

"مقاله پژوهشی"

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

پریسا شفاعتی‌علیشاه<sup>۱</sup>، غلامعلی مقدم<sup>۲\*</sup>، حسین دقیق‌کیا<sup>۲</sup>، صادق علیجانی<sup>۳</sup>

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: ۹۸/۴/۵)

### چکیده

ادیتات سدیم با کلات کردن کلسیم و ممانعت از ورود کلسیم خارج سلولی به داخل سلول و پروپیلن گلیکول با ممانعت از تشکیل بلورهای یخ داخل سلولی، از اسپرم در برابر فرآیند انجماد محافظت می‌کنند. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثر افزودن سطوح مختلف ادیتات و پروپیلن گلیکول 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 پروپیلن گلیکول 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 ۵-۴ سانتی‌متری بالای سطح نیتروژن مایع قرار گرفته و در نهایت در داخل آن غوطه‌ور شدند. خصوصیات کمی 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، ۴۰ و ۶۰ فرآیند انجماد بررسی شدند. تیمار ۱ درصد پروپیلن گلیکول با سایر گروه‌های تیمار پروپیلن گلیکول و گروه شاهد در میزان تحرک کل، درصد زنده‌مانی، آکروزوم سالم، تست یکپارچگی غشای پلاسمایی و حرکت پیشرونده تفاوت معنی‌دار داشت ( $p < 0/05$ ). 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 پروپیلن گلیکول و EDTA می‌توانند پارامترهای کیفی اسپرم قوچ را بهبود بخشند.

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

## مقدمه

می‌سازد (Ieropoli *et al.*, 2004) و مشکل حمل و نقل حیوانات یا منی تازه از فواصل دور یا در دوره‌های زمانی طولانی مدت 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.*, 2012; Silva *et al.*, 2008) و همچنین تغییرات 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 داخل سلولی 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 دیپلمیریزاسیون و ادغام غشاء می‌شود که نتیجه نهایی واکنش آکروزومی است (Keshtgar *et al.*, 2016).

EDTA (ethylenediaminetetraacetate) کلاتور یون‌های دو ظرفیتی مهمی مثل  $\text{Ca}^{2+}$ ،  $\text{Mg}^{2+}$ ،  $\text{Zn}^{2+}$  و  $\text{Cu}^{2+}$  می‌باشد که اثر سمی مستقیمی روی اسپرم ندارد (Bourinbaïar and Lee, 1996). عملکرد اصلی EDTA کلات کردن کلسیم خارج سلولی است که ورود آن را به محیط داخل سلولی 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 (Bourinbaïar and Lee, 1996). محافظت‌کننده‌های سرمایی فاکتورهای

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 منجمد شده 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 گونه‌های 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

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)، ۱/۴ گرم فروکتوز (Daejung Chemicals 0043، کره)، ۱ گرم اسید سیتریک مونوهیدرات (Appli chem GmbH 64291، آلمان)، ۱۰۰ میلی‌گرم استریتومایسین 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 برداشته شد 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: تیمار شده با رقیق‌کننده پایه (فاقد EDTA و پروپیلن گلیکول).

گروه ۱ میلی‌مولار EDTA: تیمار شده با رقیق‌کننده پایه + ۱ میلی‌مولار EDTA.

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

گروه ۲ میلی‌مولار EDTA: تیمار شده با رقیق‌کننده پایه + ۲ میلی‌مولار EDTA.

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

گروه پروپیلن گلیکول ۱ درصد: تیمار شده با رقیق‌کننده پایه + ۱ درصد پروپیلن گلیکول.

گروه پروپیلن گلیکول ۲ درصد: تیمار شده با رقیق‌کننده پایه + ۲ درصد پروپیلن گلیکول.

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 مولکولی 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 ۴ 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

گروه پروپیلن گلیکول ۳ درصد: تیمار شده با رقیق‌کننده پایه + ۳ درصد پروپیلن گلیکول.

گروه پروپیلن گلیکول ۷ درصد: تیمار شده با رقیق‌کننده پایه + ۷ درصد پروپیلن گلیکول.

بعد از آماده‌سازی، محلول منی رقیق‌شده در داخل پایت‌های ۰/۲۵ میلی لیتر کشیده شد. سپس، پایت‌ها در داخل لوله‌های درپچ‌دار گذاشته شدند. در ادامه قسمت بالایی لوله‌ها با پارافیلیم 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 به تدریج به ۵ درجه سلسیوس برسد. بعد از اتمام مرحله سردسازی، لوله‌ها به مدت ۸ تا ۱۰ دقیقه در فاصله ۴ 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 به مدت ۲ ماه طول کشید و یخ‌گشایی‌ها در روزهای صفر، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ 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 یخ‌گشائی شده 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 از آن را روی لام با دمای ۳۷ درجه سلسیوس گذاشته و سپس از میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگنمایی  $400\times$  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  $1250\times$  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

نرم‌افزار SAS9.2 و رویه GLM آنالیز شدند. برای مقایسه میانگین حداقل مربعات (Least Square mean) از آزمون دانکن (Duncan) استفاده شد. اختلافات آماری مشاهده شده با مقادیر کمتر از ۵ درصد معنی‌دار در نظر گرفته شدند ( $p < 0.05$ ).

### 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.

از اسپرم یخ‌گشایی شده با ۱۰۰ میکرولیتر محلول HOST (۹ گرم فروکتوز، ۴/۹ گرم سترات 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  $400\times$  بررسی شده و درصد اسپرم‌های سالم به دست آمد. اسپرم‌های سالم از ناحیه دم متورم بوده ولی دم اسپرم‌های مرده حالت مستقیم داشت (Zanganeh et al., 2013).  
تحلیل آماری داده‌ها: داده‌های به دست آمده به صورت  $\text{Least Square} \pm \text{SEM}$  (standard error of the mean) LSmean (mean) گزارش گردیدند. نتایج با استفاده از

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

متغیر بررسی شده	تعداد نمونه	میانگین	بیشترین	کمترین	انحراف معیار	ضریب تغییرات
حجم (میلی لیتر)	۱۵	۱/۷۰	۳/۵	۰/۹	۰/۷۵	۴۳/۹۲
غلظت ( $\times 10^9$ )	۱۵	۴/۴۶	۶/۲۷	۲/۶۸	۰/۹۲	۲۰/۲۸
رنگ نمونه (۱-۵)	۱۵	۴/۳۸	۵	۳	۰/۷۱	۱۶/۲۳
حرکت موجی (۱-۵)	۱۵	۴/۳۰	۵	۴	۰/۴۶	۱۰/۷۲
تحرک کل (درصد)	۱۵	۸۵	۹۲	۷۵	۴/۹۷	۵/۸۴
حرکت پیشرونده (درصد)	۱۵	۷۸/۳۶	۸۶	۷۱/۱۱	۴/۷۴	۶/۰۵
زنده‌مانی (درصد)	۱۵	۸۶/۷۰	۹۳/۱	۷۶/۲۶	۴/۹۲	۵/۶۸
اسپرم‌های غیرطبیعی (درصد)	۱۵	۷/۹۸	۱۱/۱۱	۳/۵	۲/۰۸	۲۶/۰۷
سلامت آکروزم در کل سلول‌ها (درصد)	۱۵	۸۹/۸۶	۹۴/۹۴	۷۸/۴۳	۴/۶۰	۵/۱۲
سلامت آکروزوم در سلول‌های مرده (درصد)	۱۵	۲۹/۴۲	۶۵	۹/۱۳	۱۴/۹۵	۵۰/۸۲

رنگ نمونه (کرم غلیظ ۵، کرم ۴، 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 ۴)، حرکت موجی نسبتاً آرام، می‌توان تک‌تک اسپرماتوزواها را دید، ۴۵ تا ۶۵٪ سلول‌های اسپرم فعال هستند (امتیاز ۳)، حرکت موجی شکل نگرفته است اما تحرک برخی اسپرماتوزواها پیدا است، ۲۰ تا ۴۰٪ سلول‌ها فعال هستند (امتیاز ۲)، فقط حدود ۱۰٪ اسپرماتوزواها علایم حیات را نشان می‌دهند (امتیاز ۱)، همه اسپرماتوزواها بی‌حرکت هستند (امتیاز صفر).

اسپرم‌های غیرطبیعی، سلامت آکروزوم در کل سلول‌های اسپرم و سلامت آکروزوم در سلول‌های مرده در جدول ۲ نشان داده شده است.

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

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

متغیر بررسی شده	تعداد نمونه	میانگین	بیشترین	کمترین	انحراف معیار	ضریب تغییرات
تحرك كل (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 ارزیابی شده بعد از یخ‌گشایی نشان می‌دهد. بر اساس نتایج ثبت‌شده در جدول ۳، مشخص گردید که میزان تحرک کل اسپرم‌ها در تمامی گروه‌های حاوی پروپیلن گلیکول با گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌داری دارد ( $p < 0/05$ )، به‌طوری‌که تیمار پروپیلن گلیکول 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 ( $p < 0/05$ ) ولی در مقایسه با تیمارهای پروپیلن گلیکول ۲ درصد و پروپیلن گلیکول 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 و گروه شاهد اختلاف آماری معنی‌داری داشت ( $p < 0/05$ ) ولی این اختلاف با گروه‌های تیمار ۲/۵ میلی‌مولار EDTA و پروپیلن گلیکول ۳ درصد معنی‌داری نبود. در گروه پروپیلن گلیکول ۳ درصد نیز در مقایسه

گلیکول ۷ درصد تفاوت آماری معنی‌دار مشاهده شد ( $p < 0/05$ )، 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 ( $p < 0/05$ ) 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 ( $p < 0/05$ ). 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 معنی‌داری داشت ( $p < 0/05$ ) ولی این اختلاف با گروه‌های تیمار ۲/۵ میلی‌مولار EDTA و پروپیلن گلیکول ۳ درصد معنی‌داری نبود. در گروه پروپیلن گلیکول ۳ درصد نیز در مقایسه

جدول ۳ مقایسه تأثیر افزودن سطوح مختلف EDTA و پروپیلن گلیکول را بر پارامترهای ارزیابی شده بعد از یخ‌گشایی نشان می‌دهد. بر اساس نتایج ثبت‌شده در جدول ۳، مشخص گردید که میزان تحرک کل اسپرم‌ها در تمامی گروه‌های حاوی پروپیلن گلیکول با گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌داری دارد ( $p < 0/05$ )، به‌طوری‌که تیمار پروپیلن گلیکول 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 ( $p < 0/05$ ) ولی در مقایسه با تیمارهای پروپیلن گلیکول ۲ درصد و پروپیلن گلیکول 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 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 ( $p < 0/05$ )، 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 ( $p < 0/05$ ).

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 ( $p < 0/05$ ) ولی در این مورد اختلاف آماری معنی‌داری با گروه شاهد نداشتند.

با گروه‌های تیمار ۱ میلی‌مولار EDTA، پروپیلن گلیکول ۷ درصد و گروه شاهد تفاوت مذکور، از نظر آماری معنی‌دار بود ( $p < 0/05$ ) 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 ( $p < 0/05$ )، ولی هیچ‌کدام از تیمارهای حاوی EDTA در این خصوص با گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌دار نداشتند.

یکپارچگی آکروزوم نیز در گروه‌های تیمار شده با پروپیلن گلیکول بالاترین میزان را در بین تیمارها نشان داد. البته تیمارهای پروپیلن گلیکول ۱ درصد و پروپیلن

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

تیمار	پارامتر	تحرك كل (درصد)	حرکت پیشرونده (درصد)	زنده‌مانی (درصد)	سلامت آکروزوم (درصد)	یکپارچگی غشای پلاسمایی (درصد)
۱ میلی‌مولار EDTA	۵۱/۷۸±۱/۵۶ <sup>cde</sup>	۴۶/۹۱±۱/۷۷ <sup>def</sup>	۵۴/۵۴±۱/۶۲ <sup>cde</sup>	۵۷/۴۷±۱/۸۵ <sup>bc</sup>	۴۶/۷۹±۱/۵۱ <sup>ab</sup>	
۱/۵ میلی‌مولار EDTA	۵۲/۲۶±۱/۵۶ <sup>cde</sup>	۴۷/۶۲±۱/۷۷ <sup>cdef</sup>	۵۵/۶۷±۱/۶۲ <sup>cde</sup>	۵۶/۱۹±۱/۸۵ <sup>cd</sup>	۴۷/۲۲±۱/۵۵ <sup>ab</sup>	
۲ میلی‌مولار EDTA	۵۵/۴۳±۱/۵۶ <sup>bcd</sup>	۵۰/۵۳±۱/۷۷ <sup>cde</sup>	۵۸/۵۱±۱/۶۲ <sup>bcd</sup>	۶۱/۵۶±۱/۸۵ <sup>abc</sup>	۴۸/۶۶±۱/۵۳ <sup>ab</sup>	
۲/۵ میلی‌مولار EDTA	۵۶/۶۱±۱/۵۶ <sup>bcd</sup>	۵۱/۴۲±۱/۷۷ <sup>bcd</sup>	۵۹/۸۸±۱/۶۲ <sup>bcd</sup>	۶۲/۱۳±۱/۸۵ <sup>abc</sup>	۴۶/۱۶±۱/۵۳ <sup>ab</sup>	
پروپیلن گلیکول ۱ درصد	۶۴/۷۱±۱/۵۶ <sup>a</sup>	۵۹/۶۹±۱/۷۷ <sup>a</sup>	۶۷/۴۷±۱/۶۲ <sup>a</sup>	۶۹/۱۷±۱/۸۵ <sup>a</sup>	۵۰/۳۸±۱/۵۳ <sup>a</sup>	
پروپیلن گلیکول ۲ درصد	۶۱/۶۸±۱/۵۶ <sup>ab</sup>	۵۷/۲۹±۱/۷۹ <sup>ab</sup>	۶۴/۲۹±۱/۶۴ <sup>ab</sup>	۶۶/۴۷±۱/۸۵ <sup>a</sup>	۵۰/۰۴±۱/۵۳ <sup>a</sup>	
پروپیلن گلیکول ۳ درصد	۵۸/۳۳±۱/۵۶ <sup>abc</sup>	۵۳/۷۶±۱/۷۷ <sup>abc</sup>	۶۱/۰۱±۱/۶۲ <sup>abc</sup>	۶۵/۰۴±۱/۸۵ <sup>ab</sup>	۵۰/۳۴±۱/۵۳ <sup>a</sup>	
پروپیلن گلیکول ۷ درصد	۴۶/۴۷±۱/۵۶ <sup>e</sup>	۴۰/۹۶±۱/۷۹ <sup>f</sup>	۴۹/۱۱±۱/۶۴ <sup>e</sup>	۵۱/۳۱±۱/۸۵ <sup>d</sup>	۴۰/۷۷±۱/۵۶ <sup>b</sup>	
شاهد	۴۹/۹۷±۱/۵۶ <sup>de</sup>	۴۴/۱۰±۱/۷۷ <sup>ef</sup>	۵۳/۵۴±۱/۶۲ <sup>de</sup>	۵۵/۵۴±۱/۸۵ <sup>cd</sup>	۴۴/۶۰±۱/۵۱ <sup>ab</sup>	

abcd: حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد ( $p < 0/05$ ).

تأثیر زمان نگه‌داری بر پارامترهای بعد از یخ‌گشایی در جدول ۴ 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 ( $p < 0/05$ ). همچنین با افزایش مدت زمان نگه‌داری انجمادی درصد حرکت درجا و درصد اسپرم‌های غیرطبیعی افزایش معنی‌داری داشتند ( $p < 0/05$ )، ولی درصد سلامت آکروزوم در سلول‌های مرده با افزایش زمان نگه‌داری تغییر معنی‌داری نکرد.

جدول ۴- تأثیر زمان نگه‌داری بر پارامترهای بعد از یخ‌گشایی

مدت زمان نگه‌داری منی در انجماد تا مرحله یخ‌گشایی (روز)				
تیمار	صفر	۲۰	۴۰	۶۰
تحرک کل	۶۱/۵۳±۱/۱۱ <sup>a</sup>	۵۶/۷۷±۱/۱۰ <sup>b</sup>	۵۲/۷۵±۱/۱۰ <sup>c</sup>	۴۹/۹۷±۱/۱۱ <sup>c</sup>
حرکت پیشرونده	۵۵/۰۹±۱/۱۱ <sup>a</sup>	۵۱/۹۹±۱/۱۰ <sup>a</sup>	۴۷/۹۹±۱/۱۰ <sup>b</sup>	۵۶/۴۴±۱/۱۱ <sup>b</sup>
حرکت درجا	۶/۴۳±۰/۳۰ <sup>a</sup>	۴/۷۸±۰/۳۰ <sup>b</sup>	۴/۸۲±۰/۳۰ <sup>b</sup>	۵/۴۸±۰/۳۰ <sup>b</sup>
زنده‌مانی	۶۵/۰۷±۱/۱۳ <sup>a</sup>	۵۹/۷۳±۱/۱۲ <sup>b</sup>	۵۵/۵۹±۱/۱۲ <sup>c</sup>	۵۲/۶۷±۱/۱۲ <sup>c</sup>
اسپرم غیرطبیعی	۸/۷۵±۱/۳۴ <sup>a</sup>	۱۴/۰۲±۰/۸۱ <sup>b</sup>	۱۳/۶۷±۰/۷۲ <sup>b</sup>	۱۲/۳۱±۰/۷۵ <sup>b</sup>
سلامت آکروزوم	۶۳/۷۱±۲/۲۱ <sup>a</sup>	۶۳/۲۰±۱/۳۵ <sup>a</sup>	۶۰/۵۷±۱/۲۲ <sup>ab</sup>	۵۷/۱۲±۱/۲۵ <sup>b</sup>
سلامت آکروزوم در سلول‌های مرده	۷/۸۲±۱/۷۲ <sup>a</sup>	۱۰/۰۲±۱/۰۵ <sup>a</sup>	۱۱/۰۸±۰/۹۵ <sup>a</sup>	۱۰/۰۱±۰/۹۷ <sup>a</sup>
یکپارچگی غشای پلاسمایی	۵۱/۲۲±۱/۰۴ <sup>a</sup>	۴۵/۹۸±۱/۰۳ <sup>b</sup>	۴۶/۳۷±۱/۰۴ <sup>b</sup>	۴۵/۳۱±۱/۰۷ <sup>b</sup>

abcd: حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد ( $p < 0/05$ ).

میلی مولار EDTA، ۱/۵ میلی مولار EDTA، ۲ میلی مولار EDTA، پروپیلن گلیکول ۷ درصد و گروه شاهد در این خصوص اختلاف آماری معنی‌داری داشت ( $p < 0/05$ ). تیمار پروپیلن گلیکول ۲ درصد نیز در این مورد با تیمارهای ۱ میلی مولار EDTA، ۱/۵ میلی مولار EDTA، پروپیلن گلیکول ۷ درصد و گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌دار داشت ( $p < 0/05$ ). همچنین تیمارهای ۲/۵ میلی مولار EDTA و پروپیلن گلیکول ۳ درصد در این خصوص با تیمار پروپیلن گلیکول ۷ درصد تفاوت آماری معنی‌داری داشتند ( $p < 0/05$ ). در روز ۶۰ یخ‌گشایی هم، تیمار پروپیلن گلیکول ۱ درصد با تیمارهای ۱ میلی مولار EDTA، ۱/۵ میلی مولار EDTA، پروپیلن گلیکول ۷ درصد و گروه شاهد تفاوت آماری

نتایج مربوط به مقایسه درصد تحرک کل اسپرم در روزهای مختلف بعد از یخ‌گشایی هم در جدول ۵ ارائه شده است. همان‌طور که جدول ۵ 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 ۲۰ یخ‌گشایی در این خصوص نشان داد که بین تیمارهای پروپیلن گلیکول ۱ درصد و پروپیلن گلیکول ۲ درصد با گروه شاهد و تیمار پروپیلن گلیکول ۷ درصد اختلاف آماری معنی‌دار وجود داشت ( $p < 0/05$ )، ولی تفاوت آماری مشاهده‌شده در این مورد، بین بقیه تیمارها با گروه شاهد معنی‌دار نبود. همچنین در روز ۴۰ یخ‌گشایی، تیمار پروپیلن گلیکول ۱ درصد با تیمارهای ۱



معنی‌دار داشت ( $p < 0/05$ ). در این مورد، تیمار پروپیلن گلیکول ۲ درصد و گروه شاهد، اختلاف آماری معنی‌دار نشان داد. 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	صفر	۲۰	۴۰	۶۰
۱ میلی مولار EDTA	۵۸/۸۶±۲/۷۷	۵۳/۹۲±۳/۰۵ <sup>bcd</sup>	۵۰/۳۴±۳/۴۶ <sup>cd</sup>	۴۵/۱۳±۲/۸۰ <sup>bc</sup>
۱/۵ میلی مولار EDTA	۶۱/۸۶±۲/۷۷	۵۵/۰۲±۳/۰۵ <sup>bcd</sup>	۴۷/۷۵±۳/۴۶ <sup>cd</sup>	۴۵/۵۳±۲/۸۰ <sup>bc</sup>
۲ میلی مولار EDTA	۶۱/۶۶±۲/۷۷	۵۸/۰۲±۳/۰۵ <sup>abc</sup>	۵۳/۹۶±۳/۴۶ <sup>bcd</sup>	۴۹/۳۳±۲/۸۰ <sup>abc</sup>
۲/۵ میلی مولار EDTA	۶۲/۸۶±۲/۷۷	۵۸/۵۲±۳/۰۵ <sup>abc</sup>	۵۵/۷۵±۳/۴۶ <sup>abc</sup>	۵۰/۵۳±۲/۸۰ <sup>abc</sup>
پروپیلن گلیکول ۱ درصد	۶۹/۶۶±۲/۷۷	۶۵/۹۲±۳/۰۵ <sup>a</sup>	۶۳/۸۶±۳/۴۶ <sup>a</sup>	۶۰/۵۳±۲/۸۰ <sup>a</sup>
پروپیلن گلیکول ۲ درصد	۶۶/۱۶±۲/۷۷	۶۲/۹۲±۳/۰۵ <sup>ab</sup>	۶۲/۲۴±۳/۴۶ <sup>ab</sup>	۵۷/۲۳±۲/۸۰ <sup>ab</sup>
پروپیلن گلیکول ۳ درصد	۶۴/۲۶±۲/۷۷	۵۹/۱۱±۳/۰۵ <sup>abc</sup>	۵۷/۰۸±۳/۴۶ <sup>abc</sup>	۵۴/۲۳±۲/۸۰ <sup>abc</sup>
پروپیلن گلیکول ۷ درصد	۵۱/۸۶±۲/۷۷	۴۷/۲۲±۳/۰۵ <sup>bc</sup>	۴۴/۹۵±۳/۴۶ <sup>d</sup>	۴۲/۵۷±۲/۸۰ <sup>c</sup>
شاهد	۵۷/۸۶±۲/۷۷	۵۱/۵۲±۳/۰۵ <sup>cd</sup>	۴۸/۰۲±۳/۴۶ <sup>cd</sup>	۴۳/۵۳±۲/۸۰ <sup>c</sup>

abcd حروف غیر مشابه در هرستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد ( $p < 0/05$ ).

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 ( $p < 0/05$ ) ولی بقیه تیمارها از این نظر، با گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌دار نداشتند. در روز ۲۰ یخ‌گشایی هم، در این خصوص تمامی تیمارهای حاوی پروپیلن گلیکول با گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌دار داشتند ( $p < 0/05$ )، ولی اختلاف آماری بین گروه‌های مختلف تیمار شده با پروپیلن گلیکول نسبت به گروه شاهد معنی‌دار نبود. همچنین تفاوت آماری مشاهده شده در این مورد، در تمامی تیمارها به جز تیمارهای ۱ میلی مولار EDTA و ۱/۵ میلی مولار EDTA نسبت به گروه پروپیلن گلیکول ۷ درصد، معنی‌دار بود ( $p < 0/05$ ). در این خصوص در روز ۶۰ یخ‌گشایی نیز تیمارهای پروپیلن گلیکول ۱ درصد و

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 ( $p < 0/05$ ) ولی بقیه تیمارها در این خصوص با گروه شاهد اختلاف آماری معنی‌دار نداشتند. همچنین در روز ۲۰ یخ‌گشایی، حرکت پیشرونده اسپرم در گروه تیمار با پروپیلن گلیکول ۱ درصد با تیمارهای ۱ میلی مولار EDTA، ۱/۵ میلی مولار EDTA، پروپیلن گلیکول ۷ درصد و گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌دار داشت

پروپیلن گلیکول ۲ درصد با گروه شاهد و تیمار پروپیلن گلیکول ۷ درصد تفاوت آماری معنی‌دار داشتند ( $p < 0/05$ )، ولی تفاوت با سایر گروه‌ها معنی‌دار نبود.

جدول ۶- مقایسه درصد حرکت پیشرونده اسپرم قوج‌های مورد مطالعه در روزهای مختلف یخ‌گشایی

تیمار	صفر	۲۰	۴۰	۶۰
۱ میلی مولار EDTA	۵۲/۷۳±۲/۸۸ <sup>abc</sup>	۴۹/۹۹±۳۴/۶۴ <sup>dc</sup>	۴۳/۹۴±۲/۸۳ <sup>cde</sup>	۴۰/۱۳±۲/۶۳ <sup>bc</sup>
۱/۵ میلی مولار EDTA	۵۵/۹۷±۲/۸۸ <sup>abc</sup>	۵۰/۷۲±۳/۶۴ <sup>bdc</sup>	۴۲/۰۴±۲/۸۳ <sup>de</sup>	۴۰/۵۸±۲/۶۳ <sup>bc</sup>
۲ میلی مولار EDTA	۵۴/۰۲±۲/۸۸ <sup>abc</sup>	۵۴/۳۴±۳/۶۴ <sup>abc</sup>	۴۸/۶۲±۲/۸۳ <sup>bcd</sup>	۴۴/۲۱±۲/۶۳ <sup>abc</sup>
۲/۵ میلی مولار EDTA	۵۶/۰۵±۲/۸۸ <sup>abc</sup>	۵۲/۶۵±۳/۶۴ <sup>abc</sup>	۵۰/۱۶±۲/۸۳ <sup>abcd</sup>	۴۵/۸۷±۲/۶۳ <sup>abc</sup>
پروپیلن گلیکول ۱ درصد	۶۴/۲۰±۲/۸۸ <sup>a</sup>	۶۱/۲۲±۳/۶۴ <sup>a</sup>	۵۷/۴۷±۲/۸۳ <sup>a</sup>	۵۴/۹۱±۲/۶۳ <sup>a</sup>
پروپیلن گلیکول ۲ درصد	۵۹/۵۹±۳/۰۶ <sup>ab</sup>	۵۹/۹۶±۳/۶۴ <sup>ab</sup>	۵۵/۷۳±۲/۸۳ <sup>ab</sup>	۵۲/۷۳±۲/۶۳ <sup>a</sup>
پروپیلن گلیکول ۳ درصد	۵۸/۲۹±۲/۸۸ <sup>abc</sup>	۵۴/۷۷±۳/۶۴ <sup>abc</sup>	۵۱/۴۱±۲/۸۳ <sup>abc</sup>	۴۹/۲۲±۲/۶۳ <sup>ab</sup>
پروپیلن گلیکول ۷ درصد	۴۶/۰۴±۲/۸۸ <sup>c</sup>	۴۱/۶۶±۳/۶۴ <sup>d</sup>	۳۸/۲۲±۲/۸۳ <sup>e</sup>	۳۷/۰۷±۲/۷۷ <sup>c</sup>
شاهد	۵۰/۸۱±۲/۸۸ <sup>bc</sup>	۴۶/۰۶±۳/۶۴ <sup>dc</sup>	۴۲/۱۰±۲/۸۳ <sup>de</sup>	۳۶/۶۶±۲/۶۳ <sup>c</sup>

abcd: حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد ( $p < 0/05$ ).

گلیکول ۷ درصد و گروه شاهد دارای اختلاف آماری معنی‌داری بود ( $p < 0/05$ ). همچنین از این نظر، تیمارهای پروپیلن گلیکول ۲ درصد، پروپیلن گلیکول ۳ درصد، ۲ میلی مولار EDTA و ۲/۵ میلی مولار EDTA با تیمار پروپیلن گلیکول ۷ درصد اختلاف آماری معنی‌دار داشتند ( $p < 0/05$ )، ولی این اختلاف با تیمار ۱ میلی مولار EDTA و گروه شاهد معنی‌دار نبود. همچنین نتایج مربوط به درصد زنده‌مانی اسپرم در مورد منی‌های یخ‌گشایی‌شده در روز ۴۰ نشان داد که در این مورد، تیمارهای پروپیلن گلیکول ۱ درصد و پروپیلن گلیکول ۲ درصد با تیمارهای ۱ میلی مولار EDTA، ۲ میلی مولار EDTA، پروپیلن گلیکول ۷ درصد و گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌دار داشتند ( $p < 0/05$ ). تیمارهای ۲ میلی مولار EDTA و پروپیلن گلیکول ۳ درصد نیز در این خصوص با تیمار پروپیلن گلیکول ۷ درصد اختلاف

مقایسه درصد زنده‌مانی اسپرم قوج‌های 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 ( $p < 0/05$ )، 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 میلی مولار EDTA، پروپیلن

پروپیلن گلیکول ۱ درصد و پروپیلن گلیکول ۲ درصد با گروه شاهد و تیمار پروپیلن گلیکول ۷ درصد را نشان داد ( $p < 0/05$ ) ولی تفاوت مذکور با سایر تیمارها معنی‌دار نبود.

آماري معنی‌داری نشان دادند ( $p < 0/05$ )، ولی نسبت به گروه شاهد، تفاوت مذکور معنی‌دار نبود. مقایسه میانگین‌های مربوط به روز ۶۰ یخ‌گشایی منی هم در این خصوص، اختلاف آماری معنی‌داری بین تیمارهای

جدول ۷- مقایسه درصد زنده‌مانی اسپرم قوچ‌های مورد مطالعه در روزهای مختلف یخ‌گشایی منی  
مدت زمان نگه‌داری منی در انجماد تا مرحله یخ‌گشایی (روز)

تیمار	صفر	۲۰	۴۰	۶۰
۱ میلی مولار EDTA	۶۲/۲۰±۲/۷۷ <sup>ab</sup>	۵۶/۱۰±۳/۰۴ <sup>bc</sup>	۵۲/۲۴±۳/۱۳ <sup>abcd</sup>	۴۷/۶۶±۲/۹۱ <sup>ab</sup>
۱/۵ میلی مولار EDTA	۶۴/۸۹±۲/۷۷ <sup>ab</sup>	۶۰/۰۶±۳/۰۴ <sup>ab</sup>	۴۸/۸۹±۳/۱۳ <sup>cd</sup>	۴۸/۹۱±۲/۹۱ <sup>ab</sup>
۲ میلی مولار EDTA	۶۶/۰۸±۲/۷۷ <sup>ab</sup>	۶۰/۰۴±۳/۰۴ <sup>ab</sup>	۵۵/۹۶±۳/۱۳ <sup>abcd</sup>	۵۲/۰۲±۲/۹۱ <sup>ab</sup>
۲/۵ میلی مولار EDTA	۶۶/۳۵±۲/۷۷ <sup>ab</sup>	۶۱/۳۹±۳/۰۴ <sup>ab</sup>	۵۸/۹۶±۳/۱۳ <sup>ab</sup>	۵۲/۸۸±۲/۹۱ <sup>ab</sup>
پروپیلن گلیکول ۱درصد	۷۲/۱۸±۲/۷۷ <sup>a</sup>	۶۸/۴۶±۳/۰۴ <sup>a</sup>	۶۵/۶۷±۳/۱۳ <sup>a</sup>	۶۳/۶۶±۲/۹۱ <sup>a</sup>
پروپیلن گلیکول ۲درصد	۶۹/۵۸±۲/۹۵ <sup>a</sup>	۶۵/۱۴±۳/۰۴ <sup>ab</sup>	۶۳/۴۱±۳/۱۳ <sup>a</sup>	۵۹/۶۳±۲/۹۱ <sup>a</sup>
پروپیلن گلیکول ۳درصد	۶۷/۳۳±۲/۷۷ <sup>a</sup>	۶۱/۵۲±۳/۰۴ <sup>ab</sup>	۵۸/۴۳±۳/۱۳ <sup>abc</sup>	۵۶/۸۰±۲/۹۱ <sup>ab</sup>
پروپیلن گلیکول ۷درصد	۵۴/۸۲±۲/۷۷ <sup>b</sup>	۵۰/۲۹±۳/۰۴ <sup>c</sup>	۴۶/۹۶±۳/۱۳ <sup>d</sup>	۴۴/۰۱±۲/۹۱ <sup>b</sup>
شاهد	۶۲/۸۶±۲/۷۷ <sup>ab</sup>	۵۵/۷۴±۳/۰۴ <sup>bc</sup>	۴۹/۵۲±۳/۱۳ <sup>abcd</sup>	۴۶/۱۰±۲/۹۱ <sup>b</sup>

abcd: حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد ( $p < 0/05$ ).

یخ‌گشایی تیمار پروپیلن گلیکول ۲ درصد بالاترین میزان یکپارچگی غشای پلاسمایی را داشت که اختلاف آن با پروپیلن گلیکول ۷ درصد معنی‌دار بود ( $p < 0/05$ ) ولی با بقیه تیمارها و گروه شاهد معنی‌دار نبود. در روز ۶۰ یخ‌گشایی پروپیلن گلیکول ۳ درصد بالاترین میزان سلامت غشاء را داشت که در مقایسه با تیمار ۲/۵ میلی مولار EDTA و پروپیلن گلیکول ۷ درصد اختلاف معنی‌دار را نشان داد ( $p < 0/05$ )، ولی با گروه شاهد و بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشت.

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 ( $p < 0/05$ ) ولی تفاوت آن با شاهد و بقیه تیمارها معنی‌دار نبود. در روز ۴۰

جدول ۸- درصد یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم قوج‌های مورد مطالعه در روزهای مختلف یخ‌گشایی منی  
مدت زمان نگهداری منی در انجماد تا مرحله یخ‌گشایی (روز)

تیمار	صفر	۲۰	۴۰	۶۰
۱ میلی مولار EDTA	۵۳/۴۵±۳/۹۸	۴۷/۵۵±۳/۰۷ <sup>ab</sup>	۴۳/۵۱±۲/۸۰ <sup>ab</sup>	۴۳/۳۳±۲/۵۲ <sup>ab</sup>
۱/۵ میلی مولار EDTA	۵۳/۱۶±۴/۱۹	۴۶/۰۱±۳/۰۷ <sup>ab</sup>	۴۵/۰۰±۲/۸۰ <sup>ab</sup>	۴۴/۸۰±۲/۶۵ <sup>ab</sup>
۲ میلی مولار EDTA	۵۰/۶۸±۳/۹۸	۴۸/۱۰±۳/۰۷ <sup>ab</sup>	۴۷/۲۸±۲/۸۰ <sup>ab</sup>	۴۹/۲۱±۲/۶۵ <sup>ab</sup>
۲/۵ میلی مولار EDTA	۴۹/۵۷±۳/۹۸	۴۷/۲۹±۳/۰۷ <sup>ab</sup>	۴۶/۰۴±۲/۸۰ <sup>ab</sup>	۴۱/۱۵±۲/۶۵ <sup>ab</sup>
پروپیلن گلیکول ۱ درصد	۵۶/۸۵±۳/۹۸	۵۰/۳۸±۳/۰۷ <sup>a</sup>	۴۷/۵۹±۲/۸۰ <sup>ab</sup>	۴۶/۵۶±۲/۶۵ <sup>ab</sup>
پروپیلن گلیکول ۲ درصد	۵۰/۷۳±۴/۲۴	۴۸/۹۶±۳/۰۷ <sup>ab</sup>	۵۳/۷۰±۲/۸۰ <sup>a</sup>	۴۶/۹۱±۲/۵۲ <sup>ab</sup>
پروپیلن گلیکول ۳ درصد	۵۳/۱۶±۳/۹۸	۴۵/۲۶±۳/۰۷ <sup>ab</sup>	۵۰/۶۱±۲/۸۰ <sup>ab</sup>	۵۲/۸۹±۲/۵۲ <sup>a</sup>
پروپیلن گلیکول ۷ درصد	۴۵/۱۰±۳/۹۸	۳۹/۰۲±۳/۰۷ <sup>b</sup>	۳۸/۵۶±۲/۸۰ <sup>b</sup>	۴۰/۴۰±۲/۸۳ <sup>b</sup>
شاهد	۴۹/۷۲±۳/۹۸	۴۱/۹۲±۳/۰۷ <sup>ab</sup>	۴۴/۷۸±۲/۸۰ <sup>ab</sup>	۴۲/۲۹±۲/۵۲ <sup>ab</sup>

abcd: حروف غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد ( $p < 0.05$ ).

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 ( $p < 0.05$ )، 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 ( $p < 0.05$ )، ولی با بقیه تیمارها و گروه شاهد در این خصوص تفاوت آماری معنی‌داری نداشتند. در مورد نمونه‌هایی 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 ( $p < 0.05$ )، 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

مدت زمان نگاه‌داری منی در انجماد تا مرحله یخ‌گشایی (روز)				
تیمار	صفر	۲۰	۴۰	۶۰
۱ میلی مولار EDTA	۶۳/۰۷±۴/۸۳	۶۰/۶۸±۳/۵۶ <sup>ab</sup>	۵۶/۴۴±۳/۵۴ <sup>ab</sup>	۵۴/۴۱±۳/۹۹ <sup>ab</sup>
۱/۵ میلی مولار EDTA	۵۶/۰۲±۴/۸۳	۶۱/۴۰±۳/۵۶ <sup>ab</sup>	۵۴/۵۰±۳/۵۴ <sup>ab</sup>	۵۳/۷۶±۴/۲۰ <sup>ab</sup>
۲ میلی مولار EDTA	۶۵/۸۱±۴/۸۳	۶۲/۵۷±۳/۵۶ <sup>ab</sup>	۶۰/۸۳±۳/۵۴ <sup>ab</sup>	۶۰/۸۲±۴/۲۰ <sup>ab</sup>
۲/۵ میلی مولار EDTA	۶۰/۴۸±۴/۸۳	۶۴/۸۹±۳/۵۶ <sup>ab</sup>	۶۳/۹۹±۳/۵۴ <sup>ab</sup>	۵۸/۴۶±۴/۲۰ <sup>ab</sup>
پروپیلن گلیکول ۱ درصد	۷۲/۶۴±۴/۸۳	۷۲/۲۹±۳/۵۶ <sup>a</sup>	۶۸/۸۸±۳/۵۴ <sup>a</sup>	۶۵/۸۱±۴/۲۰ <sup>a</sup>
پروپیلن گلیکول ۲ درصد	۶۸/۸۰±۴/۸۳	۶۹/۲۸±۳/۵۶ <sup>ab</sup>	۶۷/۷۶±۳/۵۴ <sup>a</sup>	۶۲/۵۳±۳/۹۹ <sup>ab</sup>
پروپیلن گلیکول ۳ درصد	۶۹/۲۶±۴/۸۳	۶۸/۱۱±۳/۵۶ <sup>ab</sup>	۶۴/۳۶±۳/۵۴ <sup>ab</sup>	۶۲/۰۸±۴/۲۰ <sup>ab</sup>
پروپیلن گلیکول ۷ درصد	۵۶/۷۲±۴/۸۳	۵۴/۸۳±۳/۵۶ <sup>b</sup>	۵۰/۲۳±۳/۷۷ <sup>b</sup>	۴۷/۵۹±۴/۲۰ <sup>b</sup>
شاهد	۶۲/۱۰±۴/۸۳	۵۶/۶۹±۳/۵۶ <sup>ab</sup>	۵۵/۳۹±۳/۵۴ <sup>ab</sup>	۵۲/۷۷±۴/۲۰ <sup>ab</sup>

abcd: حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد ( $p < 0.05$ ).

## 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 میلی لیتر)، حرکت موجی (۲-۵)، تحرک کل (۷۰-۹۰ درصد)، حرکت پیشرونده (۹۰-۴۵ درصد)، رنگ منی (۲-۵)، تعداد اسپرم در هر میلی لیتر ( $10^9 \times 10^9 - 5/0 - 1/0$ )، 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 میلی مولار 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 پروپیلن گلیکول ۱، ۲ و ۳ 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 میلی مولار

پروپیلن گلیکول 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 روز ۲۰ آزمایش گروه تیمار با پروپیلن گلیکول ۱ درصد، در روز ۴۰ و ۶۰ 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 پروپیلن گلیکول (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

EDTA نسبت به گروه شاهد، احتمالاً ناشی از توانایی عبور پروپیلن گلیکول از غشای سلول و جلوگیری از تشکیل بلورهای یخ داخل سلولی و کاهش آسیب به اسپرم و توانایی EDTA در کلات کردن کلسیم و ممانعت از ورود کلسیم خارج سلولی به داخل سلول و جلوگیری از ظرفیت‌پذیری سلول‌های اسپرم می‌باشد که سبب بهبود تحرک کل و پیشرونده اسپرم می‌شود (Bourinbaier and Lee, 1996; Buyukleblebici *et al.*, 2014; Keshtgar *et al.*, 2016). در مطالعه‌ای که روی قوچ‌های نژاد پامیتتا 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 پروپیلن گلیکول ۱، ۲ و ۳ درصد نسبت به گروه شاهد و گروه تیمار با

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

بدین وسیله از زحمات و همکاری‌های مسئولین ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان آقلیان مهندس حبیب چراغی، مهندس خسرو پارسایی مهر و مهندس یعقوب تیموری که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند، قدردانی می‌شود.

### تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

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 پروپیلن گلیکول ۱، ۲ و ۳ درصد نسبت به گروه شاهد و گروه تیمار با پروپیلن گلیکول 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، ۴۰ و ۶۰ 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 ۶ درصد نسبت به گروه‌های تیمار با پروپیلن گلیکول ۱، ۳ و ۱۰ درصد بیشتر بود ولی این تفاوت معنی‌دار نبود که مطابق

## 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 chelator for 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 Article*, 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 season. *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 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.