختلاف آماری معنی‌داری نداشتند. همچنین در روز ۲۰ یخ‌گشایی، حرکت پیشرونده اسپرم در گروه تیمار با پروپیلن گلیکول ۱ درصد با تیمارهای ۱ میلی‌مولار EDTA، ۱/۵ میلی‌مولار EDTA، پروپیلن گلیکول ۷ درصد و گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌دار داشت ($p<۰/۰۵$). تیمار پروپیلن گلیکول ۲ درصد نیز با تیمارهای ۱ میلی‌مولار EDTA، پروپیلن گلیکول ۷ درصد و گروه شاهد، در این مورد، اختلاف آماری معنی‌دار داشت ($p<۰/۰۵$)، اما بقیه تیمارها از این نظر، با گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌دار نداشتند. در روز ۴۰ یخ‌گشایی هم، در این خصوص تمامی تیمارهای حاوی پروپیلن گلیکول با گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌دار داشتند ($p<۰/۰۵$)، ولی اختلاف آماری بین گروه‌های مختلف تیمارشده با پروپیلن گلیکول نسبت به گروه شاهد معنی‌دار نبود. همچنین تفاوت آماری مشاهده‌شده در این مورد، در تمامی تیمارها به جز تیمارهای ۱ میلی‌مولار EDTA و ۱/۵ میلی‌مولار EDTA نسبت به گروه پروپیلن گلیکول ۷ درصد،

معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). در این خصوص در روز ٦٠ یخ‌گشایی نیز تیمارهای پروپیلن گلیکول ۱ درصد و پروپیلن گلیکول ۲ درصد با گروه شاهد و تیمار پروپیلن گلیکول ۷ درصد تفاوت آماری معنی‌دار داشتند ($p<۰/۰۵$)، ولی تفاوت با سایر گروه‌ها معنی‌دار نبود.

جدول ٦- مقایسه درصد حرکت پیشرونده اسپرم قوچ‌های مورد مطالعه در روزهای مختلف یخ‌گشایی

	مدت زمان نگه‌داری منی در انجماد تا مرحله یخ‌گشائی (روز)			
تیمار	صفر	۲۰	٤٠	٦٠
۱ میلی‌مولار EDTA	٥٢/٧٣±٢/٨٨^{abc}	٤٩/٩٩±٣٤/٦٤^{dc}	٤٣/٩٤±٢/٨٣^{cde}	٤٠/١٣±٢/٦٣^{bc}
۱/٥ میلی‌مولار EDTA	٥٥/٩٧±٢/٨٨^{abc}	٥٠/٧٢±٣/٦٤^{bdc}	٤٢/٠٤±٢/٨٣^{de}	٤٠/٥٨±٢/٦٣^{bc}
۲ میلی‌مولار EDTA	٥٤/٠٢±٢/٨٨^{abc}	٥٤/٣٤±٣/٦٤^{abc}	٤٨/٦٢±٢/٨٣^{bcd}	٤٤/٢١±٢/٦٣^{abc}
۲/٥ میلی‌مولار EDTA	٥٦/٠٥±٢/٨٨^{abc}	٥٢/٦٥±٣/٦٤^{abc}	٥٠/١٦±٢/٨٣^{abdc}	٤٥/٨٧±٢/٦٣^{abc}
پروپیلن‌گلیکول ۱درصد	٦٤/٢٠±٢/٨٨^{a}	٦١/٢٢±٣/٦٤^{a}	٥٧/٤٧±٢/٨٣^{a}	٥٤/٩١±٢/٦٣^{a}
پروپیلن‌گلیکول ۲درصد	٥٩/٥٩±٣/٠٦^{ab}	٥٩/٩٦±٣/٦٤^{ab}	٥٥/٧٣±٢/٨٣^{ab}	٥٢/٧٣±٢/٦٣^{a}
پروپیلن‌گلیکول ۳درصد	٥٨/٢٩±٢/٨٨^{abc}	٥٤/٧٧±٣/٦٤^{abc}	٥١/٤١±٢/٨٣^{abc}	٤٩/٢٢±٢/٦٣^{ab}
پروپیلن‌گلیکول ۷درصد	٤٦/٠٤±٢/٨٨^{c}	٤١/٦٦±٣/٦٤^{d}	٣٨/٢٢±٢/٨٣^{e}	٣٧/٠٧±٢/٧٧^{c}
شاهد	٥٠/٨١±٢/٨٨^{bc}	٤٦/٠٦±٣/٦٤^{dc}	٤٢/١٠±٢/٨٣^{de}	٣٦/٦٦±٢/٦٣^{c}

abcd: حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

مقایسه درصد زنده‌مانی اسپرم قوچ‌های مورد مطالعه در روزهای مختلف یخ‌گشایی منی در جدول ۷ ارائه شده است. همانگونه که در جدول ۷ مشخص شده است، با افزایش مدت زمان نگه‌داری منی، درصد زنده‌مانی اسپرم در هر یک از تیمارها کاهش یافته است. بر این اساس در روز صفر یخ‌گشایی منی، بالاترین درصد زنده‌مانی اسپرم مربوط به تیمارهای پروپیلن گلیکول ۱ درصد، پروپیلن گلیکول ۲ درصد و پروپیلن گلیکول ۳ درصد بود که در این خصوص اختلاف آماری با تیمار پروپیلن گلیکول ۷ درصد، معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$)، ولی با سایر تیمارها و گروه شاهد، اختلاف مذکور، معنی‌دار نبود. بررسی داده‌های حاصله از یخ‌گشایی منی در روز ۲۰ نیز نشان داد که درصد زنده‌مانی اسپرم در تیمار پروپیلن گلیکول ۱ درصد نسبت به تیمارهای ۱ میلی‌مولار EDTA، پروپیلن گلیکول ۷ درصد و گروه شاهد دارای اختلاف آماری معنی‌داری بود ($p<۰/۰۵$). همچنین از این نظر، تیمارهای پروپیلن گلیکول ۲ درصد، پروپیلن گلیکول ۳ درصد، ۲ میلی‌مولار EDTA و ۲/۵ میلی‌مولار EDTA با تیمار پروپیلن گلیکول ۷ درصد اختلاف آماری معنی‌دار داشتند ($p<۰/۰۵$)، ولی این اختلاف با تیمار ۱ میلی‌مولار EDTA و گروه شاهد معنی‌دار نبود. همچنین نتایج مربوط به درصد زنده‌مانی اسپرم در مورد منی‌های یخ‌گشایی‌شده در روز ٤٠ نشان داد که در این مورد، تیمارهای پروپیلن گلیکول ۱ درصد و پروپیلن گلیکول ۲ درصد با تیمارهای ۱ میلی‌مولار EDTA، ۲ میلی‌مولار EDTA، پروپیلن گلیکول ۷ درصد و گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌دار داشتند ($p<۰/۰۵$). تیمارهای ۲

میلی‌مولار EDTA و پروپیلن گلیکول ۳ درصد نیز در این خصوص با تیمار پروپیلن گلیکول ۷ درصد اختلاف آماری معنی‌داری نشان دادند ($p<۰/۰۵$)، ولی نسبت به گروه شاهد، تفاوت مذکور معنی‌دار نبود. مقایسه میانگین‌های مربوط به روز ٦٠ یخ‌گشایی منی هم در این خصوص، اختلاف آماری معنی‌داری بین تیمارهای پروپیلن گلیکول ۱ درصد و پروپیلن گلیکول ۲ درصد با گروه شاهد و تیمار پروپیلن گلیکول ۷ درصد را نشان داد ($p<۰/۰۵$) ولی تفاوت مذکور با سایر تیمارها معنی‌دار نبود.

جدول ۷- مقایسه درصد زنده‌مانی اسپرم قوچ‌های مورد مطالعه در روزهای مختلف یخ‌گشایی منی

تیمار	مدت زمان نگه‌داری منی در انجماد تا مرحله یخ‌گشائی (روز)			
	صفر	۲۰	٤٠	٦٠
۱ میلی‌مولار EDTA	٦٢/٢٠±٢/٧٧^{ab}	٥٦/١٠±٣/٠٤^{bc}	٥٢/٢٤±٣/١٣^{bcd}	٤٧/٦٦±٢/٩١^{ab}
۱/۵ میلی‌مولار EDTA	٦٤/٨٩±٢/٧٧^{ab}	٦٠/٠٦±٣/٠٤^{ab}	٤٨/٨٩±٣/١٣^{cd}	٤٨/٩١±٢/٩١^{ab}
۲ میلی‌مولار EDTA	٦٦/٠٨±٢/٧٧^{ab}	٦٠/٠٤±٣/٠٤^{ab}	٥٥/٩٦±٣/١٣^{abcd}	٥٢/٠٢±٢/٩١^{ab}
۲/۵ میلی‌مولار EDTA	٦٦/٣٥±٢/٧٧^{ab}	٦١/٣٩±٣/٠٤^{ab}	٥٨/٩٦±٣/١٣^{ab}	٥٢/٨٨±٢/٩١^{ab}
پروپیلن‌گلیکول ۱درصد	٧٢/١٨±٢/٧٧^{a}	٦٨/٤٦±٣/٠٤^{a}	٦٥/٦٧±٣/١٣^{a}	٦٣/٦٦±٢/٩١^{a}
پروپیلن‌گلیکول ۲درصد	٦٩/٥٨±٢/٩٥^{a}	٦٥/١٤±٣/٠٤^{ab}	٦٣/٤١±٣/١٣^{a}	٥٩/٦٣±٢/٩١^{a}
پروپیلن‌گلیکول ۳درصد	٦٧/٣٣±٢/٧٧^{a}	٦١/٥٢±٣/٠٤^{ab}	٥٨/٤٣±٣/١٣^{abc}	٥٦/٨٠±٢/٩١^{ab}
پروپیلن‌گلیکول ۷درصد	٥٤/٨٢±٢/٧٧^{b}	٥٠/٢٩±٣/٠٤^{c}	٤٦/٩٦±٣/١٣^{d}	٤٤/٠١±٢/٩١^{b}
شاهد	٦٢/٨٦±٢/٧٧^{ab}	٥٥/٧٤±٣/٠٤^{bc}	٤٩/٥٢±٣/١٣^{bcd}	٤٦/١٠±٢/٩١^{b}

abcd: حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

مقایسه میانگین حداقل مربعات درصد عملکرد و سلامت غشای پلاسمایی در تیمارهای مختلف در روزهای مختلف یخ‌گشایی در جدول ۸ نشان داده شده است. طبق داده‌های به‌دست آمده در روز صفر یخ‌گشایی بین گروه‌های مختلف آزمایشی هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. در روز ۲۰ یخ‌گشایی تیمار پروپیلن گلیکول ۱ درصد بالاترین میزان سلامت غشای پلاسمایی را داشت که اختلاف آن با پروپیلن گلیکول ۷ درصد معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$) ولی تفاوت آن با شاهد و بقیه تیمارها معنی‌دار نبود. در روز ٤٠ یخ‌گشایی تیمار پروپیلن گلیکول ۲ درصد بالاترین میزان یکپارچگی غشای پلاسمایی را داشت که اختلاف آن با پروپیلن گلیکول ۷ درصد معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$) ولی با بقیه‌ی تیمارها و گروه شاهد معنی‌دار نبود. در روز ٦٠ یخ‌گشایی پروپیلن گلیکول ۳ درصد بالاترین میزان سلامت غشاء را داشت که در مقایسه با تیمار ۲/۵ میلی‌مولار EDTA و پروپیلن‌گلیکول ۷ درصد اختلاف معنی‌دار را نشان داد ($p<۰/۰۵$)، ولی با گروه شاهد و بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشت.

جدول ۸- درصد یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم قوچ‌های مورد مطالعه در روزهای مختلف یخ‌گشایی منی

تیمار	مدت زمان نگه‌داری منی در انجماد تا مرحله یخ‌گشائی (روز)			
	صفر	۲۰	۴۰	۶۰
۱ میلی‌مولار EDTA	۵۳/۴۵±۳/۹۸	۴۷/۵۵±۳/۰۷^{ab}	۴۳/۵۱±۲/۸۰^{ab}	۴۳/۳۳±۲/۵۲^{ab}
۱/۵ میلی‌مولار EDTA	۵۳/۱۶±۴/۱۹	۴۶/۰۱±۳/۰۷^{ab}	۴۵/۰۰±۲/۸۰^{ab}	۴۴/۸۰±۲/۶۵^{ab}
۲ میلی‌مولار EDTA	۵۰/۶۸±۳/۹۸	۴۸/۱۰±۳/۰۷^{ab}	۴۷/۲۸±۲/۸۰^{ab}	۴۹/۲۱±۲/۶۵^{ab}
۲/۵ میلی‌مولار EDTA	۴۹/۵۷±۳/۹۸	۴۷/۲۹±۳/۰۷^{ab}	۴۶/۰۴±۲/۸۰^{ab}	۴۱/۱۵±۲/۶۵^{ab}
پروپیلن‌گلیکول ۱درصد	۵۶/۸۵±۳/۹۸	۵۰/۳۸±۳/۰۷^{a}	۴۷/۵۹±۲/۸۰^{ab}	۴۶/۵۶±۲/۶۵^{ab}
پروپیلن‌گلیکول ۲درصد	۵۰/۷۳±۴/۲۴	۴۸/۹۶±۳/۰۷^{ab}	۵۳/۷۰±۲/۸۰^{a}	۴۶/۹۱±۲/۵۲^{ab}
پروپیلن‌گلیکول ۳درصد	۵۳/۱۶±۳/۹۸	۴۵/۲۶±۳/۰۷^{ab}	۵۰/۶۱±۲/۸۰^{ab}	۵۲/۸۹±۲/۵۲^{a}
پروپیلن‌گلیکول ۷درصد	۴۵/۱۰±۳/۹۸	۳۹/۰۲±۳/۰۷^{b}	۳۸/۵۶±۲/۸۰^{b}	۴۰/۴۰±۲/۸۳^{b}
شاهد	۴۹/۷۲±۳/۹۸	۴۱/۹۲±۳/۰۷^{ab}	۴۴/۷۸±۲/۸۰^{ab}	۴۲/۲۹±۲/۵۲^{ab}

abcd: حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد (p<۰/۰۵).

مقایسه یافته‌های مربوط به درصد یکپارچگی آکروزوم اسپرم در همه نمونه‌های مورد بررسی در جدول ۹ ارائه شده است. با توجه به جدول ۹، در روز صفر یخ‌گشایی منی درصد یکپارچگی آکروزوم اسپرم در بین تیمارهای مختلف با یکدیگر و نیز با گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشد. در روز ۲۰ یخ‌گشایی، تیمار پروپیلن گلیکول ۱ درصد با تیمار پروپیلن گلیکول ۷ درصد از این نظر تفاوت آماری معنی‌دار داشت (p<۰/۰۵)، ولی با بین بقیه تیمارها و گروه شاهد تفاوت مذکور، معنی‌دار نبود. در روز ۴۰ تیمارهای پروپیلن گلیکول ۱ درصد و پروپیلن گلیکول ۲ درصد در مورد درصد یکپارچگی آکروزوم اسپرم دارای اختلاف آماری معنی‌داری با تیمار پروپیلن گلیکول ۷ درصد بودند (p<۰/۰۵)، ولی با بقیه تیمارها و گروه شاهد در این خصوص تفاوت آماری معنی‌داری نداشتند. در مورد نمونه‌هائی که در روز ۶۰ یخ‌گشایی شدند نیز درصد یکپارچگی آکروزوم اسپرم در تیمار پروپیلن گلیکول ۱ درصد با تیمار پروپیلن گلیکول ۷ درصد تفاوت آماری معنی‌دار داشت (p<۰/۰۵)، ولی از این نظر با بقیه تیمارها تفاوت آماری معنی‌دار مشاهده نشد.

جدول ۹- مقایسه درصد یکپارچگی آکروزوم اسپرم قوچ‌های مورد مطالعه در روزهای مختلف یخ‌گشایی منی

تیمار	مدت زمان نگه‌داری منی درانجماد تا مرحله یخ‌گشائی(روز)			
	صفر	۲۰	۴۰	۶۰
۱ میلی‌مولار EDTA	۶۳/۰۷±۴/۸۳	۶۰/۶۸±۳/۵۶^{ab}	۵۶/۴۴±۳/۵۴^{ab}	۵۴/۴۱±۳/۹۹^{ab}
۱/۵ میلی‌مولار EDTA	۵۶/۰۲±۴/۸۳	۶۱/۴۰±۳/۵۶^{ab}	۵۴/۵۰±۳/۵۴^{ab}	۵۳/۷۶±۴/۲۰^{ab}
۲ میلی‌مولار EDTA	۶۵/۸۱±۴/۸۳	۶۲/۵۷±۳/۵۶^{ab}	۶۰/۸۳±۳/۵۴^{ab}	۶۰/۸۲±۴/۲۰^{ab}
۲/۵ میلی‌مولار EDTA	۶۰/۴۸±۴/۸۳	۶۴/۸۹±۳/۵۶^{ab}	۶۳/۹۹±۳/۵۴^{ab}	۵۸/۴۶±۴/۲۰^{ab}
پروپیلن‌گلیکول ۱درصد	۷۲/۶۴±۴/۸۳	۷۲/۲۹±۳/۵۶^{a}	۶۸/۸۸±۳/۵۴^{a}	۶۵/۸۱±۴/۲۰^{a}
پروپیلن‌گلیکول ۲درصد	۶۸/۸۰±۴/۸۳	۶۹/۲۸±۳/۵۶^{ab}	۶۷/۷۶±۳/۵۴^{a}	۶۲/۵۳±۳/۹۹^{ab}
پروپیلن‌گلیکول ۳درصد	۶۹/۲۶±۴/۸۳	۶۸/۱۱±۳/۵۶^{ab}	۶۴/۳۶±۳/۵۴^{ab}	۶۲/۰۸±۴/۲۰^{ab}
پروپیلن‌گلیکول ۷درصد	۵۶/۷۲±۴/۸۳	۵۴/۸۳±۳/۵۶^{b}	۵۰/۲۳±۳/۷۷^{b}	۴۷/۵۹±۴/۲۰^{b}
شاهد	۶۲/۱۰±۴/۸۳	۵۶/۶۹±۳/۵۶^{ab}	۵۵/۳۹±۳/۵۴^{ab}	۵۲/۷۷±۴/۲۰^{ab}

abcd: حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

بحث و نتیجه‌گیری

محدوده تغییرات مقادیر هر یک از ویژگی‌های کمی و کیفی اسپرم قبلاً توسط گزارشات مختلف در مورد حجم انزال (۱/۶-۰/۵ میلی‌لیتر)، حرکت موجی (۲-۵)، تحرک کل (۹۰-۷۰ درصد)، حرکت پیشرونده (۴۵-۹۰ درصد)، رنگ منی (۵-۲)، تعداد اسپرم در هر میلی‌لیتر ($۱۰^{۹}\times$ ۵/۰-۱/۰۷)، درصد اسپرم زنده (۹۰-۶۰ درصد) و درصد اسپرم‌های غیرطبیعی (۱۵-۵ درصد) عنوان شده است (Karagiannidis *et al.*, 2000; Moghaddam *et al.*, 2012; Dolati doorbash *et al.*, 2015; Ranghraz Tavakoli *et al.*, 2016)، که نتایج حاصل از مطالعه حاضر با نتایج گزارش فوق هم‌خوانی دارد.

بررسی تحرک کل تمامی گروه‌های آزمایشی در مطالعه حاضر نشان داد که گروه‌های تیمار در تمام سطوح پروپیلن گلیکول (۱، ۲ و ۳ درصد) تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد و همچنین گروه تیمار با پروپیلن گلیکول ۷ درصد داشتند. همچنین درصد تحرک کل در روزهای مختلف یخ‌گشایی در گروه‌های تیمار با پروپیلن گلیکول ۱ و ۲ درصد بهترین عملکرد را در مقایسه با بقیه گروه‌ها داشته و تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نشان دادند. درصد حرکت پیشرونده اسپرم‌ها در گروه‌های تیمار با پروپیلن گلیکول ۱، ۲ و ۳ درصد و همچنین گروه تیمار با ۲/۵ میلی‌مولار EDTA تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد داشتند. نتایج یخ‌گشایی در روزهای مختلف نشان داد که حرکت پیشرونده در روز صفر آزمایش در تیمار حاوی پروپیلن گلیکول ۱ درصد، در روز ۲۰ آزمایش در تیمارهای حاوی پروپیلن گلیکول ۱ و ۲ درصد، در روز ۴۰ و ۶۰ آزمایش در تیمارهای حاوی پروپیلن‌گلیکول ۱، ۲ و۳ درصد تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد داشتند. افزایش معنی‌دار درصد تحرک کل و حرکت پیشرونده اسپرم در نمونه‌های

تیمار با پروپیلن گلیکول و همچنین درصد حرکت پیشرونده اسپرم در گروه تیمار با ۲/۵ میلی‌مولار EDTA نسبت به گروه شاهد، احتمالاً ناشی از توانایی عبور پروپیلن گلیکول از غشای سلول و جلوگیری از تشکیل بلورهای یخ داخل‌سلولی و کاهش آسیب به اسپرم و توانایی EDTA در کلات‌کردن کلسیم و ممانعت از ورود کلسیم خارج‌سلولی به داخل سلول و جلوگیری از ظرفیت‌پذیری سلول‌های اسپرم می‌باشد که سبب بهبود تحرک کل و پیشرونده اسپرم می‌شود (Bourinbaiar and Lee, 1996; Buyukleblebici *et al*., 2014; Keshtgar *et al*., 2016). در مطالعه‌ای که روی قوچ‌های نژاد پامینتا انجام گرفته شده است، نشان داده شده که افزودن مقدار ۱/۵ گرم بر لیتر EDTA بر رقیق‌کننده اسپرم دارای جنبایی کمتری نسبت به گروه شاهد بود (Aisen *et al*., 1999). همچنین مطالعه‌ای دیگر روی اسپرم انسان نشان داد که افزودن ۱/۱ میلی‌مولار EDTA به رقیق‌کننده منی در مقایسه با گروه شاهد، تفاوت آماری معنی‌داری در میزان جنبایی اسپرم‌ها ایجاد نکرد. همچنین این مطالعه نشان داد که میزان حرکت پیشرونده اسپرم‌ها در مقایسه با گروه شاهد بهبود یافت ولی این تفاوت نیز از نظر آماری معنی‌دار نبود (Keshtgar *et al*., 2016)، که با نتایج حاصل از این پژوهش در مورد EDTA مطابقت دارد. در پژوهشی که روی اسپرم انسان انجام گرفته است، نشان داده شد که افزودن پروپیلن گلیکول به رقیق‌کننده اسپرم انسان سبب بهبود معنی‌دار تحرک کل اسپرم می‌شود (Barri and Anthony, 2001)، که با نتایج حاصل از پژوهش حاضر مطابقت دارد.

مقایسه‌ها بین تیمارها نشان داد که درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها در گروه‌های تیمار با پروپیلن‌گلیکول ۱، ۲ و ۳ درصد نسبت به گروه شاهد و گروه تیمار با پروپیلن‌گلیکول ۷ درصد تفاوت معنی‌داری داشتند. همچنین نتایج حاصل از یخ‌گشایی در روزهای مختلف آزمایشی نشان داد که درصد زنده‌مانی در روز صفر در تمامی تیمارها تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشت و در روز۲۰ آزمایش گروه تیمار با پروپیلن‌گلیکول ۱ درصد، در روز ٤٠ و ٦٠ آزمایش گروه‌های تیمار با پروپیلن گلیکول ۱ و ۲ درصد تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد داشتند. در هنگام نگه‌داری انجمادی اسپرم، تشکیل یخ داخل و خارج سلولی سبب تخریب و مرگ سلول می‌شود. جهت رفع این مشکل از پروپیلن گلیکول که یک حفاظت‌کننده نفوذپذیر در داخل سلول است، استفاده شد که افزودن آن به محیط رقیق‌کننده سبب افزایش زنده‌مانی اسپرم‌ها گردید (Holt, 2000). در پژوهشی نشان داده شده است که افزودن پروپیلن گلیکول به رقیق‌کننده اسپرم میگوی آب‌های شیرین سبب افزایش معنی‌دار درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها شده است که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد (Claudet *et al*., 2016). در بررسی اسپرم منجمد انسان نشان داده شده است که استفاده از مقدار ۱/۱ میلی‌مولار EDTA زنده‌مانی اسپرم را نسبت به گروه شاهد افزایش داد ولی معنی‌دار نبود (Keshtgar *et al*., 2016)، که مطابق با یافته‌های پژوهش حاضر می‌باشد.

بررسی یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم‌های رقیق شده با EDTA و پروپیلن گلیکول نشان می‌دهد که هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری بین سطوح مختلف پروپیلن‌گلیکول (۱، ۲ و ۳ درصد) و EDTA (۱، ۱/۵، ۲

و ۲/۵ میلی‌مولار) با گروه شاهد وجود ندارد. همچنین یخ‌گشایی در روزهای مختلف آزمایش نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تیمارها با گروه شاهد در هیچ یک از روزها وجود ندارد. در بررسی اسپرم منجمد انسان نشان داده شده است که استفاده از مقدار ۱/۱ میلی‌مولار EDTA، یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم انسان را نسبت به گروه شاهد افزایش می‌دهد (Keshtgar *et al*., 2016)، که مغایر با یافته‌های پژوهش حاضر می‌باشد. این امر می‌تواند به دلیل تفاوت گونه‌های مورد آزمایش باشد.

مقایسه بین تیمارها نشان داد که درصد سلامت غشای آکروزوم اسپرم‌ها در گروه‌های تیمار با پروپیلن‌گلیکول ۱، ۲ و ۳ درصد نسبت به گروه شاهد و گروه تیمار با پروپیلن‌گلیکول ۷ درصد تفاوت معنی‌داری داشتند. همچنین نتایج حاصل از یخ‌گشایی در روزهای مختلف آزمایشی نشان داد که درصد سلامت غشای آکروزوم اسپرم‌ها در روز صفر، ۲۰، ٤٠ و ٦٠ در هیچ یک از تیمارها تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشت. در یک بررسی که روی اسپرم انسان انجام شده است، مشاهده شده است که گروه حاوی EDTA نسبت به گروه شاهد دارای آکروزوم سالم بیشتری بود که این یافته با نتایج پژوهش حاضر مغایر می‌باشد که دلیل این امر می‌تواند مربوط به تفاوت گونه‌های مورد مطالعه باشد (Mukherjee *et al*., 2016). در بررسی دیگری نشان دادند که یکپارچگی آکروزوم در گروه تیمار با پروپیلن گلیکول ٦ درصد نسبت به گروه‌های تیمار با پروپیلن گلیکول ۱، ۳ و ۱۰ درصد بیشتر بود ولی این تفاوت معنی‌دار نبود که مطابق با یافته‌های پژوهش حاضر می‌باشد (Ping *et al*., 2012).

یکی از عوامل مهم در کاهش تحرک اسپرم‌ها در اثر گذر زمان، افزایش میزان نفوذپذیری سلول و کاهش توانایی تنظیم سطوح یونی در داخل سلول و همچنین تشکیل بلورهای یخ داخل سلولی است که به طور کلی بر سلامت و عملکرد غشای اسپرم زیان‌آور می‌باشد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که افزودن مقادیر ۱ و ۲ درصد پروپیلن گلیکول به رقیق‌کننده اسپرم قوچ قزل، درصد تحرک کل، حرکت پیشرونده و زنده‌مانی اسپرم‌ها را پس از یخ‌گشایی به طور معنی‌داری بهبود می‌بخشد. همچنین افزودن سطح ۲/۵ میلی‌مولار EDTA نیز سبب بهبود معنی‌دار درصد حرکت پیشرونده اسپرم نسبت به گروه شاهد می‌شود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از زحمات و همکاری‌های مسئولین ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان آقایان مهندس حبیب چراغی، مهندس خسرو پارسایی‌مهر و مهندس یعقوب تیموری که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند، قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

- Aisen, E.G., Alvarez, H.L., Grade, J.J. and Venturino, A. (1999). Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. Theriogenolog, 53(5): 1053-1061.
- Barri, A.B. and Anthony, V. (2001). Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. Journal of Andrology, 22(6): 1061-1069.
- Bittencourt, R.F., Bicudo, S.D., Biscarde, E.A., Chalhoub, M., Filho, A.D.L. and Oba, E. (2014). Trehalose and Calcium chelatorfor ram semen cryopreservation. Archives of Veterinary Science, 19(2): 66-77.
- Bourinbaiar, A.S. and Lee, C. (1996). Synergistic effect of Gramicidin and EDTA in inhibiting sperm motility and cervical mucus penetration in vitro. Original Research Articale, 54(6): 367-372.
- Buyukleblebici, S., Barbaros Tuncer, P., Ekin A., Bucak, M.N., Sariozkan, S., *et al*. (2014). Cryopreservation of bull sperm: Effect of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. Animal Reproduction Science, 150(3-4): 77-83.
- Chi, H.J., Choi, S.Y., Chun, E.K., Chung, D.Y., Kim, J.H., Kim, M.H., *et al*. (2008). Protective effect of antioxidant supplementation in sperm-preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa. Human Reproduction, 23(5): 1023-1028.
- Claudet, P.V., Natesan, M. and Selvakumar, N. (2016). Effect of cryopreservation and cooling rates on fertility potential of sperm in the giant freshwater prawn, Macrobrachium rosenbergii (De Man). Animal Reproduction Science, 171: 49-57.
- Dolati Doorbash, P., Daghighkia, H., Moghaddam, G.H., Rafat, S.A. and Taghizadeh, A. (2015). The effect of adding raffinose concentrations in the diluents in semen cryopreservation of different breeds of ram at the reproductive seasone. Journal of Animal Science Researches (Agricultural Science), 25(2): 121-132. [In Persian]
- Evans, G. and Maxwell, V.M.C. (1987). Salamon's artificial insemination of sheep and goat. Butterworths Pty Limited, pp:125-132
- Holt, W.V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. Animal Reproduction Science, 62(1-3): 3-22.
- Hu, J.H., Chen, X.Y., Li, G., Li, Q.W., Yang, H., Wang, L.I., *et al*. (2005). The cryopreservation effect on frozen-thawed semen of egg yolk low density lipoproteins. Asian-Aust. Journal of Animal Science, 19(4): 486-494.
- Ieropoli, S., Do Espirito Santo, M., Masullo, P. and Sansone, G. (2004). Effect of extender composition, cooling rate and freezing on the fertilization viability of spermatozoa of the Pacific oyster (Crassostrea gigas). Cryobiology, 49(3): 250-257.
- Karagiannidis, A., Alexopoulos, C., Amarantidis, I. and Varsakeli, S. (2000). Seasonal variation in semen characteristics of Chois and Feresian rams in Greece. Small Ruminant Research, 37(1-2): 125-130.
- Keshtgar, S., Gharesi-Fard, B., Iravanpour, F. and Kazerooni, M. (2016). Combined effect of Trolox and EDTA on frozen-thawed sperm quality. Iranian Journal of Medical Sciences, 41(3): 230-237.
- Li, Y.H., Cai, K.J., Kovacs, A. and Ji, W.Z. (2005). Effect of various extenders and permeating cryoprotectants on cryopreservation of Cynomolgus Monkey (Macaca fascicularis) spermatozoa. Journal of Andrology, 26(3): 387-394.
- Moghaddam, G.H., Pourseif, M.M. and Rafat, S.A. (2012). Seasonal variation in semen quantity and quality traits of Iranian crossbred rams. Slovak Journal of Animal Science, 45(3): 67-75.

- Mukherjee, K.P., Sahoo, A.K., Ray, K., Chattaraj, S. and Datta, U. (2016). Cryoprotective effect of EDTA, lactose, ascorbic acid and L-cysteine as an additives on garole ram (Ovis aries) semen. International Journal of Advanced Research in Biological Science, 3(7): 92-98.
- Ozkavukcu, S., Erdemli, E., Isik, A., Oztuna, D. and 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.
- Ping, S.H., Wang, C.Y., Yue, F., Yang, S.H., Si, W. and Luo, Y. (2012). Effect of Dimethyl Sulfoxide, Ethylene glycol, Propylene glycol and Glycerol on cryopreservation of wild tree shrew (Tupaia belangeri chinese) cauda epididimal sperm. Journal of Animal and Veterinary Advances, 11(19): 3568-3574.
- Ranghraz Tavakoli, H., Daghighkia, H., Moghaddam, G.H. and Rafat, S.A. (2016). The effect of hCG injection on serum and seminal plasma testosterone in Ghezel ram. Journal of Animal Science Researches (Agricultural Science), 26(2): 131-139.
- Silva, S.V., Soares, A.T., Batista, A.M., Almeida, F.C., Nunes, J.F. and Peixoto, C.A. (2013). Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. Animal Reproductive Science, 137(1-2): 37-44
- Wilhem, K.M., Graham, J.K. and Squires, E.L. (1996). Effect of phosphatidilserine and cholesterol liposomes on the viability, motility, and acrosomal integrity of stallion spermatozoa prior and after cryopreservation. Cryobiology, 33(3): 320-329.
- World Health Organization. (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed., pp: 149.
- Zanganeh, Z., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Nabi, M.M., Najafi, A., Zare-Shahneh, A. and Zhandi, M. (2013). Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation. Small Ruminant Research, 114(1): 120-125.