

# ผลของ Dimethylacetamide ในน้ำยาแช่แข็งต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่พ่อพันธุ์

## Effect of Dimethylacetamide in Cryopreservation Medium on the Quality of Rooster Semen

ศศิธร แก้วสิมมา

Sasithon Kaeosimma

ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

### บทคัดย่อ

การเก็บรักษาอสุจิด้วยการแช่แข็งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและสำคัญในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่ ในการวิจัยพบว่ามีสารป้องกันการแช่แข็งแบบซึมผ่านได้ (Permeant CPAs) ที่มีประสิทธิภาพในการแช่แข็งอสุจิไก่ โดย ไดเมทิลอะซีตาไมด์ (Dimethylacetamide หรือ DMA) เป็นสารที่ได้รับความนิยม เนื่องจากมีความสามารถในการซึมผ่านเมมเบรนเซลล์สูงและไม่รบกวนการทำงานของเซลล์ อย่างไรก็ตาม หากใช้ความเข้มข้นที่สูงอาจทำให้เกิดความเป็นพิษและทำลายเซลล์อสุจิได้ สัมมนาฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ Dimethylacetamide ในสูตรน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พ่อพันธุ์ต่อคุณลักษณะของอสุจิภายหลังการทำละลาย โดยการรวบรวมและศึกษาข้อมูลจากเอกสารทางวิชาการจำนวน 3 ฉบับ ซึ่งการเสริม DMA ในสูตรน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พ่อพันธุ์พื้นเมืองและไก่พ่อพันธุ์ผสมต่อคุณลักษณะของอสุจิที่ระดับความเข้มข้น 0, 3, 6 และ 9% พบว่าการเติมสาร DMA ต่ออสุจิที่ระดับความเข้มข้น 0, 3, 6 และ 9% ทำให้มีการเคลื่อนที่แบบหมุนของตัวอสุจิ และอัตราการรอดชีวิตของตัวอสุจิที่เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกรณีไม่เติมสาร DMA แต่ในทางตรงกันข้ามพบว่าคุณภาพของตัวอสุจิมีการเพิ่มมากขึ้น โดยพบว่าการเติมที่ระดับ 6% ตัวอสุจิมีประสิทธิภาพสูงสุด และจากการเติมสาร DMA ต่ออสุจิที่ระดับความเข้มข้น 0, 3, 9% พบว่าการเคลื่อนที่แบบหมุนของตัวอสุจิ และอัตราการทำงานของตัวอสุจิไม่ได้สูงมาก สรุปได้ว่า การเติมสาร DMA ในระดับ 6% สามารถช่วยลดการสูญเสียของตัวอสุจิ ปรับปรุงคุณภาพด้านอัตราการเคลื่อนที่ และลดอัตราการความผิดปกติของตัวอสุจิภายหลังการทำละลาย

คำสำคัญ: ไก่พ่อพันธุ์ ไดเมทิลอะซีตาไมด์ การแช่แข็งน้ำเชื้อ คุณภาพน้ำเชื้อ

## บทนำ

การเก็บรักษาอสุจิด้วยการแช่แข็งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและสำคัญในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่ โดยเฉพาะในกรณีที่เกี่ยวข้องกับการสูญพันธุ์ส่งต่อการวิจัย และการนำไปใช้ในอนาคต อย่างไรก็ตาม แม้ว่าการแช่แข็งอสุจิ (Sperm cryopreservation) จะมีศักยภาพสูงในอุตสาหกรรมสัตว์ปีก แต่ยังมีข้อจำกัดในด้านเศรษฐกิจ เนื่องจากอัตราการเจริญพันธุ์ของอสุจิที่ถูกแช่แข็งและละลายน้ำแช่แข็งนั้นค่อนข้างต่ำ อสุจิของสัตว์ปีกมีลักษณะเฉพาะทางเซลล์ที่แตกต่างจากสัตว์อื่น ๆ เช่น ปริมาณไฮโดรพลาสซึม ไมโทคอนเดรีย และสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณต่ำ รวมทั้งกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในระดับสูง ทำให้มีความเสี่ยงสูงต่อความเสียหายและลดลงของอัตราการเจริญพันธุ์หลังจากการแช่แข็งและละลายน้ำแช่แข็ง นั่นทำให้การใช้ประโยชน์จากอสุจิที่แช่แข็งในอุตสาหกรรมสัตว์ปีกยังคงมีข้อจำกัดในการวิจัยพบว่ามีสารป้องกันการแช่แข็งแบบซึมผ่านได้ (Permeant CPAs) ที่มีประสิทธิภาพในการแช่แข็งอสุจิได้แก่ กลีเซอรอล (Glycerol หรือ GLY) และ ไดเมทิลอะซิตาไมด์ (Dimethylacetamide หรือ DMA) โดย DMA เป็นสารที่ได้รับความนิยม เนื่องจากมีความสามารถในการซึมผ่านเมมเบรนเซลล์สูงและไม่รบกวนการทำงานของชีวภาพของเซลล์ นอกจากนี้ DMA ยังไม่จำเป็นต้องกำจัดออกก่อนการใช้ในการผสมเทียม ซึ่งแตกต่างจาก GLY อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่า DMA อาจมีผลกระทบต่ออสุจิที่แช่แข็ง/ละลายน้ำแช่แข็ง โดยการทำงานของเมมเบรนและการเกิดปฏิกิริยาอะโครโซมอาจเปลี่ยนแปลงได้หลังจากการสัมผัสกับ DMA นอกจากนี้ อัตราการเจริญพันธุ์ที่ได้จากอสุจิที่แช่แข็งด้วย DMA ยังต่ำและมีความผันผวนตั้งแต่ 10 ถึง 77%

### ผลของ Dimethylacetamide ในน้ำยาแช่แข็งต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังการละลาย (Motility)

Mosca et al. (2019) ได้ทำการศึกษาและเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของ Dimethylacetamide และ N-methylacetamide ต่อคุณภาพและความสมบูรณ์ของน้ำเชื้อไก่หลังการละลายน้ำแช่แข็ง โดยใช้ความเข้มข้นที่ 6 และ 9% ผลการทดลองพบว่ากลุ่มที่ใช้ Dimethylacetamide ความเข้มข้นที่ 6 และ 9% มีการเคลื่อนที่ (motility) และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motility) ไม่พบความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างสองกลุ่ม ( $P>0.05$ , Table 1) ซึ่งสอดคล้องกับ Mosca et al. (2016) ที่ได้ทำการศึกษา Dimethylacetamide ความเข้มข้นที่ 0, 3, และ 6% พบว่าการเคลื่อนที่ (motility) และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motility) ไม่พบความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างสามกลุ่ม ( $P>0.05$ , Table 2) ในขณะที่ Mehaisen et al. (2022) ได้ทำการศึกษาผลของ Dimethylacetamide ที่มีความเข้มข้น 3, 6 และ 9% ต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่หลังการละลายน้ำแช่แข็ง พบว่ากลุ่มทดลองที่ใช้ Dimethylacetamide ความเข้มข้นที่ 6% มีการเคลื่อนที่ (motility) และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motility) สูงกว่ากลุ่มทดลองที่ใช้ Dimethylacetamide ความเข้มข้นที่ 3 และ 9% อย่างมีนัยสำคัญ ( $P<0.05$ , Table 3)

จากงานทั้ง 3 งาน พบว่าการใช้ Dimethylacetamide ในน้ำยาแช่แข็งช่วยทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิดีขึ้น เพราะ Dimethylacetamide เป็นสารป้องกันการเยือกแข็งที่แทรกซึมเข้าเซลล์ได้ดี แต่มันมีความเป็นพิษ การใช้

DMA ในระดับความเข้มข้น 6% เป็นทางเลือกที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่ เนื่องจากระดับนี้ให้ค่าการเคลื่อนที่ของอสุจิสูงสุด ช่วยลดความเสี่ยงจากพิษของสารเคมี และมีการใช้ทรัพยากรอย่างมีประสิทธิภาพที่สุด โดยหากเลือกใช้ความเข้มข้นต่ำกว่า (3%) อาจไม่สามารถป้องกันเซลล์จากการเกิดผลึกน้ำแข็งได้ ขณะที่ใช้ความเข้มข้นสูงกว่า (9%) อาจทำให้สารเคมีที่มีพิษส่งผลเสียต่อโครงสร้างของอสุจิ (Mehaisen et al., 2022)

**Table 1** Sperm quality traits (LS Means  $\pm$  S.E.) measured in fresh and frozen/thawed semen cryopreserved using permeant cryoprotectants at different concentration: dimethylacetamide (DMA) 6 and 9% and N-methylacetamide (NMA) 6 and 9%

Sperm traits <sup>1</sup>	Fresh semen	Frozen/thawed semen				S.E.
		DMA	NMA	6%	9%	
Viability (%)	87.9 <sup>A</sup>	47.5 <sup>B</sup>	26.8 <sup>C</sup>	32.2 <sup>E</sup>	42.0 <sup>D</sup>	1.2
Motility (%)	89.4 <sup>A</sup>	30.0 <sup>B</sup>	16.0 <sup>C</sup>	21.8 <sup>E</sup>	24.2 <sup>D</sup>	1.0
Progressive motility (%)	20.8 <sup>A</sup>	1.4 <sup>B</sup>	0.6 <sup>B</sup>	1.3 <sup>D</sup>	0.8 <sup>E</sup>	0.4
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	56.3 <sup>A</sup>	34.4 <sup>B</sup>	31.1 <sup>C</sup>	34.1 <sup>D</sup>	31.3 <sup>E</sup>	0.8
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	21.8 <sup>A</sup>	9.3 <sup>B</sup>	8.8 <sup>B</sup>	9.5 <sup>D</sup>	8.6 <sup>D</sup>	0.4
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	35.2 <sup>A</sup>	18.1 <sup>B</sup>	16.2 <sup>C</sup>	17.6 <sup>D</sup>	16.6 <sup>D</sup>	0.5
LIN (%)	38.9 <sup>A</sup>	27.1 <sup>B</sup>	28.4 <sup>B</sup>	28.0 <sup>D</sup>	27.5 <sup>D</sup>	0.9
STR (%)	61.8 <sup>A</sup>	51.4 <sup>C</sup>	54.5 <sup>B</sup>	54.2 <sup>D</sup>	51.6 <sup>E</sup>	0.6
WOB (%)	62.8 <sup>A</sup>	52.8 <sup>B</sup>	52.0 <sup>B</sup>	51.5 <sup>D</sup>	53.3 <sup>D</sup>	1.1
ALH ( $\mu\text{m}$ )	2.9 <sup>A</sup>	2.7 <sup>B</sup>	2.2 <sup>C</sup>	2.6 <sup>D</sup>	2.3 <sup>E</sup>	0.1
BCF (Hz)	8.2 <sup>A</sup>	6.0 <sup>B</sup>	5.0 <sup>C</sup>	6.0 <sup>D</sup>	5.1 <sup>E</sup>	0.2

<sup>1</sup>Viability, percentage viable spermatozoa; motility, percentage motile spermatozoa; progressive motility, spermatozoa swim forward fast in a straight line; VCL, curvilinear velocity; VSL, straight-line velocity; VAP, average path velocity; ALH, amplitude of lateral head displacement; BCF, beat cross frequency; LIN (VSL/VCL  $\times$  100), linearity; STR (VSL/VAP  $\times$  100), straightness and WOB (VAP/VCL  $\times$  100), wobble.

<sup>A,B</sup> Values within a row with no common superscripts differ significantly at  $P < 0.001$  within CPA.

<sup>C,D</sup> Values within a row with no common superscripts differ significantly at  $P < 0.001$  within C.

**Source:** Mosca et al. (2019)

**Table 2** Sperm quality parameters (LSMeans±7SE) measured in fresh semen and in semen frozen according to the following treatments: 0.1M trehalose+0% dimethylacetamide (DMA-0), 0.1 M trehalose 3% dimethylacetamide (DMA-3), 0.1 M trehalose 6% dimethylacetamide (DMA-6)

Sperm parameters <sup>a</sup>	Fresh	DMA-0	DMA-3	DMA-6	S.E.
Viability (%)	87.9 <sup>A</sup>	4.3 <sup>B</sup>	31.8 <sup>C</sup>	37.1 <sup>C</sup>	2.0
Motility (%)	81.7 <sup>A</sup>	8.0 <sup>B</sup>	24.2 <sup>C</sup>	29.1 <sup>C</sup>	2.1
Progressive motility (%)	14.1 <sup>A</sup>	0.1 <sup>B</sup>	1.5 <sup>B</sup>	1.2 <sup>B</sup>	1.3
VCL (µm/s)	47.4 <sup>A</sup>	25.7 <sup>B</sup>	35.6 <sup>C</sup>	33.7 <sup>C</sup>	1.5
VSL (µm/s)	17.0 <sup>A</sup>	4.6 <sup>B</sup>	10.1 <sup>C</sup>	9.3 <sup>C</sup>	0.8
VAP (µm/s)	28.3 <sup>A</sup>	10.2 <sup>B</sup>	18.4 <sup>C</sup>	17.8 <sup>C</sup>	1.0
LIN (%)	35.7 <sup>A</sup>	17.9 <sup>B</sup>	28.1 <sup>C</sup>	27.7 <sup>C</sup>	1.0
STR (%)	59.8 <sup>A</sup>	45.2 <sup>B</sup>	54.4 <sup>C</sup>	52.5 <sup>C</sup>	1.1
WOB (%)	59.6 <sup>A</sup>	39.3 <sup>B</sup>	51.6 <sup>C</sup>	52.7 <sup>C</sup>	0.9
ALH (µm)	2.8 <sup>A</sup>	0.9 <sup>B</sup>	2.5 <sup>C</sup>	2.7 <sup>C</sup>	0.1
BCF (Hz)	7.9 <sup>A</sup>	0.7 <sup>B</sup>	6.1 <sup>C</sup>	5.4 <sup>C</sup>	0.4

<sup>A,B</sup> Values within each row with different superscript letters are significantly different (P < 0.001).

<sup>a</sup> Viability, the percentage of viable spermatozoa; motility, the percentage of motile spermatozoa; progressive motility, spermatozoa swim forward fast in a straight line; VCL, curvilinear velocity; VSL, straight-line velocity; VAP, average path velocity; LIN (VSL/VCL x 100), linearity; STR (VSL/VAP x 100) straightness; WOB (VAP/VCL x 100); ALH, amplitude of lateral head displacement; BCF, beat cross frequency.

**Source:** Mosca et al. (2016)

### ผลของ Dimethylacetamide ในน้ำยาแช่แข็งต่ออัตราการมีชีวิตรอด (Viability)

Mehaisen et al. (2022) พบว่ากลุ่มที่ใช้ Dimethylacetamide ความเข้มข้นที่ 6% มีอัตราการมีชีวิตรอด (Viability) มากกว่ากลุ่มที่ใช้ Dimethylacetamide ความเข้มข้นที่ 3 และ 9% อย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05, Table 3) และสูงที่สุดในการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับ Mosca et al. (2016) ที่ได้ทำการศึกษา Dimethylacetamide ความเข้มข้นที่ 0, 3, และ 6% พบว่าอัตราการมีชีวิตรอด (Viability) ของกลุ่มที่ใช้ Dimethylacetamide ความเข้มข้นที่ 6% มีอัตราการมีชีวิตรอด (Viability) สูงที่สุดมากกว่ากลุ่มที่ใช้ Dimethylacetamide ความเข้มข้นที่ 0 และ 3% แต่ไม่พบความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่ใช้ Dimethylacetamide ความเข้มข้นที่ 3 และ 6% (P>0.05, Table 2) ในขณะที่ Mosca et al. (2019) พบว่ากลุ่มที่ใช้ Dimethylacetamide ความเข้มข้นที่ 9% มีอัตราการมีชีวิตรอด (Viability) สูงที่สุดในการทดลองมากกว่ากลุ่มที่ใช้ Dimethylacetamide ความเข้มข้นที่ 6% ซึ่งพบความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05, Table 3)

Dimethylacetamide ที่ระดับ 6% ช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของอสุจิ โดยการรักษาความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิของไก่ ช่วยลดความเสี่ยงจากการได้รับสารเคมีที่มีความเข้มข้นสูงซึ่งอาจมีพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity) และอาจส่งผลกระทบต่อความสามารถในการปฏิสนธิในขั้นตอนถัดไป (Zaniboni et al., 2022)

**Table 3** Effect of dimethylacetamide (DMA) concentration in semen freezing extender on the motion characteristics of rooster sperm after thawing

Parameters	DMA Concentration			SEM
	3%	6%	9%	
Viability (%)	66.7 <sup>b</sup>	85.6 <sup>a</sup>	74.8 <sup>ab</sup>	5.00
Motility sperm (%)	59.1 <sup>ab</sup>	64.9 <sup>a</sup>	55.2 <sup>b</sup>	2.6
PROG (%)	33.2 <sup>ab</sup>	38.2 <sup>a</sup>	30.5 <sup>b</sup>	1.9
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	63.9	63.8	61.1	3.23
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	126.5	124.2	120.0	6.43
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	34.9	35.5	34.6	1.71
STR (%)	54.5	55.2	56.5	2.19
LIN (%)	27.8	28.3	28.8	1.64
WOB (%)	50.3	51.0	50.7	1.18
ALH ( $\mu\text{m}$ )	5.5	5.4	5.3	0.16
BCF (Hz)	27.3	26.3	25.5	0.73

Data are presented as means  $\pm$  standard error of means (SEM). Means with different superscripts, within parameters, are significantly different ( $p < 0.05$ ). PROG: progressive motility; VAP: velocity average line ( $\mu\text{m/s}$ ); VCL: velocity curved line ( $\mu\text{m/s}$ ); VSL: velocity straight line ( $\mu\text{m/s}$ ); STR: straightness (VSL/VAP%); LIN: linearity (VSL/VCL%); WOB: wobble (VAP/VCL%); ALH: amplitude of lateral head displacement ( $\mu\text{m}$ ); BCF: beat cross frequency ( $\text{H}_z$ ).

**Source:** Mehaisen et al. (2022)

### ผลของ Dimethylacetamide ในน้ำยาแช่แข็งต่อคุณสมบัติเกี่ยวกับการเคลื่อนไหวและความเร็ว

Mehaisen et al. (2022) พบว่ากลุ่มที่ใช้ Dimethylacetamide ความเข้มข้นที่ 3, 6 และ 9% มีอัตราความเร็วในหลายด้าน เช่น ความเร็วเส้นโค้ง ความเร็วเส้นตรง ความเร็วเฉลี่ย และคุณสมบัติการเคลื่อนที่อื่น ๆ ของทุกกลุ่มไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $P > 0.05$ , Table 3) ซึ่งสอดคล้องกับ Mosca et al. (2016) ที่ได้ทำการศึกษา Dimethylacetamide ความเข้มข้นที่ 0, 3, และ 6% พบว่าอัตราความเร็วในหลายด้าน เช่น ความเร็วเส้นโค้ง ความเร็วเส้นตรง ความเร็วเฉลี่ย และคุณสมบัติการเคลื่อนที่อื่น ๆ ของทุกกลุ่มไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $P > 0.05$ , Table 2) ในขณะที่ Mosca et al. (2019) พบว่าการใช้ Dimethylacetamide ความเข้มข้นที่ 6 และ 9% มีอัตราความเร็วในหลายด้าน เช่น ความเร็วเส้นตรง ความเร็วเฉลี่ย และคุณสมบัติการเคลื่อนที่อื่น ๆ ของทุกกลุ่มไม่แตกต่าง

กันทางสถิติ ( $P>0.05$ , Table 1) แต่ยังมีคุณสมบัติการเคลื่อนที่อื่น ๆ ที่แตกต่างกัน เช่น ความเร็วเส้นโค้ง ความเป็นเส้นตรง และแอมพลิจูด อย่างมีนัยสำคัญ ( $P<0.05$ , Table 1) สรุปได้ว่าการใช้ Dimethylacetamide 3, 6 และ 9% มีความเร็วที่ดีขึ้นในหลายด้าน ซึ่งดีกว่ามากเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ใช้ Dimethylacetamide 0% การใช้ Dimethylacetamide ในระดับความเข้มข้น 3, 6 หรือ 9% ช่วยเพิ่มความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิ ใก้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมหลังการละลาย อสุจิที่ได้รับการปกป้องด้วย DMA ในความเข้มข้นที่เหมาะสม (3%, 6%, 9%) มีคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ซึ่งช่วยให้การควบคุมสารภายในเซลล์เป็นไปอย่างปกติและลดการเสียหายของศักย์ไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้ไมโทคอนเดรียสามารถผลิต ATP (พลังงาน) ได้อย่างมีประสิทธิภาพเพื่อขับเคลื่อนหางอสุจิ นอกจากนี้ โครงสร้างแอกโซนิม (Axoneme) ภายในหางอสุจิที่ได้รับการปกป้องยังทำให้การโบกพัดของหางมีประสิทธิภาพมากขึ้น พร้อมทั้งลดการสูญเสียเอ็นไซม์และโปรตีนที่สำคัญ ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นต่อกระบวนการผลิตพลังงานและการเคลื่อนที่ของอสุจิอย่างมาก (Sasaki et al., 2010) นอกจากนี้ ยังสามารถเลือกใช้ Dimethylacetamide ในช่วงความเข้มข้นที่กว้าง (3-9%) โดยไม่มีผลกระทบต่อความเร็วหลักของอสุจิ อย่างไรก็ตาม หากพิจารณาความสมบูรณ์ของรูปแบบการว่ายน้ำ การเลือกใช้ความเข้มข้นในระดับกลางที่ประมาณ 6% จะเป็นตัวเลือกที่ดีที่สุดในการรักษาคุณภาพของอสุจิอย่างมีประสิทธิภาพ (Zaniboni et al., 2014)

### สรุป

Dimethylacetamide ที่ความเข้มข้น 6% เป็นระดับที่ดีที่สุด เพราะช่วยรักษาอัตราการมีชีวิตรอดและการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังการละลายได้อย่างมีประสิทธิภาพ หากใช้ความเข้มข้นที่สูงหรือต่ำกว่านี้ อาจทำให้เกิดความเป็นพิษและทำลายเซลล์อสุจิได้

### เอกสารอ้างอิง

- Mosca, Fabio, Luisa Zaniboni, Ahmad Abdel Sayed, Manuela Madeddu, Nicolaia Iaffaldano and Silvia Cerolini. 2019. "Effect of dimethylacetamide and N-methylacetamide on the quality and fertility of frozen/thawed chicken semen". *Poultry Science*. 98 (12): 6071–6077.
- Mosca, Fabio, Manuela Madeddu, Ahmad Abdel Sayed, Luisa Zaniboni, Nicolaia Iaffaldano and Silvia Cerolini. 2016. "Data on the positive synergic action of dimethylacetamide and trehalose on quality of cryopreserved chicken sperm". *Data in Brief*. 9: 1118–1121.
- Mehaisen, G. M. K., Elomda, A. M., Hamad, S. K., Ghaly, M. M., Sun, Y., Li, Y., Zong, Y., Chen, J., Partyka, A., Nazmi, A., Abbas, A. O. and Stino, F. K. R. 2022. "Effect of Dimethylacetamide Concentration on Motility, Quality, Antioxidant Biomarkers, Anti-Freeze Gene Expression, and Fertilizing Ability of Frozen/Thawed Rooster Sperm". *Animals*. 12 (20): 2739.

- Sasaki, K.; Tatsumi, T.; Tsutsui, M.; Niinomi, T.; Imai, T.; Naito, M.; Tajima, A.; Nishi, Y. "A Method for Cryopreserving Semen from Yakido Roosters Using N-Methylacetamide as a Cryoprotective Agent. Jap". **Poult. Sci.** 2010, 47, 297–301.
- Zaniboni, L.; Madeddu, M.; Mosca, F.; Sayed, A.A.; Marelli, S.P.; di Iorio, M.; Iaffaldano, N.; "Cerolini, S. Concentration Dependent Effect of Dimethylacetamide and N-Methylacetamide on the Quality and Fertility of Cryopreserved Chicken Semen". *Cryobiology* 2022, 106, 66–72.
- Zaniboni, L.; Cassinelli, C.; Mangiagalli, M.G.; Gliozzi, T.M.; Cerolini, S. "Pellet Cryopreservation for Chicken Semen: Effects of Sperm Working Concentration, Cryoprotectant Concentration, and Equilibration Time during in Vitro Processing". **Theriogenology** 2014, 82, 251–258.