The University of Tehran Press

Iranian Journal of Animal Science

Online ISNN: 2008-4773

Homepage: http:// ijas.ut.ac.ir/

Effect of different levels of alpha-lipoic acid in egg yolk-based extender on the quality of frozen-thawed ram sperm

Moslem Mehdizadeh [1], Touba Nadri [2]✉, Farhad Farrokhi Ardebili [3], Saeed Zeinoldeni [4], Filipp Georgijevic Savvulidi [5]

1. Department of Animal Science, College of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran. E-mail: m.mehdizadeh@urmia.ac.ir
2. Corresponding author, Department of Animal Science, College of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran. E-mail: t.nadri@urmia.ac.ir
3. Department of Animal Science, College of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran. E-mail: f.farrokhi@urmia.ac.ir
4. Department of Animal Sciences, Faculties of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: zeinoaldini@ut.ac.ir
5. Department of Animal Science, Faculty of Agrobiology, Food and Natural Resources, Czech University, Prague, Kamýck´a, Czech Republic. E-mail: vargova.mmbd@gmail.com

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 28 December 2025

Received in revised form: 15 March 2026

Accepted: 21 March 2026

Published online: Atumn 2026

Keywords:

Freezing, Alpha-lipoic acid, Viability, Sperm, Ram.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of different levels of alpha-lipoic acid (ALA) (1, 2, and 4 µM; AL1, AL2, and AL4, respectively) on the quality of ram sperm after freezing and thawing. Ejaculates were collected weekly from four adult rams using an artificial vagina for six weeks. Semen was mixed and diluted with egg yolk extenders containing 1, 2, and 4 µM ALA, as well as egg yolk extender without ALA (control group). Motility, viability, and membrane functionality of sperm were evaluated after freezing. The results of this paper showed that the AL4 group showed significantly higher total motility (69.2±2.3) than the other groups. Also, AL4 had higher progressive motility (46.6±3.7) than the other treatments. Compared with the control group, the AL4 group showed significantly higher plasma membrane integrity (72.6±1.9 vs. 51.4±1.9) and plasma membrane activity (75.2±1.3 vs. 52.4±3.1). AL4 showed the highest percentage of live sperm (68.2±2.5) and the lowest percentage of dead sperm (22.3±1.9) ($P<0.05$). Therefore, it seems that the addition of 4 µM to the egg yolk-based extender can increase the quality and viability of ram sperm after cryopreservation.

Cite this article: Mehdizadeh, M., Nadri, T., Farrokhi-Ardebili, F., Zeinoldeni, S. & Georgijevis Svvaulidi, F.(2026). Effect of different levels of alpha-lipoic acid in egg yolk-based extender on the quality of frozen-thawed ram sperm. *Iranian Journal of Animal Science*, 57 **(**3**),** 509-518. DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2026.408705.654117

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2026.408705.654117

Extended Abstract

Introduction

Sperm cryopreservation decreases the quality of sperm, partly from oxidative stress, mainly affecting on cell membrane, sperm motility, mitochondrial activity, ATP production, and increasing DNA damage, diminishing post-thawing fertility. Small molecules like Alpha-lipoic acid are vital antioxidants and cofactors in mitochondrial activity and ROS metabolism . Artificial insemination is an effective tool for advancing the livestock industry, but structural and morphological damage to sperm during cryopreservation can reduce fertility **.** Among the damages that occur during the freeze-thaw process are the production of oxygen-free radicals (ROS), lipid peroxidation of the sperm membrane, DNA damage, and reduced sperm motility and viability. In this regard, the use of antioxidants in sperm extenders to reduce oxidative damage and improve sperm viability and fertility has been considered as an effective solution. Alpha-lipoic acid (ALA) is one of the most important natural antioxidants with unique properties that are active in both water-soluble and lipid-soluble forms and can directly inhibit ROS or exert its effect through the recovery of other antioxidants such as glutathione and vitamins C and E. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of different levels of Alpha-lipoic acid on ram sperm quality.

Materials and methods

Semen was collected with an artificial vagina from four mature rams once weekly for 6 wk. Ejaculates were immediately placed in a water bath (37 °C) and evaluated for color, volume, concentration, motility, and sperm morphology**.** The egg yolk-based extenders (EY) were prepared at concentrations of 15% (v/v). Then, the egg yolk-based extender was divided into four parts and assigned to the respective treatments, which included the control group (without ALA), egg yolk-based extender containing 1 µM ALA (AL1), egg yolk-based extender containing 2 µM ALA (AL2), and egg yolk-based extender containing 4 µM ALA (AL4).

Results and Discussion

In this experiment, increasing the level of alpha lipoic acid from 1 to 4 µM increased total motility. The AL4 group showed a significantly higher total motility (69.2±2.3) than the other groups, while the control group had the lowest total motility level (47.0±1.3). Also, the AL4 level had a higher progressive motility than the other treatments, although the difference between treatments was not significant (P>0.05). For sperm viability, all the extenders containing ALA yielded a higher proportion of viable sperm than the control; AL4 had the highest percentage of Plasma membrane integrity (72.6±1.9), and there was a significant difference with AL1 (57.8±1.9) and AL2 (60.5±1.9) treatments and the control group (51.4±1.9).

Conclusion

The use of 4 µM alpha-lipoic acid in semen extender for ram semen cryopreservation was found to be beneficial as a supplement for ram semen cryopreservation. Alpha-lipoic acid prevents ATP loss by maintaining sperm membrane integrity and activity and improving the efficiency of the electron transport chain, increasing total and progressive motility, and protecting cellular structures against oxidative stress.

Author Contributions

Moslem Mehdizade: Investigation, Data analysis; Touba Nadri: Conceptualization, Validation, Methodology, Software, Formal analysis, Writing - Original Draft, Supervision, Formal analysis, Investigation; Farhad Farrokhi: Software; Saeed Zeinoaldini: Supervision; Filipp Georgijevic Savvulidi; Methodology

Data Availability Statement

The data supporting the reported results are collected and used from published articles, to which we have referred in the manuscript.

Ethical considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.

انتشارات دانشگاه تهران

نشریه علوم دامی ایران، دوره ۵۷، شماره ۳

شاپا الکترونیکی: ۷۹۴۹-۲۴۲۳

Homepage: http://ijas.ut.ac.ir//

اثر سطوح مختلف آلفا لیپوییک اسید در رقیق کننده بر پایه زرده تخم مرغ بر کیفیت اسپرم قوچ پس از انجماد–ذوب

مسلم مهدیزاده[۱] | طوبی ندری[۲]✉ | فرهاد فرخی اردبیلی[۳] | سعید زین الدینی[۴] | فیلیپ جورجیویس ساوولیدی[۵]

۱. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: m.mehdizadeh@urmia.ac.ir.

۲. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: t.nadri@urmia.ac.ir

۳. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: f.farrokhi@urmia.ac.ir

۴. گروه علوم دامی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: zeinoaldini@ut.ac.ir

۵. گروه علوم دامی، دانشکده اگروبیولوژی، غذا و منابع طبیعی، دانشگاه چک، پراگ، کامیکسا، جمهوری چک. رایانامه: vargova.mmbd@gmail.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۰/۰۷

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۱۲/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۱/۰۱

تاریخ انتشار: پاییز ۱۴۰۵

چکیده

این مطالعه با هدف ارزیابی تأثیر سطوح مختلف آلفا–لیپوئیک اسید (ALA) (۱، ۲ و ۴ میکرومولار؛ به ترتیب AL1، AL2 و AL4) بر کیفیت اسپرم قوچ پس از انجماد و ذوب انجام شد. جمع آوری منی به مدت شش هفته و به صورت هفتگی از چهار قوچ بالغ با استفاده از واژن مصنوعی گرفته شد. منی با رقیق‌کننده‌های زرده تخم‌مرغ حاوی ۱، ۲ و ۴ میکرومولار ALA و رقیق‌کننده زرده تخم‌مرغ بدون ALA (گروه کنترل) مخلوط و رقیق شد. تحرک، زنده‌مانی وعملکرد غشای اسپرم پس از انجماد ارزیابی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که گروه AL4 به طور معنی داری تحرک کل (۶۹/۲±۲/۳) و تحرک پیشرونده (۴۶/۶±۳/۷) بالاتری نسبت به سایر گروه‌ها داشت. در مقایسه با گروه کنترل، گروه AL4 به طور قابل توجهی یکپارچگی غشای پلاسمایی (۷۲/۶±۱/۹ در مقابل ۵۱/۴±۱/۹) و فعالیت غشای پلاسمایی (۷۵/۲±۱/۳ در مقابل ۵۲/۴±۳/۱) بالاتری را نشان داد. AL4 بالاترین درصد اسپرم‌های زنده (۶۸/۲±۲/۵) و کمترین درصد اسپرم‌های مرده (۲۲/۱±۳/۹) را نشان داد ($P<0.05$). بنابراین، به نظر می‌رسد که افزودن ۴ میکرومولار به رقیق‌کننده انجمادی برپایه زرده تخم‌مرغ می‌تواند کیفیت و زندمانی اسپرم قوچ پس از انجماد را افزایش دهد.

کلیدواژه‌ها:

آلفا–لیپوئیک اسید، انجماد، اسپرم، قوچ ، زنده‌مانی.

استناد: مهدیزاده، مسلم؛ ندری، طوبی، فرخی اردبیلی، فرهاد؛ زین الدینی، سعید و جورجیویس ساوولیدی، فیلیپ (۱۴۰۵). اثر سطوح مختلف آلفا لیپوییک اسید در رقیق کننده بر پایه زرده تخم مرغ بر کیفیت اسپرم قوچ پس از انجماد–ذوب. *نشریه علوم دامی ایران*، ۵۷ (۳)، ۵۱۸-۵۰۹. DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2026.408705.654117

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2026.408705.654117

مقدمه

تلقیح مصنوعی ابزار مؤثری برای پیشرفت صنعت دامپروری است، اما آسیب‌های ساختاری و ریخت شناختی اسپرم در طی فرآیند انجماد می‌تواند باروری را کاهش دهد (Bailey *et al*., 2000). از جمله آسیب‌هایی که طی فرآیند انجماد-ذوب رخ می‌دهد می‌توان به تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS)، پراکسیداسیون لیپیدی[1] غشای اسپرم، تخریب و یا شکست DNA و کاهش تحرک و زنده‌مانی اسپرم اشاره کرد (Baumber *et al*., 2000). که بخشی از آن به دلیل تنش اکسیداتیو است و عمدتاً بر غشای سلولی، تحرک اسپرم، فعالیت میتوکندری و تولید انرژی تأثیر می‌گذارد و باروری پس از ذوب را کاهش می‌دهد (Ayaz *et al*., 2021). در این راستا، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در رقیق‌کننده‌های اسپرم به‌منظور کاهش آسیب‌های اکسیداتیو و بهبود قابلیت زنده‌مانی و باروری اسپرم، به‌عنوان راهکاری مؤثر مورد توجه قرار گرفته است(Sarıözkan *et al*., 2009).

یکی از آنتی اکسیدان‌هایی که اخیراً توجه زیادی را به خود جلب کرده است آلفا لیپوییک اسید می‌باشد. آلفا لیپوئیک اسید، یکی از آنتی‌اکسیدان‌ها و کوفاکتورهای حیاتی در فعالیت میتوکندری و تعادل آنتی اکسیدانی (Ayaz *et al*., 2021; Nadri *et al*., 2019; Packer *et al*., 1995). فزون بر این، ALA با کیلات کردن فلزهای سنگین، القای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان درون‌زا و حفظ ساختار میتوکندری، نقش کلیدی در حفظ عملکرد سلولی دارد (Bustamante *et al*., 1998). با توجه به اینکه اسپرم از نظر غشای پلاسمایی و میتوکندری بسیار حساس است، مکمل ALA می‌تواند یک استراتژی موثر برای افزایش مقاومت اسپرم در برابر استرس اکسیداتیو باشد (Bucak *et al*., 2010). آلفا لیپوئیک اسید ترکیبی است که به طور طبیعی در بدن وجود دارد و به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی خود شناخته شده است (Packer *et al*., 1995). این ترکیب می‌تواند با خنثی کردن رادیکال‌های آزاد و افزایش فعالیت سایر آنتی‌اکسیدان‌ها در بدن، استرس اکسیداتیو را کاهش دهد. در زمینه حفظ اسپرم، افزودن اسید لیپوئیک به رقیق‌کننده‌های بر پایه‌ی زرده تخم مرغ، شاخص‌های مختلف کیفیت اسپرم را بهبود بخشیده است (Packer *et al*., 1995). یکی از راهکارهای پیشنهادی برای کاهش آسیب اکسیداتیو به اسپرم، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در رقیق‌کننده‌های اسپرم است. آلفا لیپوئیک اسید، یک آنتی‌اکسیدان قوی محلول در چربی و آب است کهمی‌تواند با توانایی خود در بازسازی سایر آنتی‌اکسیدان‌ها مانند ویتامین‌های C و E، لیپیدهای غشای اسپرم را از پراکسیداسیون محافظت کند (Packer *et al*., 1995).

پیشینه پژوهش

پژوهش‌ها متعددی در گونه‌های دیگر، از جمله گاو و مرغ، نشان دادند که افزودن ALA به رقیق‌کننده اسپرم می‌تواند پارامترهای کیفیت اسپرم، از جمله تحرک، زنده‌مانی و سلامت DNA را بهبود بخشد (Ayaz *et al*., 2021; Partyka & Niżański, 2021). در اسپرم قوچ، آسیب ناشی از انجماد باعث کاهش شدید فعالیت کمپلکس‌های زنجیره تنفسی و افزایش نشت الکترون می‌شود که منجر به افزایش تولید ROS و چرخه خود تقویت‌کننده آسیب می‌شود (Zhang *et al*., 2024). الگوی مشابهی در گونه‌های دیگر گزارش شده است. در گاو، انجماد باعث کاهش شدید تحرک پیشرونده و زنده‌مانی می‌شود و سطح مالون دی آلدهید (نشانگر پراکسیداسیون لیپید) پس از یخ‌گشایی به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد (Behnam *et al*., 2023). در بز، افزایش ROS و کاهش یکپارچگی غشاء و آکروزوم پس از انجماد به طور مستقیم با کاهش باروری مرتبط است (Bucak et al., 2010; Tuncer *et al*., 2010). ایبراهیم و همکاران (۲۰۰۸) گزارش دادند که غلظت ۰/۰۲ میلی‌مول بر میلی‌لیتر اسید لیپوئیک به طور قابل توجهی تحرک اسپرم بز بوئر را پس از انجماد–ذوب بهبود بخشید (Ibrahim *et al*., 2008). شن و همکاران (۲۰۱۶) در مطالعه‌ای که روی اسپرم خوک و پس از انجماد انجام شد، گزارش کردند که غلظت شش میکروگرم اسید لیپوئیک موثرترین سطح برای افزایش تحرک اسپرم پس از انجماد است (Shen *et al*., 2016). مشاهده شده است که افزودن یک میلی‌مولار اسید لیپوئیک اثر محافظتی قابل توجهی بر سلامت ساختاری اسپرم بز پس از انجماد دارد (Avdatek *et al*., 2020). گزارش شده است که استفاده از ۰/۲۵میلی‌مولار ALA پس از ذوب اسپرم منجمد سبب بهبود پارامترهای حرکتی و غشایی شد، هرچند دوز بالاتر (یک میلی‌مولار) پس از شش ساعت انکوباسیون تأثیری منفی بر یکپارچگی DNA داشت (Lee *et al*., 2020). همچنین در فصول غیرتولیدمثل که کیفیت اسپرم کاهش می‌یابد، افزودن ALA یا آنتی اکسیدان ترولکس به رقیق‌کننده انجماد اسپرم، موجب افزایش تحرک اسپرم،

1. Reactive Oxygen Species

کاهش آسیب DNA، بهبود ساختار آکروزومی و کاهش شاخص‌های تنش اکسیداتیو مانند MDA شد (Gürler *et al.*, 2016). بنابراین هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی اثر سطوح مختلف آلفا–لیپوئیک اسید بر کیفیت اسپرم قوچ پس از انجماد و ذوب بود.

روش شناسی پژوهش

آلفا لیپوییک اسید از شرکت سیگما–آلدریچ (St. Louis, MO, USA) خریداری شد و سایر مواد شیمیایی موجود در بافر از شرکت مرک (Darmstadt, Germany) خریداری شد.

تعداد ۲۴ نمونه اسپرم از چهار راس قوچ نژاد قزل با سن ۲ تا ۳ سال جمع‌آوری شد. جمع‌آوری منی به صورت دستی با استفاده از مهبل مصنوعی انجام شد. بلافاصله پس از جمع‌آوری، هر نمونه منی از نظر رنگ، حجم، غلظت، تحرک اسپرم، زنده‌مانی (یکپارچگی غشای پلاسما)، مورفولوژی و تحرک ارزیابی شد. فقط نمونه‌های منی که معیارهای کیفی زیر را داشتند در مطالعه گنجانده شدند: تحرک $\geq$ ٪ ۸۰، غلظت $\leq$ ۹۰۰×۱۰^{۶} اسپرم در میلی‌لیتر و مورفولوژی غیرطبیعی $\geq$ ۱۰ درصد. این آزمایش دو بار در هفته و به مدت سه هفته تکرار شد (Nadri *et al.*, 2025).

رقیق‌کننده‌های بر پایه تریس و زرده تخم‌مرغ (EY) با غلظت ۱۵ درصد (v/v) تهیه شدند. سپس، رقیق‌کننده بر پایه زرده تخم‌مرغ به چهار قسمت تقسیم شد و به تیمارهای مربوطه اختصاص داده شد که شامل گروه کنترل (بدون ALA)، رقیق‌کننده بر پایه زرده تخم‌مرغ حاوی یک میکرومولار ALA (AL1)، رقیق‌کننده بر پایه زرده تخم‌مرغ حاوی دو میکرومولار ALA (AL2) و رقیق‌کننده بر پایه زرده تخم‌مرغ حاوی چهار میکرومولار ALA (AL4) بود.

منی به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق (حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد و سپس به مدت ۲/۵ ساعت برای رسیدن به دمای تعادل در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. منی سرد شده در پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری (L'Agile France ،Biovet) با تراکم ۵ ×۱۰^{۷} اسپرم در میلی‌لیتر ریخته شد و سپس با پودر پلی‌وینیل الکل بسته شدند. پایوت‌ها به مدت ۱۲ دقیقه در فاصله چهار سانتی‌متری بخار نیتروژن مایع، قرار گرفتند تا منجمد شوند. سپس، پایوت‌ها برای نگهداری در نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند. پس ازگذشت دو هفته یخگشایی نمونه‌ها به صورت جداگانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه در حمام آب یخ‌زدایی و ارزیابی شدند.

پارامترهای حرکتی اسپرم با استفاده از آنالیزهای کامپیوتری (CASA; 12.3 CEROS, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA) ارزیابی شدند. حداقل ۲۰۰ اسپرم در هر نمونه تحت شرایط استاندارد و با حفظ دمای ثابت ۳۷ درجه سانتیگراد در طول آنالیز ارزیابی شدند. نسبت کل اسپرم‌های متحرک (TM٪) و اسپرم‌های متحرک پیشرونده (PM ٪) اندازه‌گیری شد. علاوه بر این، پارامترهای حرکتی زیر برای هر نمونه ارزیابی شدند: سرعت خط مستقیم (VSL، میلی‌متر بر ثانیه)، سرعت منحنی (VCL، میلی‌متر بر ثانیه)، سرعت متوسط مسیر (VAP، میلی‌متر بر ثانیه)، خطی بودن (LIN٪؛ محاسبه شده به صورت VSL/VCL)، فرکانس ضربدری ضربدری (BCF، هرتز)، مستقیم بودن (STR، درصد؛ محاسبه شده به صورت VSL/VAP) و دامنه جابجایی جانبی سر (ALH، میلی‌متر).

ارزیابی زنده مانی اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی ائوزین–نیگروزین ارزیابی شد. فرآیند رنگ‌آمیزی شامل ترکیب ۱۰ میکرولیتر مایع منی با ۲۰ میکرولیتر رنگ روی یک اسلاید از قبل گرم شده و سپس حذف سریع رنگ با استفاده از اسلاید دوم بود. پس از خشک شدن، اسپرم‌های با غشای یکپارچه و مرده با میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگنمایی x ۴۰۰ بررسی شدند. اسپرم‌هایی که رنگ بنفش را نشان می‌دادند به عنوان غیر زنده طبقه‌بندی شدند، در حالی که اسپرم‌هایی که کاملاً فاقد رنگ بودند به عنوان زنده طبقه‌بندی شدند (Bucak *et al.*, 2007).

آزمایش یکپارچگی غشا (HOSt)، بر اساس وجود دم‌های پیچ خورده اسپرم در معرض محلول هیپواسموتیک، برای ارزیابی عملکرد غشای پلاسمایی استفاده شد. این سنجش با انکوباسیون ۱۰ میکرولیتر مایع منی با یک میلی‌لیتر محلول ۱۰۰ میلی‌اسمول در لیتر (۵۷/۶ میلی‌مولار فروکتوز و ۱۹/۲ میلی‌مولار سیترات سدیم) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انجام شد. مخلوط‌ها همگن شدند و سپس با میکروسکوپ نوری (Olympus CX31، ژاپن) معکوس با بزرگنمایی x ۴۰۰ بررسی شدند، و حداقل ۲۰۰ اسپرم در حداقل پنج میدان میکروسکوپی مجزا ارزیابی شدند. درصد اسپرم‌های دارای دم پیچ خورده و خمیده ثبت شد (Nadri *et al.*, 2025).

ریخت شناسی در نمونه‌هایی شامل ۱۵ میکرولیتر نمونه اسپرم تثبیت شده در ۳۰۰ میکرولیتر محلول هانکوک تحت میکروسکوپ فاز کنتراست (Olympus CKX41، ژاپن) با بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر تجزیه و تحلیل شد. در مجموع ۲۰۰ اسپرم در هر نمونه برای تعیین درصد کل ناهنجاری‌های اسپرم، از جمله ناهنجاری‌های سر، سرهای جدا شده، نقص‌های قطعه میانی و ناهنجاری‌های دم، مورد ارزیابی قرار گرفتند (Nadri *et al.*, 2025).

داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS (version 9.1, 2002, Cary, NC, USA) آنالیز شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و شش تکرار انجام و آزمون نرمالیتی داده‌ها با استفاده از رویه univariate انجام شد. تفاوت میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی بررسی و داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین نشان داده شده‌اند. مدل آماری برای تجزیه و تحلیل داده ها به صورت $Yij= \mu + Ti + eij$ بود، که در آن Yij : مقدار هر مشاهده، μ: اثر میانگین، Ti: اثر تیمارهای آزمایشی، eij: اثرات باقیمانده.

یافته‌های پژوهش

نتایج جنبایی و فراسنجه‌های سرعت اسپرم در جدول ۱ نشان داده شده است نتایج این پژوهش نشان داد که گروه AL4 بیشترین جنبایی کل را داشت (۶۹/۲) که تفاوت معنی داری با گروه AL1 (۵۳/۹) و AL2 (۵۷/۱) و گروه کنترل (۴۷/۱) نشان داد. سایر فراسنجه‌های حرکتی در این پژوهش تحت تاثیر تیمارها قرار نگرفتند (جدول۱).

جدول ۱. اثر سطوح مختلف آلفا لیپوییک اسید بر ویژگی‌های حرکتی و فراسنجه‌های سرعت اسپرم منجمد- ذوب شده قوچ، نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است **(P <۰/۰۵)**

Table 1. Effects of different level of Alpha-lipoic Acid on the kinematic parameters of post-thaw ram sperm. Results are mean ± SEM. (P<0.05).

EY	AL4	AL2	AL1	Group
2.3^{c} ± 47.1	69.2±2.3^{a}	57.1± 2.3^{b}	53.9±2.3^{bc}	**Total motility (%)**
31.8±3.7^{b}	46.6 ±3.7^{a}	3.7^{ab} 41.1±	3.7^{b} 37.3±	**Progressive motility (%)**
22±1.7	23±1.7	22±1.7	21±1.7	**VSL (µm/s)**
34±2.3	35±2.3	35±2.3	34±2.3	**VAP (µm/s)**
88±2.5	85±2.5	83±2.5	80±2.5	**VCL (µm/s)**
27±2.1	28±2.1	22±2.1	25±2.1	**LIN (%)**
66±2.3	65±2.3	63±2.3	61±2.3	**STR (%)**
2.3±1.3	2.4±1.3	2.1±1.3	2.6±1.3	**ALH (µm)**

حروف کوچک (a و b و c) در ردیف‌ها نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در تیمارهای مختلف است. AL1: رقیق کننده حاوی ۱ میکرومولار آلفا لیپوئیک اسید، AL2: رقیق کننده حاوی ۲ میکرومولار آلفا لیپوئیک اسید،AL4: رقیق کننده حاوی ۴ میکرومولار آلفا لیپوئیک اسید، ، EY: رقیق کننده بر پایه ۱۵ درصد زرده تخم مرغ VSL: سرعت اسپرم در خط مستقیم، VCL : سرعت واقعی اسپرم در مسیر طی شده، VAP: میانگین سرعت در مسیر مستقیم LIN: معیار خطی بودن حرکت اسپرم که برحسب درصد، STR: معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم برحسب درصد ALH: بیشترین دامنه حرکت‌های جانبی بر حسب میکرومتر،

نتاج حاصل از رنگ آمیزی اِئوزین- نیگروزین در جدول شماره ۲ آورده شده است. نتایج این ارزیابی نشان داد که افزودن آلفا لیپوییک اسید سبب بهبود یکپارچگی غشای اسپرم قوچ شد. به طوری که تیمار AL4 (۷۲/۶) بالاترین یکپارچگی غشای سلول را نشان دادند همچنین تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای AL1 و AL2 با گروه کنترل وجود داشت که نشان دهنده اثر محافظتی آلفا لیپوییک اسید بر غشای اسپرم می‌باشد. کمترین درصد یکپارچگی غشای سلول مربوط به گروه کنترل ۵۱/۴) بود که تفاوت معنی داری با L2 و گروه کنترل نشان داد .

نتایج ارزیابی یکپارچگی غشا در جدول شماره ۲ نشان داده شده است نتایج این آزمون نشان داد که تیمار AL4 بیشترین درصد فعالیت غشای پلاسمایی (۳/۱ ± ۷۵/۲) را داشت که با تیمارهای A L2، AL1 و کنترل تفاوت معنی داری (به ترتیب ۵۹/۶ و ۶۴/۶) داشت.

نتایج حاصل از ارزیابی ریخت شناختی در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. نتایج به دست آمده از این ارزیابی نیز نشان داد که از نظر ریخت شناختی، تیمار AL4 بیشترین درصد با ریخت شناسی طبیعی را نشان داد و با سایر تیمارها تفاوت معنی داری داشت.

جدول ۲. اثر سطوح مختلف آلفا لیپوییک اسید بر زنده مانی، یکپارچگی غشاء و ریخت شناختی اسپرم منجمد– ذوب شده قوچ، نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است (P <۰/۰۵)

Table 2. Effect of different level of Alpha-lipoic Acid on post-thaw ram sperm viability, membrane integrity, and morphology. Results are mean ± SEM. (P<0.05).

	Group			
	AL1	AL2	AL4	EY
Viability	57.8±1.9^{b}	60.5±1.9^{b}	72.6±1.9^{a}	51.4±1.9^{c}
Cell membrane integrity	59.6±3.1^{bc}	64.6±3.1^{c}	75.2±3.1^{a}	52.4±3.1^{c}
Morphology	90.8±0.9^{b}	93.6±0.9^{b}	96.4±0.9^{a}	87.4±0.9^{c}

حروف کوچک (a و b) در ردیف‌ها نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در تیمارهای مختلف است. AL1: رقیق کننده حاوی ۱ میکرومولار آلفا لیپوئیک اسید، AL2: رقیق کننده حاوی ۲ میکرومولار آلفا لیپوئیک اسید،AL4: رقیق کننده حاوی ۴ میکرومولار آلفا لیپوئیک اسید، ، EY: رقیق کننده بر پایه ۱۵ درصد زرده تخم مرغ

بحث

پژوهش کنونی به بررسی تأثیر سطوح مختلف آلفا–لیپوئیک اسید بر کیفیت اسپرم قوچ پس از انجماد و یخ‌گشایی پرداخت. تحرک اسپرم، زنده مانی، یکپارچگی غشای اسپرمو ریخت شناسی اسپرم پس از انجماد و ذوب ارزیابی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن چهار میکرومولار آلفا–لیپوئیک اسید، تحرک کل و پیشرونده اسپرم قوچ را پس از انجماد و یخ‌گشایی افزایش داد. آلفا لیپوئیک اسید قادر به کاهش آسیب اکسیداتیو به اسپرم و حفظ پارامترهای حرکتی بهینه است.

ایبراهیم و همکاران (۲۰۰۸) خاطرنشان کردند که غلظت ۰/۰۲ میلی‌مول بر میلی‌لیتر اسید لیپوئیک به طور قابل توجهی تحرک اسپرم بز بوئر را پس از انجماد–ذوب بهبود بخشید(Ibrahim *et al*., 2008). در مطالعه‌ای بر روی اسپرم خوک پس از انجماد–ذوب، گزارش شد که غلظت شش میکروگرم اسید لیپوئیک موثرترین سطح برای افزایش تحرک اسپرم پس از یخ‌گشایی است(Kasimanickam *et al*., 2006). این نتایج با یافته‌های مطالعه حاضر مطابقت دارد و نشان می‌دهد که اسید لیپوئیک می‌تواند کیفیت اسپرم را پس از انجماد–یخ‌گشایی بهبود بخشد. البته، غلظت بهینه اسید لیپوئیک ممکن است بین گونه‌های مختلف و شرایط ذخیره‌سازی مختلف متفاوت باشد. در مطالعه حاضر، اثر مثبت چهار میکرومولار اسید آلفا لیپوئیک بر تحرک کل و تحرک پیشرونده اسپرم قابل توضیح است. یکی از مهمترین سازوکارها این اثرات مثبت آلفا لیپوییک اسید، کاهش استرس اکسیداتیو در سلول‌های اسپرم است. لیپوئیک اسید توانایی بالایی در حذف ROS و در نتیجه جلوگیری از آسیب به پروتئین‌ها و لیپیدهای غشایی دارد که به نوبه خود ساختار و عملکرد اندامک‌هایی مانند میتوکندری را حفظ می‌کند (Shen *et al*., 2016). مطالعه‌ای روی اسپرم قوچ نشان داده است که افزودن لیپوئیک اسید میزان ROS و MDA را کاهش داده و همزمان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل را افزایش داده است که با بهبود تحرک کل همراه بوده است (Başpınar *et al*., 2011; Pires *et al*., 2025). علاوه بر این، با حمایت از عملکرد میتوکندری و تثبیت پتانسیل غشای میتوکندری، لیپوئیک اسید می‌تواند منجر به افزایش تولید ATP شود که منبع اصلی انرژی برای تحرک اسپرم است (Onder *et al*., 2022). در شرایط عملکرد خوب میتوکندری، سنتز ATP افزایش می‌یابد و انرژی مورد نیاز برای تحرک سلولی تأمین می‌شود. این امر به ویژه زمانی

اهمیت دارد که تنش سرمایی یا تنش اکسیداتیو عملکرد سلول را تهدید می‌کند (Dong *et al.*, 2022). در مطالعه‌ای تیمار با آلفا لیپوییک اسید به طور قابل توجهی پتانسیل غشای میتوکندری و ATP را در اسپرم قوچ افزایش داد که با بهبود جنبایی کل همبستگی داشت و نقش حیاتی این مکانیسم را تأیید کرد (Sun *et al.*, 2024).

در مطالعه حاضر، زنده مانی و یکپارچگی غشا در تیمار حاوی چهار میکرومولار آلفا لیپوئیک اسید به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود که نشان دهنده نقش محافظتی لیپوئیک اسید بر ساختار غشای اسپرم است. گزارش شده است که لیپوئیک اسید می‌تواند یکپارچگی غشای اسپرم قوچ را پس از انجماد–ذوب بهبود بخشد (Başpınar *et al.*, 2011). همچنین در مطالعه دیگریگزارش شده است که افزودن یک میلی‌مولار لیپوئیک اسید اثر محافظتی قابل توجهی بر یکپارچگی ساختاری اسپرم بز پس از انجماد دارد (Canepa *et al.*, 2018). این نتایج با یافته‌های مطالعه حاضر مطابقت دارد. مطالعات پایه نشان می‌دهد که آسیب غشاء یکی از اولین و حساس‌ترین پاسخ‌های اسپرم به شوک سرمایی و فرآیندهای رقیق‌سازی است (Avdatek *et al.*, 2019). تغییرات در سیالیت غشاء، جداسازی بین فسفولیپیدهای غشاء و پروتئین‌ها و تخریب ساختار دولایه فسفولیپید توسط پراکسیداسیون لیپید، همگی منجر به از دست رفتن عملکرد طبیعی غشاء، نفوذپذیری غیرطبیعی یون و در نهایت کاهش زنده‌مانی و باروری می‌شوند (Lacalle *et al.*, 2021). مطالعات متعدد در گوسفند، بز، گاو و خوک نشان داده‌اند که شاخص‌هایی مانند درصد فعالیت غشای سلول (که با آزمایش‌هایی مانند HOSt اندازه‌گیری می‌شوند) پس از انجماد–ذوب کاهش می‌یابند و این کاهش مستقیماً با افزایش مالون دی آلدئید و سایر نشانگرهای پراکسیداسیون لیپید مرتبط است (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2024; Lopez Rodriguez *et al.*, 2012; Nadri *et al.*, 2019). مطالعات اخیر در گوسفند، که اثرات لیپوئیک اسید را بررسی کرده‌اند، نشان داده‌اند که افزودن لیپوئیک اسید به رقیق‌کننده می‌تواند درصد یکپارچگی غشاء و یکپارچگی آکروزوم را به طور قابل توجهی افزایش دهد، که احتمالاً با کاهش پراکسیداسیون لیپید و تثبیت ساختار فسفولیپید همراه است (Sun *et al.*, 2024). غشای پلاسمایی اسپرم حاوی مقدار زیادی اسیدهای چرب غیراشباع است که به سرعت اکسید می‌شوند و می‌توانند به اسپرم آسیب برسانند (Bucak *et al.*, 2010; Ustuner *et al.*, 2018). علاوه بر این، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تولید شده توسط متابولیسم اسپرم می‌تواند باعث آسیب پراکسیداتیو به ساختار اسپرم قوچ شود. از آنجایی که لیپوئیک اسید هم در چربی و هم در آب محلول است، پس از جذب توسط غشای اسپرم، می‌تواند با دولایه فسفولیپید و اجزای مایع اطراف اسپرم تعامل داشته باشد (Aitken & Baker, 2006). در نهایت، یک لایه محافظ روی سطح غشای اسپرم تشکیل می‌شود که مقاومت آن را در برابر حمله رادیکال‌های آزاد افزایش می‌دهد و به حفظ یکپارچگی ساختاری اسپرم کمک می‌کند (Han *et al.*, 1997). در سطح بیوشیمیایی، پایداری غشای پلاسما به ترکیب اسید چرب و نسبت اشباع/غیراشباع بستگی دارد (Han et al., 1997). اسیدهای چرب غیراشباع که در غشای اسپرم فراوان هستند، به پراکسیداسیون بسیار حساس هستند و این فرآیند اثرات مضری بر سیالیت غشا و عملکرد پروتئین‌های غشایی دارد (Nadri *et al.*, 2025; Najafi *et al.*, 2021). با توجه به حلالیت دوگانه اسید لیپوئیک، این مولکول می‌تواند وارد قسمت‌های لیپوفیلیک غشا شود و با کاهش تولید رادیکال‌ها با مهار منابع تولید ROS، از شروع زنجیره پراکسیداسیون لیپید جلوگیری کند (Collodel *et al.*, 2020).

نتیجه‌گیری

استفاده از چهار میکرومولار آلفا لیپوئیک اسید در رقیق‌کننده برای انجماد اسپرم قوچ، اثرات مفیدی بر کیفیت اسپرم قوچ پس از انجماد نشان داد. آلفا–لیپوئیک اسید با حفظ زنده مانی و یکپارچگی غشای اسپرم و بهبود کارایی زنجیره انتقال الکترون، از هدر رفت ATP جلوگیری می‌کند و سبب افزایش جنبایی کل و جنبایی پیشرونده و حفظ ساختارهای سلولی در برابر استرس اکسیداتیو می‌شود.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

REFERENCES

Aitken, R. J., & Baker, M. A. (2006). Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Molecular and cellular endocrinology*, *250*(1-2), 66-69 .

Álvarez-Rodríguez, M., Tomás-Almenar, C., Nieto-Cristóbal, H., & de Mercado, E. (2024). Evaluation of different thawing protocols on Iberian boar sperm preserved for 10 years at different liquid nitrogen levels. *Animals*, *14*(6), 914 .

Avdatek, F., Inanç, M., Yeni, D., Güngör, Ş., Acar, A., & Ata, A. (2020). Effect of alpha lipoic acid and trehalose on ram semen cryopreservation .

Avdatek, F., Yengdot over˜, D., Bgdot over˜ rdane, M., & Gündoğan, M. (2019). Influence of trolox and alpha-lipoic acid on post-thawed pırlak ram sperm parameters, oxidative stress and DNA damage in non-breeding season .

Ayaz, M., Ahmed, A., Khan, M., Yousaf, M., Din, B., & Riaz, A. (2021). Addition of alpha-lipoic acid in semen extender improves post-thaw antioxidant profile and semen quality of achai (Bos indicus) cattle bulls. *JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences*, *31* .(۳)

Bailey, J. L., BLODEAU, J. F., & Cormier, N. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon minireview. *Journal of andrology*, *21*(1), 1-7 .

Başpınar, N., Çoyan, K., Bucak, M. N., Ömür, A. D., Ataman, M. B., Akalın, P .P., Güngör, Ş., & Öztürk, C. (2011). Effect of lipoic acid on spermatological and biochemical parameters following equilibration and freeze-thawing of ram semen. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, *27*(2), 87-92 .

Baumber, J., Ball, B. A., GRAVANCE ,C. G., Medina, V., & DAVIES-MOREL, M. C. (2000). The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *Journal of andrology*, *21*(6), 895-902 .

Behnam, M., Asadpour, R., Topraggaleh, T. R., & Hamali, H. (2023). Improvement of post-thaw quality and fertilizing ability of bull spermatozoa using Rho kinase inhibitor in freezing extender. *Frontiers in veterinary science*, *10*, 1155048 .

Bucak, M. N., Ateşşahin, A., Varışlı, Ö., Yüce, A., Tekin, N., & Akçay, A. (2007). The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. *Theriogenology*, *67*(5), 1060-1067 .

Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Sarıözkan, S., Başpınar, N., Taşpınar, M., Çoyan, K., Bilgili, A., Akalın, P. P., Büyükleblebici, S., & Aydos, S. (2010). Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiology*, *61*(3), 248-253 .

Bustamante, J., Lodge, J. K., Marcocci, L., Tritschler, H. J., Packer, L., & Rihn, B. H. (1998). α-Lipoic acid in liver metabolism and disease. *Free radical biology and medicine*, *24*(6), 1023-10 .۳۹

Canepa, P., Dal Lago, A., De Leo, C., Gallo, M., Rizzo, C., Licata, E., Anserini, P., Rago, R., & Scaruffi, P. (2018). Combined treatment with myo-inositol, alpha-lipoic acid, folic acid and vitamins significantly improves sperm parameters of sub-fertile men: a multi-centric study. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, *22* .(۲۰)

Collodel, G., Castellini, C., Lee, J. C.-Y., & Signorini, C. (2020). Relevance of fatty acids to sperm maturation and quality. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2020*(1), 7038124 .

Dong, L., Yang, F., Li, J., Li, Y., Yu, X., & Zhang, X. (2022). Effect of oral alpha-lipoic acid (ALA) on sperm parameters: a systematic review and meta-analysis. *Basic and Clinical Andrology*, *32*(1), 23 .

Gürler, H., Malama ,E., Heppelmann, M., Calisici, O., Leiding, C., Kastelic, J., & Bollwein, H. (2016). Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*, *86*(2), 562-571 .

Han, D., Sen, C. K ,.Roy, S., Kobayashi, M. S., Tritschler, H. J., & Packer, L. (1997). Protection against glutamate-induced cytotoxicity in C6 glial cells by thiol antioxidants. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *273*(5), R17–۷۱\R1778 .

Ibrahim, S. F., Osman, K., Das, S., Othman, A. M., Majid, N. A., & Rahman, M. P. A. (2008). A study of the antioxidant effect of alpha lipoic acids on sperm quality. *Clinics*, *63*, 545-550 .

Kasimanickam, R., Pelzer, K. D., Kasimanickam, V., Swecker, W. S., & Thatcher, C. D. (2006). Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. *Theriogenology*, *65*(7), 1407-1421 .

Lacalle, E., Núñez, A., Fernández-Alegre, E., Crespo-Félez, I., Domínguez, J. C., Alonso, M. E., González-Urdiales, R., & Martínez-Pastor, F. (2021). Cold-shock test is a practical method for selecting boar ejaculates yielding appropriate seminal plasma for post-thawing supplementation . *Animals*, *11*(3), 871 .

Lee, S. H., Kim, Y. J., Kang, B. H., Yun, Y. S., & Park, C. K. (2020). The relationship between acrosome reaction and polyunsaturated fatty acid composition in boar sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, *55*(5), 624-631 .

Lopez Rodriguez, A., Rijsselaere, T., Vyt, P., Van Soom, A., & Maes, D. (2012). Effect of dilution temperature on boar semen quality. *Reproduction in Domestic Animals*, *47*(5), e63-e66 .

Nadri, T., Towhidi, A., Zeinoaldini, S., Gholami, D., Riazi, G., & Martínez-Pastor, F. (2025). Impact of particle size of nanoliposomes on the biological response of frozen-thawed sperm in Holstein bulls. *Cryobiology*, *118*, 105208 .

Nadri, T., Towhidi, A., Zeinoaldini, S., Martínez-Pastor, F., Mousavi, M., Noei, R., Tar, M., & Sangcheshmeh, A. M. (2019). Lecithin nanoparticles enhance the cryosurvival of caprine sperm. *Theriogenology*, *133*, 38-44 .

Najafi, A., Kia, H. D., & Hamishehkar, H. (2021). Does alpha-lipoic acid–loaded nanostructured lipid carriers improve post-thawed sperm quality and ameliorate apoptosis-related genes of rooster sperm? *Poultry science*, *100*(1), 357-365 .

Onder, N. T., Alcay, S., & Nur, Z. (2022). Effects of alpha-lipoic acid on ram semen cryopreservation and post-thaw life span. *Andrologia*, *54*(1), e14249 .

Packer, L., Witt, E. H., & Tritschler, H. J. (1995). Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free radical biology and medicine*, *19*(2), 227-250 .

Partyka, A., & Niżański, W. (2021). Supplementation of avian semen extenders with antioxidants to improve semen quality—Is it an effective strategy? *Antioxidants*, *10*(12), 1927 .

Pires, I. Z., Gobbo, M. O. d. S., Sudo, R. Y. U., Milbradt, T. L., Marquardt Filho, N., Carvalhal, G. F., & Ros, C. T. D. (2025). Efficacy of alpha lipoic acid supplementation in sperm parameters: A systematic review and Meta-Analysis of randomized trials. *International braz j urol*, *51*, e20240614 .

Sarıözkan, S., Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Ulutaş, P. A., & Bilgen, A. (2009). The influence of cysteine and taurine on microscopic–oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology*, *58*(2), 134-138 .

Shen, T., Jiang, Z.-L., Li, C.-J., Hu, X.-C., & Li, Q.-W. (2016). Effect of alpha-lipoic acid on boar spermatozoa quality during freezing–thawing. *Zygote*, *24*(2), 259-265 .

Sun, X., Zhang, L., Kang, Y., Wang, X., Jiang, C., Wang, J., Sohail, T., & Li, Y. (2024). Alpha-lipoic acid improves the quality of ram spermatozoa stored at 4 C by reducing oxidative stress and increasing mitochondrial potential. *Frontiers in veterinary science*, *10*, 1345016 .

Tuncer, P. B., Bucak, M. N., Sariozkan, S., Sakin, F., Atessahin, A., Kulaksiz, R., & Cevik, M. (2010). The Effect of Antioxidants on Post-Thawed Angora Goat (Capra hircus ancryrensis) Sperm Parameters, Lipid Peroxidation, and Antioxidant Activities. In: Oxford University Press.

Ustuner, B., Gokce, E., Toker, M., Onder, N., Soylu, M., Sagirkaya, H., & Nur, Z. (2018). Effect of sperm pooling with seminal plasma collected in breeding or nonbreeding season on Saanen goat sperm cryosurvival. *Andrologia*, *50*(4), e12968 .

Zhang, L., Sun, Y., Jiang, C., Sohail, T., Sun, X., Wang, J., & Li, Y. (2024). Damage to mitochondria during the cryopreservation, causing ROS leakage, leading to oxidative stress and decreased quality of ram sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, *59*(10), e14737 .