ผลการเสริมเมลาโทนินในน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งของไก่

(Effect of Supplementation Melatonin in Chicken Extender to Quality Semen Cryopreserved)

พัชราภรณ์ จันทร์ทัย

Phatcharaphorn Chanthai

ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

บทคัดย่อ

อสุจิของไก่มีลักษณะเฉพาะที่มีความไวต่อการถูกทำลายจากกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อ เนื่องจากมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในพลาสมาเมมเบรนในปริมาณสูง และมีไมโตรคอนเดรียขนาดเล็กเมื่อเทียบกับอสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การเติมสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำเชื้อก่อนทำการแช่แข็ง อาจจะช่วยเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลายได้ ดังนั้นสัมมนาฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริมเมลาโทนินในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพตัวอสุจิของไก่หลังการแช่แข็ง โดยรวบรวมและศึกษาจากเอกสารวิจัยจำนวน 3 ฉบับ ที่ตีพิมพ์ในช่วง ค.ศ. 2019-2024 ซึ่งมีการเสริมเมลาโทนินในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ ตั้งแต่ $2.32x10^{-7}$ – $5.00x10^{-1}$ มก./มล. พบว่าการเสริมเมลาโทนินช่วยเพิ่มคุณภาพหลังการละลายได้ โดยการใช้เมลาโทนิน $2.32x10^{-1}$ – $2.50x10^{-1}$ มก./มล. มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ความสมบูรณ์ของพลาสมาเมมเบรน ความสมบูรณ์ของอะโครโซมมากกว่าการใช้ระดับอื่น และการเสริมเมลาโทนินช่วยลดระดับปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการเสริมเมลาโทนินระหว่างการแช่แข็งมีผลทำให้คุณภาพของตัวอสุจิหลังละลายเพิ่มขึ้น และควรเสริมที่ระดับ $2.32x10^{-1}$ – $2.50x10^{-1}$ มก./มล. ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ

คำสำคัญ : เมลาโทนิน สารละลายเจือจาง อสุจิไก่ พลาสมาเมมเบรน อะโครโซม

บทนำ

การเก็บรักษาอสุจิด้วยการแช่แข็งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและสำคัญในการอนุรักษ์และป้องกันการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่โดยเฉพาะในกรณีที่มีความเสี่ยงในการสูญพันธุ์ที่กำลังสูญเสียอย่างถาวร ส่งผลต่อการวิจัยทางวิชาการในอนาคต การเก็บรักษาพันธุกรรมไว้ เพื่อให้แน่ใจว่าจะนำกลับมาใช้ใหม่ การศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้จำนวนมากเห็นตรงกันว่าตัวอสุจิของไก่นั้นมีลักษณะเฉพาะที่ไวต่ออุณหภูมิการแช่แข็งมากกว่าตัวอสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Xia et al., 1988; Santiago et al., 2016; Ciftci et al., 2018) ลักษณะเฉพาะ คือ มีไซโตรพลาซึมน้อย มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนจำนวนมากในพลาสมาเมมเบรน และไมโตคอนเดียมีขนาดเล็ก ซึ่งทำให้ตัวอสุจิเสี่ยงต่อความเสียหายระหว่างกระบวนการแช่แข็ง (Partyka et al., 2011) อีกทั้งอัตราการอยู่รอดของตัวอสุจิที่ผ่านการเก็บรักษาโดยการแช่แข็งของสัตว์ปีกนั้นต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับอสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Wishart, 1985 อ้างโดย Micharl et al., 2019) จึงทำให้การเก็บรักษาด้วยการแช่แข็งไม่นิยมในอุตสาหกรรมสัตว์ปีก (Fulton, 2006)

ในระหว่างการเก็บรักษาอสุจิด้วยการแช่แข็งทำให้ตัวอสุจิเกิดความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ของตัวอสุจิอุดมไปด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน ทำให้ง่ายต่อการเกิดอนุมูลอิสระของออกซิเจน (Reactive oxygen species; ROS) ซึ่งในระหว่างกระบวนการแช่แข็งและละลายทำให้เกิดการผลิต ROS มากเกินไป ส่งผลให้เกิด lipid peroxidation (LPO) ที่เพิ่มขึ้นมีความเสียหายทางโครงสร้างของไมโตคอนเดรียและบริเวณอะโครโซม เกิดความเสียหายของ DNA และความเสียหายของโครมาติน (Blesbois et al., 2005) ตามมาด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ เช่น การก่อตัวของอัลดีไฮด์ที่เป็นพิษต่อเซลล์ (โดยเฉพาะ malondialdehyde) ในเยื่อหุ้มอสุจิ จึงทำให้อัตราการผสมติดลดลง (Krishnamoorty et al., 2007; Partyka et al., 2011 อ้างโดย Yan et al., 2024) ดังนั้นเพื่อปกป้องตัวอสุจิจากการทำลายโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Jan et al., 2015) จึงมีการนำสารต้านอนุมูลอิสระเข้ามาช่วยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและช่วยลดการบาดเจ็บของตัวอสุจิ เช่น วิตามินอี (Moghbeli et al., 2016) ซีลีเนียม (Ebeid, 2013) ซีสเตอีน ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (Partyka et al., 2013) แอลคาร์นิทีน (Fattah et al., 2017) ทอรีน (Partyka et al., 2017) และกรดไฮยาลูโรนิก (Lotfi et al., 2017)

เมลาโทนิน *(N*-aceyl-5-methoxytryptamine) มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และลดการก่อตัวของ ROS รักษาความสมบูรณ์ของไมโตคอนเดรียและช่วยรักษาการทำงานของเซลล์ นอกจากนี้ เมลาโทนินยังสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อรักษาความลื่นไหลและความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ผ่านฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทางอ้อม มีรายงานผลการป้องกันด้วยเมลาโทนินต่อความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในมนุษย์ หมูป่า ควาย และ หนู ในการศึกษาล่าสุดเกี่ยวกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมการเสริมสารละลายเจือจางด้วยเมลาโทนินช่วยปรับปรุงการทำงานของตัวอสุจิหลังละลายของอสุจิแกะ วัว ควาย และม้า (Gamal et al., 2020; Yan et al., 2024) และยังมีผลการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่าเมลาโทนินช่วยลดการเปลี่ยนแปลงคล้ายอะพอพโทติก (Apoptotic) ในระหว่างการเก็บรักษาอสุจิด้วยการแช่แข็ง (Gamal et al., 2020) อย่างไรก็ตาม Gwayi et al (2022) รายงานว่าเมลาโทนินมี

ผลเสียต่อการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิในหนู ในขณะที่ยังไม่ได้ข้อสรุปเกี่ยวกับระดับการใช้เมลาโทนินที่เหมาะสมในไก่ ดังนั้นสัมมนาฉบับนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริมเมลาโทนินในน้ำยาเจือจางแช่แข็งต่อคุณภาพสเปิร์มของไก่

Table 1 Effect of supplementation with melatonin during frozen after-thawing on movement efficiency

	Concentration of melatonin (mg/ml)				
	0	2.32×10^{-1}	2.32×10^{-3}	2.32×10^{-5}	2.32×10^{-7}
Progressive motility (%)	25.74 ± 2.635^{b}	41.01 ± 2.699^{a}	40.21 ± 2.828^{a}	35.73 ± 4.688^{ab}	33.02 ± 4.130^{ab}
Total motility (%)	44.58 ± 3.121^{b}	58.19 ± 1.890^{a}	59.07 ± 1.890^{a}	60.22 ± 1.985^{a}	51.28 ± 3.866^{ab}
VCL (μm/s)	70.55±18.78	65.56±12.08	104.40±23.58	77.27±16.96	70.33±15.79
VSL (μm/s)	37.92±10.53	37.70±7.830	69.41±19.24	47.85±10.95	42.75±8.33
VAP (μm/s)	60.41±18.28	56.09±12.80	93.04±24.60	68.52±17.02	61.18±15.86
LIN (%)	51.25±2.876	55.14±3.3.89	57.49±5.911	57.27±3.552	50.74±3.715
STR (%)	68.08±3.272	71.00±3.227	74.19±2.079	72.90±2.686	67.45±2.809

Note: Data were expressed as means ± SEM, different letters, within the same column, indicate significant differences ($p < 0.05$). VCL: curvilinear velocity; VSL: straight-line velocity; VAP: average path velocity; LIN: linearity (ratio VSL/VCL); STR: straightness (ratio VSL/VAP)

Source: Yan et al. (2024)

ผลของการเสริมเมลาโทนินในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังการละลาย (Motility)

Yan et al. (2024) ทำการทดลองโดยใช้ไก่พันธุ์ Beijing you ที่อายุ 50-70 สัปดาห์ เสริมเมลาโทนินในระหว่างการแช่แข็งสเปิร์มที่ความเข้มข้น 2.32×10^{-1}, 2.32×10^{-3}, 2.32×10^{-5}, 2.32×10^{-7} มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าการเคลื่อนที่หมู่ (Total motility) กลุ่มที่เสริม 2.32×10^{-1} 2.32×10^{-3} และ 2.32×10^{-5} มีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (Progressive motility) ของทุกกลุ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 1) ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับงานของ Gamal et al. (2020) ได้ทำการทดลองกับไก่พันธุ์ Greenleg Partridge ที่โตเต็มวัย พบว่าการเสริมเมลาโทนินที่ระดับ 2.32×10^{-1}, 2.32×10^{-4} ช่วยเพิ่มการเคลื่อนที่อย่างมีนัยสำคัญ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (Progressive motility) ของทุกกลุ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 2) ในขณะที่ Michael et al. (2019) ทำการทดลองกับไก่พันธุ์ Arbor Acre อายุ 25 สัปดาห์ พบว่าการเสริมเมลาโทนินที่ความเข้มข้น 2.50×10^{-1}, 5.00×10^{-1} มีการเคลื่อนที่มากกว่ากลุ่มควบคุม แต่ทั้งนี้การเสริมที่ความเข้มข้น 1.25×10^{-1} ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (Table 3) จึงสรุปได้ว่าเมลาโทนินช่วยเพิ่มการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไก่หลังการแช่แข็งได้ ซึ่ง

เป็นไปตามหลักการ เนื่องจากเมลาโทนินมีบทบาทในการต้านอนุมูลอิสระช่วยป้องกันการถูกทำลายของพลาสมาเมมเบรน ไมโตรคอนเดรีย และนอกจากนั้นแล้วยังมีคุณสมบัติ Lipophilic ช่วยในการขนส่งสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และการเก็บสะสมพลังงานของไมโตรคอนเดรีย ซึ่งจำเป็นสำหรับการเคลื่อนที่ของอสุจิ

Table 2 Effect of supplementation with melatonin during frozen after-thawing on movement efficiency

	Concentration of melatonin (mg/ml)			
	0	2.32×10^{-1}	2.32×10^{-4}	2.32×10^{-7}
Progressive motility (%)	7.3±0.56	8.2±0.98	9.7±0.99	8.7±0.84
Total motility (%)	25.3 ± 3.53^{b}	34.5 ± 1.75^{a}	34.7 ± 2.70^{a}	32.2 ± 2.34^{ab}
VCL (μm/s)	124.9±5.28	116.9±4.44	126.0±5.79	123.5±4.22
VSL (μm/s)	57.0±5.92	46.0±3.01	51.1±1.90	51.0±2.92
VAP (μm/s)	74.1±5.51	63.4±3.49	69.5±2.59	69.9±3.48
LIN (%)	40.2±2.94	35.2±1.01	37.2±0.70	37.3.±1.33
STR (%)	68.3±1.82	65.7±0.84	66.4±0.61	65.5±0.89

Note: Different superscripts within the same row denote differences ($P < 0.05$).

VCL: curvilinear velocity; VSL: straight-line velocity; VAP: average path velocity; LIN: linearity (ratio VSL/VCL); STR: straightness (ratio VSL/VAP)

Source: Gamal et al. (2020)

Table 3 Effect of supplementation with melatonin during frozen after-thawing on movement efficiency

	Concentration of melatonin (mg/ml)			
	0	1.25×10^{-1}	2.50×10^{-1}	5.00×10^{-1}
Total motility (%)	32.33±0.8810	25.67±0.8819	39.67±1.202**	37.33±1.453*

Different superscripts within the same row denote differences ($P < 0.05$)

Note: ***P* and **P* represent significant differences compared to the control.

(ns, $P > 0.05$, **P* < 0.05; ***P* < 0.01)

Source: Michael et al. (2019)

ผลการเสริมเมลาโทนินในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อต่อความสมบูรณ์ของพลาสมาเมมเบรนของอสุจิหลังการละลาย (Plasmamembrane integrity)

Yan et al. (2024) ทำการเสริมเมลาโทนินที่ความเข้มข้น 2.32×10^{-1} มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถเพิ่มสัดส่วนของอสุจิที่มีพลาสมาสมบูรณ์ได้อย่างมีนัยสำคัญ (Figure 1) เป็นไปในทางเดียวกันกับงานของ Michael et al. (2019) ที่พบว่าที่ความเข้มข้น 2.50×10^{-1} และ 5.00×10^{-1} มก./มล. ช่วยปกป้องความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ของตัวอสุจิอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Figure 3) ในขณะที่ Gamal et al. (2020) พบว่าที่ความเข้มข้น 2.32×10^{-1}, 2.32×10^{-4} มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ให้ค่าความสมบูรณ์ของพลาสมาเมมเบรนที่มากที่สุด (Figure2) จึงสรุปได้ว่าซึ่งเป็นไปตามหลักการ เนื่องจากเมลาโทนินเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจึงช่วยและป้องกันการถูกทำลายของพลาสมาเมมเบรนจากสารอนุมูลอิสระ

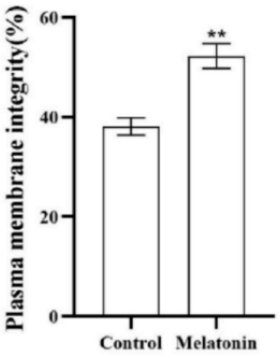

Figure 1 The integrity rate of sperm plasma membrane after thawing.

Note: ** P on bars indicate significant differences among the groups ($P < 0.01$) vs control.

Source: Yan et al. (2024)

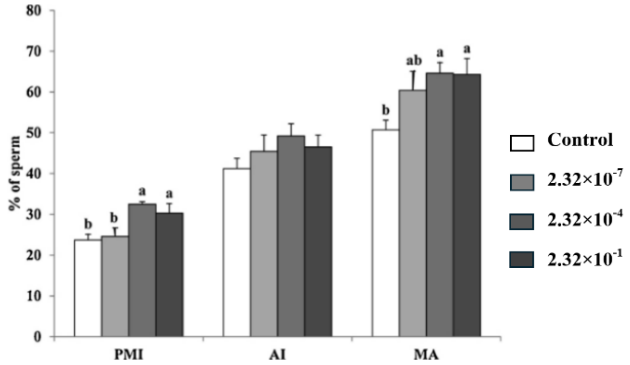

Figure 2 Flow cytometric evaluation of **plasma membrane integrity (PMI)**, Acrosomal integrity (AI) and mitochondrial activity (MA) of post-thawed rooster sperm supplemented with different concentrations of melatonin; Bars represent means ± SE, and different superscripts above bars for the same variable indicate differences ($P < 0.05$)

Source: Gamal et al. (2020)

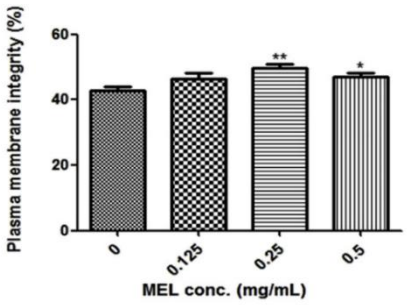

Figure 3 Influence of MEL on the plasma membrane functionality of chicken spermatozoa after the process of cryopreservation via the base extender administered with diverse dosages of. MEL (mg/mL). Note: **P and *P on bars indicate significant differences among the groups (ns, $P > 0.05$; **$P < 0.01$ and *$P < 0.05$). Data are presented as per the mean ± SEM.

Source: Michael et al. (2019)

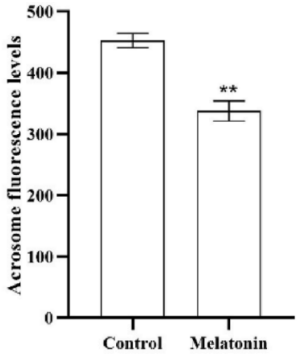

Figure 4 The integrity of sperm acrosome indicated by fluorescence intensity.

Note: ** P on bars indicate significant differences among the groups ($P < 0.01$) vs control.

Source: Yan et al. (2024)

ผลการเสริมเมลาโทนินในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อต่อความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิหลังการละลาย (Acrosomal integrity)

Yan et al. (2024) พบว่าที่ความเข้มข้น 2.32×10^{-1} มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถป้องกันหรือรักษาสภาพความสมบูรณ์ของอะโครโซมของตัวอสุจิอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Figure 4) เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับงานของ Michael et al. (2019) ที่พบว่าการเสริมเมลาโทนินที่ระดับความเข้มข้น 2.50×10^{-1} มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทำให้อสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์สูงกว่ากลุ่มควบคุม (Figure 6) แต่ในงานของ Gamal et al. (2020) พบว่าการเสริมเมลาโทนินที่ระดับ 2.32×10^{-1} 2.32×10^{-4} และ 2.32×10^{-7} ความสมบูรณ์ของอะโครโซมไม่แตกต่างกัน (Figure 5) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าเนื่องจาก เมลาโทนินมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจึงช่วยปกป้องและลดการเข้าทำลายของสารอนุมูลอิสระทำให้ความสมบูรณ์ของอะโครโซมสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เสริมเมลาโทนิน

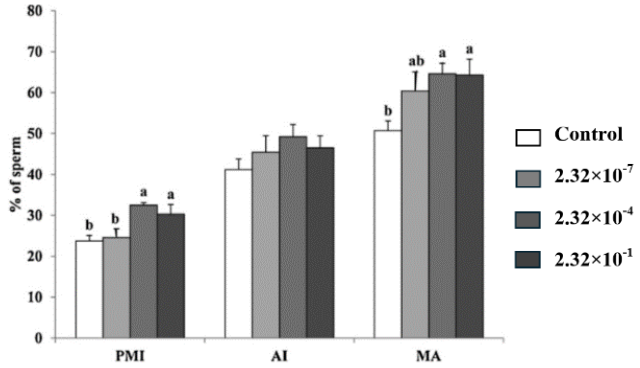

Figure 5 Flow cytometric evaluation of plasma membrane integrity (PMI), **Acrosomal integrity (AI)** and mitochondrial activity (MA) of post-thawed rooster sperm supplemented with different concentrations of melatonin; Bars represent means ± SE, and different superscripts above bars for the same variable indicate differences ($P < 0.05$).

Source: Gamal et al. (2020)

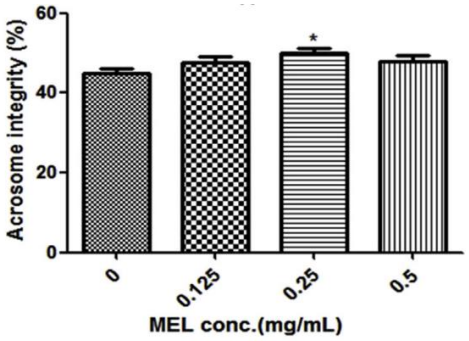

Figure 6 Influence of MEL on the acrosome integrity of chicken spermatozoa after cryopreservation process via the base extender administered with diverse dosages of MEL (mg/mL).

Note: *P on bars indicate significant differences among the groups (ns, $P > 0.05$ and *$P < 0.05$; and). Data are presented as the mean ± SEM.

Source: Michael et al. (2019

ผลการเสริมเมลาโทนินในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อต่อระดับ Reactive oxygen species (ROS) หลังการละลาย

Yan et al. (2024) ทำการเสริมเมลาโทนินที่ความเข้มข้น 2.32×10^{-1} มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าช่วยลดระดับ ROS ในน้ำเชื้ออย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Figure 7) เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับงานของ Michael et al. (2019) ที่พบว่าการเสริมเมลาโทนินที่ความเข้มข้น 1.25×10^{-1}, 2.50×10^{-1}, 5.00×10^{-1} ส่งผลให้ระดับ ROS ต่ำกว่า

กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (Figure 8) จึงสามารสรุปได้ว่า ทั้งนี้น่าจะเกิดขึ้นเนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกันหรือลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของออกซิเจน จึงทำให้อนุมูลอิสระลดลง

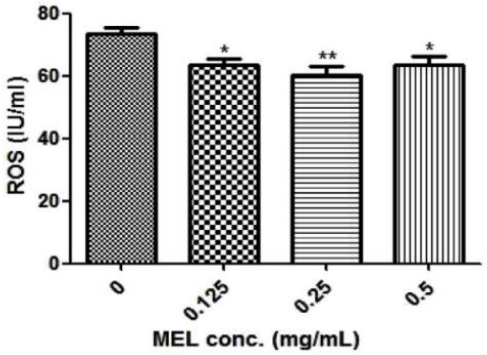

Figure 7 The ROS levels measured by DCFH-DA staining indicated by fluorescence intensity.

Note: ** P on bars indicate significant differences among the groups (P < 0.01) vs control.

Source: Yan et al. (2024

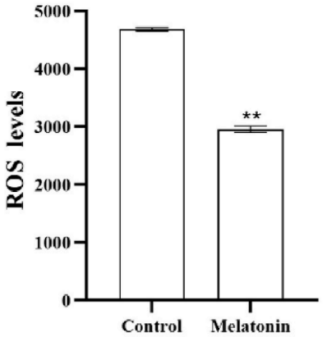

Figure 8 Influence of melatonin to levels of ROS of cryopreserved chicken spermatozoa via the base extender administered with diverse dosages of MEL.

Note: **P and * P on bars indicate significant differences among the groups of different treatment (ns, P > 0.05; **P < 0.01; *P < 0.05). Data are displayed as the mean ± SEM.

Source: Michael et al. (2019)

สรุป

การเสริมเมลาโทนินในสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งของไก่ช่วยทำให้คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลายดีขึ้น และควรเสริมที่ความเข้มข้น $2.32x10^{-1}$ – $2.50x10^{-1}$ มก./มล. เนื่องจากลดระดับความเครียดจากปฏิกิริยา ออกซิเดชั่นลดความเสียหายของพลาสมาเมมเบรน ช่วยเพิ่มการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ รักษาความสมบูรณ์ของอะโครโซม เมื่อเปรียบเทียบกับการเสริมเมลาโทนินที่ความเข้มข้นอื่นๆ

เอกสารอ้างอิง

Appiah, M.O., He, B., Lu. W. and Wang, J. 2019. "Antioxidative effect of melatonin on cryopreserved chicken semen". **Cryobiology.** 89: 90-95.

Blesbois, E., Grasseau, I. and Seigneurin, F. 2005. "Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryipreservation". **Reproduction.** 123(3): 371-378.

Ciftci, B.A. and Aygun, A. 2018. "Poultry semen cryopreservation technologies". **Poult. Science.** 74(4): 600-710.

Ebid, T.A. 2013. "Vitamin E and organic selenium enhances the antioxidative status and quality of chicken semen under high ambient temperature". **British Poultry Science.** 52(5): 708-714.

Fattah, A., Sharafi, M., Masoudi, R., Shahverdi, A. and Esmaeili, V. 2017. "L-carnitine is a survival factor for chilled storage of rooster semen for a long time". **Cryobiology.** 74: 13-18.

Fulton, J.E. 2006. "Avian genetic stock preservation: an industry perspective". **Poult. Science.** 85: 227–231.

Gwayi, N. and Bernard, R.T.F. 2002. "The effects of melatonin on sperm motility in vitro in Wistar rats". **Andrologia.** 34(6): 391-396.

Krishnamoorthy, G., Venkataraman, P., Arunkumar, A., Vignesh, R.C., Aruldhas, M.M. and Arunakaran, J. 2007. "Ameliorative effect of vitamins (α-tocopherol and ascorbic acid) on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress in rat epididymal sperm". **Reproductive Toxicology.** 23(2): 239-245.

Long, J.A. 2006. "Avian Semen Cryopreservation: What Are the Biological Challenges?". **Poult. Science.** 852: 232-236.

Lotfi, S., Mehri, M., Sharafi, M. and Masoudi, R. 2017. "Hyaluronic acid improves frozen-thawed sperm quality and fertility potential in rooster". **Animal Reproduction Science.** 184: 204-210.

Mehaisen, G.M.K., Partyka, A., Ligocka, Z. and Nianski,W. 2020. "Cryoprotective effect of melatonin supplementation on post-thawed rooster sperm quality". **Animal Reproduction Science.** 212: 1-7.

Moghbeli, M., Kohram, H., Zare, S.A., Zhandi, M., Sharafi, M., Mehdi, N.M., Zahedi, V. and Sharideh, H. 2016. "Are the optimum levels of the catalase and vitamin E in rooster semen extender after freezing-thawing influenced by sperm concentration?". **Cryobiology.** 72(3): 264-268.

Partyka, A., Lukaszewicz, E., Nizanski, W. and Twardon, J. 2011. "Detection of lipid peroxidation in frozen-thawed avian spermatozoa using C_{11}-BODIPY$^{581/591}$". **Theriogenology.** 75(9): 1623-1529.

Partyka, A., Nizanski, W., Bajzert, J., LukaszewicZ, E. and Oxhota, M. 2013. "The effect of cysteine and superoxide dismutase on the quality of post-thawed chicken sperm". **Cryobiology.** 67(2): 132-136.

Partyka, A., Rodak, O., Bajzert, J., Kochan, J. and Nizanski, W. 2017. "The Effect of L-Carnitine, Hypotaurine, and Taurine Supplementation on the Quality of Cryopreserved Chicken Semen". **BioMed Research International.** 2017: 1-8

Santiago, M.J., Cristina, E.M., Villaverde, M.S., Toledano, D.A., Castano, C., Velazquez, R., Lopez, S.A., Lopez, G.A. and Gimeno, M.J. 2016. "Recent advances in bird sperm morphometric analysis and its role in male gamete characterization and reproduction technologies". **Asian Journal of Andrology.** 18(6): 882-888.

Wishart, G.J. 1985. "Quantitation of the fertilizing ability of fresh compared with frozen and thawed fowl spermatozoa". **Poult. Science.** 26: 375–380.

Xia, L.J., Lalli, M.F., Ansah, G.A. and Buckland, R.B. 1988. "Ultrastructure of fresh and frozen-thawed spermatozoa of high and low fertility lines of chickens". **Poult. Science.** 67: 819–825.

Yan, L.Q., Li ,J.Y., Li ,G.D., Ma, W.K., Liu, Y.J., Liu, X.N., Zhao, M.M., Ji, P.Y., Zheng, Q.H., Deng, X.M. and Liu, G.S. 2024. "Research article effect of melatonin on cryopreservation of Beijing you chicken (gallus gallus) spermatozoa". **Cryobiology.** 114: 1-7.