"Research article" DOI: 10.71499/jvcp.2024.3041410

Evaluation of the effect of the amino acid methionine on goat epididymal sperm motility parameters during preservation at 5 degrees celsius using CASA (Computer Assisted Sperm Analysis)

Lotfy, M.[1], Abdy, K.[2*]

1- Graduate of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad Univercity, Urmia, Iran.
*Corresponding author's email: Keivanabdy@gmail.com
(Received: 2023/9/27 Accepted: 2024/1/26)

Abstract

Sperm storage in liquid form disrupts sperm motility by oxidation of membrane lipids and production of reactive oxygen species (ROS). The amino acid methionine as an anti-oxidant is effective in clearing ROS and improving sperm motility. The aim of this study was to investigate the effect of four concentrations of methionine on the motility pattern of goat epididymal sperm during preservation at 5 °C. For this purpose, 30 pairs of testicles of adult male goats were collected from Urmia industrial slaughterhouse and transferred to the laboratory next to ice pack. In the laboratory, after incisions on the epididymal tail, sperm were transferred to micro-tubes containing HTF (Human Tubal Fluid) medium with 10% bovine serum albumin. After preparing a dilution between 30 and 40 million sperm per ml of HTF medium, 4 levels of methionine (1, 2, 4 and 6 mmol) were added to the micro-tubes containing culture medium and sperms. After 5 minutes of incubation at 37 °C, the samples were evaluated in terms of motility pattern with computer assisted sperm analysis (CASA). Data were analyzed using SPSS software and the Tukey test. The results showed that CASA parameters including progressive motility (class A+B, %), straight line velocity (VSL, µm/s), average path velocity (VAP, µm/s), curvilinear velocity (VCL, µm/s), straightness (STR, %) and wobble (WOB, %) were significantly higher in methionine treatment at 60 hours than in the control (p<0.05). Therefore, methionine amino acid can be used to improve the quality of goat epididymis sperm.

Conflict of interest: None declared.
Keyword: CASA, Epididymis, Goat, Methionine, Sperm motility.

"مقاله پژوهشی "

DOI: 10.71499/jvcp.2024.3041410

ارزیابی تاثیر اسیدآمینه متیونین بر شاخص‌های حرکتی اسپرم اپیدیدیمی بز طی ماندگاری در دمای ۵ درجه سلسیوس با استفاده از سیستم رایانه‌ای CASA

مهران لطفی[۱]، کیوان عبدی[۲*]

۱- دانش‌آموخته دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران.

۲- استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: keivanabdy@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۷/۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۶)

چکیده

ذخیره اسپرم به صورت مایع، با اکسیداسیون چربی‌های غشاء و تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی (reactive oxygen species; ROS) الگوی حرکتی اسپرم را مختل می‌سازد. اسیدآمینه متیونین به عنوان آنتی‌اکسیدان، در پاکسازی ROS و بهبود تحرک اسپرم موثر است. هدف از انجام تحقیق حاضر، بررسی تاثیر ۴ غلظت متیونین بر الگوی حرکتی اسپرم اپیدیدیمی بز طی ماندگاری در دمای ۵ درجه سلسیوس بود. به این منظور ۳۰ جفت بیضهٔ بز نر بالغ از کشتارگاه صنعتی ارومیه جمع‌آوری و کنار یخ خشک به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از بذل دم اپیدیدیم، اسپرم‌ها به میکروتیوب‌های حاوی محیط HTF (Human Tubal Fluid)، با ۱۰ درصد آلبومین سرم گاوی منتقل شد. پس از تهیه رقت ۳۰ الی ۴۰ میلیون اسپرم در میلی لیتر محیط HTF، غلظت‌های ۱، ۲، ۴ و ۶ میلی‌مول متیونین به اسپرم اضافه گردید. در زمان‌های ۱، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۶۰ ساعت بعد از نگه‌داری در دمای ۵ درجه سلسیوس، نمونه‌ها پس از ۵ دقیقه گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، از نظر الگوی حرکتی با سیستم رایانه‌ای CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) ارزیابی گردید. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و انجام آنالیز آماری با آزمون توکی، ثبت گردید. نتایج نشان داد که شاخص‌های کاسا مثل حرکت پیش‌رونده، سرعت خط مستقیم، متوسط سرعت مسیر حرکت، سرعت خط منحنی، مستقیم‌الخط بودن و درصد لرزش مسیر حرکت، در غلظت ۲ میلی‌مول متیونین و در زمان ۶۰ ساعت، به طور معنی‌داری از شاهد بیشتر بوده است ($p<۰/۰۵$). بنابراین، طبق نتایج به‌دست‌آمده می‌توان از اسید آمینه متیونین در بهبود کیفیت اسپرم اپیدیدیمی بز بهره جست.

کلیدواژه‌ها: حرکت اسپرم، اپیدیدیم، بز، متیونین، نرم افزار کاسا.

مقدمه

جهت انتشار گسترده اسپرم نژادهای ارزشمند گونه‌های مختلف دام مثل گوسفند و بز و در واقع به‌منظور بارورسازی تعداد زیادی دام ماده، لازم است که اسپرم تحت شرایط خاص نگه‌داری و منتقل شود. دو روش اصلی برای ذخیره اسپرم، شامل نگه‌داری به صورت منجمد و نگه‌داری در دمای ۵ درجه سلسیوس به‌صورت مایع می‌باشد (Çoyan, Başpınar *et al.*, 2010). در واقع برای نگه‌داری اسپرم و افزایش عمر باروری آن لازم است که فعالیت متابولیکی سلول‌های اسپرم کاهش یابد و یا متوقف شود. انجماد و ذوب اسپرم در مقایسه با نگه‌داری اسپرم در دمای ۵ درجه سلسیوس، آسیب بیشتری به شاخص‌های باروری اسپرم وارد ساخته و کاهش تحرک اسپرم، کاهش باروری و به دنبال آن افزایش جذب جنین را باعث می‌شود (Akhter *et al.*, 2011; Bucak *et al.*, 2012; Allai *et al.*, 2018). به‌هرحال اگرچه نگه‌داری اسپرم به صورت منجمد مزایایی نیز دارد، نظیر امکان نگه‌داری اسپرم در زمان‌های بسیار طولانی‌تر و عدم محدودیت در به کارگیری برنامه‌های تولیدمثلی، چرا که در زمان مورد نظر، اسپرم ذوب شده و به کار می‌رود و محدودیت نگه‌داری اسپرم در دمای ۵ درجه سلسیوس را ندارد، ولی قطعاً کیفیت اسپرم منجمد پس از ذوب و یخ-گشایی، به مراتب کمتر از اسپرم خوب ذخیره‌شده در دمای ۵ درجه سلسیوس خواهد بود (Sariozkan *et al.*, 2012; Mata-Campuzano *et al.*, 2014). یکی از منابع با ارزش استحصال اسپرم و به تعبیری آخرین منبع اخذ اسپرم پس از مرگ دام، بیضهٔ دام و در واقع اسپرم موجود در دم اپیدیدیم است و بسته به دمای محیط تا چندین ساعت پس از مرگ، قابلیت ذخیره‌سازی به صورت مایع، منجمد، ذوب و باروری موفق را دارد (Santiago-Moreno *et al.*, 2006; Fernández-Santos *et al.*, 2011). بنابراین هم برای حفظ ذخایر ژنتیکی با ارزش و هم در موارد خاص، مثل مرگ ناگهانی دام‌های نر مراکز اصلاح نژاد به دلایل مختلف، همچنین در گونه‌های حیات وحش که جز با بیهوش کردن دام امکان اخذ اسپرم انزالی وجود ندارد، می‌توان از اسپرم‌های ذخیره شده در دم اپیدیدیم با درصد باروری بالا استفاده نمود (Guerrero *et al.*, 2008; Fernández-Santos *et al.*, 2009; Fernández-Santos *et al.*, 2011; Hajihassani *et al.*, 2019; Zahmel *et al.*, 2022).

برای نگه‌داری اسپرم به صورت مایع، حتما باید تمهیداتی در خصوص کنترل متابولیت‌های ناشی از فعالیت اسپرم به عمل‌آید. در واقع اسپرم باید در محیطی نگه‌داری شود که یکپارچگی غشاء آکروزوم و نیز تحرک و باروری آن تا بیشترین زمان ممکن حفظ شود. هر نوع دست‌کاری اسپرم در آزمایشگاه و به عبارتی فعالیت اسپرم در محیط بیرون بدن به دلیل تحمیل استرس اُکسیداتیو، سبب تولید رادیکال‌های آزاد مثل آنیون‌های سوپراکسید و گونه‌های اکسیژن واکنشی می-شود. این ترکیبات در مقدار کم برای ظرفیت‌پذیری و تحرک اسپرم لازم است ولی در مقادیر زیاد به علت اکسیداسیون چربی‌های غشاء اسپرم، عملکرد آن را مختل و تحرک و ماندگاری اسپرم کاهش می‌یابد. منی پستانداران به صورت طبیعی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مثل کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون دارد، ولی مقدار ترکیبات مذکور، ممکن است برای نگه‌داری اسپرم به صورت مایع خنک، کافی نباشد. بنابراین لازم

است که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی دیگری هم به محیط کشت و یا رقیق‌کننده اسپرم اضافه گردد. اسیدآمینه متیونین به‌عنوان پیش‌ساز گلوتاتیون، نقش مؤثری در پیشگیری از آسیب اُکسیداتیو بر عملکرد حیاتی اسپرم دارد و در سم‌زدایی از محیط کشت نیز مؤثر است. هم‌چنین گروه تیول متیونین در شِلاته‌کردن سرب و خروج آن از بافت‌ها نقش دارد (Bucak *et al*., 2012; Çoyan *et al*., 2013, Omur and Coyan, 2016).

اسپرم اپیدیدیم آخرین منبع در دسترس برای استحصال، حفظ و نگه‌داری ذخیرهٔ ژنتیکی دام‌ها می‌باشد. لذا در زمانی‌که اخذ اسپرم با روش معمول امکان‌پذیر نیست، مثل مرگ ناگهانی دام به هر دلیلی، مخصوصاً دام‌های نر با ارزش ژنتیکی بالا، تنها راه عملی، جمع‌آوری بیضه از لاشهٔ دام، بذل دم اپیدیدیم و اخذ اسپرم می‌باشد. در مورد بُز، مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که می‌توان اسپرم دم اپیدیدیم را استحصال و به صورت مایع و یا منجمد نگه‌داری نمود و با موفقیت در برنامه‌های تولید مثلی مثل لقاح آزمایشگاهی و تلقیح مصنوعی بکاربرد. بنابراین، اخذ اسپرم زنده از اپیدیدیم به‌عنوان یک روش جایگزین و کاربردی جهت جمع‌آوری گامت نر امکان‌پذیر است. هم‌چنین گزارش شده، چه پس از مرگ دام و چه در زمانی‌که با روش معمول نتوان از گونه‌های حیات وحش، اسپرم انزالی گرفت، می‌توان با بیهوش‌کردن حیوان به راحتی از دم اپیدیدیم اسپرم اخذ نمود (Blash *et al*., 2000; Fernández-Santos *et al*., 2011, Turri *et al*., 2014; Martínez-Fresneda *et al*., 2019; Miró *et al*., 2020). البته اسپرم ذخیره‌شده در دم اپیدیدیم، چون ترشحات غدد ضمیمه را ندارد، لذا در محیط آزمایشگاه در معرض خطر بیشتری از جانب رادیکال‌های آزاد قرار می‌گیرد و به دنبال آن، کاهش تحرک، کاهش زنده مانی، آسیب آکسونِم و افزایش آسیب به قطعه میانی، همراه با اثرات مخرب در ظرفیت‌پذیری و واکنش آکروزومی آن دیده می‌شود (Indhu *et al*., 2021).

با توجه به مطالب ذکرشده، در تحقیق حاضر به منظور ارائه راهکاری برای نگه‌داری با کیفیت تحرک اسپرم دم اپیدیدیم گونه بز اهلی، اسیدآمینه متیونین در غلظت‌های مختلف به محیط کشت اسپرم اضافه گردید تا اثرات حاصله در جهت حفظ تحرک مطلوب اسپرم طی بیشترین زمان نگه‌داری آن در محیط خارج از بدن و در دمای ۵ درجه سلسیوس، با استفاده از سیستم نرم‌افزاری کاسا (Monawar *et al*., 2023) ارزیابی شود.

مواد و روش‌ها

تحقیق کاربردی، نیمه‌تجربی و مداخله‌ای حاضر در کلینیک تخصصی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، واقع در استان آذربایجان‌غربی، ۲۰ کیلومتری جادهٔ سِنتو انجام شد. بدین منظور ابتدا با مراجعه به کشتارگاه صنعتی ارومیه طی یک ماه کاری و از اواخر اسفند ۱۳۹۳ تا اردیبهشت ماه ۱۳۹۴، در مجموع با استفاده از فرمول ویلیام کوکران و در سطح اطمینان ۵ درصد با جامعه آماری ۵۰ رأس بز نر بالغ و سالم کشتاری، تعداد نمونه حدود ۴۵ جفت محاسبه گردید و چون بیضه‌های کاملاً سالم و بدون چسبندگی لایه های پوششی و با دم اپیدیدیم مد نظر بود، لذا در نهایت ۳۰ جفت بیضه برای مطالعه انتخاب گردید. بیضه دان‌ها پس از کشتار دام در ظروف درب‌دار که تهویه مناسب داشت داخل یونولیت حاوی بسته‌های پلاستیکی یخ زده، به آزمایشگاه کلینیک دانشکده منتقل گردید. در

آزمایشگاه پس از جداسازی بیضه‌دان، بیضه‌های سالم فاقد چسپندگی و یا آبسه، انتخاب گردید. در واقع نمونه‌گیری به صورت نیمه‌تصادفی بود. پس از جداسازی پوشش بیضه، دم اپیدیدیم بین دو انگشت تثبیت گردید و در ادامه با ایجاد چند برش ظریف به‌کمک تیغ بیستوری، ریز لوله‌های منی‌بر مشخص شد و با برش نهایی در مناطق بدون مویرگ، اسپرم‌ها بدون آغشته‌شدن با خون، به میکروتیوب‌های ۵ میلی‌لیتری حاوی محیط کشت لوله رحمی HTF (Human Tubal Fluid)، شرکت سیگما آلدریج (MR-070 Sigma-Aldrich)، همراه با ۱۰ درصد آلبومین سرم گاوی (BSA-1U,50G 9048-46-8) منتقل گردید. سپس ۸۰۰ میکرولیتر از محیط HTF آلبومین‌دار به میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل شد. همچنین متیونین (L-Methionin Art.5707-MERK) با سطوح (۱، ۲، ۴ و ۶ میلی‌مول در میلی‌لیتر) به میکروتیوب‌های گروه تیمار با سمپلر سکورکس (نوع مدرج ۱ الی ۱۰ میکرولیتر، Socorex Cat.#825.0010Y, SN, 21081870) اضافه گردید و بعد از آن ۲۰۰ میکرولیتر از محیط HTF حاوی اسپرم غلیظ به هر میکروتیوب افزوده شد تا در نهایت حجم هر میکروتیوب ۱۰۰۰ میکرولیتر و یا یک میلی‌لیتر با حدود ۳۰ الی ۴۰ میلیون اسپرم اپیدیدیم بز گردد. (لازم به ذکر است که رقت حاوی بیش از ۵۰ میلیون اسپرم در میلی‌لیتر توسط سیستم کاسا قابل ارزیابی نیست). پس از تهیه رقت‌های مورد نظر در طرح آزمایش، نمونه‌های اسپرم مربوط به گروه‌های متیونین و شاهد به مدت ۶۰ ساعت در یخچال ۵ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. در ادامه و پس از طی شدن زمان‌های ۱، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۶۰ ساعت، از هر میکروتیوب، جداگانه به میزان ۵ میکرولیتر برداشته شده و سریعاً بر روی لام ماکلِر ۳۷ درجه سلسیوس سیستم سخت‌افزار- نرم‌افزار کاسا (Computer Assisted Sperm Analysis; CASA) (شرکت هوشمند فن‌آور تهران نسخه نرم افزاری ویرایش هفتم، ۲۰۰۹) قرار می‌گرفت (Abdy *et al*., 2023) و پس از۵ دقیقه، الگوی حرکت در ۵ زمینه میکروسکوپی و با ارزیابی داده‌های حرکتی حداقل تعداد ۱۰۰۰ الی ۲۰۰۰ اسپرم بررسی می‌شد (Coyan *et al*., 2011; Sohail *et al*., 2013; Giaretta *et al*., 2017; Dziekońska *et al*., 2020; Shi *et al*., 2020; Van der Horst, 2020).

- **تحلیل آماری داده‌ها**: نتایج حاصله از ۳ بار تکرار آزمایش به صورت میانگین±خطای استاندارد، با نرم افزارSPSS نسخه ۲۶ و آزمون مقایسه میانگین چند جامعه ارزیابی گردید. ابتدا داده‌ها از نظر معنی‌دار بودن تفاوت واریانس‌ها مورد بررسی قرار گرفت و برای انجام آزمون‌های چند دامنه یا پس از تجربه، آزمون توکی در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که اسید آمینه متیونین در طی زمان‌های ۱، ۱۲ و ۲۴ ساعت نگه‌داری اسپرم در دمای ۵ درجه سلسیوس، تاثیر مفید و قابل قبولی بر شاخص‌های حرکتی اسپرم ندارد ولی پس از طی زمان ۶۰ ساعت نگه‌داری اسپرم در دمای ۵ درجه سلسیوس، اثر متیونین در افزایش شاخص‌های حرکتی اسپرم، طبق نتایج ارائه شده در جداول ۱ تا ۶، معنی‌دار بود (p<۰/۰۵).

اولین شاخص ارزیابی شده در خصوص تاثیر متیونین بر الگوی حرکتی اسپرم اپیدیدیم بز در دمای ۵ درجه سلسیوس، میانگین درصد حرکت پیش‌رونده اسپرم (Class A+B) بود (جدول ۱). در ارتباط با این داده، میانگین حاصله در مورد نمونه‌های گروه تیمار در زمان ۶۰ ساعت و تمام سطوح متیونین استفاده شده، از میزان میانگین آن در مورد نمونه‌های گروه شاهد، مقادیر عددی بالاتری داشت. البته میانگین مذکور در خصوص نمونه‌های گروه تیمار، فقط در غلظت‌های ۲ و ۴ میلی-مول از اسیدآمینه متیونین، با مقدار آن در مورد نمونه-های گروه شاهد، تفاوت آماری معنی‌دار نشان داد ($p<۰/۰۵$).

جدول ۱- میانگین± خطای استاندارد درصد اسپرم‌های با حرکت پیش‌رونده در نمونه‌های مربوط به گروه‌های شاهد و تیمارشده با غلظت‌های مختلف اسیدآمینه متیونین

گروه مورد آزمایش	مدت زمان نگهداری اسپرم در دمای ۵ درجه سلسیوس برحسب ساعت				
	۱	۱۲	۲۴	۴۸	۶۰
شاهد	۸۶/۸±۰/۶۸^{a}	۷۸/۰۸±۱/۶۶	۸۷/۷۹±۰/۱۲^{a}	۸۲/۸۸±۰/۷	۶۵/۶۷±۰/۷۲^{b}
تیمار با متیونین ۱	۷۵/۳۶±۰/۸۶^{ab}	۷۵/۵۲±۳/۵۹	۸۰/۵±۲/۲۶^{b}	۷۹/۷۹±۵/۲۳	۷۳/۰۹±۱/۶۷^{ab}
تیمار با متیونین ۲	۸۵/۷۸±۱/۹۷ ^{ab}	۷۵/۰۷±۴/۴۲	۸۰/۹۱±۱/۷۴^{b}	۸۰/۹۳±۰/۶۶	۷۴/۵۳±۲/۱۲^{a}
تیمار با متیونین ۴	۷۴/۸±۸۶/۱۱^{b}	۸۴/۳۵±۲/۷۸	۸۴/۶۹±۲/۴۲^{ab}	۸۱/۷۳±۰/۱۶	۷۳/۳۸±۱/۹۴^{a}
تیمار با متیونین ۶	۸۵/۱±۴۲/۰۲^{ab}	۷۵/۹۵±۳/۱۳	۸۵/۲۹±۳/۵^{ab}	۸۲/۳۳±۱/۴	۷۰/۱۴±۳/۳۹^{ab}

a,b, ...: در هر ستون میانگین‌های با حروف انگلیسی غیریکسان، اختلاف آماری معنی‌دار دارند ($p<۰/۰۵$).

در ارتباط با شاخص سرعت اسپرم در خط منحنی (Velocity Curvilinear; VCL) برحسب میکرومتر در ثانیه (جدول ۲)، میانگین نتایج ثبت‌شده برای این داده در زمان نگه‌داری ۶۰ ساعت در استفاده از تمامی سطوح متیونین در مورد نمونه‌های گروه‌های تیمار، از مقدار آن در خصوص نمونه‌های اسپرم گروه شاهد بالاتر و بهتر بود. البته در مورد شاخص مذکور، تفاوت آماری معنی‌دار نسبت به گروه شاهد، فقط در خصوص نمونه‌های اسپرم تیمار شده با غلظت ۲میلی‌مول متیونین مشاهده گردید ($p<۰/۰۵$).

جدول ۲- میانگین± خطای استاندارد سرعت حرکت اسپرم در خط منحنی برحسب میکرومتر در ثانیه در نمونه‌های مربوط به گروه‌های شاهد و تیمارشده با غلظت‌های مختلف اسیدآمینه متیونین

گروه **مورد آزمایش**	مدت زمان نگه‌داری اسپرم در دمای ۵ درجه سلسیوس برحسب ساعت				
	۱	۱۲	۲۴	۴۸	۶۰
شاهد	۱۰۹/۴۷±۱/۰۴^{a}	۷۲/۱۰±۲/۹۹^{ab}	۱۰۶/۸۶±۰/۶۶^{a}	۹۰/۳۸±۲/۸۴	۶۴/۶۴±۱/۳۱^{b}
تیمار با متیونین ۱	۹۵/۷۱±۱/۵^{b}	۵۹/۳۷±۵/۷۵^{b}	۹۸/۹۹±۳/۶۸^{ab}	۹۵/۴۵±۱۲/۷۸	۷۰/۸۵±۳/۰۸^{ab}
تیمار با متیونین ۲	۱۰۶/۲۶±۰/۷۵^{ab}	۶۳/۳۹±۹/۵۶^{b}	۸۸/۰۱±۰/۹۹^{b}	۸۶/۳۰±۸/۲۶	۷۸/۱۹±۳/۳۳^{a}
تیمار با متیونین ۴	۱۱۰/۶۴±۷/۳۴^{a}	۸۹/۵۵±۵/۴۶^{a}	۱۰۲/۰۲±۷/۴۰^{a}	۹۵/۳۰±۰/۷۳	۷۵/۵۷±۳/۴۳^{ab}
تیمار با متیونین ۶	۱۰۸±۳/۷۵^{ab}	۶۳/۱۷±۴/۹۷^{b}	۹۵/۷۴±۵/۵۷^{ab}	۹۰/۹۸±۲/۴	۷۰/۹۲±۴/۹۵^{ab}

a,b, ...: در هر ستون میانگین‌های با حروف انگلیسی غیریکسان، اختلاف آماری معنی‌دار دارند ($p<۰/۰۵$).

هم‌چنین نتایج حاصله از بررسی سرعت اسپرم در خط مستقیم (VSL: Straight-line Velocity) برحسب میکرومتر در ثانیه، مطابق داده‌های ارائه‌شده در جدول ۳، در زمان‌های نگه‌داری اسپرم، طی ۴۸ و ۶۰ ساعت، در مورد تمامی سطوح استفاده شده از متیونین برای تیمار نمونه‌ها، مقادیر حاصله، از میزان آن در مورد نمونه‌های اسپرم گروه شاهد بالاتر بود. البته یافته‌های ثبت‌شده در مورد فاکتور حرکتی مذکور، نشان داد که در این خصوص، اختلاف آماری معنی‌دار با نمونه‌های گروه شاهد، فقط در مورد نمونه‌های اسپرم نگه‌داری‌شده در دمای ۵ درجه سلسیوس در طی مدت ۶۰ ساعت و تیمار شده با ۲ میلی‌مول متیونین، وجود دارد ($p<۰/۰۵$).

جدول ۳- میانگین± خطای استاندارد سرعت حرکت اسپرم در خط مستقیم برحسب میکرومتر در ثانیه در نمونه‌های مربوط به گروه‌های شاهد و تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسیدآمینه متیونین

گروه **مورد آزمایش**	**مدت زمان نگه‌داری اسپرم در دمای ۵ درجه سلسیوس برحسب ساعت**				
	۱	۱۲	۲۴	۴۸	۶۰
شاهد	۷۴/۳۳±۰/۵۷^{a}	۴۵/۲۶±۲/۱۹^{ab}	۷۱/۸۹±۰/۸۸^{a}	۵۵/۸۱±۷/۶۸	۳۸/۰۱±۰/۶۲^{b}
تیمار با متیونین ۱	۶۲/۲۱±۱/۱۴^{b}	۳۳/۶۷±۶/۹۵^{b}	۶۶/۶±۳/۸۹^{ab}	۶۳/۰۲±۱۰/۲	۴۴/۵±۳/۵۶^{ab}
تیمار با متیونین ۲	۷۰/۵۵±۳/۵۳^{ab}	۳۵/۲۷±۸/۴۵^{b}	۵۸/۵±۱/۸۵^{b}	۶۲/۵۶±۱/۹	۴۹/۴۸±۲/۸۶^{a}
تیمار با متیونین ۴	۷۳/۰۴±۵/۵۵^{a}	۵۷/۰۳±۳/۲۰^{a}	۷۲/۴۳±۷/۵۶^{a}	۶۴/۳۲±۱/۸	۴۶/۰۶±۲/۹۹^{ab}
تیمار با متیونین ۶	۷۳/۷۱±۲/۹۸^{a}	۳۷/۸۱±۳/۸۳^{ab}	۶۴/۹۶±۴/۰۶^{ab}	۵۶/۸۲±۳/۰۲	۴۳/۸۳±۳/۰۸^{ab}

a,b, ...: در هر ستون میانگین‌های با حروف انگلیسی غیریکسان، اختلاف آماری معنی‌دار دارند ($p<۰/۰۵$).

نتایج بررسی آخرین شاخص سرعت حرکت اسپرم اپیدیدیمی بز و در واقع میانگین سرعت حرکت اسپرم (VAP: Average Path Velocity) برحسب میکرومتر در ثانیه هم مطابق داده‌های ارائه‌شده در جدول ۴ نشان داد که میانگین متغیر مذکور در طی زمان‌های ۴۸ و ۶۰ ساعته نگه‌داری نمونه‌های اسپرم در تمامی غلظت‌های استفاده‌شده از متیونین، از میانگین آن در مورد نمونه‌های گروه شاهد، مقادیر عددی بالاتری داشت. همچنین در مورد فاکتور فوق، اختلاف آماری معنی‌دار با نتایج مربوط به نمونه‌های اسپرم گروه شاهد، فقط در مدت زمان ۶۰ ساعت و سطح ۲ میلی‌مول استفاده شده از اسیدآمینه متیونین، مشاهده گردید ($p<۰/۰۵$).

جدول ۴- میانگین± خطای استاندارد متوسط سرعت حرکت اسپرم برحسب میکرومتر در ثانیه در نمونه‌های مربوط به گروه‌های شاهد و تیمارشده با غلظت‌های مختلف اسیدآمینه متیونین

گروه **مورد آزمایش**	**مدت زمان نگه‌داری اسپرم در دمای ۵ درجه سلسیوس برحسب ساعت**				
	۱	۱۲	۲۴	۴۸	۶۰
شاهد	۸۵/۹۶±۰/۴۲^{a}	۵۲/۶۸±۲/۴۷^{ab}	۸۶/۱۸±۰/۸۸^{a}	۷۰/۷۷±۲/۳۸	۴۹/۴۷±۰/۶۳^{b}
تیمار با متیونین ۱	۷۳/۱۶±۱/۱۵^{b}	۴۰/۲۶±۶/۷۱^{b}	۷۸/۷۷±۳/۶۸^{ab}	۷۷/۳۶±۱۱/۷۸	۵۴/۳۲±۴/۰۴^{ab}
تیمار با متیونین ۲	۸۲/۲۷±۲/۵۹^{ab}	۴۲/۷۵±۹/۶۹^{b}	۶۹/۹۲±۱/۹۵^{b}	۷۷/۵۶±۲/۸۶	۶۱/۴۱±۳/۲۱^{a}
تیمار با متیونین ۴	۸۵/۰۳±۵/۶۱^{a}	۶۸/۰۶±۴/۲۰^{a}	۸۵/۱۹±۸/۳۰^{a}	۷۹/۳۳±۱/۸	۵۷/۴۷±۳/۴۱^{ab}

تیمار با متیونین ۶	۸۵/۶۴±۳/۲۰^{a}	۴۴/۹۲±۴/۶۷^{b}	۷۶/۹۰±۴/۶۸^{ab}	۶۹/۲۷±۳/۱۵	۵۵/۰۶±۳/۹۷^{ab}

... ,a,b: در هر ستون میانگین‌های با حروف انگلیسی غیریکسان، اختلاف آماری معنی‌دار دارند (p<۰/۰۵).

هم‌چنین در ارتباط با شاخص میانگین نسبت متوسط سرعت مسیر حرکت اسپرم اپیدیدیم بز بر سرعت خط منحنی برحسب درصد که تحت عنوان وابِل (Wobble) شناخته می‌شود، مطابق داده‌های جدول ۵، مشخص گردید که فاکتور مذکور در مورد نمونه‌های اسپرم تیمارشده با غلظت‌های ۱، ۲ و ۶ میلی‌مول از متیونین و طی نگه‌داری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۵ درجه سلسیوس، نسبت به نمونه‌های گروه شاهد مقادیر بیشتری داشت و حتی در ساعت ۶۰ دوره نگه‌داری، میزان متغیر مذکور در مورد نمونه‌های تیمارشده با تمام سطوح متیونین از مقدار آن در مورد نمونه‌های شاهد بیشتر بود. البته اختلاف آماری معنی‌دار در این خصوص با نمونه‌های مربوط به گروه شاهد، فقط در مورد نمونه-های اسپرم تیمارشده با غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌مول متیونین مشاهده گردید (p<۰/۰۵).

جدول ۵- میانگین± خطای استاندارد درصد نسبت متوسط سرعت مسیر حرکت اسپرم بر سرعت خط منحنی سرعت حرکت اسپرم در نمونه‌های مربوط به گروه‌های شاهد و تیمارشده با غلظت‌های مختلف اسیدآمینه متیونین

گروه **مورد آزمایش**	**مدت زمان نگه‌داری اسپرم در دمای ۵ درجه سلسیوس برحسب ساعت**				
	۱	۱۲	۲۴	۴۸	۶۰
شاهد	۷۲/۵۱±۰/۹	۶۱/۹۴±۱/۵۷	۷۴/۳۵±۰/۳۱^{a}	۶۷/۵۷±۱/۰۱	۵۵/۳۰±۰/۴۵^{b}
تیمار با متیونین ۱	۶۵/۱۰±۰/۷۵	۵۸/۵۶±۴/۷۸	۶۹/۳۷±۱/۴۹^{ab}	۶۹/۲۷±۴/۸	۶۲/۵۴±۱/۶۶^{a}
تیمار با متیونین ۲	۷۲/۰۱±۲/۴۲	۵۷/۱۶±۵/۶۲	۶۸/۴۶±۱/۲۱^{b}	۶۹/۵۶±۰/۰۱	۶۳/۳۶±۲/۱۸^{a}
تیمار با متیونین ۴	۷۰/۵۰±۰/۶۲	۶۸/۷۷±۲/۴	۷۳/۴۷±۲/۸۳^{ab}	۶۱/۴۱±۰/۲۲	۶۱/۲۸±۱/۹۳^{ab}
تیمار با متیونین ۶	۶۳/۴۴±۸/۰۷	۵۹/۸۲±۲/۹۹	۷۱/۹۶±۱/۷۴^{ab}	۶۸/۲۷±۱/۴	۵۹/۶۸±۳/۰۵^{ab}

... ,a,b: در هر ستون میانگین‌های با حروف انگلیسی غیریکسان، اختلاف آماری معنی‌دار دارند (p<۰/۰۵).

نتایج حاصله از بررسی آخرین متغیر تحقیق حاضر یعنی میانگین نسبت سرعت خط مستقیم بر متوسط سرعت مسیر حرکت اسپرم یا STR (Straightness) برحسب درصد، مطابق داده‌های ارائه‌شده در جدول ۶ نشان داد که میانگین شاخص مذکور، در ساعت ۶۰ دوره نگه‌داری نمونه‌های اسپرم در دمای ۵ درجه سلسیوس، در تمامی سطوح استفاده‌شده از متیونین برای تیمار نمونه‌ها، از مقدار آن در مورد نمونه‌های شاهد بیشتر بود ولی تفاوت آماری معنی‌دار در این خصوص با نمونه‌های گروه شاهد، فقط در مورد نمونه‌های تیمارشده با غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ میلی‌مول متیونین مشاهده‌گردید (p<۰/۰۵).

جدول ۶- میانگین± خطای استاندارد درصد نسبت سرعت خط مستقیم بر متوسط سرعت مسیر حرکت اسپرم در نمونه‌های مربوط به گروه‌های شاهد و تیمارشده با غلظت‌های مختلف اسیدآمینه متیونین

گروه مورد آزمایش	مدت زمان نگه‌داری اسپرم در دمای ۵ درجه سلسیوس برحسب ساعت				
	۱	۱۲	۲۴	۴۸	۶۰
شاهد	۷۶/۵۱±۰/۴۷^{a}	۷۰/۳۶±۱/۴۶	۷۴/۷±۰/۲^{a}	۶۸/۶۷±۰/۸۱	۵۵/۳۰±۰/۷۱^{b}
تیمار با متیونین ۱	۶۷/۵۵±۰/۳۴^{b}	۶۸/۸±۴/۴۸	۷۰/۴۰±۱/۷۳^{ab}	۶۸/۳±۴/۱	۶۴/۰۷±۱/۳۷^{a}
تیمار با متیونین ۲	۷۵/۷۵±۱/۹۰^{b}	۶۶/۸۷±۳/۴۵	۶۹/۸۳±۱/۳۹^{b}	۶۷/۸±۱/۷۰	۶۳/۶۲±۲/۱۱^{a}
تیمار با متیونین ۴	۷۴/۷۳±۱/۲۵^{b}	۷۳/۱۶±۲/۰۹	۷۳/۳۹±۲/۱۷^{ab}	۶۴/۲±۰/۰۴	۶۲/۵۷±۱/۵۱^{a}
تیمار با متیونین ۶	۷۴/۴۸±۰/۸۷^{b}	۶۸/۴±۱/۳۱	۷۳/۲±۰/۵۳^{ab}	۷۰/۵±۱/۴۳	۵۹/۹۷±۲/۸۱^{ab}

a,b, ...: در هر ستون میانگین‌های با حروف انگلیسی غیریکسان، اختلاف آماری معنی‌دار (p<۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر، داده‌های حاصله از تاثیر ۴ سطح مختلف از اسیدآمینه متیونین بر الگوی حرکتی اسپرم اپیدیدیمی بز، طی نگه‌داری در دمای ۵ درجه سلسیوس نشان داد که در زمان‌های ۱، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از نگه‌داری، متیونین اثر مطلوب بر اصلاح و بهبود شاخص‌های حرکتی اسپرم ندارد احتمالا" در زمانهای ۱، ۱۲ و ۲۴ ساعت، هنوز اسپرم بدون حضور متیونین، توانایی کافی در پاکسازی رادیکالهای آزاد دارد و اگر بعضاً عملکرد شاهد از گروه متیونین بهتر است شاید ناشی از استرس عدم تعادل محیط کشت حاوی اسپرم با متیونین در مراحل اول تحقیق باشد ولی در طی زمان ۶۰ ساعت (جداول ۱ الی ۶)، شاخص‌های حرکتی اسپرم، علی‌الخصوص در مورد اسپرم‌های تیمارشده با غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌مول از متیونین، نسبت به مقادیر شاخص‌های مذکور در نمونه‌های شاهد، به‌طور معنی‌دار بهتر بود (جداول ۱، ۳، ۵ و ۶)، (p<۰/۰۵).

در ارتباط با حفاظت از غشاء در برابر رادیکال‌های آزاد ناشی از متابولیسم اسپرم در محیط هوازی و نیز محافظت و پایداری غشاء اسپرم در زمان نگه‌داری در دمای ۵ درجه سلسیوس و یا در زمان انجماد، مواد محافظتی مختلفی به محیط کشت اسپرم اضافه می‌گردد که یکی از این مواد اسیدآمینه متیونین می‌باشد (Omur and Coyan, 2016; Indhu *et al*., 2021).

در بررسی چویان و همکاران، تحرک اسپرم قوچ نژاد مرینو، به‌دنبال تیمار با مقادیر ۱، ۲ و۴ میلی‌مول از اسیدآمینه متیونین، طی۷۲ ساعت نگه‌داری در دمای ۵ درجه سلسیوس یخچال ارزیابی‌گردید و نتایج نشان داد که همه سطوح استفاده شده از متیونین سبب افزایش تحرک اسپرم در زمان‌های مختلف می‌گردد. البته اختلاف آماری معنی‌دار در مطالعه فوق، در طی زمان ۷۲ ساعت نگه‌داری و در سطح ۱ میلی‌مول مشاهده گردید. نامبردگان گزارش کردند که نگه‌داری نمونه‌های اسپرم در محیط حاوی مکمل متیونین، سبب افزایش آنتی‌اکسیدان توکوفرول در مقایسه با نمونه‌های شاهد شده‌است و بهبود تحرک اسپرم در نمونه‌های تیمارشده با متیونین به علت تولید توکوفرول بوده‌است. از طرف دیگر، اعلام کردند که تاخیر در پاسخ‌دهی تا ۷۲ ساعت

احتمالاً می‌تواند ناشی از افزایش تدریجی سطح گلوتاتیون باشد (Çoyan *et al.*, 2010). در مطالعه حاضر نیز تاثیر معنی‌دار تیمار با متیونین در سطوح ۱ و ۲ میلی‌مول، در بهبود شاخص‌های حرکتی اسپرم در زمان ۶۰ ساعت مشاهده گردید (جداول ۱ الی۶) که در راستای نتایج تحقیق چویان و همکاران می‌باشد. همچنین در بررسی بوجاک و همکاران، شاخص‌های حرکتی اسپرم قوچ پس از استفاده از غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌مول متیونین در زمان‌های ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت نگه‌داری در حالت مایع و در دمای ۵ درجه سلسیوس بررسی گردید و نشان داد که شاخص‌های کیفیت منی، مثل زنده‌مانی و تحرک اسپرم تا زمان ۹۶ ساعت، در نمونه‌های اسپرم تیمارشده، نسبت به نمونه‌های شاهد، با اختلاف آماری معنی‌دار بیشتر بود (Bucak *et al*. 2012). نتایج تحقیق ما نیز در راستای یافته‌های بررسی فوق می‌باشد، چرا که اثرات سودمند استفاده از اسیدآمینه متیونین را به عنوان مکمل افزودنی به اسپرم، نشان داد (جداول۱ الی ۶). در مطالعه سِاری-اُزکان و همکاران نیز، در خصوص بررسی تاثیر متیونین در طی انجماد اسپرم گاو هلشتاین، گزارش شده که اسپرم‌های تیمارشده با مقدار ۲ میلی‌مول متیونین، متوسط سرعت مسیر حرکت، سرعت خط مستقیم و درصد خطی‌بودن کمتری نسبت به اسپرم‌های گروه شاهد داشتند. از طرفی هم سرعت خط منحنی و دامنه حرکت جانبی سر اسپرم و همچنین درصد باروری، در مورد اسپرم‌های تیمارشده با متیونین، از مقادیر شاخص-های فوق در نمونه‌های شاهد، بیشتر بود. البته اختلاف میانگین‌های به‌دست‌آمده از نمونه‌های گروه‌های شاهد و تیمارشده با متیونین، معنی‌دار نبود ولی درصد اسپرم‌های غیرطبیعی و موارد آسیب در DNA اسپرم‌ها، به طور معنی‌داری در مورد نمونه‌های تیمار از نمونه‌های گروه شاهد کمتر بود (Sarıözkan *et al.*, 2014). در مطالعه حاضر هم تاثیر تیمار اسپرم‌ها با استفاده از غلظت متیونین ۲ میلی‌مول، بر شاخص‌های حرکتی سنجش‌شده توسط سیستم نرم‌افزاری کاسا، نسبت به مقدار شاخص مذکور در نمونه‌های گروه شاهد بیشتر و در بسیاری موارد هم با تفاوت آماری معنی‌دار در میانگین‌های مربوطه، بود (جداول ۱ الی۶). نتایج بررسی ال باتاوی و ال ناتات هم که در سال ۲۰۱۸ در مورد نگه‌داری اسپرم بز در حالت مایع و در دمای ۵ درجه سلسیوس انجام شده، نشان داده که با افزایش زمان نگه‌داری اسپرم، تیمار با اسیدآمینه متیونین، سبب حفظ و بهبود معنی‌دار تحرک اسپرم در مقایسه با نمونه‌های شاهد می‌گردد (El-Battawy and El-Nattat, 2018). نتایج بررسی حاضر نیز که نشان داد متیونین باعث حفظ معنی‌دار شاخص‌های حرکتی اسپرم مایع ذخیره‌شده در دمای ۵ درجه سلسیوس شده (جداول ۱ الی۶)، در راستای تحقیق مذکور می‌باشد.

در بررسی تانسِر و همکاران هم اعلام شده که تیمار با اسیدآمینه متیونین، سبب بهبود شاخص‌های حرکتی اسپرم گاو در مقایسه با نمونه‌های اسپرم گروه شاهد گردیده و شاخص‌هایی مثل تحرک، سرعت خط منحنی، سرعت خط مستقیم و متوسط سرعت مسیر حرکت، در مورد اسپرم‌های تیمارشده با متیونین از نظر مقادیر عددی از میزان آن‌ها در مورد اسپرم‌های گروه شاهد بالاتر بوده‌است. البته اختلافات مشاهده‌شده در خصوص میانگین فاکتورهای مذکور، از نظر آماری معنی‌دار نبود (Tuncer *et al.*, 2021). در مطالعه حاضر

اگرچه تاثیر انجماد اسپرم بررسی نشد، منتهی تیمار با متیونین در مراحل آخر تحقیق، به‌طور معنی‌دار در بهبود شاخص‌های سرعت و تحرک اسپرم اپیدیدیم بز نقش خود را ثابت نمود (جداول ۱ الی۶).

در توجیه تاثیرات مثبت اسیدآمینه متیونین بر اکثر شاخص‌های حرکتی اسپرم در تحقیق حاضر، به نظر می‌رسد که متیونین احتمالاً با پاکسازی ROS از محیط، تاثیر مطلوب خود را آشکار نموده است، چرا که در تحقیقات مختلف استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدان مثل متیونین، توانایی حذف ROS و بهبود کیفیت اسپرم در شرایط آزمایشگاهی را اثبات کرده‌است (Rizkallah *et al.*, 2022). در این خصوص، گزارش شده که متیونین با داشتن گروه تیول، پتانسیل بالایی در پاکسازی ROS و بهبود کیفیت اسپرم در برنامه‌های تولیدمثلی دارد (Indhu *et al.*, 2021). همچنین عقیده بر این است که متیونین به عنوان پیش ساز اسیدآمینه گلوتاتیون، سلول اسپرم را در برابر آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کند و به‌ویژه در شوک سرمایی، نقش مراقبتی بسیار خوبی دارد. البته در خصوص نقش متیونین در حفظ یکپارچگی DNA، نتایج مطالعات متناقض بوده‌است ولی به‌هرحال متیونین در سم‌زدایی نیز نقش حیاتی دارد و گروه تیولی آن با اتصال به فلزات سمی، منجمله سرب، بافت‌ها را از آسیب آن‌ها خارج می‌سازد (Sarıözkan *et al.*, 2014).

اسیدآمینه متیونین در تقابل با اکسیدان‌ها در نقش متیونین سولفوکساید، اثرات مضر را از اسپرم دور می‌سازد. همچنین متیونین شاخص‌های حرکتی اسپرم قوچ را بهبود بخشیده و در حفظ تحرک اسپرم در دمای یخچال و تا ۷۲ ساعت بسیار عالی عمل می‌نماید. متیونین در سطح پائین ۱ و ۲ میلی‌مول تاثیر بهتری در بهبود کیفیت اسپرم اپیدیدیم نقش دارد. البته گزارش شده فعالیت مثبت متیونین در اسپرم انزالی، به علت کاهش غلظت، افزایش مصرف و ترکیب با اجزای پلاسما، کمتر از اسپرم اپیدیدیمی است (Naoman, 2023). لازم به ذکر است که در مطالعه حاضر نیز استفاده از مقادیر ۱ و ۲ میلی‌مول از اسیدآمینه متیونین در طی نگه‌داری در دمای ۵ درجه سلسیوس، تاثیر بهتری در بهبود الگوی حرکتی اسپرم اپیدیدیمی بز داشت (جداول۱ الی۶).

با توجه به یافته‌های مطالعهٔ حاضر، مشخص گردید که اسیدآمینه متیونین در حفظ و بهبود شاخص‌های حرکتی اسپرم اپیدیدیم بز در محیط کشت HTF، طی نگه‌داری به صورت مایع و در دمای ۵ درجه سلسیوس، در تیمار با مقادیر ۱ و مخصوصا ۲ میلی‌مول از آن، مؤثر عمل نموده‌است و به نظر می‌رسد که احتمالاً به عنوان آنتی‌اکسیدان با پاکسازی رادیکال‌های آزاد محیط کشت، در افزایش مدت زمان نگه‌داری اسپرم نقش دارد. البته ضروری است که برای ارائه نظرات دقیق‌تر در این خصوص، اثر متیونین بر کیفیت اسپرم اپیدیدیم، در محیط‌های کشت و نیز رقیق کننده‌های مختلف، قبل و بعد از انجماد و یخ‌گشایی بررسی گردد.

سپاسگزاری

تمامی داده‌های تحقیق، مستخرج از پایان نامه آقای مهران لطفی با کد ۱۰۳۱۰۵۰۱۹۳۲۰۲۸ می‌باشد. سیستم کاسا نیز با هزینه شخصی توسط نویسنده مسئول و از شرکت هوشمند فن‌آور تهران خریداری شده است. نویسندگان از مساعدت پرسنل محترم آزمایشگاه مرجع

کلینیک دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، کمال تقدیر و تشکر را دارند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافع ندارند.

منابع

- Abdy, K., Tajik, P.,Gasemzade, H., Kave., A.A. and Mirshokraei, P. (2008). The effect of different concentrations of citric acid on motility patterns of bovine epididymal sperms in Hams F10 milieu. Veterinary Clinical Pathology, 2(3): 217-239. [In Persian]
- Akhter, S., Ansari, M.S., Rakha, B.A., Ullah, N., Andrabi, S.M.H. and Khalid, M. (2011). In Vitro Evaluation of Liquid-stored Buffalo Semen at 5°C Diluted in Soya Lecithin Based Extender (Bioxcell®), Tris-Citric Egg Yolk, Skim Milk and Egg Yolk-Citrate Extenders. Reproduction in Domestic Animals, 46(1): 45-49.
- Allai, L., Benmoula, A., Marciane da Silva, M.M., Nasser, B. and El Amiri, B. (2018). Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. Animal Reproduction Science, 192: 6-17.
- Blash, S., Melican, D. and Gavin, W. (2000). Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. Theriogenology, 54(6): 899-905.
- Bucak, M.N., Çoyan, K., Öztürk, C., Güngör, S. and Ömür, A.D. (2012). Methionine supplementation improves ram sperm parameters during liquid storage at 5°C. Cryobiology, 65(3): 335-337.
- Coyan, K., Başpınar, N., Bucak, M.N. and Akalın, P.P. (2011). Effects of cysteine and ergothioneine on post-thawed Merino ram sperm and biochemical parameters. Cryobiology, 63(1): 1-6.
- Çoyan, K., Başpınar, N., Bucak, M.N., Akalın, P.P., Ataman, M.B., Ömür, A.D., et al. (2010). Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation, and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. Research in Veterinary Science, 89(3): 426-431.
- Çoyan, K., Bucak, M.N., Öztürk, C., Güngör, S. and Ömür, A.D. (2013). Methionine supplementation improves ram sperm parameters during liquid storage at 5°C. Reproductive Biology, 13: 23-26
- Dziekońska, A., Niedźwiecka, E., Niklewska, M.E., Koziorowska-Gilun, M. and Kordan, W. (2020). Viability longevity and quality of epididymal sperm stored in the liquid state of European red deer (Cervus elaphus elaphus). Animal Reproduction Science, 213, 106269.
- El-Battawy, K.A. and El-Nattat, W.S. (2018). Cryopreservation of buck semen with emphasis on its chilling and its characteristics after some amino acids supplementation. Current Sciences International, 7(4): 731-736.
- Fernández-Santos, M.D.R., Martínez-Pastor, D., Matias, A.E., Domínguez-Rebolledo, M.C., Esteso, V. Montoro, V., et al. (2009). Effects of long-term chilled storage of red deer epididymides on DNA integrity and motility of thawed spermatozoa. Animal Reproduction Science, 111(1): 93-104.
- Fernández-Santos, M.D.R., Soler, A.J., Ramón, M., Ros-Santaella, J.L., Maroto-Morales, A., García-Álvarez, O., et al. (2011). Effect of post-mortem time on post-thaw characteristics of Spanish ibex (Capra pyrenaica) S cc ccv nnnnnnnb bpermatozoa. Animal Reproduction Science, 129(1-2): 56-66.
- Giaretta, E., Munerato, M., Yeste, M., Galeati, G., Spinaci, M., Tamanini, C., et al. (2017). Implementing an open-access CASA software for the assessment of stallion sperm motility relationship with other sperm quality parameters. Animal Reproduction Science, 176 (Supplement C): 11-19.

- Guerrero, C.A., Gentry, G., Saenz, J., Bondioli, K.R. and Godke, R.A. (2008). 9 Birth of calves after artificial insemination with cryopreserved bovine epididymal spermatozoa harvested from postmortem bulls. Reproduction, Fertility and Development, 21(1): 105-105.
- Hajihassani, A., Ahmadi, E., Shirazi, A., Shams-Esfandabadi, N. (2019). Reduced glutathione in the freezing extender improves the in vitro fertility of ram epididymal spermatozoa. Small Ruminant Research, 174: 13-18.
- Indhu, M.S., Ramamoorthy, M., Pandey, S., Mathesh, K., Mahawar, M., Sarkar, M., et al., (2021). Improved quality and fertilizability of cryopreserved buffalo spermatozoa with the supplementation of methionine sulfoxide reductase A. Andrology, 9(6): 1943-1957.
- Martínez-Fresneda, L., Castaño, C., Bóveda, P., Tesfaye, D., Schellander, K., Santiago-Moreno, J., et al. (2019). Epididymal and ejaculated sperm differ on their response to the cryopreservation and capacitation processes in mouflon (Ovis musimon). Scientific Reports, 9(1): 15659.
- Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Tamayo-Canul, J., López-Urueña, E., de Paz, P., Anel, L., et al. (2014). Refrigerated storage of ram sperm in presence of Trolox and GSH antioxidants: Effect of temperature, extender and storage time. Animal Reproduction Science, 151(3-4): 137-147.
- Miró, J., Morató, R., Vilagran, I., Taberner, E., Bonet, S. and Yeste, M. (2020). Preservation of Epididymal Stallion Sperm in Liquid and Frozen States: Effects of Seminal Plasma on Sperm Function and Fertility. Journal of Equine Veterinary Science, 88: 102940.
- Monavvar., H.G., Moghaddam., G., Daghighkia., H. and Qasemi-Panahi, B. (2023). Evaluation of the characteristics of ram sperm diluted with Thymus vulgaris essential oil using phase-contrast microscope and CASA software. Veterinary Clinical Pathology, 17(65): 55-68. [In Persian]
- Naoman, U.T. (2023). A Comparative Study of Numerous Antioxidants Supplementation on Several Characteristics for Cooled Storage of Awassi Rams Epididymal Sperms. Egyptian Journal of Veterinary Sciences, 54(5): 797-804.
- Omur, A.D. and Coyan, K. (2016). Protective effects of the antioxidants curcumin, ellagic acid and methionine on motility, mitochondrial transmembrane potential, plasma membrane and acrosome integrity in freeze-thawed Merino ram sperm. Veterinarni Medicina, 61(1): 10-16.
- Rizkallah, N., Chambers, C.G., de Graaf, S.P. and Rickard, J. (2022). Factors Affecting the Survival of Ram Spermatozoa during Liquid Storage and Options for Improvement. Animals, 12(3): 244.
- Santiago-Moreno, J., Toledano-Díaz, A., Pulido-Pastor, A., Gómez-Brunet, A. and López-Sebastián, A. (2006). Birth of live Spanish ibex (Capra pyrenaica hispanica) derived from artificial insemination with epididymal spermatozoa retrieved after death. Theriogenology, 66(2): 283-291.
- Sariozkan, S., Bucak, M.N., Canturk, F., Ozdamar, S., Yay, A., Tuncer, P.B., et al. (2012). The effects of different sugars on motility, morphology and DNA damage during the liquid storage of rat epididymal sperm at 4 degrees C. Cryobiology, 65(2): 93-97.
- Sarıözkan, S., Bucak, M. N., Tuncer, P.B., Büyükleblebici, S. and Cantürk, F. (2014). Influence of various antioxidants added to TCM-199 on post-thaw bovine sperm parameters, DNA integrity and fertilizing ability. Cryobiology, 68(1): 129-133.
- Shi, L., Jin, T., Hu, Y., Ma, Z., Niu, H. and Ren, Y. (2020). Effects of reduced glutathione on ram sperm parameters, antioxidant status, mitochondrial activity and the abundance of hexose transporters during liquid storage at 5 ℃. Small Ruminant Research, 189: 106139.
- Sohail, A., Andrabi, S.M.H., Anwar, M., Ali, L. and Mehmood, A. (2013). Assessment of Buffalo Bull Semen Quality Based on Sperm Motility Parameters, Motion Characteristics and In Vitro Fertilization Rate. Pakistan Veterinary Journal, 33(1): 53-56.
- Tuncer, P.B., Sariozkan, S., Bucak, M.N. and Buyukleblebici, S. (2021). Antioxidant supplementation ameliorates bull sperm parameters and fertilizing abilityfollowing the freeze-thaw process. Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences, 45(3): 457-462.
- Turri, F., Madeddu, M., Gliozzi, T.M., Gandini, G. and Pizzi, F. (2014). Effect of testicle postmortem storage on goat frozen-thawed epididymal sperm quality as a tool to improve genebanking in local breeds. Animal, 8(3): 440-447.

- van der Horst, G. (2020). Computer Aided Sperm Analysis (CASA) in domestic animals: Current status, three D tracking and flagellar analysis. Animal Reproduction Science, 220: 106350.
- Zahmel, J., Skalborg Simonsen, K., Stagegaard, J., Palma-Vera, S.E. and Jewgenow, K. (2022). Current State of In Vitro Embryo Production in African Lion (Panthera leo). Animals, 12(11): 1424.