"Research article" **DOI: 10.30495/JVCP.2023.1980107.1397**

Evaluation of the characteristics of ram sperm diluted with *Thymus-vulgaris* essential oil using phase-contrast microscope and CASA software

Ghamari Monavvar, H.[1], Moghaddam, Gh.[2*], Daghigh Kia, H.[2], Qasemi Panahi, B.[3]

1- Ph.D. 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- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
*Corresponding author's email: ghmoghaddam@tabrizu.ac.ir
(Received: 2023/2/20 Accepted: 2023/8/5)

Abstract

The ability of sperm to perform fertilization depends on various characteristics such as movement, viability, and sufficient volume. The present study was conducted to investigate the effect of *Thymus vulgaris* essential oil on the motility characteristics of ram sperm using phase-contrast microscope and CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer) software. For this purpose, semen was collected twice a week from four rams. Initial evaluations included volume, wave motility, progressive motility, non-progressive motility and survival percentage of sperms. Then sperm samples were mixed with standard index Tris-based diluent, 20% egg yolk, 7% glycerol, plus 0, 100, 200 and 400 µg of *Thymus vulgaris* essential oil per ml. After bringing the temperature of the sperm samples to 5 degrees Celsius in the refrigerator, they were placed at 4 cm above liquid nitrogen for 10 minutes and finally immersed in it. The samples were thawed on days 0 and 30 of the experiment. Traits which were investigated during freezing and thawing days included total and progressive motility, non-progressive motility, viability percentage, MDA (Malondialdehyde) and CASA characteristics. The results showed that the percentage of viability and mobility decreased significantly during the experiment (p<0.001). The treatments of 100, 200 and 400 µg *Thymus vulgaris* essential oil had the most significant percentages compared to the control group in the characteristics of progressive and total motility, viability and CASA (p<0.001). Malondialdehyde had significantly decreased in the 100 and 200 treatments compared to the 400 and control treatments (p<0.001). The results of the present study showed that diluents containing *Thymus vulgaris* essential oil improve sperm motility and viability during freezing.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: CASA software, Motility characteristics, Ram, Sperm, *Thymus vulgaris*.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2023.1980107.1397

بررسی صفات اسپرم رقیق‌شده قوچ با اسانس آویشن (*Thymus vulgaris*)، با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست و نرم‌افزار CASA

حدیثه قمری‌منور[۱]، غلامعلی مقدم[۲*]، حسین دقیق‌کیا[۲]، بابک قاسمی‌پناهی[۳]

۱-دانشجوی دکترای گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

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

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

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

(دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۱۲/۱ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۵/۱۴)

چکیده

توانایی اسپرم در انجام لقاح به صفات مختلفی ازجمله حرکت، زنده‌مانی و حجم کافی بستگی دارد. پژوهش حاضر به‌منظور بررسی تاثیر اسانس آویشن بر صفات حرکتی اسپرم قوچ با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست و نرم‌افزار CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer) انجام گرفت. بدین منظور اسپرم‌گیری از ۴ رأس قوچ و هفته‌ای دوبار انجام شد. ارزیابی اولیه شامل حجم، حرکت موجی و پیش‌رونده، حرکت درجا و درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها بود. سپس نمونه‌های اسپرم با رقیق‌کننده شاخص استاندارد بر پایه تریس، ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ، ۷ درصد گلیسرول، به‌علاوه مقادیر صفر، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم اسانس آویشن، مخلوط شدند. بعد از رساندن دمای نمونه‌های اسپرم به ۵ درجه سلسیوس در یخچال، به مدت ۱۰ دقیقه در فاصله ۴ سانتی‌متری بالای نیتروژن مایع قرار گرفتند و در نهایت داخل آن غوطه‌ور شدند. نمونه‌ها در روزهای صفر و ۳۰ آزمایش، یخ‌گشایی شدند. در روزهای انجماد و ذوب، تحرک کل و پیش‌رونده، حرکت درجا، درصد زنده مانی و صفات CASA و مقدار مالون‌دی‌آلدئید (malondialdehyde) مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که درصد زنده‌مانی و تحرک و مقدار MDA در طول دوره آزمایش کاهش معنی‌داری داشتند ($p<۰/۰۰۱$) و تیمارهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم آویشن، بیشترین اختلاف معنی‌دار را نسبت به گروه شاهد در صفات حرکت پیش‌رونده و کل، زنده‌مانی و CASA به خود اختصاص دادند ($p<۰/۰۰۱$). در صفت MDA تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ اختلاف معنی‌داری نسبت به تیمار ۴۰۰ و شاهد داشتند ($p<۰/۰۰۱$). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از اسانس آویشن به عنوان رقیق‌کننده باعث بهبود صفات حرکتی اسپرم و زنده‌مانی در طول انجماد می‌شود.

کلیدواژه‌ها: اسپرم، آویشن، صفات حرکتی، قوچ، نرم‌افزار CASA.

مقدمه

انجماد اسپرم در تلقیح مصنوعی و باروری، جهت نگه‌داری گامت نر و ایجاد فرصتی برای باروری‌های بعدی به کار گرفته می‌شود (Eriksson and Martinez, 2000). نگه‌داری اسپرم به روش انجماد مزایای زیادی دارد که می‌توان به از بین رفتن مشکلات حمل و نقل منی تازه از فواصل دور، کاهش خطر انتقال عفونت‌ها و ایجاد لاین‌های مفید در پرورش اشاره کرد (Ieropoli *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2006). این در حالی است که انجماد باعث کاهش زنده‌مانی و تحرک اسپرم شده و تغییراتی را در غشای پلاسمایی و آکروزوم اسپرم ایجاد می‌کند که پتانسیل باروری را کاهش می‌دهد (Silva *et al.*, 2013; Daghigh kia *et al.*, 2017) و آسیب‌هایی که ایجاد می‌شود شامل استرس اکسیداتیو، شکل گرفتن بلورهای یخ و سازمان‌دهی مجدد لیپوپروتئین در غشای پلاسمایی اسپرم‌ها می‌باشد (Bailey *et al.*, 2000). هم‌چنین انجماد منی، مقدار کلسیم داخل سلولی را افزایش می‌دهد که این امر موجب اختلال در عملکرد و مرگ سلول می‌شود (Bittencourt *et al.*, 2014; Shafaati *et al.*, 2020). زنده‌مانی و تحرک اسپرم پس از انجماد به عوامل متعددی نظیر کیفیت منی و غلظت اجزای موجود در محیط انجماد بستگی دارد (Sharafi *et al.*, 2009). در این راستا، به کاربردن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در محیط انجماد منی که بتواند از اسپرم‌ها در برابر آسیب‌های مرحله یخ‌گشایی محافظت کرده و زنده‌مانی و تحرک را حفظ کند، گام مهمی در جهت باروری و تلقیح می‌باشد (Masoudi *et al.*, 2019). آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که سبب توقف و خنثی سازی مواد واسطه حاصل از فرآیند تولید انرژی در زنجیره انتقال الکترون سلول‌ها می‌شوند که به انواع اکسیژن فعال معروف بوده و در گروه رادیکال‌های آزاد قرار می‌گیرند (Nateq *et al.*, 2020).

در سال‌های اخیر، در رابطه با خواص آنتی‌اکسیدانی گیاهان، به انواعی از ترکیبات گیاهی دست پیدا کرده‌اند که می‌توانند برای کنترل رادیکال‌های آزاد مفید واقع شوند. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی شامل فنول‌های گیاهی هستند که می‌توانند به عنوان عوامل احیاءکننده عمل کنند (Malo *et al.*, 2011). ترکیب‌های فنولیک به دلیل داشتن خواص اکسید و احیاءکنندگی، در جذب و خنثی کردن رادیکال‌های آزاد نقش مهمی دارند (Daghigh kia *et al.*, 2016). آویشن (*Thymus vulgaris*) یکی از گیاهانی می‌باشد که خواص آنتی‌اکسیدانی قوی در مقابل رادیکال‌های آزاد دارد. این گیاه اثرات آنتی‌اکسیدانی بیشتری از ویتامین E، میوه‌جات و سبزیجات دارد (Novak *et al.*, 2000). آویشن دارای ترکیباتی نظیر تیمول، کارواکرول و گاماتریپنین (Hazzit *et al.*, 2006) و همچنین سینئول می‌باشد که مخصوصاً ترکیب اخیر با القای آنزیم هیدروکسیلاز تستوسترون، آندروژن را افزایش داده و بر میزان غلظت اسپرم می‌افزاید (Ozguven and Tansi, 1998). همچنین آویشن گیرنده‌های آندروژنی در سلول‌های گونادوتروپ را کاهش می‌دهد و بنابراین کاهش بازخورد منفی تستوسترون بر این سلول‌ها و افزایش ترشح LH رخ می‌دهد (Wang *et al.*, 1997). اسانس آویشن با اثرگذاری بر اعصاب سمپاتیک و افزایش تعداد گیرنده‌های سلول‌های لایدیک باعث افزایش تستوسترون و تاثیر بر غلظت هورمون LH می‌شود (Ariza *et al.*, 2011). از طرف دیگر، از

آن‌جایی که اسپرم‌ها مقدار زیادی از سیتوپلاسم خود را در طی اسپرماتوژنز از دست می‌دهند، به علت فقدان سیستم‌های آنتی اکسیدانی، ظاهراً نسبت به سلول‌های سوماتیک حساسیت بیشتری نسبت به افزایش رادیکال‌های آزاد دارند. اولین پیامد حمله رادیکال‌های آزاد به ساختارهای غشایی، می‌تواند پراکسیداسیون لیپیدی در غشای سلول‌ها و اندامک‌ها باشد. آنتی اکسیدان‌هایی مانند آویشن، سموم و رادیکال‌های آزاد را از محیط اطراف سلول حذف می‌کنند و پراکسیداسیون لیپیدی را مهار می‌کنند که منجر به حفظ ساختار بیوشیمیایی سلولی می‌شود (Jalili *et al.*, 2018). مالون‌دی‌آلدئید (malondialdehyde; MDA)، ترکیبی آلدئیدی، فعال و بسیار واکنش‌پذیر است و در بدن جانداران از پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع تولید می‌شود، بنابراین با اندازه‌گیری میزان مالون‌دی‌آلدئید در نمونه‌های بیولوژیک مختلف، می‌توان به میزان پراکسیداسیون چربی‌ها پی برد و از آن به عنوان یک نشانگر برای اندازه‌گیری سطح استرس اکسیداتیو در یک موجود زنده استفاده نمود (Sicherle *et al.*, 2011).

نرم‌افزار (تکنولوژی) CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer) در آخر دهۀ ۱۹۸۱ برای تجزیه و تحلیل ویژگی‌های حرکتی اسپرم توسعه یافت و در این زمینه بسیار موفق بوده‌است. سیستم آنالیزگر CASA سیستم پیشرفته‌ای است که امروزه برای آنالیزهای کیفی اسپرم استفاده می‌شود. سیستم مذکور در طی ۱۵ سال گذشته پیشرفت زیادی کرده تا ابزاری عملی و کاربردی برای اندازه‌گیری و مشخص کردن سرعت و الگوی حرکت اسپرم‌ها را فراهم آورد و همچنین زمان واقعی و پارامترهای حرکتی مختلف را ارائه می‌دهد. علاوه بر این، نرم‌افزار CASA قادر به اندازه‌گیری مقادیر متعدد برای تحرک اسپرم‌ها است. در واقع سیستم تجزیۀ کامپیوتری اسپرم به طور معمول به عنوان یک ابزار تحلیل معمول اسپرم در آزمایشگاه‌های بالینی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Vahedi *et al.*, 2018).

با توجه به مطالب ارائه‌شده و نیز نظر براین‌که در مورد اثرات آنتی‌اکسیدانی رقیق‌کننده آویشن در قوچ به منظور حفاظت اسپرم در مقابل انجماد، مطالعه‌ای انجام نگرفته است، لذا در پژوهش حاضر به بررسی و تعیین اثربخشی غلظت‌های مختلف اسانس گیاه آویشن به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی، بر صفات حرکت و زنده‌مانی اسپرم منجمدشده قوچ پرداخته شده‌است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه مداخله‌ای با طرح کاملاً تصادفی به مدت ۴ ماه در ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان دانشگاه تبریز واقع در جاده باسمنج از اوایل تیرماه تا اواخر مهرماه ۱۴۰۱ انجام گرفت که در آن از تعداد ۴ رأس قوچ نژاد قزل ۲ تا ۴ ساله استفاده شد. قوچ‌ها در تمام دوره تحقیق در یک سالن سرپوشیده نگه‌داری می‌شدند و قبل از شروع نمونه‌برداری به مدت ۲ هفته نسبت به فرآیند اسپرم‌گیری عادت‌دهی شدند. اسپرم‌گیری ۲ بار در هفته توسط واژن مصنوعی صورت گرفت. بلافاصله بعد از اسپرم‌گیری ارزیابی‌های اولیه از جمله حجم، حرکت موجی، حرکت پیشرونده، حرکت درجا و درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها انجام می‌شد و فقط آن نمونه‌های اسپرمی به مرحله انجماد انتقال داده می‌شدند

که دارای حداقل حجم یک میلی‌لیتر، تراکم بالای ۳ میلیارد اسپرم و حرکت پیشرونده بالای ۷۵ درصد بودند.

- **روش تهیه اسانس گیاه آویشن:** برای تهیه اسانس آویشن، ابتدا مقدار ۲۰۰ گرم از گیاه خشک‌شده (تهیه‌شده از مناطق دشتی شهرستان تکاب) پس از تأیید در آزمایشگاه گیاهان دارویی دانشگاه تبریز خرد و پودر گردیده و سپس با کمک دستگاه سوکسله، عملیات استخراج انجام شد. بدین منظور پودر آویشن بعد از قرارگرفتن در داخل کاغذ صافی، به داخل محفظه شیشه‌ای دستگاه سوکسله انتقال داده شد. در ادامه به میزان دو سوم حجم بالون دستگاه سوکسله اتانول ریخته شد. سپس دمای شوف بالون به محدوده ۵۵ الی۶۵ درجه سلسیوس (دمای جوش الکل) رسانده شد و در زمانی‌که عمل سیفوناژ اتفاق افتاد و ماده مورد نظر به همراه حلال وارد بالون شد، به اندازه نصف مقدار ماده، از حلال قبلی به مبدل و روی نمونه اضافه گردید تا بار دیگر سیفوناژ اتفاق بیفتد. بعد از ۴ یا ۵ بار عمل سیفوناژ، اسانس مورد نظر به دست آمد و حلالی که در بالون باقی مانده‌بود، تبخیر شد (Vahedi *et al*., 2018).

- **روش رقیق‌سازی و آماده‌سازی نمونه‌های اسپرم:** در ادامه برای رقیق‌سازی نمونه‌ها از رقیق‌کننده‌ای بر پایه تریس استفاده شد که حاوی ۲/۷۱ گرم تریس هیدروکسی‌متیل آمینواتان (Merck, Germany)، یک گرم اسید سیتریک مونوهیدرات (Appli Chem, Germany)، ۱/۴ گرم فروکتوز (Dae Jung, Korea) و ۱۰۰ میلی‌گرم استرپتومایسین (داروسازی نصر، ایران) بود که در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل شده و سپس ۷۳ میلی‌لیتر از این محلول با ۲۰ میلی لیتر زرده تخم‌مرغ (زرده تخم مرغ معمولی) و ۷ میلی‌لیتر گلیسرول (آرمان سیتا، ایران) ترکیب می‌شدند. پس از تهیه رقیق‌کننده، نمونه اسپرم اخذشده به نسبت ۱ به ۹ به رقیق‌کننده اضافه می‌شد. در نهایت نمونه‌ها شامل: گروه ۱. نمونه اسپرم رقیق‌شده+تیمار با غلظت ۵ میکرولیتر از اسانس آویشن (۱۰۰ میکروگرم)، گروه ۲. نمونه اسپرم رقیق‌شده+تیمار با غلظت ۱۰ میکرولیتر از اسانس آویشن (۲۰۰ میکروگرم)، گروه ۳. نمونه اسپرم رقیق‌شده+تیمار با غلظت ۲۰ میکرولیتر از اسانس آویشن (۴۰۰ میکروگرم) و گروه ۴. یعنی گروه کنترل (نمونه اسپرم رقیق‌شده، بدون افزودن اسانس آویشن)، آماده گردید.

در ادامه از هر گروه نمونه تهیه‌شده در مرحله قبل، تعداد ۶ پایوت۰/۵ میلی‌لیتری (IMV, France) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس پر شده و بلافاصله سر پایوت‌ها با خمیر هماتوکریت بسته می‌شد. سپس همه پایوت‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در یخچال نگه‌داری گردید تا به دمای ۵ درجه سلسیوس برسند. بعد از مرحله سردسازی، پایوت‌ها در فاصله ۵-۴ سانتی‌متری بالای سطح نیتروژن مایع (قسمت بخار آن) به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند و در نهایت به درون مخزن نیتروژن مایع، به حالت غوطه‌ور، انتقال داده‌شدند.

- **بررسی صفات نمونه‌های تازه اسپرم:** حجم منی توسط لوله مخصوص جمع‌آوری اسپرم (IMV, France) با دقت ۰/۱ میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد که بسته به شرایط حیوان، فراوانی و بسامد اسپرم‌گیری و مهارت اپراتور، بین ۰/۷ تا ۲ میلی‌لیتر متغیر بود. همچنین برای مشاهدهٔ حرکت موجی اسپرم، بلافاصله بعد از اسپرم‌گیری و انتقال نمونه به آزمایشگاه، یک قطره از نمونه منی تازه

روی لام با دمای ۳۷ درجه زیر میکروسکوپ (Nikon, Japan) قرار داده شده و با بزرگنمایی ×۱۰۰ بررسی و از عدد ۱ تا عدد ۵ نمره‌دهی شد. برای بررسی وضعیت حرکت اسپرم‌ها، نمونه منی با نسبت ۱ به ۱۰۰ با محلول سیترات سدیم ۲/۹ درصد (Merck, Germany) رقیق شده و سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از منی رقیق‌شده بر روی لام (QC Lab, China) قرار داده شد و روی آن با لامل پوشانده شد، سپس زیر میکروسکوپ نوری و با استفاده از بزرگ‌نمایی ×۴۰۰، درصد اسپرم‌های متحرک با حرکت رو به جلو (پیش‌رونده) و درجا تعیین شد (WHO, 2010).

برای بررسی و محاسبه درصد اسپرم‌های زنده و مرده (درصد زنده‌مانی اسپرم) نیز از رنگ‌آمیزی ائوزین – نیگروزین (Fluka, Switzerland) استفاده شد. بدین منظور، پس از رقیق‌سازی نمونه منی با محلول سیترات سدیم ۲/۹ درصد در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، با نسبت ۱ به ۱۰۰، یک قطره از رنگ ائوزین نیگروزین به محلول مدنظر اضافه گردیده و رنگ‌آمیزی روی لام صورت گرفت و سپس زیر میکروسکوپ نوری و با استفاده از بزرگ‌نمایی ×۴۰۰، در ۵ ناحیه مختلف لام حدود ۲۰۰ اسپرم شمارش انجام شد (Zanganeh *et al.*, 2013).

– بررسی صفات نمونه‌های اسپرم منجمد و یخ‌گشایی‌شده: نمونه‌های منی، در روزهای یکم و سی‌ام پس از انجماد هم، برای بررسی صفاتی چون تحرک کل و پیش‌رونده، حرکت درجا، درصد اسپرم‌های زنده، فراسنجه CASA (تجزیه و تحلیل نرم‌افزاری ویژگی‌های حرکتی اسپرم) و شاخص استرس اکسیداتیو (مالون‌دی‌آلدئید)، پس از یخ‌گشائی، ارزیابی شدند.

لازم به ذکر است که برای اندازه‌گیری و مشخص‌کردن سرعت و الگوی حرکت اسپرم‌ها و همچنین زمان واقعی و پارامترهای حرکتی مختلف، از نرم افزار (تکنولوژی) CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer) استفاده شد که قادر به اندازه‌گیری مقادیر متعدد برای تحرک اسپرم‌ها هم می‌باشد. این سیستم مجهز به یک میکروسکوپ سه چشمی فازکنتراست، یک دوربین، یک صفحه گرم، کارت سخت‌افزاری برای تبدیل تصاویر بصورت دیجیتال، کامپیوتر و یک نرم‌افزار پیشرفته پردازش و آنالیز اسپرم می‌باشد که کارت سخت‌افزاری فوق‌الذکر، تصاویر را با کیفیت و وضوح بسیار بالا دریافت و در هر ثانیه ۵۰ و یا ۶۰ تصویر را ثبت و تبدیل به تصاویر دیجیتال نموده و در کامپیوتر ذخیره می‌نماید. همچنین به‌منظور تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدهای اسپرم (مالون‌دی‌آلدئید) از آزمایش تیوباربیوتریک اسید (TBARs) استفاده شد. بدین منظور ابتدا جهت رسوب دادن پروتئین‌ها، میزان۱ میلی‌لیتر از نمونه اسپرم هرگروه، با ۲ میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک (Merck, Germany) در یک لولهٔ استریل مخلوط شده و در نهایت هم، مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول هیدروکسی‌تولوئن بوتیله (Merck, Germany) شده به همراه ۱ میلی‌لیتر ازاتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA- Chem Lab, Belgium) به محلول مورد نظر افزوده گردید. سپس لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (بهراد، ایران) شدند. پس از اتمام عمل سانتریفیوژ، مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول بالای هر لوله با ۱ میلی‌لیتر تیوباربیتوریک اسید ۰/۶۷درصد (Merck, Germany) در یک میکروتیوب مخلوط شده و به مدت ۲۰ دقیقه

در آب ۹۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند. پس از سرد شدن نمونه‌ها، میزان جذب نور نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (GENEQ, USA) با طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد سپس عدد به‌دست‌آمده از میزان جذب نمونه در دستگاه، در داخل فرمول قرار داده شد و میزان مالون‌دی‌آلدئید به‌دست آمد (Esterbauer and Cheeseman., 1990).

- **تحلیل آماری داده‌ها:** نتایج حاصله از آزمایش سطوح مختلف آویشن در قالب طرح اندازه‌گیری‌های مکرر با استفاده از رویه Proc Mixed به‌وسیله نرم‌افزار SAS آنالیز و سطح معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) در نظر گرفته شد. مقایسه میانگین‌ها هم با استفاده از روش توکی انجام شد. مدل آماری طرح نیز به شرح زیر بود:

$$Y_{ijklm}=\mu+T_i+D_j+S_k+R_l+e_{ijklm}$$

که در آن، Y_{ijklm} مقدار عددی هر مشاهده می‌باشد که از مجموع اثرات تیمار (T_i)، زمان (D_j)، سطح (S_k)، اثر قوچ (R_l)، اشتباه آزمایشی (e_{ijklm}) و میانگین کل جمعیت (μ) حاصل می‌شود.

i= ۱ و ۲ j= ۰ و ۳۰

k= ۱-۴ l= ۱-۴ m= ۵

یافته‌ها

توصیف آماری صفات ارزیابی‌شده منی تازه شامل حجم، حرکت موجی، درصد حرکت پیشرونده، درصد حرکت درجا و کل و درصد زنده‌مانی در جدول ۱ ارائه شده است ، در دامنه طبیعی و مورد قبول برای سردسازی و انجماد بودند.

جدول ۱- آمار توصیفی صفات کیفی و کمی نمونه‌های منی تازه (قبل از رقیق‌سازی)

صفت بررسی‌شده	تعداد نمونه	میانگین	حداقل	حداکثر	انحراف معیار	ضریب تغییرات
حجم (میلی‌لیتر)	۲۰	۱/۴	۱	۳	۰/۵۷	۰/۴۱
حرکت موجی (۵-۱)*	۲۰	۴/۳۵	۳/۵	۵	۰/۴۶	۰/۱۰
حرکت پیشرونده (درصد)#	۲۰	۸۸/۷۵	۸۰	۹۵	۴/۵۵	۰/۰۵
حرکت درجا (درصد)	۲۰	۷/۲۵	۰	۱۵	۴/۱۲	۰/۵۷
حرکت کل (درصد)	۲۰	۹۶	۹۰	۱۰۰	۳/۰۷	۰/۰۳
زنده‌مانی (درصد)	۲۰	۹۲/۲۵	۸۵	۹۵	۳/۴۳	۰/۰۴

*حرکت موجی بیش از ۹۰ درصد اسپرم‌ها فعال بوده و حرکت بسیار سریع داشتند (نمره ۵)، در ۷۰ تا ۸۵ درصد اسپرم‌ها فعالیت حرکت موجی بصورت سریع بود (نمره ۴)، حدود ۴۵ تا ۶۵ درصد اسپرم‌ها دارای فعالیت بوده و حرکت موجی نسبتا آرام داشتند (نمره ۳)، ۲۰ تا ۴۰ درصد اسپرم‌ها فعال و حرکت موجی بسیار کم داشتند (نمره ۲)، فقط در ۱۰ درصد اسپرم‌ها فعالیت وجود داشت و تحرک هم بسیار ناچیز بود (نمره ۱). #حرکت پیشرونده نمونه‌ها نیز ۸۰ درصد بود که بالاتر از شاخص‌های موردنظر برای سردسازی و انجماد بودند.

آمار توصیفی صفات مورد بررسی در نمونه‌های منی منجمد- یخ‌گشایی‌شده که شامل درصد حرکت پیشرونده، درصد حرکت درجا، درصد حرکت کل، درصد زنده‌مانی، فراسنجه‌های CASA و مقدار مالون‌دی‌آلدئید بودند، در جدول ۲ ارائه شده‌است.

جدول ۲- آماری توصیفی صفات کیفی نمونه‌های منی بعد از یخ‌گشایی

صفت بررسی‌شده	تعداد	میانگین	حداقل	حداکثر	انحراف معیار	ضریب تغییرات
حرکت پیشرونده (درصد)	۱۶۰	۴۸/۳۱	۳۰	۹۰	۱۴/۷۹	۰/۴۷
حرکت درجا (درصد)	۱۶۰	۸/۵	۰	۲۰	۴/۵۸	۰/۵۴
حرکت کل (درصد)	۱۶۰	۵۶/۸۱	۴۰	۱۰۰	۱۲/۸۹	۰/۲۳
زنده‌مانی (درصد)	۱۶۰	۶۷/۵۰	۵۰	۹۵	۱۳/۵۹	۰/۲۰
خطی‌بودن حرکت (درصد)	۸۰	۰/۴۶	۰/۲۵	۰/۶۹	۰/۱۴	۰/۳۰
سرعت در مسیر مستقیم (میکرومتر/ثانیه)	۸۰	۴۹/۰۱	۳۸/۲۳	۵۹/۷۴	۶/۶۷	۰/۱۴
سرعت در مسیر منحنی (میکرومتر/ثانیه)	۸۰	۱۰۵/۲۲	۸۵/۲۷	۱۳۴/۵۹	۱۵/۴۵	۰/۱۵
سرعت در مسیر میانگین (میکرومتر/ثانیه)	۸۰	۴۹/۷۴	۴۰/۱۵	۶۰/۹۵	۷/۳۳	۰/۱۵
تحرک عرضی سر (میکرومتر)	۸۰	۳/۱۷	۲/۰۹	۴/۷۸	۰/۸۸	۰/۲۸
راستی مسیر طی‌شده (درصد)	۸۰	۳۰/۶۰	۲۱	۳۹/۹۸	۷/۱۰	۰/۱۲
مالون‌دی‌آلدئید (نانومول/میلی لیتر)	۱۶۰	۱/۲۸	۰/۱۶	۲/۱۶	۰/۴۲	۰/۳۲

نتایج حاصله از آنالیز داده‌ها نیز در جدول ۳ ارائه شده‌است که نشان می‌دهد تحرک اسپرم‌ها (حرکت کل و پیشرونده) در نمونه‌های اسپرم تیمارشده با مقادیر ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر اسانس آویشن، دارای بیشترین اختلاف معنی‌داری نسبت به نمونه‌های اسپرم تیمارشده با مقدار ۴۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر و نمونه‌های اسپرم گروه کنترل بودند و افزودن این دو تیمار به رقیق‌کننده اسپرم، سبب حفظ تحرک بیشتر اسپرم‌ها شد ($p<۰/۰۰۱$). همچنین، مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در صفت زنده‌مانی بین نمونه‌های اسپرم تیمارشده با مقادیر ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر اسانس آویشن با نمونه‌های اسپرم گروه شاهد و نمونه‌های اسپرم تیمارشده با مقدار ۴۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر، اختلاف آماری معنی‌دار وجود داشت ($p<۰/۰۰۱$).

از طرف دیگر، در مورد ۶ صفت بررسی‌شده توسط نرم‌افزار CASA (خطی بودن حرکت، سرعت در مسیر مستقیم، سرعت در مسیر منحنی، سرعت در مسیر میانگین، تحرک عرضی سر و راستی مسیر طی)، بین تمامی گروه‌ها اختلاف آماری معنی‌دار وجود داشت ($p<۰/۰۰۱$)، به‌طوری‌که بیشترین اختلاف معنی‌دار در صفات خطی بودن حرکت، سرعت در مسیر مستقیم، سرعت در مسیر منحنی، سرعت در مسیر میانگین و تحرک عرضی سر، مربوط به نمونه‌های اسپرم تیمار شده با مقدار ۱۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر اسانس آویشن و در مورد صفت راستی مسیر طی‌شده بیشترین اختلاف معنی‌دار مربوط به نمونه‌های اسپرم تیمار شده با مقدار ۲۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر اسانس آویشن بود. هم‌چنین در صفات تحرک عرضی سر و راستی مسیر طی‌شده، کم‌ترین اختلاف آماری معنی‌دار، مربوط به نمونه‌های اسپرم تیمار شده با مقدار ۴۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر اسانس آویشن بود که البته در مورد سایر صفات، این یافته صدق نمی‌کند و کم‌ترین اختلاف آماری معنی‌دار در مورد نمونه‌های اسپرم گروه شاهد مشاهده گردید ($p<۰/۰۰۱$).

همچنین داده‌های جدول ۳ نشان می‌دهد که مقادیر به‌دست آمده برای فاکتور مالون‌دی‌آلدئید نمونه‌های اسپرم تیمارشده با مقادیر ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر اسانس آویشن، اختلاف آماری معنی‌داری نسبت به مقادیر ثبت‌شده در مورد نمونه‌های اسپرم تیمارشده با مقادیر ۴۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر و نمونه‌های اسپرم گروه شاهد داشته‌است ($p<۰/۰۰۱$).

جدول ۳- مقایسه اثرات مختلف اسانس آویشن بر روی صفات حرکتی اسپرم قوچ قزل پس از یخ‌گشایی نمونه منی (میانگین± انحراف معیار)

صفت بررسی‌شده	نوع تیمار (بدون اسانس آویشن) گروه ۱	گروه ۲ (حاوی ۱۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر اسانس آویشن)	گروه ۳ (حاوی ۲۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر اسانس آویشن)	گروه ۴ (حاوی ۴۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر اسانس آویشن)
حرکت پیشرونده (درصد)	۴۲±۲/۱۱^{c}	۵۴±۲/۳۲^{a}	۵۱/۲۵±۲/۲۴^{ab}	۴۶±۲/۲۸^{bc}
حرکت کل (درصد)	۵۱/۱۲±۱/۷۴^{c}	۶۱/۷۵±۱/۹۷^{a}	۵۹/۶۲±۲/۰۲^{ab}	۵۴/۷۵±۲/۰۲^{bc}
زنده‌مانی (درصد)	۶۲±۱/۸۹^{c}	۷۲/۳۷±۲/۰۵^{a}	۷۰/۶۲±۲/۱۳^{ab}	۶۵±۲/۱۶^{bc}
خطی‌بودن حرکت (درصد)	۰/۳۰±۰/۰۰۶^{d}	۰/۶۳±۰/۰۰۷^{a}	۰/۵۶±۰/۰۰۶^{b}	۰/۳۶±۰/۰۰۶^{c}
سرعت در مسیر مستقیم (میکرومتر/ثانیه)	۴۰/۳۶±۰/۲۶^{d}	۵۷/۴۸±۰/۲۹^{a}	۵۲/۴۶±۰/۲۶^{b}	۴۵/۷۳±۰/۳۳^{c}
سرعت در مسیر منحنی (میکرومتر/ثانیه)	۸۸/۱۸±۰/۴۹^{d}	۱۲۸/۱۳±۰/۸۶^{a}	۱۰۸/۷۸±۰/۳۸^{b}	۹۵/۷۸±۰/۴۶^{c}
سرعت در مسیر میانگین (میکرومتر/ثانیه)	۴۱/۸۳±۰/۲۵^{d}	۵۸/۴۷±۰/۳۲^{a}	۵۵/۰۸±۰/۲۸^{b}	۴۳/۵۸±۰/۳۲^{c}
تحرک عرضی سر (میکرومتر)	۲/۴۷±۰/۰۴^{c}	۴/۴۴±۰/۰۵^{a}	۳/۴۷±۰/۰۵^{b}	۲/۳۰±۰/۰۳^{d}
راستی مسیر طی‌شده (درصد)	۲۴/۷۵±۰/۲۴^{c}	۳۶/۵۴±۰/۱۸^{b}	۳۸/۴۰±۰/۲۰^{a}	۲۲/۷۲±۰/۴۷^{d}
مالون‌دی‌آلدئید (نانومول/میلی‌لیتر)	۱/۵۷±۰/۰۵^{b}	۱/۰۷±۰/۰۶^{a}	۱/۱۲±۰/۰۶^{a}	۱/۳۲±۰/۰۵^{b}

a,b,c,d : حروف غیر مشابه در هر سطر نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد ($p<۰/۰۰۱$)

یافته‌های مربوط به تاثیر مدت‌زمان نگه‌داری، بر صفات اسپرم‌های منجمد، بعد از مرحله یخ‌گشایی نیز در جدول ۴ ارائه شده‌است. همان‌طور که مشاهده می‌گردد با گذشت زمان و افزایش زمان نگه‌داری منی، حرکت درجای اسپرم‌ها افزایش پیدا کرده و سایر صفات از جمله حرکت پیشرونده و حرکت کل و درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها، کاهش پیدا کرده‌است. این در حالی است که بیشترین اختلاف آماری معنی‌دار در مورد صفات مذکور، به جز حرکت درجا و مقدار مالون‌دی‌آلدئید، مربوط به نمونه‌های اسپرم روز اول یا همان ۲۴ ساعت بعد از انجماد بوده‌است ($p<۰/۰۰۱$) و بر این اساس، کاهش آماری معنی‌دار، با گذر زمان، برای تمامی صفات رخ داده‌است ($p<۰/۰۰۱$).

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر مدت زمان نگه‌داری منی بر روی صفات اسپرم منجمد- یخ‌گشایی‌شده (میانگین± انحراف معیار)

زمان بررسی‌شده / صفت بررسی‌شده	۲۴ ساعت بعد از انجماد	۳۰ روز بعد از انجماد
حرکت درجا (درصد)	۶/۴۳±۰/۳۹^{b}	۱۰/۵۶±۰/۵۲^{a}
حرکت پیشرونده (درصد)	۵۵/۸۱±۱/۵۹^{a}	۴۰/۸۱±۱/۲۴^{b}
حرکت کل (درصد)	۶۲/۲۵±۱/۵۲^{a}	۵۱/۳۷±۱/۰۶^{b}
زنده‌مانی (درصد)	۷۳/۴۳±۲/۰۷^{a}	۶۱/۵۶±۱/۲۷^{b}
مالون‌دی‌آلدئید (نانومول/میلی لیتر)	۱/۱۲±۰/۰۴^{b}	۱/۴۳±۰/۰۴^{a}

a,b :حروف غیرمشابه در هر سطر نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد ($p<۰/۰۰۱$)

بحث و نتیجه‌گیری

ویژگی‌های کمی اسپرم تازه در گزارشات مختلف به این شکل عنوان شده است: حجم انزال (۱/۶-۰/۶ میلی‌لیتر)، حرکت موجی با معیار مشاهده‌ای (۴/۵-۴)، حرکت پیشرونده (۹۰-۴۵ درصد)، حرکت کل (۹۰-۷۰ درصد) و درصد اسپرم‌های زنده (۹۰-۶۰) (Moghaddam *et al*., 2012; Lupold and Fitzpatrick, 2015; Cunha *et al*., 2020; Shafaati and Moghaddam, 2021) که آنالیز داده‌های حاصله از مطالعه حاضر نیز، ویژگی‌های کمی اسپرم تازه را در دامنه مذکور نشان داد (جدول ۱).

از طرف دیگر، بررسی یافته‌های مربوط به اسپرم منجمد یخ‌گشایی شده در تحقیق حاضر نشان داد که افزودن اسانس آویشن به‌عنوان رقیق‌کننده، تاثیر به‌سزایی در میزان تحرک اسپرم (حرکت پیشرونده و کل)، درصد زنده‌مانی، صفات مربوط به نرم‌افزار CASA و مقدار مالون‌دی‌آلدئید داشته است که تاثیر مذکور، در نمونه‌های اسپرم تیمار شده با مقادیر ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر اسانس آویشن، در مورد صفات تحرک (پیشرونده و کل) و درصد زنده‌مانی بیشتر مشهود بود و تفاوت آماری معنی‌دار نسبت به نمونه‌های اسپرم تیمار شده با مقدار ۴۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر اسانس آویشن و نیز نمونه‌های اسپرم گروه شاهد داشتند ($p<۰/۰۰۱$) (جدول ۳). در مطالعه ای اعلام کردند که نمونه‌های رقیق‌شده با مقادیر ۲ و ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر اسانس آویشن، دارای تحرک کل بیشتری نسبت به سایر گروه‌ها بوده و هم‌چنین نمونهٔ تیمارشده با مقدار ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر اسانس آویشن، دارای حرکت پیشرونده و درصد زنده‌مانی بیشتری نسبت به دوزهای بالاتر بوده‌است، یافته های مذکور با گزارشات بالا هم‌خوانی (جدول ۳) دارد (Vahedi *et al*., 2018). در مطالعه‌ای دیگر اعلام کرده‌اند که افزودن آویشن به مکمل‌ها باعث افزایش درصد اسپرم‌های زنده و تحرک اسپرم شده‌است (افزودن مقدار ۱۰ درصد از آویشن موجب بهبود عملکرد صفات حرکتی و زنده مانی شده است) که این یافته با نتایج تحقیق حاضر (جدول ۳) هم‌خوانی دارد (Shanoon and Mahdi, 2012). در پژوهشی چیکهون و همکاران در سال ۲۰۱۵، بی‌حرکتی قابل توجهی در نمونه‌های تیمارشده با مقدار ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آویشن و بالاتر از آن مشاهده کرده‌اند که این یافته، با نتایج مطالعه ما مطابقت دارد،

طوری‌که در تحقیق حاضر نیز با افزایش میزان اسانس آویشن، نتیجه عکس در میزان حرکت کل و زنده‌مانی اسپرم‌ها رخ داده است. هم‌چنین ایشان اعلام کرده‌اند که میزان بالای ماده مذکور، نه تنها موجب کاهش تحرک شده، بلکه خاصیت اسپرم‌کشی نیز دارد و این در حالی است که روغن آویشن در دوزهای پایین‌تر از ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، موجب افزایش تحرک و درصد زنده‌مانی می‌شود (Chikhoune *et al.*, 2015). هم چنین در مطالعه ای گزارش داده‌اند که افزودن آویشن در رژیم غذایی موش‌های نر، حجم، تراکم و تحرک اسپرم‌ها را افزایش داده است (Ahmed *et al.*, 2015). که گزارش مذکور هم با یافته‌های تحقیق حاضر، مطابقت دارد (جدول ۳). این در حالی است که در تحقیقی گزارش شده که افزودن اسانس آویشن، اثر معنی‌داری روی اسپرم موش نداشته‌است که یافته مذکور، با نتایج تحقیق حاضر مغایرت دارد (Alasadiy, 2014). همچنین تمامی صفات سنجش شده توسط نرم‌افزار CASA در تحقیق حاضر، به جز راستی مسیر طی‌شده توسط اسپرم در مورد نمونه‌های تیمارشده با مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از اسانس آویشن، بهترین عملکرد را داشتند در حالی که برای صفت مذکور، بیشترین تفاوت آماری معنی‌دار، مربوط به نمونه‌های اسپرم تیمارشده با مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اسانس آویشن بود ($p<۰/۰۰۱$). هم‌چنین کم‌ترین تفاوت آماری معنی‌دار در مورد صفات سنجش شده توسط نرم‌افزار CASA به جز تحرک عرضی سر و راستی مسیر طی‌شده توسط اسپرم که مربوط به نمونه‌های تیمارشده با مقدار ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از اسانس آویشن بود، در مورد سایر صفات، کم‌ترین تفاوت آماری معنی‌دار مربوط به نمونه‌های اسپرم گروه شاهد بود ($p<۰/۰۰۱$) که این نتایج با گزارشات مطالعه ای تطابق دارد که اعلام کرده‌اند، صفات سرعت در مسیر میانگین، سرعت در مسیر مستقیم و سرعت در مسیر منحنی، راستی مسیر طی‌شده و خطی‌بودن حرکت اسپرم‌ها، در مورد نمونه‌های اسپرم تیمارشده با مقدار ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر از آویشن نسبت به نمونه‌های تیمارشده با مقادیر ۱۲ و ۱۶ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر و نیز نمونه‌های شاهد، اختلاف آماری معنی‌دار داشته و کم‌ترین اختلاف آماری معنی‌دار هم مربوط به نمونه‌های تیمارشده با مقدار ۱۶ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر از آویشن بوده‌است (Vahedi *et al.*, 2018).

از طرف دیگر در طی پژوهش حاضر، بهترین عملکرد برای کاهش مقدار مالون‌دی‌آلدئید، مربوط به نمونه‌های اسپرم تیمارشده با مقادیر ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر اسانس آویشن بود و کم‌ترین میزان استرس اکسیداتیو هم مربوط به این دو تیمار می‌باشد (جدول ۳)، در حالی که در در نمونه‌های اسپرم تیمارشده با مقدار ۴۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر اسانس آویشن و هم‌چنین نمونه‌های اسپرم گروه کنترل، افزایش چشمگیری در مقدار مالون‌دی‌آلدئید مشاهده‌شد (جدول ۳). نتایج یک تحقیق نشان داده که اسانس آویشن موجب کاهش قابل توجه استرس اکسیداتیو و به دنبال آن کاهش میزان مالون‌دی‌آلدئید در کبد موش‌های مبتلا به هپاتیت شده‌است (جدول ۳) که این گزارش با نتیجه پژوهش حاضر نیز مطابقت دارد (Hamzawy *et al.*, 2012). در حالی‌که در تحقیقی دیگر، گزارش شده که آویشن تاثیر چندانی در پراکسیداسیون لیپید و کاهش میزان مالون‌دی‌آلدئید نداشته است (جدول ۳) که یافته

مذکور، با نتایج تحقیق حاضر مغایرت دارد (Ahmed *et al.*, 2015). در این ارتباط اعلام شده که آویشن در دوزهای پایین، قادر به کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بافت بیضه می‌باشد و بنابراین استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد (Gedicoglu *et al.*, 2019) و به‌نظر می‌رسد که آویشن پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از ترت بوتیل هیدروپراکسید را در اسپرم مهار می‌کند. هم‌چنین آویشن یک مولکول چربی‌دوست است که قادر می‌باشد از پراکسیداسیون لیپیدی از طریق واکنش فنتون جلوگیری کند (Maia *et al.*, 2019). در مطالعه ای گزارش داده‌اند که آویشن اثرات بهبودی بر برخی پارامترهای تولیدمثلی مردان و همچنین کاهش استرس اکسیداتیو با کاهش سطح مالون‌دی‌آلدئید دارد (Salahshoor *et al.*, 2020).

در تحقیق حاضر، نتایج یخ‌گشایی نمونه‌های منی در روزهای مختلف هم نشان داد که درصد تحرک پیشرونده و کل در روز یکم نسبت به روز سی‌ام انجماد، بیشتر بود و این نتیجه در مورد درصد زنده‌مانی و میزان مالون‌دی‌آلدئید نیز صدق می‌کند (جدول ۴). در این خصوص، در تحقیقی گزارش کردند که با گذر زمان و افزایش ساعت‌های سپری شده از زمان انجماد-یخ‌گشایی، میزان تحرک و درصد زنده‌مانی تحت تاثیر قرارگرفته و کاهش پیدا می‌کنند به طوری که در زمان صفر بیشترین تحرک و زنده‌مانی نسبت به نیم ساعت بعد مشاهده شده‌است و هم‌چنین میزان کم تحرکی و درجا زدن اسپرم‌ها با افزایش زمان، افزایش پیدا می‌کند (Chikhouneh *et al.*, 2015)، که در تحقیق حاضر نیز بیشترین درصد حرکت درجا در روز ۳۰ رخ داده است، که مطابق با یافته‌های پژوهش حاضر می‌باشد (جدول ۴).

به‌طور کلی یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد که اسانس آویشن با دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بهترین عملکرد را درحفظ صفات تحرک، زنده‌مانی، کاهش سطح مالون‌دی‌آلدئید و هم‌چنین صفات سنجش‌شده توسط نرم‌افزار CASA را داشته و باعث بهبود صفات حرکتی اسپرم شده‌است.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از دانشگاه تبریز به سبب فراهم ساختن امکانات انجام این پژوهش و از زحمات و همکاری‌های آقایان مهندس حبیب چراغی و دکتر خسرو پارسائی مهر قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافع ندارند.

منابع

- Ahmed, N.A.H., Nahed, M. and El-Aal, R.A. (2015). Assessing the effect of thyme and rosmary as antiaflatoxicosis on fertility in male rats. The Journal of American Science, 11(12): 294-302.
- Alasadiy, Y.D.K. (2014). Study of the biological effect of Thymus vulgaris extracts on spermatogenesis in experimentally infected white mice Balb/c by Toxoplasma gondii. International Journal of Scientific and Engineering Research, 5(10): 547-553.
- Ariza-Nieto, C., Bandrick, M., Baidoo, S.K., Anil, L., Molitor, T.W. and Hathaway, M.R. (2011). Effect of dietary supplementation of oregano essential oils to sows on colostrum and milk composition, growth pattern and immune status of suckling pigs. Journal of Animal Science, 89(4): 1079-1089.
- Bailey, J.L., Blodeau, J.F. and Cormier, N.Y. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon mini review. Journal of Andrology, 21(1): 1-7.
- Bittencourt, R.F., Bicudo, S.D., Biscarde, E.A., Chalhoub, M., Filho, A.D.L. and Oba, E. (2014). Trehalose and Calcium chelator for ram semen cryopreservation. Archives of Verterinary Science, 19(2): 66-77.
- Chikhoune, A., Stouvenel, L., Iguer-Ouada, M., Hazzit, M., Schmitt, A., Lores, P., *et al*. (2015). In-vitro effects of Thymus munbyanus essential oil and Thymol on human sperm motility and function. Reproductive Biomedicine Online, 31(9): 411-420.
- Cunha, D., Brito, B., Evangelista, J., Junior, F., Pereira, L., Rebeiro, L., *et al*. (2020). Characterization of seminal parameters, sperm morphometry, micromorphology, and ultrastructure in gray brocket deer (Mazama gouazoubira, Fischer, 1814). Microscopy Research Technology, 84(2): 313-325.
- Daghigh kia, H., Sadeghi, F., Ebrahimi, M. and Samadian, F. (2017). Comparative effect of different concentrations of hydro-ethanolic extract of chamomile on freeze-thawn semen quality of rams. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 41(11): 13-24. [In Persian]
- Daghigh Kia, H., Farhadi, R., Ashrafi, I. and Mehdipour, M. (2016). Anti-oxidative effects of ethanol extract of Origanum vulgare on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved Holstein bull spermatozoa. Iranian Journal of Applied Animal Science, 6(4): 901-907.
- Eriksson, B.M. and Rudriguez-Martinez, H. (2000). Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in Flat Packs and Maxi-Straws. Animal Reproduction Science, 63(3-4): 205-220.
- Esterabauer, H. and Cheeseman K.H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods in Enzymology, 186(3): 407-421.
- Gedicoglu, A., Sokmen, M. and Civit, A. (2019). Evaluation of Thymus vulgaris and Thymbra spicata essential oils and plant extracts for chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties. Food Science and Nutrition, 7(5): 1704-1714.
- Hamzawy, M.A., El-Denshary, E.S.M., Hassan, N.S., Manaa, F. and Abdel Wahhab, M.A. (2012). Antioxidant and renoprotective effects of Thymus vulgaris extracts in rats during aflatoxicosis. Global Journal of Pharmacy and Pharmacology, 6(2): 106-117.
- Hazzit, M., Baaliouamer, A., Faleiro, M.L. and Miguel, M.G. (2006). Composition of the essential oils of Thymus and Origanum species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(17): 6314-6321.
- Hu, J.H., Chen, X.Y., Li, G., Li, Q.W., Yang, H., Wang, L.I., *et al*. (2006). The cryopreservation effect on frozen-thawed semen of egg yolk low density lipoproteins. 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.
- Jalili, C., Kamani, M., Roshankhah, S., Sadeghi, H. and Salahshoor, M.R. (2018). Effect of Falcaria vulgaris extracts on sperm parameters in diabetic rats. Andrologia, 50(10): 1-9.

- Lupold, S. and Fitzpatrick, J.L. (2015). Sperm number trumps sperm size in mammalian ejaculate evolution. Proceedings of the Royal Society, 282(1): 1-7.
- Maia, J.D., La Corte, R., Martinez, J., Ubbink, J. and Prata, A.S. (2019). Improved activity of Thyme essential oil (Thymus vulgaris) against Aedes aegypti larvae using a biodegradable controlled release system. Industrial Crops and Products, 136(2): 110-120.
- Malo, C., Gil, L., Cano, R., Martinez, F. and Gale, I. (2011). Antioxidant effect of rosmary (Rosmarinus officinalis) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. Theriogenology, 75(9): 1735-1741.
- Masoudi, R., Shahneh, A.Z. and Asadzadeh, N. (2019). Improvement of ram's frozen sperm quality using Glutathione antioxidant. Veterinary Research and Biological Products, 33(128): 69-75. [In Persian]
- 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.
- Nateq, S., Moghaddam, G.H., Alijani, S. and Behnam, M. (2020). The effects of different levels of Nano selenium on the quality of frozen-thawed sperm in ram. Journal of Applied Animal Reaserch, 48(1): 434-439.
- Novak, J., Bitsch, C., Langbehn, J., Pank, F., Skoula, M., Gotsiou, Y., *et al*. (2000). Ratios of cis- and trans-sabinene hydrate in Oryganum majorana L. and Origanum microphyllum (Bentham) Vogel. Biochemical Systematics and Ecology, 28(7): 697-704.
- Ozguven, M. and Tansi, S. (1998). Drug yield and essential oil of Thymus vulgaris L. as in influenced by ecological and ontogenetical variation. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 22(6): 537- 542.
- Salahshoor, M.R., Abdolmaleki, A., Faramarzi, A., Ziapour, A. and Roshankhah, S. (2020). Thymus vulgaris attenuates Myleran-induced reproductive damage by decreasing oxidative stress and Lipid peroxidation in male rats. Journal of Human Reproductive Sciences, 13(1): 38-45.
- Shanoon, A.K. and Mahdi, S.J. (2012). Effects of Thymus vulgaris and Zingiber officinale aqueous on semen parameters, testes weight and histology measurement of broiler breeder male. International Journal of Poultry Science, 11(9): 594-598.
- Shafaati, P. and Moghaddam, G.H. (2021). The effect of morphometry, viscosity and liquefaction on frozen sperm quality of Ghezel ram. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 58(15): 155-167. [In Persian]
- Shafaati, P., Moghaddam, G.H., Daghigh kia, H. and Alijani, S. (2020). Investigating the effect of diluents containing EDTA and Propylene glycol on survival of frozen semen of Ghezel ram. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 52(13): 353-369. [In Persian]
- Sharafi, M.M., Forouzanfar, S.M., Hosseini, M., Hajian, M., Ostadhosseini, S., Hosseini, L., *et al*. (2009). In vitro comparison of soybean lecithin based- extender with commercially available extender for ram semen cryopreservation. International Journal of Fertility and Sterility, 3(3): 149-152.
- Sicherle, C.C., Maia, M.S., Bicudo, S.D., Rodello, L. and Azqvedo, H.C. (2011). Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or Torolox. Small Ruminant Research, 95(2-3): 144-149.
- 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 Reproduction Science, 137(1-2): 37-44.
- Vahedi, V., Hedayat Evrigh, N., Behroozlak, M. and Dirandeh, E. (2018). Antioxidant effects of Thyme (Thymus vulgaris) extract on ram sperm quality during cryopreservation. Iranian Journal of Applied Animal Science, 8(2): 263-269.
- Wang, L.G., Liu, X.M., Kreis, W. and Budman, D.R. (1997). Down-regulation of prostate-specific antigen expression by finasteride through inhibition of complex formation between androgen

receptor and steroid receptor binding consensus in the promoter of the PSA gene in LNCaP cells. Cancer Research, 57(4): 714-719.

- 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.