"Research article" DOI: 10.30495/JVCP.2021.1923863.1302

The effect of morphometry, viscosity and liquefaction on frozen sperm quality of Ghezel ram

Shafaati Alishah, P.[1] Moghaddam, Gh.[2*]

1- MSc Student, 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.
*Corresponding author's email: ghmoghaddam@tabrizu.ac.ir
(Received: 2021/2/28 Accepted: 2021/6/27)

Abstract

The ability of sperm to move and reach the oocyte for fertilization and fertility depends on different factors such as morphometry, liquefaction and semen viscosity. The present study was performed to evaluate the effect of morphometry, viscosity and liquefaction of semen on Ghezel ram frozen sperm quality. Semen was collected once a week for 3 weeks from 5 Ghezel rams. Initial assessments included total and progressive motility, viability, abnormal sperm percentage, concentration, viscosity, morphometry, and liquefaction. Samples with a concentration of 2.5 billion sperm and a progressive motility of over 70% were used for dilution. After dilution, straws (0.25 ml) were filled and after cooling and reaching the temperature of 5$^{\circ C}$ in the refrigerator, were placed 4-5 cm above liquid nitrogen for 8-10 min and then, ultimately were immersed in liquid nitrogen. The traits of motility and sperm health were assessed on days 0, 20, 40 and 60 of cryopreservation. The results showed that motility traits and viability were significantly reduced over time of cryopreservation (p<0.05). Furthermore, the results of this study showed a negative and significant correlation between drop length and plasma membrane health (p<0.05). Also, it was shown that there was a positive and significant correlation between semen string length and total motility (p<0.01). There was a significant negative correlation between liquefaction and total motility, progressive motility, viability and acrosome integrity (p<0.01). There was a significant negative correlation between tail length and total sperm length with plasma membrane health (p<0.01). The findings of the present study indicated that the shorter the liquefaction time, sperm tail length and total length of sperm, the qualitative traits of sperm will be better preserved in the freezing process.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Cryopreservation, Liquefaction, Morphometry, Sperm, Viscosity.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2021.1923863.1302

تأثیر مورفومتری، ویسکوزیته و آبکی‌شدن منی بر کیفیت اسپرم منجمد قوچ قزل

پریسا شفاعتی‌علیشاه[۱]، غلامعلی مقدم[۲*]

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.

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

(دریافت مقاله: ۹۹/۱۲/۱۰ پذیرش نهایی: ۱٤۰۰/٤/۱٦)

چکیده

توانایی اسپرم در حرکت و رسیدن به اووسیت جهت انجام لقاح و باروری به عوامل مختلفی از جمله مورفومتری، آبکی‌شدن و ویسکوزیته منی بستگی دارد. مطالعهٔ حاضر به منظور ارزیابی تأثیر مورفومتری، ویسکوزیته و آبکی‌شدن مایع منی بر کیفیت اسپرم منجمد قوچ قزل انجام گرفت. جمع‌آوری منی یکبار در هفته به مدت ۳ هفته از ۵ رأس قوچ قزل صورت گرفت. ارزیابی‌های اولیه شامل تحرک کل و پیشرونده، درصد زنده‌مانی، درصد اسپرم‌های غیرطبیعی، غلظت، ویسکوزیته، مورفومتری و آبکی‌شدن بود. نمونه‌های با غلظت بالای ۲/۵ میلیارد اسپرم و حرکت پیشروندهٔ بالای ۷۰ درصد برای رقیق‌سازی مورد استفاده قرار گرفتند. بعد از رقیق‌سازی، نمونه‌ها در داخل پایت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری کشیده شده و در یخچال به مدت ۲-۱/۵ ساعت جهت سردسازی تا دمای ۵ درجهٔ سلسیوس قرار گرفتند. سپس به مدت ۱۰-۸ دقیقه در ۵-٤ سانتی‌متری بالای سطح نیتروژن مایع در بخار ازت قرار گرفتند و در نهایت داخل نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند. یخ‌گشایی نمونه‌ها در روزهای صفر، ۲۰، ٤۰ و ٦۰ دوره نگه‌داری، انجام شد. نتایج نشان داد که صفات مربوط به تحرک و زنده‌مانی اسپرم‌ها با گذشت زمان کاهش معنی‌داری داشتند ($p<۰/۰۵$). بین طول قطره و یکپارچگی غشای پلاسمایی منی هم رابطهٔ منفی و معنی‌دار وجود داشت ($p<۰/۰۵$). همچنین بین طول رشتهٔ منی و تحرک کل، همبستگی مثبت و معنی‌دار، ولی بین آبکی‌شدن با تحرک کل، حرکت پیشرونده، زنده‌مانی و یکپارچگی آکروزوم، همبستگی منفی و معنی‌دار مشاهده گردید ($p<۰/۰۱$). بین طول دم و طول کل اسپرم با یکپارچگی غشای پلاسمایی نیز رابطهٔ منفی و معنی‌دار مشاهده شد ($p<۰/۰۱$). یافته‌های تحقیق حاضر مشخص کرد که هرچه زمان آبکی‌شدن مایع منی، طول دم و طول کل اسپرماتوزئید کوتاه‌تر باشد، صفات کیفی آن در فرایند انجماد بهتر حفظ خواهد شد.

کلیدواژه‌ها: آبکی‌شدن، اسپرم، مورفومتری، ویسکوزیته، نگه‌داری انجمادی.

مقدمه

اهمیت فرآیند انجماد اسپرم به عنوان فرآیندی که مانع از آسیب رساندن به سلول اسپرم و همچنین کاهش تنش‌های ناشی از تغییرات سلولی می‌باشد، واضح است (Ansari *et al.*, 2011). اما انجماد موجب کاهش تحرک و زنده‌مانی اسپرم شده و باعث تغییرات در مورفولوژی اسپرم مانند تغییر در غشای پلاسمایی و تغییرات آکروزومی می‌شود (Shafaati *et al.*, 2020).

تعداد زیادی اسپرم در هر انزال در دستگاه تناسلی ماده تخلیه می‌شوند ولی خصوصیات خاصی که اسپرمی را قادر به رسیدن به اووسیت و لقاح در مقایسه با میلیون‌ها اسپرم دیگر می‌کند هنوز ناشناخته است. هر اسپرم یک مشخصه خاص بیومتریک دارد که آن را قادر می‌سازد تا در دستگاه تناسلی جنس ماده حرکت کرده و باعث باروری شود (Gadea *et al.*, 2011). ناتوانی اسپرم‌های غیرطبیعی در رسیدن به محل لقاح در گونه‌های مختلف نشان داده شده‌است (Garcia *et al.*, 2015). بررسی‌های به عمل آمده نشان می‌دهد که مورفولوژی اسپرمانوزوئیدها در نفوذ و باروری تخمک مهم بوده و ارتباطی قوی بین درصد آکروزوم‌های سالم و باروری وجود دارد (Rastegharnia and Shafipour, 2008). یک انزال از زیرمجموعه‌های مختلف اسپرم تشکیل شده که با تفاوت‌های حرکتی، وضعیت تقسیم DNA، مورفولوژی یا شکل و اندازه، حساسیت به مولکول‌های پیام‌دهنده و بسیاری از خواص دیگر مشخص می‌شوند. در این بین تحرک بسیار مهم است چرا که اووسیت با اسپرمی لقاح پیدا می‌کند که زودتر به آن می‌رسد (Hernandez *et al.*, 2015). آنچه که باعث موفقیت اسپرم در رسیدن به محل لقاح و باروری تخمک می‌شود به عوامل گوناگونی مثل جنبندگی خوب، مورفولوژی مناسب و وضعیت طبیعی DNA بستگی دارد. اندازه و شکل اسپرم‌ها در گونه‌های مختلف و حتی در یک انزال متفاوت است (Breed, 1983). به نظر می‌رسد که گونه‌هائی که رقابت بین اسپرم‌های آن‌ها در رسیدن به اووسیت زیاد است، دارای اسپرم‌های دراز هستند، زیرا از دیدگاه کاملاً بیوفیزیکی، همبستگی مثبت بین طول تاژک و سرعت شنا، اسپرم سریع‌تر را قادر می‌سازد که قبل از رسیدن سایر رقبا خودشان را به لوله‌های رحمی و اووسیت برسانند (Dresdner and Katz, 1981). طول کل اسپرم از ۲۸/۳۰ تا ۲۵۸/۳۳ میکرومتر در بیش از ۲۰۰ گونه از پستانداران گزارش شده‌است (Lupold and Fitzpatrick, 2015). البته در مورد حیوانات اهلی، تفاوت بین گونه‌ها در این مورد، کمتر می‌باشد، به‌طوری‌که در این گونه از حیوانات، طول کل اسپرم از٤٧/٢١ تا ١١٤/٧ میکرومتر ثبت شده است. اسپرم‌ها در طی انزال معمولاً اشکال مختلفی داشته و به موجب آن یک نوع سلول می‌تواند پتانسیل بالای باروری داشته باشد (Santolaria *et al.*, 2015).

ویسکوزیته، مقاومت مایع منی به سیلان آن را نشان می‌دهد. ویسکوزیتهٔ بالا ممکن است با تعیین جنبندگی اسپرم، غلظت و پوشش آنتی‌بادی اسپرم در ارتباط باشد. به طور معمول منی بعد از انزال لخته می‌بندد و سپس معمولاً بین ۱۵ الی ۲۰ دقیقه آبکی می‌شود (Vasan, 2011). به مایع منی که به صورت لخته باقی می‌ماند غیرآبکی‌شدن می‌گویند درحالی‌که چیزی که به صورت رشتهٔ ضخیم به جای قطره جاری می‌شود هایپرویسکوز نامیده می‌شود (Keel *et al.*, 1990). زمان دقیق آبکی‌شدن هیچ اهمیت تشخیصی

ندارد مگر آنکه تا بعد از ۲ ساعت هیچ تغییری رخ ندهد. ناتوانی در آبکی‌شدن معمولاً نشانهٔ ترشح ناکافی آنزیم‌های پروتئولیتیک فیبرینولیزین، فیبرینوژناز و آمینوپپتیداز از غدهٔ پروستات است (Amelar, 1962). از سوی دیگر انعقاد ممکن است انسداد مجرای انزالی یا عدم وجود مادرزادی وزیکول سمینال را نشان دهد. مهم‌تر از همه این‌که، پدیده آبکی‌شدن از ویسکوزیته باید تفریق داده‌شود، چراکه به عنوان مثال اختلال در ویسکوزیته می‌تواند نتیجهٔ عملکرد غیرطبیعی پروستات باشد (Vasan, 2011). مسیر ویسکوزیتهٔ سمینال به نظر می‌رسد با ناباروری نرها در ارتباط باشد. گزارش شده‌است که ویسکوزیتهٔ بالا (رفتار جریان مایع منی) در زوج‌های نابارور نسبت به زوج‌های بارور بیشتر دیده شده‌است (Moon and Bunge, 1968). ویسکوزیتهٔ منی می‌تواند به سادگی توسط اندازه‌گیری ویسکوالاستیسیته مشخص شود (WHO, 2010).

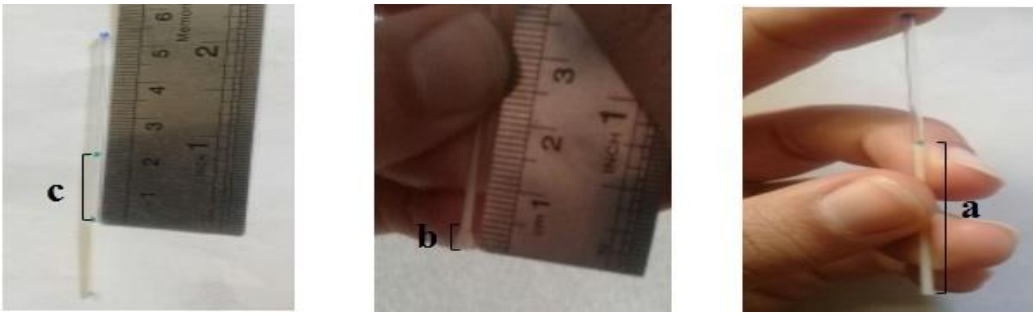
لذا هدف از انجام مطالعهٔ حاضر، بررسی مورفومتری اسپرم‌ها، ویسکوزیته و آبکی‌شدن منی قوچ و ارتباط آن‌ها با کیفیت اسپرم بوده‌است.

مواد و روش‌ها

-حیوانات مورد مطالعه: این مطالعه در ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تبریز انجام شد. اسپرم‌گیری در فصل غیرتولیدمثلی، از ۵ رأس قوچ نژاد قزل (٤-۲ ساله) با استفاده از واژن مصنوعی (شرکت IMV، فرانسه) انجام شد. قوچ‌ها تحت شرایط نور طبیعی در طول دورهٔ تحقیق نگهداری شدند و در این مدت به آب و غذا و نمک لیسیدینی دسترسی داشتند. همچنین به مدت ۲ هفته به فرآیند اسپرم‌گیری و اپراتور عادت‌دهی شدند.

-بررسی‌های انجام گرفته بر روی اسپرم‌های تازه:

-اندازه‌گیری ویسکوزیته منی: بلافاصله بعد اسپرم‌گیری، ویسکوزیته منی اندازه‌گیری شد. بدین منظور از لوله مویین (شرکت پارس پیوند، ایران) استفاده شد به طوری‌که مقداری از مایع منی به داخل لوله‌های مویین با قطر ۱/۵ میلی‌لیتر کشیده شده و اجازه داده می‌شد تا قطره خارج شود. اگر قطره مذکور یک رشته به طول بیش از ۲ سانتی‌متر ایجاد می‌کرد ویسکوزیتهٔ منی غیرطبیعی درنظر گرفته می‌شد. لازم به ذکر است هم طول خود قطره و هم رشته‌ای که در لوله مویین ایجاد کرده بود، اندازه گرفته شد.

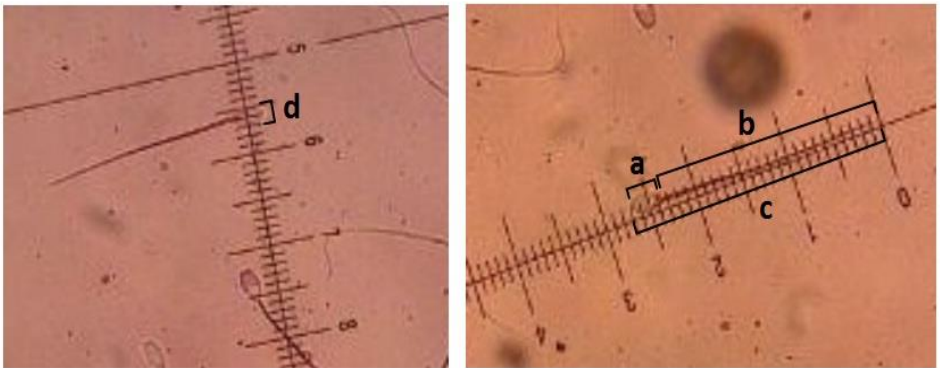


شکل ۱- نحوه اندازه‌گیری ویسکوزیتهٔ منی. a: اندازه‌گیری طول کل منی کشیده شده در لوله مویین. b: اندازه‌گیری طول قطره. c: اندازه‌گیری طول رشته

- **اندازه‌گیری زمان آبکی‌شدن منی**: بلافاصله پس از انزال، منی معمولاً به صورت توده‌ٔ منعقد نیمه‌جامد است ولی در عرض چند دقیقه در دمای اتاق، شروع به آبکی‌شدن می‌کند که در آن زمان مخلوط ناهمگنی از توده‌ها در مایع دیده می‌شود. همان‌طور که آبکی‌شدن ادامه می‌یابد، منی یکدست شده و کاملاً رقیق می‌شود و در نهایت فقط مناطق کوچکی از انعقاد باقی می‌ماند. نمونه‌ٔ کامل، معمولاً ظرف ۱۵ دقیقه در دمای اتاق آبکی می‌شود(WHO, 2010). به منظور اندازه‌گیری زمان آبکی‌شدن منی، مقداری از مایع منی در لوله‌ٔ اپندورف (Maxwell, China) یا لوله‌ٔ شیشه‌ای باریک ریخته شده و در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه‌ٔ سلسیوس قرار داه می‌شد. در نهایت با مشاهده‌ٔ اجسام ژلاتینی در لوله‌های مذکور، نمونه‌ٔ منی مورد آزمایش، آبکی‌شده‌ٔ طبیعی در نظر گرفته می‌شد. برای هر کدام از انزال‌ها، زمان‌های آبکی‌شدن منی، جداگانه بررسی و یادداشت شد.

شکل ۲- نمونه‌ای از مایع منی آبکی‌شده

-**اندازه گیری مورفومتری اسپرماتوزوئیدها**: بدین منظور از گسترش تهیه‌شده روی اسلاید رنگ‌آمیزی شده با ائوزین- نیگروزین (شرکت فلوکا، سوئیس) و عدسی میکرومتری (نیکون، ژاپن) با بزرگنمایی ×۴۰۰ استفاده شد. اندازه‌گیری از ٤ قسمت سلول اسپرم شامل طول کل اسپرم، طول سر، عرض سر و طول دم انجام می‌گردید. همچنین در هر نمونه‌ٔ رنگ‌آمیزی شده، مورفومتری تعداد ۱۰ اسپرم به طور تصادفی اندازه‌گیری می‌شد.



شکل ۳- مورفومتری اسپرماتوزوئید. a: طول سر. b: طول دم. c: طول کل اسپرماتوزوئید. d: عرض سر اسپرماتوزوئید

-**اندازه گیری غلظت اسپرم:** برای تعیین غلظت اسپرم در هر میلی‌لیتر از نمونه منی، از لام توما (Marieufeld, Germany) استفاده شد. بدین منظور، ابتدا مایع منی به نسبت ۱ به ۳۰۰ با محلول سیترات سدیم ۲/۹ درصد (مرک، آلمان) رقیق شده و سپس یک قطره فرمالین ۲ درصد(مرک، آلمان) به محلول فوق اضافه می‌شد تا اسپرم‌ها بمیرند و زیر میکروسکوپ حرکتی نداشته باشند. سپس ۱۰ میکرولیتر از نمونه برداشته شده و زیر لامل به آرامی تزریق می‌گردید (حدود ۳۰ ثانیه باید صبر کرد تا جریان حرکت اسپرم‌ها زیر لامل متوقف شود). در ادامه لام تومای حاوی لامل و نمونه مذکور، به روی صفحه مخصوص لام میکروسکوپ (Nikon, Japan) انتقال داده‌شده و با بزرگنمایی ×۴۰۰ در۵ مربع متوسط (شامل ۸۰ مربع کوچک) لام توما، اسپرم‌ها شمرده می‌شدند (WHO, 2010).

-**روش انجماد و تهیه رقیق‌کننده برای نمونه‌های منی:** پس از جمع‌آوری منی، نمونه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه فیزیولوژی دام دانشگاه تبریز منتقل شده و بعد از بررسی‌های لازم، نمونه‌های با استاندارد لازم (غلظت ۲/۵ میلیارد اسپرم و حرکت پیشرونده‌ٔ بالای ۷۰ درصد) به عنوان نمونه مناسب جهت انجماد در نظر گرفته می‌شدند. رقیق‌کننده‌ٔ مورد استفاده بر پایه‌ٔ ۲/۷۱ گرم تریس (هیدروکسی‌متیل‌آمینواتان، Merck 64271، Germany)، ۱/٤ گرم فروکتوز(Daejung Chemicals 0043, Korea)، ۱ گرم اسید سیتریک مونوهیدرات(Appli chem Gmbh 64291, Germany)، ۱۰۰ میلی‌گرم استرپتومایسین و ۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی پنی‌سیلین (Abott، امریکا) بود. در ادامه اسپرم به نسبت ۱ به ۱۰ با رقیق‌کننده مخلوط شده و سپس داخل پایت‌های ۲۵۰ میکرولیتری کشیده می‌شدند و دو طرف پایت (Paillette 0.25 ml transparente, IMV, France) به وسیله‌ٔ خمیر هماتوکریت (Lab Tron، شرکت پارس پیوند، ایران) مسدود میگردید. اسپرم‌گیری ٤۵ بار انجام شد که از این تعداد، ۳۰ نمونه قابلیت انجماد را داشتند. در هر بار هم ٤ پایت پر می‌شد. سپس پایت‌ها با دمای ۳۰ درجه‌ٔ سلسیوس به مدت ۱/۵ الی ۲ ساعت به یخچال (ارج، ایران) انتقال داده می‌شدند تا عمل سردسازی آن‌ها صورت گیرد. سپس نمونه‌های سردشده به مدت ۸ تا ۱۰ دقیقه در ٤ الی ۵ سانتی‌متری سطح نیتروژن مایع قرار می‌گرفتند و در نهایت هم در نیتروژن مایع جهت انجماد، به مدت ٦۰ روز غوطه‌ور می‌گردیدند. یخ‌گشایی نمونه‌ها در روزهای صفر، ۲۰، ٤۰ و ٦۰ در دمای ۳۸ درجه‌ٔ سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت. ارزیابی‌های پس از ذوب شامل بررسی تحرک کل، حرکت پیشرونده، درصد زنده‌مانی، درصد اسپرم‌های غیرطبیعی، یکپارچگی آکروزوم و آزمون یکپارچگی غشای پلاسمایی بودند.

-**بررسی انواع جنبه‌های تحرک اسپرم‌ها (تحرک کل و پیشرونده):** بدین منظور ابتدا هر نمونه منی یخ‌گشائی‌شده به نسبت ۱ به ۱۰۰ با سیترات سدیم ۲/۹ درصد (Merck 64271; Germany) و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس رقیق می‌شد و در ادامه برای تعیین درصد تحرک کل و پیشرونده اسپرم‌ها، یک قطره از نمونه‌ٔ یخ‌گشایی‌شده را روی لام با دمای ۳۷ درجه سلسیوس گذاشته و سپس از میکروسکوپ فازکنتراست (Nikon, Japan) با بزرگنمایی ×٤۰۰ استفاده می‌گردید (WHO, 2010).

-**درصد زنده‌مانی و درصد اسپرم‌های غیرطبیعی**: برای ارزیابی اسپرم‌های زنده و مرده و همچنین میزان اسپرم‌های غیرطبیعی از رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین استفاده شد. بدین منظور پس از رقیق‌سازی نمونهٔ یخ‌گشایی‌شده با سیترات سدیم ۲/۹ درصد به نسبت ۱ به ۱۰۰ در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس، رنگ‌آمیزی صورت گرفته و حدود ۲۰۰ اسپرم در ۵ نقطه از لام شمرده می‌شد. اسپرم‌های غیرطبیعی (بدون سر، بدون دم، دم دراز یا باریک، دم پیچ‌خورده، سر بزرگ یا کوچک و . . .) نیز در لام مذکور شمارش می‌گردید (Zanganeh *et al*., 2013).

-**درصد سلامت آکروزوم اسپرم**: برای تعیین سلامت آکروزوم اسپرم‌ها هم از نمونهٔ یخ‌گشایی‌شده رنگ‌آمیزی‌شده با ائوزین- نیگروزین و یک دستگاه میکروسکوپ نوری (نیکون، ژاپن) با بزرگنمایی ×۱۲۵۰ استفاده گردید. بدین منظور اسپرم‌های زنده به عنوان اسپرم با آکروزوم سالم در نظر گرفته شدند و از بین اسپرم‌های مرده تعداد ۲۰ اسپرم شمرده‌شده و آکروزوم‌شان بررسی و نسبت اسپرم‌های با آکروزوم سالم محاسبه می‌شد.

-**آزمایش یکپارچگی غشای پلاسمایی (hypo osmotic swelling test)**: برای تعیین سلامت عملکرد غشا اسپرم‌ها، ۱۰ میکرولیتر از اسپرم یخ‌گشایی‌شده با ۱۰۰ میکرولیتر محلول Host رقیق شده (۹ گرم فروکتوز و ٤/۹ گرم سیترات سدیم در ۱ لیتر آب استریل حل می‌شود) و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۸ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری می‌شد. سپس از نمونه‌های رقیق شده مذکور، بر روی لام گسترش تهیه کرده و با بزرگنمایی ×٤۰۰ میکروسکوپ نوری (نیکون، ژاپن) مطالعه شده و درصد اسپرم‌های سالم به دست می‌آمد. لازم به ذکر است که اسپرم‌های سالم از ناحیهٔ دم متورم می‌شوند ولی اسپرم‌های مرده متورم نشده و دم‌شان حالت مستقیم دارد (Zanganeh *et al*., 2013; Shafaati *et al*., 2020).

-**تحلیل آماری داده‌ها**: آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.2 و رویه proc corr و proc univariate صورت گرفت. مقادیر $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها

آمار توصیفی صفات کمی ارزیابی‌شده در مورد نمونه‌های منی، شامل درصد تحرک (کل و پیشرونده)، درصد زنده‌مانی، درصد اسپرم غیرطبیعی، غلظت، ویسکوزیته، مورفومتری و آبکی‌شدن در جدول ۱ ارائه شده‌است.

جدول ۱- آمار توصیفی صفات کمی نمونه‌های منی قبل از رقیق‌سازی

صفت بررسی‌شده	تعداد	میانگین	حداکثر	حداقل	انحراف معیار	ضریب تغییرات
تحرک کل (درصد)	۳۰	۸٤/۵۳	۹۲/۰۰	۷۵/۰۰	٤/۳٤	۵/۱٤
حرکت پیشرونده (درصد)	۳۰	۷۸/۱۹	۸٦/۰۰	۷۱/۱۱	٤/٤۳	۵/٦٦
زنده‌مانی (درصد)	۳۰	۸۷/۰۰	۹۳/۱۰	۷٦/۲٦	٤/٦۱	۵/۳۰
درصد اسپرم غیرطبیعی (درصد)	۳۰	۷/۷۵	۱۵/۷۹	۳/۵۰	۲/٦۵	۳٤/۲۰
غلظت ($\times 10^9$)	۳۰	٤/۵۵	٦/۲۷	۲/٦۸	۰/۹۲	۲۰/۲۸
طول قطره (سانتی‌متر)	۳۰	۰/۵۱	۰/٦	۰/٤	۰/۰٤	۷/۸۹
طول رشته (سانتی‌متر)	۳۰	۱/۸۷	۲	۱/۷۰	۰/۰۸	٤/٤۲
طول سر اسپرم (میکرومتر)	۳۰	۳/۰۵	۳/۲۵	۳	۰/۰۸	۲/٦۲
طول دم اسپرم (میکرومتر)	۳۰	۲۳/٦۷	۲٤/٤	۲۲/۹	۰/٤۳	۱/۸۲
طول کل اسپرم (میکرومتر)	۳۰	۲٦/۷۳	۲۷/٤	۲۵/۹	۰/٤٤	۱/٦۵
عرض سر اسپرم (میکرومتر)	۳۰	۱/۹۹	۲/۱۰	۱/۹۵	۰/۰۳	۱/٦۷
آبکی‌شدن (دقیقه)	۳۰	۲٤/۰۷	۳۵	۱۳	٦/۹۷	۲۸/۹۳

آمار توصیفی صفات ارزیابی‌شده در مورد نمونه‌های منی بعد از یخ‌گشایی هم که شامل پارامترهای تحرک کل، حرکت پیشرونده، زنده‌مانی، سلامت غشای پلاسمایی(Host)، اسپرم‌های غیرطبیعی و یکپارچگی آکروزوم می‌باشد، در جدول ۲ ارائه شده‌است.

جدول۲- آمار توصیفی صفات کمی نمونه‌های منی بعد از یخ‌گشایی

صفت بررسی‌شده	تعداد	میانگین	حداکثر	حداقل	انحراف معیار	ضریب تغییرات
تحرک کل (درصد)	۷۸	۵۲/۰٤	۷۵	۳۰	۹/۷٤	۱۸/۷۱
حرکت پیشرونده (درصد)	۷۹	٤۵/٤۰	٦٤/۵	۲٦/۰۰	۹/۱۹	۲۰/۲۵
زنده‌مانی (درصد)	۷۸	۵٤/٦۲	۸۰/٤۰	۳۱/۰۰	۹/۷٤	۱۷/۸۳
درصد اسپرم غیرطبیعی (درصد)	۸۰	٤۵/۱۹	٦۹/۲۵	۲٦/٦۳	۸/٤٤	۱۸/٦۹
سلامت غشای پلاسمایی (درصد)	٦۱	۱۲/۹٤	۳۰/۲۳	۳/۹٦	٦/۱۵	۵٤,٤۷
یکپارچگی آکوزوم (درصد)	٦۱	۵۷/۱۸	۷۹/٦٤	۳٤/۱۹	۹/۷۸	۱۷/۱۰

همچنین تأثیر زمان نگه‌داری منی، بر روی تحرک کل، حرکت پیشرونده، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی، یکپارچگی آکروزوم و اسپرم غیرطبیعی هم در جدول ۳ ارائه شده‌است. همان‌طور که مشاهده می‌گردد، افزایش زمان نگه‌داری به مدت ٦۰ روز، باعث کاهش معنی‌دار درصد تحرک کل، حرکت پیشرونده و زنده‌مانی اسپرم نسبت به روز صفر شده‌است ($p<۰/۰۵$). اما در مورد پارامترهای یکپارچگی غشای پلاسمایی، یکپارچگی آکروزوم و اسپرم غیرطبیعی، تفاوت آماری معنی‌داری بین روزهای نگه‌داری مشاهده نگردید ($p>۰/۰۵$).

جدول۳- تأثیر طول زمان نگه‌داری منی بر پارامترهای اسپرم پس از یخ‌گشایی

صفت بررسی‌شده	زمان‌های نگه‌داری (روز)			
	صفر	۲۰	٤۰	٦۰
تحرک کل (درصد)	۵۸/۵±۳/٤٦^{a}	۵۲/۱۰±۳/٤٦^{b}	٤۸/۰۲±۳/٤٦^{b}	٤٤/۳۰±۳/٤٦^{b}
حرکت پیشرونده (درصد)	۵۰/۸۱±۲/۸۸^{a}	٤٦/۰٦±۲/۸۸^{ab}	٤۲/۹۲±۲/۸۸^{b}	۳۷/۱۱±۲/۸۸^{b}
زنده‌مانی (درصد)	٦۳/۵۲±۲/۲۷^{a}	۵٦/۱۹±۲/۲۷^{ab}	۵۰/۲۳±۲/۲۷^{b}	٤٦/۹۵±۲/۲۷^{b}
یکپارچگی غشای پلاسمایی (درصد)	٤۹/۷۲±۳/۹۸^{a}	٤۱/۹۲±۳/۰۷^{a}	٤٤/۷۸±۲/۸۰^{a}	٤۲/۲۹ ±۲/۵۲^{a}
یکپارچگی آکروزوم (درصد)	٦۲/۱۰±٤/۸۳^{a}	۵٦/۸٤±٤/۸۳^{a}	۵٦/۲۲±٤/۸۳^{a}	۵۲/۷۷±۳/۹۹^{a}
اسپرم غیرطبیعی (درصد)	۸/۷۷±۱/٤۸^{a}	۹/۸۰±۱/۱۷^{a}	۱٤/۸۵±۰/۷^{a}	۱۱/۵۳±۱/۱٦^{a}

* حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهندهٔ وجود اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد(p<۰/۰۵).

همبستگی بین مورفومتری، ویسکوزیته و آبکی‌شدن اسپرم با پارامترهای تحرک کل، حرکت پیشرونده، زنده‌مانی، اسپرم غیرطبیعی و غلظت منی هم در جدول ٤ ارائه شده‌است. همان‌طور که ملاحظه می‌گردد، بین طول قطره، طول رشته، طول سر، طول دم، طول کل اسپرم و عرض سر با تحرک کل، حرکت پیشرونده، زنده‌مانی، اسپرم غیرطبیعی و غلظت منی همبستگی وجود ندارد ولی بین آبکی‌شدن منی و حرکت پیشرونده، همبستگی مثبت و معنی‌دار ثبت شده‌است (p<۰/۰۱).

جدول ٤- همبستگی بین مورفومتری، ویسکوزیته و آبکی‌شدن اسپرم با پارامترهای کمی منی تازه

صفت بررسی‌شده	تحرک کل	حرکت پیشرونده	زنده‌مانی	غلظت	اسپرم غیرطبیعی
طول قطره (سانتی‌متر)	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی
طول رشته (سانتی‌متر)	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی
آبکی‌شدن (دقیقه)	بی‌معنی	۰/٤۸**	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی
طول سر اسپرم (میکرومتر)	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی
طول دم اسپرم (میکرومتر)	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی
طول کل اسپرم (میکرومتر)	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی
عرض سر اسپرم (میکرومتر)	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی

** رابطهٔ بین دو متغیر در سطح ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد.

همبستگی بین مورفومتری، ویسکوزیته و آبکی‌شدن اسپرم با پارامترهای بعد از یخ‌گشایی منی که در جدول ۵ نمایش داده شده، وجود رابطهٔ منفی معنی‌دار بین پارامترهای آبکی‌شدن و تحرک کل، حرکت پیشرونده، زنده‌مانی و یکپارچگی آکروزوم را نشان می‌دهد (p<۰/۰۱). این موضوع بیان‌گر آن است که هر چه زمان آبکی‌شدن مایع منی کمتر باشد پارامترهای تحرک کل، حرکت پیشرونده، زنده‌مانی و

یکپارچگی آکروزوم بهبود می‌یابد. همچنین بین طول قطره و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم هم رابطهٔ منفی معنی‌دار مشاهده می‌شود ($p<۰/۰۱$)، یعنی هر چه طول رشتهٔ ایجاد شده بیشتر باشد، یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم کاهش می‌یابد. اما رابطهٔ بین طول رشته با تحرک کل، مثبت و معنی‌دار می‌باشد ($p<۰/۰۱$)، که نشان می‌دهد با افزایش طول رشته، تحرک کل افزایش می‌یابد. همچنین داده‌های این جدول نشان می‌دهد که بین طول دم و طول کل اسپرم با یکپارچگی غشای پلاسمایی رابطهٔ منفی معنی‌دار وجود دارد ($p<۰/۰۱$). این بدان معناست که با افزایش طول دم و طول کل اسپرم یکپارچگی غشای پلاسمایی کاهش می‌یابد. داده‌های حاصله از جدول ۵ در مورد پارامتر اسپرم غیرطبیعی، هیچ‌گونه رابطه‌ای را بین این پارامتر با پارامترهای ویسکوزیته، آبکی‌شدن و مورفومتری نشان نداد ($p>۰/۰۵$).

جدول ۵- همبستگی بین مورفومتری، ویسکوزیته و آبکی‌شدن اسپرم با پارامترهای منی منجمد یخ‌گشایی‌شده

صفت بررسی‌شده	تحرک کل	حرکت پیشرونده	زنده‌مانی	سلامت غشای پلاسمایی	یکپارچگی آکروزوم	اسپرم غیرطبیعی
طول قطره (سانتی‌متر)	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی	-۰/۲۵*	بی‌معنی	بی‌معنی
طول رشته (سانتی‌متر)	۰/۲۷**	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی
آبکی‌شدن (دقیقه)	-۰/۳۸**	-۰/۳٤**	-۰/۳۵**	بی‌معنی	-۰/۳۲**	بی‌معنی
طول سر اسپرم (میکرومتر)	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی
طول دم اسپرم (میکرومتر)	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی	-۰/۳۱**	بی‌معنی	بی‌معنی
طول کل اسپرم (میکرومتر)	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی	-۰/۲۵*	بی‌معنی	بی‌معنی
عرض سر اسپرم (میکرومتر)	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی	بی‌معنی

** رابطهٔ بین دو متغیر در سطح ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد.

* رابطهٔ بین دو متغیر در سطح ۵ درصد معنی‌دار می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

ویژگی‌های کمی و کیفی اسپرم قبلاً توسط گزارشات مختلف در مورد تحرک کل (۹۰-۷۰ درصد)، حرکت پیش‌رونده (۹۰-٤۵ درصد)، غلظت در هر میلی‌لیتر ($۱۰^{۹}\times$ ۵/۰-۱/۰۷)، درصد اسپرم زنده (۹۰-٦۰ درصد)، درصد اسپرم‌های غیرطبیعی (۱۵-۵ درصد) و طول کل اسپرم (۲۵۸/۳۳-۲۸/۳۰ میکرومتر)، آبکی‌شدن (۱۵-۲۰ دقیقه) و ویسکوزیته (کمتر از ۲ سانتی‌متر) در گونه‌های مختلف عنوان شده‌است (Karagiannidis *et al*., 2000; WHO, 2010; Vasan, 2011; Moghaddam *et al*., 2012; Lupold and Fitzpatrick, 2015; Shafaati *et al*., 2020; Cunha *et al*., 2020)، که داده‌های حاصل از مطالعه حاضر نیز ویژگی‌های کمی و کیفی اسپرم تازه را در این دامنه نشان داد (جدول ۱). همچنین نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش زمان نگه‌داری، تحرک کل، حرکت پیشرونده و زنده‌مانی اسپرم‌ها به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (جدول ۳).

با وجود پیشرفت‌های زیادی که در روش‌های نگه‌داری انجمادی اسپرم در سال‌های اخیر صورت گرفته، تحقیقات ثابت کرده است که نگه‌داری طولانی‌مدت منی در حالت منجمد، جنبندگی و زنده‌مانی اسپرم را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد

(Ozkavukcu *et al*., 2008; Silva *et al*., 2013)، که این به دلیل اختلال در ساختار غشایی، تغییرات در مورفولوژی اسپرم، افزایش سطوح کلسیم داخل‌سلولی و ظرفیت‌پذیری زودرس اسپرم و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در طول فرآیند انجماد و در نهایت مرگ سول است (Shafaati *et al*., 2020)، که این نتایج در پژوهش حاضر نیز مشاهده گردید.

همچنین در این بررسی نشان داده شد که هر چه زمان آبکی‌شدن افزایش یابد، حرکت پیش‌رونده در اسپرم تازه به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد، درحالی‌که زمان آبکی‌شدن تأثیری روی پارامترهای تحرک کل، زنده‌مانی، غلظت و اسپرم غیرطبیعی مایع منی تازه نداشت (جدول ٤). درحالی‌که نتایج حاصل از اسپرم منجمد یخ‌گشایی‌شده نشان داد که با افزایش زمان آبکی‌شدن مایع منی، تحرک کل، حرکت پیش‌رونده، زنده‌مانی و یکپارچگی آکروزوم به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (جدول ٥). در مطالعه‌ای که حسینی و همکاران در سال ۲۰۱۷ روی اسپرم انسان انجام دادند، مشاهده نمودند که با افزایش زمان آبکی‌شدن میزان تحرک اسپرم به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (Hosseini *et al*., 2017). فرآیند آبکی‌شدن برای افزایش جنبایی و انتقال اسپرم جهت باروری موفقیت‌آمیز در لوله‌های فالوپ بسیار مهم است. عدم آبکی‌شدن یکی از دلایل ناباروری در نرهاست (Anamthathmakula and Winuthayanon, 2020). گزارشات مختلف نشان می‌دهد که ناتوانی در آبکی‌شدن معمولاً نشانه ترشح ناکافی آنزیم‌های پروتئولیتیک فیبرینولیزین، فیبرینوژناز و آمینوپپتیداز از غدهٔ پروستات است (Amelar, 1962)، زیرا پروتئین‌های سمینال‌پلاسما نقش مهمی در لخته‌شدن مایع منی، جنبایی اسپرم، ظرفیت‌پذیری و واکنش آکروزومی در دستگاه تولیدمثلی حیوان ماده بازی می‌کنند (Anamthathmakula and Winuthayanon, 2020).

در مطالعهٔ حاضر نشان داده شد که ویسکوزیته و مورفومتری اسپرم تأثیری روی میزان تحرک کل، حرکت پیش‌رونده، زنده‌مانی، غلظت و اسپرم غیرطبیعی در اسپرم تازه نداشتند (جدول ٤). ولی بررسی‌ها روی اسپرم منجمد یخ‌گشایی‌شده نشان داد که با افزایش طول قطره منی، یکپارچگی غشای پلاسمایی به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (جدول ٥). همچنین نشان داده شد که با افزایش طول رشته تحرک کل اسپرم منجمد یخ‌گشایی‌شده به طور معنی‌داری افزایش پیدا می‌کند (جدول ٥). فاکتورهایی همچون pH، پاسخ آنتی‌بادی، ساختار کلی و ظرفیت عملکردی اسپرم بر جنبایی آن مؤثر است. نشان داده شده است که با افزایش ویسکوزیته، جنبایی اسپرم افزایش داشته است و در نتیجه قدرت شنای اسپرم بهبود یافته است (Berns *et al*., 2012). پس محیط ویسکوز اسپرم می‌تواند نقش مهمی بر جنبایی آن و توانایی اسپرم برای رسیدن و باروری تخمک را داشته باشد (Moon and Bunge, 1968). این افزایش جنبایی به این دلیل بوده است که انرژی اسپرم (تولید ATP) در پاسخ به محیط با ویسکوزیتهٔ بالا و چسبناک افزایش می‌یابد و تولید ATP در میتوکندری قطعهٔ میانی اسپرم زیادتر می‌شود (Berns *et al*., 2012). ولی محققان در مطالعات دیگر بیان کرده‌اند که ویسکوزیته منی با ناباروری نرها در ارتباط است. گزارش شده‌است که ویسکوزیتهٔ بالا در

زوج‌های نابارور نسبت به زوج‌های بارور بیشتر دیده شده‌است (Moon and Bunge, 1968). الزاناتی و همکاران در سال ۲۰۰٤ نشان دادند که ویسکوالاستیسیتهٔ بیش از حد مایع منی با کاهش درصد اسپرم جنبا و تغییر در ویژگی‌های حرکتی اسپرم همراه است (Elzanaty *et al*., 2004). همچنین چادهوری و همکاران در سال ۱۹۷۹ مشاهده کردند که بین ویسکوزیته و جنبایی سلول‌های اسپرم انسان رابطهٔ منفی و معنی‌دار وجود دارد (Chaudhuri *et al*., 1979). در رابطه با پارامتر مورفومتری، طول سر اسپرم هیچ‌گونه تأثیری بر تحرک کل، حرکت پیشرونده، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی، یکپارچگی آکروزوم و اسپرم غیرطبیعی نداشت، در حالی‌که با افزایش طول دم و طول کل اسپرم، یکپارچگی غشای پلاسمایی به میزان قابل توجهی کاهش یافت (جدول ۵). همچنین در تحقیق حاضر نشان داده شد که عرض سر اسپرم هیچ‌گونه تأثیری بر تحرک کل، حرکت پیشرونده، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی، یکپارچگی آکروزوم و اسپرم غیرطبیعی نداشت (جدول ۵). اندازه و شکل اسپرم‌ها در گونه‌های مختلف متفاوت است، به طوری که نشان داده شده هر چه طول دم و تاژک اسپرم بلندتر باشد، اسپرم را قادر می‌سازد تا سریع‌تر شنا کرده و به اووسیت برسد. به هر حال شواهد کمی برای ارتباط مثبت بین طول اسپرم و سرعت آن وجود دارد. پژوهشگران مشاهده نمودند که اسپرم‌های با سر کوچک و دم بزرگ سرعت شنای بالاتری دارند (Evans *et al*., 2012). مورفولوژی سر اسپرم بر روی رقابت اسپرم تأثیر می‌گذارد زیرا رانش تولیدشده توسط تاژک اسپرم با کشش تولیدشده توسط سر اسپرم رقابت می‌کند. علاوه بر آن، انتظار می‌رود که رقابت اسپرم در اندازهٔ قطعهٔ میانی اسپرم که حاوی میتوکندری است و محل اولیهٔ تولید انرژی است، تأثیر بگذارد (Evans *et al*., 2012). همچنین پژوهشگران مشاهده کردند که سر اسپرم‌های با آکروزوم آسیب‌دیده به طور معنی‌داری کوچکتر از اسپرم‌های با آکروزوم سالم بود و اسپرم‌هایی که غشای پلاسمایی آسیب دیده داشتند، سر و آکروزوم بزرگتری نسبت به اسپرم‌های دارای غشای پلاسمایی سالم داشتند. بین تحرک اسپرم و پارامترهای مورفومتریک در اسپرم های سالم رابطهٔ مثبت وجود دارد (Palacin *et al*., 2020). یافته‌های تحقیق حاضر مشخص کرد که هرچه زمان آبکی‌شدن مایع منی، طول دم و طول کل اسپرماتوزئید کوتاه‌تر باشد، صفات کیفی آن در فرایند انجماد بهتر حفظ شده، و طول مدت ماندگاری منی بیشتر خواهد شد.

سپاسگزاری

نویسندگان بدین وسیله از زحمات مسئولین ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان و تحصیلات تکمیلی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

- Amelar, R.D. (1962). Coagulation, liquefaction and viscosity of human semen. Journal of Urology, 87(2): 187-190.
- Anamthathmakula, P. and Winuthayanon, W. (2020). Mechanism of semen liquefaction and itspotential for a novel non-hormonalcontraception. Biology of Reproduction, 103(2): 411-426.
- Ansari, M., Tohidi, A. and Mohammad Moradishahr, B. (2011). Evaluation the effect of adding different levels of n-3 fatty acids to bioxel diluent on the freezing capacity of goat sperm. The Journal of Veterinary Clinical Pathology, 4(4): 1013-1017. [In Persian]
- Berns, M.W., Chandsawangbhuwana, C., Hyun, N., Shi, L.Z., Yang-Wong, C. and Zhu, O. (2012). Effects of viscosity on sperm motility studied with optical tweezers. Journal of Biomedical Optics, 17(2): 1-6.
- Breed, W.G. (1983). Variation in sperm morphology in the Australian rodent genus, Pseudomys (Muridae). Cell and Tissue Research, 229(3): 611-625.
- Chaudhuri, N., Nag, A. and Nag, P.K. (1979). Relative Viscosity of Human Seminal Fluid: Influence of Sperm Concentration, Motility and Biochemical Ingredients. Andrologia, 11(6): 478-482.
- Cunha, D., Brito, B., Evangelista, J., Júnior, F., Pereira, L. Ribeiro, 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.
- Dresdner, R.D. and Katz, D.F. (1981). Relationships of mammalian sperm motility and morphology to hydrodynamic aspects of cell function. Biology of Reproduction, 25(5): 920-930.
- Elzanaty, S., Malm, J. and Giwercman, A. (2004). Visco-elasticity of seminal fluid in relation to the epididymal and accessory sex gland function and its impact on sperm motility. International Journal of Andrology, 27(2): 94-100.
- Evans, J.P., Fitzpatrick, J.L., Humphries, S., Simmons L.W. and Simpson, J.L. (2012). Relationship between sperm length and sperm differ among three internally and externally fertilizing species. Journal Storage, 68(1): 92-104.
- Gadea, J., Molla, M., Selles, E., Marco, M.A., Garcia-Vazquez, F.A. and Gardon, J.C. (2011). Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. Cryobiology, 62(1): 40-46.
- Garcia-Vazquez, F.A., Hernandez-Caravaca, I., Matas, C., Soriano-Ubeda, C. and Abril-Sanchez, S. (2015). Morphological study of boar sperm during their passage through the female genital tract. Journal of Reproduction and Development, 61(5): 407-413.
- Hernandez-Caravaca, I., Soriano-Ubeda, C., Matas, C., Izquierdo-Rico, M.J. and Garcia-Vazquez, .F.A. (2015). Boar sperm with defective motility are discriminated in the backflow moments after insemination. Theriogenology, 83(4): 655-661.
- Hosseini, S., Mohammad khani, A.G., Moghbelinejad, S. and Shabani, Kh. (2017). The effects of Semen Parameters and age on Sperm Motility of Iranian men. Global Journal of Fertility and Research, 2(1): 024-029.
- 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.
- Keel, B.A. (1990). The semen analysis. In: Keel, B., Webster, B., editors. CRC Handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility. Boca Raton: CRC Press, pp: 27-69.
- Lupold, S. and Fitzpatrick, J.L. (2015). Sperm number trumps sperm size in mammalian ejaculate evolution. Proceedings of the Royal Society, 282(1819): 1-7.
- 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.

- Moon, K.H. and Bunge, R.G. (1968). Observations on the biochemistry of human semen. III. Amylase. Fertility and Sterility, 19(6): 977-981.
- 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.
- Palacin, I., Alquezar-Baeta, C., Santolaria, P., Silvestre, M.A., Soler, C. and Yaniz, J. (2020). Relationship of sperm plasma membrane and acrosomal integrities with sperm morphometry in Bos-taurus. Asian Journal of Andrology, 22(6): 578-582.
- Rastegharnia, A. and Shafipour, V. (2008). The effect of lactose, milkweed and tris diluents on buffalo frozen sperm. The Journal of Veterinary Clinical Pathology, 1(2): 79-88. [In Persian]
- Santolaria, P., Vicente-Fiel, S., Palacin, I., Fantova, E. and Blasco, M.E. (2015). Predictive capacity of sperm quality parameters and sperm subpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep. Animal Reproduction Science, 163(2015): 82-88.
- Shafaati Alishah, P., Moghaddam, G.h., Daghighkia, H. and Alijani, S. (2020). Investigating the effect of diluents containing EDTA and Propylene glycol on survival of frozen semen of Ghezel ram. The Journal of Veterinary Clinical Pathology, 52(13): 353-369. [In Persian]
- Silva, S., Soares, A., Batista, A., Almeida, F., Nunes, J., Peixoto, C. and Guerra, M. (2013). Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoa structure and kinematics after cryopreservation. Animal Reproduction Science, 137(1-2): 37-44.
- Vasan, S.S. (2011). Semen Analysis and sperm function tests: How much to test. Indian Journal of Urology, 27(1): 41-48.
- World Health Organization. (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed., World Health Organization, pp: 140-143.
- 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.