مقاله تحقیقی

بررسی غلظتهای مختلف گلیسرول و زرده تخم مرغ بر تحرک اسپرم قوچ نژاد بختیاری پس از انجماد- ذوب مایع منی

✎ محسن فروزانفرPh.D*، محمد فضیلتی.Ph.D **، سید مرتضی حسینیDVM***، فریبا مولوی.B.Sc***

مهدی حاجیان.M.Sc***، سمیه اسدا... صالحی .B.Sc****، اسدا... ربیعی .B.Sc****، محمد حسین نصر اصفهانی.Ph.D***

* گروه علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی مرودشت

** گروه صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

*** گروه جنین شناسی پژوهشکده رویان اصفهان

**** ایستگاه توسعه پرورش و اصلاح نژاد گوسفندی لری بختیاری شهرکرد

تاریخ وصول: بهمن‌ماه ۸۵، تاریخ پذیرش: اردیبهشت‌ماه ۸۶

چکیده

هدف: تعیین غلظتهای بهینه گلیسرول و زرده تخم مرغ به منظور انجماد مایع منی قوچ

مواد و روشها: جمع آوری مایع منی توسط واژن مصنوعی انجام شد. از هر قوچ دو انزال پی درپی به‌صورت یک روز در میان جمع آوری شد. نمونه‌ها با محیطهای انجماد فوق به روش یک مرحله‌ای رقیق شدند و تا دمای ۵درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت به‌صورت تدریجی سرد شدند، سپس به داخل نی‌های انجماد ۰/۵ ml کشیده شدند. نی‌ها به مدت ۱۲ دقیقه در بخار نیتروژن قرار داده شدند و برای ذخیره نهایی در نیتروژن مایع نگهداری شدند.

یافته‌ها: نتایج حاصل ازاین تحقیق نشان داد که هر چند در تمام گروه‌های تیماری، اسپرمهای قوچ پس از انجماد ـ ذوب دارای تحرک بودند ولی درصد تحرک در گروه‌های مختلف تیماری با یکدیگر متفاوت است.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل ازاین تحقیق بیانگر این است که هر چند درصد تحرک اسپرم پس از انجماد- ذوب در تمام گروه‌های تیماری در مقایسه با حالت قبل از انجماد کاهش معنی داری ($p\leq0.05$) را نشان می‌دهد ولی در بین گروه‌های تیماری ،گروه E10G4(۱۰درصد زرده تخم مرغ و ٤درصد گلیسرول)، کمترین (۳/٤درصد) وگروه E20G8(۲۰درصد زرده تخم مرغ و ۸درصد گلیسرول)، بیشترین (٤۸درصد) درصد تحرک اسپرم را پس از انجماد ذوب نشان دادند.

کلیدواژه‌ها: اسپرم قوچ، انجماد ـ ذوب، گلیسرول، زرده

مقدمه

حفظ انجمادی (Cryopreservation) گامت، شامل در معرض قرار دادن ابتدایی گامتها با مواد محافظ انجماد (Cryoprotectant)، کاهش دما به زیر صفر درجه سانتیگراد، ذخیره، ذوب و سرانجام حذف ماده محافظ انجماد و بازگشت به حالت طبیعی فیزیولوژیکی گامت است. امروزه تلاشهای

✎ آدرس مکاتبه: اصفهان، پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی

صندوق پستی: ۸۱۵۸۹٦۸٤۳۳ E-mail: mh_nasr@med.mui.ac.ir

قابل ملاحظه‌ای روی تکوین تکنیکهای تلقیح مصنوعی در گوسفند با استفاده از اسپرم منجمد شده قوچ در حال انجام است. انجماد و ذخیره مایع منی قوچ، شامل قراردادن مایع منی در ازت مایع و در نتیجه توقف واکنشهای متابولیکی اسپرم است. بدین وسیله می‌توان طول زمان باروری (Fertile life) اسپرم را افزایش داد. از مزایای منجمد کردن اسپرم قوچ می‌توان به بارور نمودن همزمان تعداد زیادی میش با استفاده از اسپرم قوچهای با نژاد برتر، انتقال آسان مایع منی از مرکز تولید و جمع آوری به دورترین دامداریها، ذخیره ژنها برای استفاده آینده و تضمین در مقابل از دست دادن نرهای منحصر به فرد اشاره نمود.

هر چند در اغلب گاوداریهای سنتی، نیمه صنعتی و صنعتی کشورمان تلقیح مصنوعی، به طور معمول از اسپرم منجمد شده گاو استفاده می‌شود، با این حال استفاده از این روش در گوسفند با مشکلاتی از جمله بقاء و تحرک کم اسپرمها بعد از فرایند انجماد- ذوب همراه است. بقای اسپرم قوچ پس از انجماد ـ ذوب متاثر از فاکتورهای متعددی از قبیل نوع و غلظت اجزای مورد استفاده در محیط انجماد مایع منی، غلظت گلیسرول یا سایر مواد محافظ کننده در برابر انجماد، کیفیت روش انجماد – ذوب و همچنین کیفیت مایع منی مورد استفاده برای انجماد است [۲،۱و۳]. بنابراین استفاده از محیط انجماد مناسب مایع منی قوچ که بتواند از اسپرمها در برابر آسیبهای انجماد- ذوب محافظت کند و بقای و تحرک اسپرم را بعد از انجماد ـ ذوب حفظ کند،گام مهمی در جهت استفاده از تلقیح مصنوعی در گوسفند است.

تمام روشهای انجماد سلولی بر اساس استفاده از یک یا چند ماده محافظ انجماد است. گلیسرول، دی متیل سولفوکساید (DMSO) و اتیلن گلیکول، عوامل محافظ انجمادی درون سلولی یا نفوذ کننده هستند، که وزن مولکولی آنها نسبتا کم است (MW<100). اسپرم گونه‌های پستانداران عموما به کمک گلیسرول به عنوان ماده محافظ انجماد، منجمد می‌شود. گلیسرول یک ماده قابل نفوذ به درون سلول است. افزودن گلیسرول به مایع منی قبل از انجماد، شامل مرحله موازنه است که طی‌این مرحله آب درون سلولی اسپرم به‌واسطه شیب اسمزی خارج شده و گلیسرول جایگزین آن می شود و بدین ترتیب مانع تشکیل کریستالهای یخ درون سلولی شده و سلولها را در برابر آسیب حاصل از تشکیل کریستالهای یخ محافظت می‌کند [٤، ٥و٦]. به‌علاوه زرده تخم مرغ نیز یک جزء معمول تشکیل دهنده محیط انجمادها است و با عمل روی غشای سلولی، اسپرم را در برابر شوک سرما محافظت می‌کند [۷]. از طرف دیگر غلظت گلیسرول می‌تواند توسط میزان زرده تخم مرغ موجود در محیط انجماد تحت تاثیر قرار گیرد [۸]. این تحقیق به منظور بررسی آثار غلظتهای مختلف گلیسرول و زرده تخم مرغ در محیط بر پایه تریس روی کیفیت و تحرک اسپرم قوچ نژاد بختیاری پس از انجماد- ذوب مایع منی انجام شد. بدین منظور تاثیر ۹ محیط انجماد مایع منی با غلظتهای مختلف زرده و گلیسرول در محیط بر پایه تریس، روی کیفیت و توان تحرک اسپرم قوچ پس از انجماد – ذوب مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

جمع آوری مایع منی

در این تحقیق از سیمن قوچهای نژاد بختیاری (سن بیش از ۲ سال) استفاده شد. جمع آوری مایع منی به صورت هفته‌ای دو بار، به صورت یک یا دو انزال پی در پی با فاصله ۱۵-۱۰ دقیقه با استفاده از واژن مصنوعی (٤٢-٤٠درجه سانتی‌گراد) انجام پذیرفت.

محیط انجماد

در این تحقیق از محیط انجماد بر پایه تریس و غلظتهای مختلف گلیسرول (٤ و ٦ و ٨ درصد) و زرده تخم مرغ (۱۰ و ۱۵ و ۲۰ درصد) استفاده شد. اجزای تشکیل دهنده محیط انجماد در جدول ۱ خلاصه شده است.

جدول ۱. مقدار و نوع اجزا تشکیل دهنده محیط پایه انجماد

Component	Tris gr/l	Glucose gr/l	Citric acid gr/l.	pH	Osmolarity. m.osm
dosage	36.342	5.0456	18.253	7.2	325

پردازش مایع منی

حجم بین ۲- ۰/۷۵ میلی لیتر، غلظت بیشتر از ۱۰۹ × ۳/۵ اسپرم درمیلی لیتر، تحرک بیشتر از ۷۰ درصد و مرفولوژی کمتر از ۱۰ درصد اسپرم غیر طبیعی، در هر انزال به عنوان مایع منی نرمال در نظر گرفته شد، در غیر این‌صورت مایع منی‌های جمع آوری شده حذف شدند. بلافاصله بعد از جمع آوری مایع منی، رقیق سازی به نسبت ۱ حجم مایع منی و ۲۰ حجم محیط‌های انجماد فوق الذکر در دمای ۳۷درجه‌سانتی‌گراد انجام شد. سپس لوله مایع منی در ظرف محتوی ۱۰۰سی سی آب ۳۷درجه‌سانتی‌گراد قرار داده شد و در عرض ۳۰ دقیقه به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه پس از آنالیز اولیه فاکتورهای اسپرمی (غلظت، مرفولوژی و تحرک اسپرمها)، در صورت مناسب بودن فاکتورهای فوق، برای سرد شدن تدریجی و انکوباسیون با محیط انجماد (به‌ویژه گلیسرول)، ظرف آب محتوی لوله اسپرمی به مدت ۲ساعت در یخچال ۵درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شد. غلظت نهایی اسپرم به‌میزان ۲۰۰-۱۰۰ میلیون اسپرم در هر میلی لیتر تعیین شد. پس از گذشت ۲ ساعت جهت حفظ دمای مایع منی، ظرف آب محتوی مایع منی روی کریستالهای یخ قرار داده شد و بلافاصله در داخل نیهای انجماد ۰/۲۵ میلی لیتر کشیده شد.

انجماد- ذوب مایع منی

ابتدا نیها به مدت ۱۲ دقیقه در بالای سطح ازت مایع (۵ سانتی‌متر) قرار گرفتند و سپس به سرعت در ازت مایع انتقال داده شدند. برای ذوب ـ مایع منی، نی‌ها از ازت مایع خارج و به مدت ۱ دقیقه در حمام آب ۳۷درجه‌سانتی‌گراد قرار داده شدند، سپس پارامترهای اسپرم ارزیابی شد.

طراحی آزمایش

شکل ۱ مراحل آماده‌سازی کلی محیطهای انجماد مورد استفاده این تحقیق را نشان می‌دهد.

دراین تحقیق به ازای هر یک از گروه‌های تیماری سه بار تکرار انجام شد و در هر تکرار ۱۰ نی منجمد و پس از ذوب ارزیابی آماری انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

ارتباط بین پارامترها با استفاده از آنالیز آماری chi square بررسی شد. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار spss انجام گرفت.

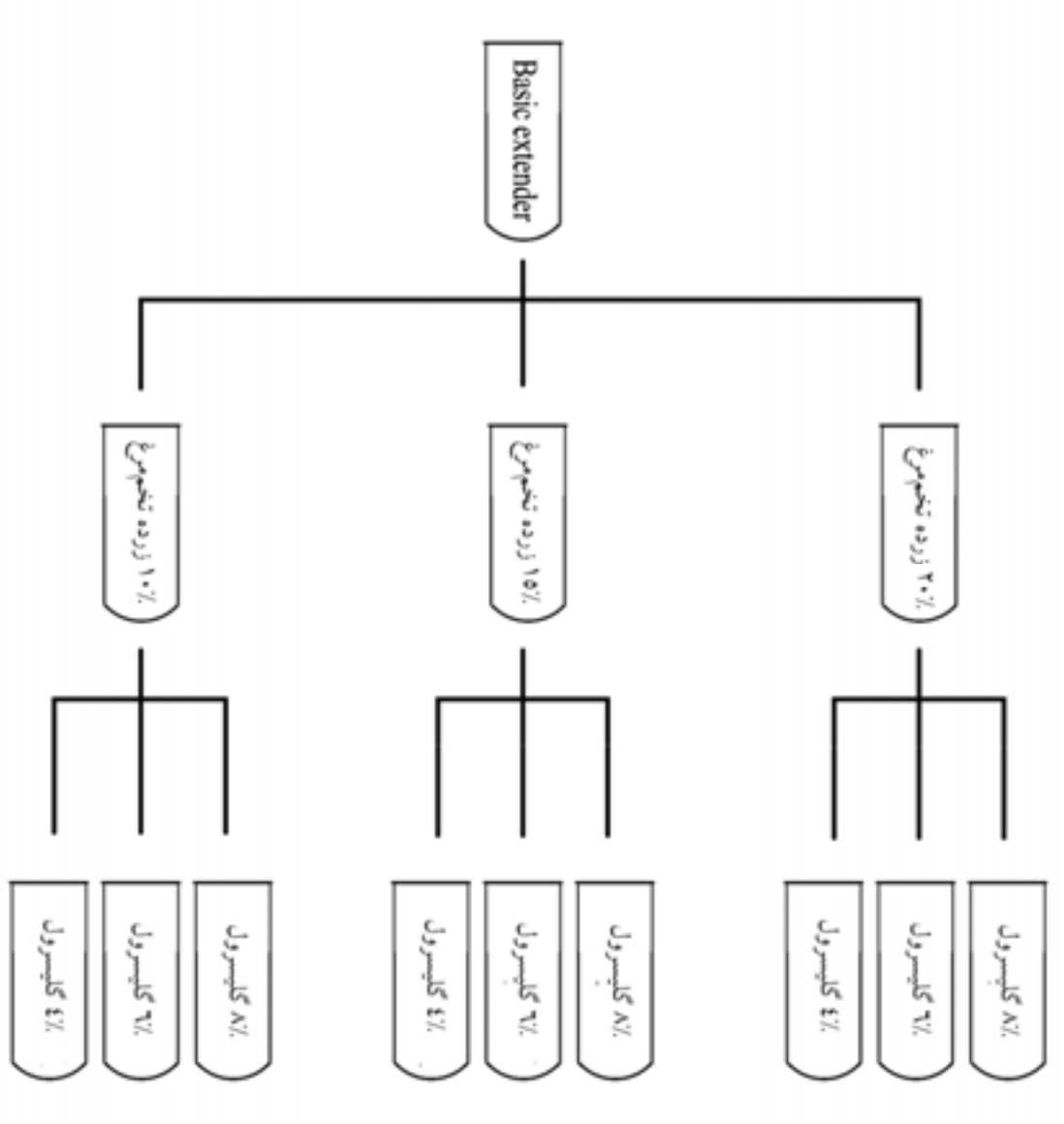
یافته‌ها

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در غلظت ۱۰ درصد زرده و غلظتهای ٤،٦ و ۸ درصد گلیسرول، تحرک اسپرم پس از انجماد - ذوب روند افزایشی را به ترتیب در گروه‌های تیماری E10G4، E10G6 وE10G8 نشان می دهد که‌این افزایش در بین گروه‌های تیماری E10G4 با E10G6 و E10G8 از نظر آماری معنی دار ($p \leq 0.05$) است (شکل ۲).

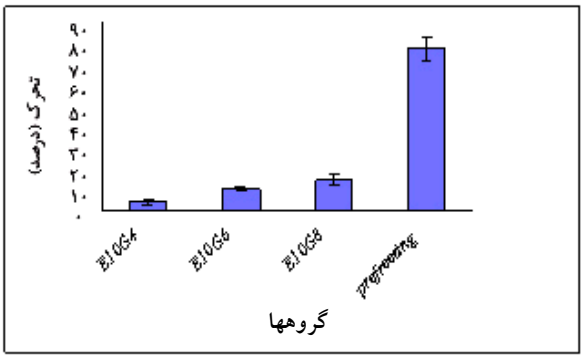
تیمار مایع منی قوچ با غلظت ۱۵ درصد زرده و غلظتهای ٤،

٦ و ٨ درصد گلیسرول (شکل ٣) منجر به افزایش درصد تحرک اسپرم پس از انجماد- ذوب شد که‌این افزایش در بین گروه‌های تیماری E15G4 با E15G8 و E15G6 با E15G8 از نظر آماری معنی دار ($p\leq0.05$) است. همچنین در غلظت ٢٠ درصد زرده و غلظتهای ٤، ٦ و ٨ درصد گلیسرول نیز یک روند افزایش در درصد تحرک اسپرم پس از انجماد ذوب مشاهده شد که این افزایش بین گروه‌های تیماری E20G4 و E20G6 با گروه تیماری E20G8 از نظر آماری معنی دار ($p\leq0.05$) است (شکل ٤).

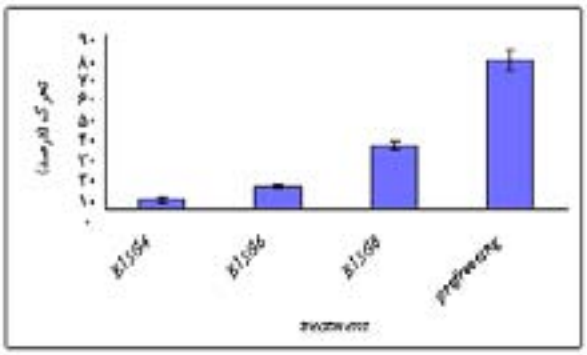
به‌طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر آن است که درصد تحرک اسپرم قوچ نژاد بختیاری پس از انجماد- ذوب، در تمام گروه‌های تیماری در مقایسه با قبل از انجماد کاهش معنی داری ($p\leq0.05$) را نشان داد. همچنین گروه تیماری E10G4 کمترین و گروه تیماری E20G8 بیشترین درصد تحرک اسپرم را پس از انجماد ـ ذوب در مقایسه با سایر گروه‌های تیماری نشان دادند.



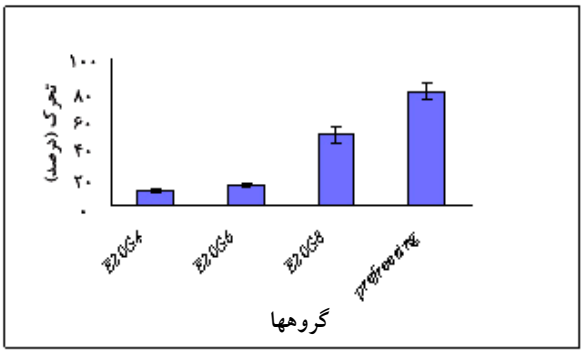
شکل ۱. طراحی آزمایش جهت بررسی تاثیر همزمان گلیسرول و زرده تخم مرغ بر روی کیفیت تحرک اسپرم قوچ پس از انجماد ـ ذوب



شکل ۲. تأثیر تیمار غلظت ۱۰ درصد زرده و غلظتهای ٤، ٦ و ۸ درصد گلیسرول در محیط پایه تریس بر تحرک اسپرم قوچ پس از انجماد ـ ذوب مایع منی. هر سه گروه تیماری با گروه قبل از انجماد و گروه E10G4 با گروههای E10G6 و E10G8 تفاوت معنی داری را نشان می دهد($p\leq0.05$).



شکل ۳. تأثیر تیمار غلظت۱۵ درصد زرده و غلظتهای ٤، ٦ و ۸ درصد گلیسرول در محیط پایه تریس بر تحرک اسپرم قوچ پس از انجماد- ذوب مایع منی. هر سه گروه تیماری با گروه قبل از انجماد و گروههای E15G4 و E15G6 با گروه E15G8 تفاوت معنی داری را نشان می دهد($p\leq0.05$).



شکل ٤. تأثیر تیمار غلظت ۲۰ درصد زرده و غلظتهای ٤، ٦ و ۸ درصد گلیسرول در محیط پایه تریس بر تحرک اسپرم قوچ پس از انجماد- ذوب مایع منی. هر سه گروه تیماری با گروه قبل از انجماد و گروههای E20G4 و E20G6 با گروه E20G8 تفاوت معنی داری را نشان می دهد($p\leq0.05$).

بحث

از انجماد طولانی مدت مایع منی قوچ برای بارور نمودن همزمان تعداد زیادی میش، ذخیره ژنها برای استفاده آینده و تضمین در مقابل از دست دادن قوچهای منحصر به فرد استفاده می‌شود. همچنین اسپرم منجمد شده را می‌توان به راحتی در مسافتهای طولانی حمل و نقل نمود.

تحقیقات نشان داده که طی فرایند انجماد- ذوب مایع منی پارامترهای اصلی مایع منی شامل تعداد اسپرمها، مرفولوژی و تحرک اسپرم تحت تاثیر قرار می‌گیرد. یکی از مهمترین پارامترها برای ارزیابی کیفیت محیط انجماد مایع منی و همچنین کارآیی روش مورد استفاده برای انجماد- ذوب، بررسی توانایی تحرک اسپرم پس از انجماد –ذوب است. از علل کاهش تحرک اسپرم می‌توان به آسیب به فراساختار اسپرم اشاره نمود.گزارش شده است که حفظ انجمادی موجب تغییراتی در مرفولوژی اسپرم، آسیب به آکروزوم، آسیب میتوکندریایی و آسیب به دم اسپرم می‌شود [۹ و ۱۰]. بنابراین درصد کمی از اسپرمها بعد از انجماد – ذوب دارای غشای سالم و فعالیت طبیعی میتوکندری و دم هستند [۱۱]. تحرک اسپرم بعد از انجماد- ذوب نیز تا حدودی به تغییرات فوق حساس است [۱۲]. سونمز (Sonmez) و همکاران تاثیر غلظتهای مختلف گلیسرول و اسید اسکوربیک را در محیط بر پایه تریس جهت انجماد مایع منی قوچ بررسی نمودند. نتایج تجربیات آنها نشان داد که تحرک اسپرم پس از انجماد ذوب در گروه‌های تیماری مختلف بین ٤٤-۱ درصد بود [۱۳]. گابریلا (Gabriella) و همکاران تاثیر محیط انجماد شیر- لاکتوز ـ زرده تخم مرغ را روی تحرک اسپرم قوچ، پس از انجماد – ذوب در فصول مختلف سال بررسی نمودند. نتایج تجربیات آنها نشان داد که تحرک اسپرم پس از انجماد- ذوب در فصول مختلف سال بین ۳٦/۹- ۱۱/۱ درصد بود[١٤]. با وجودی اینکه عموماً پذیرفته شده است که تحرک اسپرم طی

انجماد- ذوب کاهش می‌یابد، اما مکانیسمی که به موجب آن این امر صورت می‌گیرد، به‌طور کامل مشخص نشده است [۱۵و۱٦].

تحقیق حاضر نیز بیانگر کاهش معنی دار ($p\leq0.05$) درصد تحرک اسپرم قوچ نژاد بختیاری پس از انجماد – ذوب، در مقایسه با قبل از انجماد در تمام گروه‌های تیماری است. هر چند این کاهش در برخی از گروه‌های تیماری از قبیل E10G4، E10G6، E10G8، E15G4 و E15G6 فوق العاده چشمگیر است ولی در گروه تیماری E15G8 و به‌ویژه گروه تیماری E20G8 (به ترتیب ۳۳/٤ و ٤۸درصد) کاهش نسبتا معمولی را نشان می‌دهد.

گلیسرول معمولترین عامل محافظ انجمادی مورد استفاده برای انجماد مایع منی قوچ است. گلیسرول را می‌توان بلافاصله بعد از جمع آوری مایع منی (در یک مرحله) یا در ۵ درجه سانتی گراد (در دو مرحله) به مایع منی اضافه کرد [۷و۱۷]. غلظت نهایی گلیسرول در محیط انجماد برای انجماد مایع منی قوچ، در نهایت به وسیله خاصیت سمی آن محدود می‌شود [۱۸و۱۹. که به نوبه خود به میزان خنک سازی و انجماد [۲۰]، نوع و غلظت اجزای تشکیل دهنده محیط انجماد [۲۱] و روش اضافه کردن گلیسرول [۲۲] بستگی دارد. غلظت اپتیمال گلیسرول اضافه شده به رقیق کننده مایع منی قوچ، همچنین به میزان زرده تخم مرغ موجود در آن بستگی دارد [۸]. زرده تخم مرغ یکی از اجزای معمول مورد استفاده در محیط انجماد مایع منی است و اسپرمها را در برابر شوک سرما محافظت می‌کند و در طی انجماد ـ ذوب مایع منی نقش محافظتی برای اسپرم دارد. عقیده بر این است که زرده در سطح غشای پلاسمایی سلول عمل می‌کند.

غلظت اپتیمم زرده در رقیق کننده مایع منی قوچ بستگی به اجزای تشکیل دهنده رقیق کننده دارد [۲۳]. گرچه زرده تخم مرغ را بعضی مواقع می‌توان با ماده دیگری با فعالیت مناسب جایگزین نمود، با این حال در مورد انجماد مایع منی قوچ، زرده به واسطه خاصیت محافظتی روی غشای سلولی، یکی از اجزای مهم محیط انجماد است [۷]. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که افزایش غلظت زرده تخم مرغ تا میزان ۲۰ درصد و افزایش غلظت گلیسرول تا میزان ۸ درصد حجم کلی محیط انجماد، آثار مثبتی روی توان حرکت اسپرم قوچ پس از انجماد ـ ذوب دارد.

در طی فرایند انجماد ـ ذوب سلولها و بافتها یکی از مهمترین مشکلات ایجاد کریستالهای یخ درون سلولی است که این کریستالها به نوبه خود می‌توانند موجب مرگ سلول شوند به نظر می‌رسد که در گروه تیماری E20G8 عمل جایگزینی آب با گلیسرول در مقایسه با سایر گروه‌های تیماری به نحو بهتری صورت گرفته به‌علاوه غلظت ۲۰درصد زرده تخم مرغ در این محیط نیز کارایی مناسبی در محافظت از غشای سلولی در مقایسه با سایر سلولهای تیماری داشته است.

پیشنهاد شده است که غلظت اپتیمال گلیسرول در محیط انجماد سیمن همچنین به غلظت نسبی اسپرماتوزوآ بستگی دارد[۲٤]. به نظر می‌رسد که در غلظت استفاده شده اسپرماتوزوآ در این تحقیق (۱۰٦ × ۲۰۰-۱۰۰ اسپرم/میلی لیتر) تداخل غلظت ۲۰درصد زرده، همراه با غلظت ۸درصد گلیسرول در محیط انجماد بر پایه تریس و گلوکز (گروه تیماری E20G8) در روش یک مرحله‌ای انجماد بهترین کارایی را برای حفظ تحرک اسپرم قوچ نژاد بختیاری داشته و به‌عنوان مناسب‌ترین محیط برای انجماد پیشنهاد می‌شود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از مدیریت محترم پژوهشکده رویان بابت فراهم نمودن امکانات و تجهیزات و همچنین از مدیریت محترم سازمان حفاظت محیط زیست اصفهان که هزینه‌های مادی انجام این طرح را فراهم نمودند، سپاسگزاری می‌نمایند.

References

1. **Fiser PS, Ainsworth L, Fairfull RW.** Evaluation of new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. Theriogenology 1987; 28:599-607.
2. **Evans G, Maxwell WMC.** Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworths Sydney 1987, pp194.
3. **Salamon S, Maxwell WMC.** Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. Anim Reprod Sci1995; 37:185-249.
4. **Abdelhakeam AA, Graham EF, Vazquez IA.** Studies on the presence and absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: fertility trials and the effect of dilution methods on freezing ram semen in the absence of glycerol. Cryobiology 1991; 28:36-4
5. **Anel L, de Pas P, Alvares M, Chamorro CA, Boixo JC, Manso A, et al.** Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen . Theriogenology 2003; 60:1293-308.
6. **Adrienne E, Crosier AB, Budhan S, Pukazhenthi a, Josephine N, Henghali b, et al.** Cryopreservation of spermatozoa from wild-born Namibian cheetahs and inXuence of glycerol on cryosurvival. Cryobiology 2006; 52:169-181.
7. **Salamon S, Maxwel WMC.** Storage of ram semen. Anim Reprod Sei 2000 ; 62:77-111.
8. **Watson PF, Martin ICA.** Regions of the freezing curve causing changes in structure and viability of ram sperm. Nature_Lond 1974; 251:315-6.
9. **Wooley DM, Richardson DW.** Ultrastructural injury to human spermatozoa after freezing and thowing . J Reprod Fert 1978; 53:389-94.
10. **Connel MO, MEClure N, LewisSEM.** The effect of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. Human Reproduction 2002; 17(3 pp):704-709.
11. **Holt WV.** Alternative strategies for the long term preservation of spermatozoa. Reprod Fertil Dev 1997; 9:309-19.
12. **Henry MA, Nioles EE, Gao D, Mazure P, Critser JK.** Cryopreservation of human spermatozoa, IV The effects of cooling and warming rates on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. Fertil Steril 1993; 60:911-8.
13. **Sonmez M, Demirci E.** The effect of ascorbic acid on the freezability of ram semen diluted with extenders containing different proportion of glycerol. Turk J Vet Anim Sci 2003; 28:893-9.
14. **Gabriella A, Martemucci G.** Post- thaw survival and acrosome integrity of spermatozoa of leccese rams frozen in different seasons with a milk-agg yolk extender. Ital J Anim Sci 2005; 4:139-48.
15. **Sharma RK, Agarwal A.** Sperm quality improvement in cry preserved human semen. J Urol 1996; 156:1008-12.
16. **Centala GM, Raubertas RF, Whittingham DJ.** Cryopreservation of human semen – comparision of cryopreservatives, sourceso f variability , and prediction of post thow survival. J Androl 1992; 13:283-8.
17. **Salamon S, Maxwel WMC.** Frozen storage of ram semen, Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. Anim Reprod Sci 1995; 37:185-249.
18. **Hammerstedt RH, Graham JK.** Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. Cryobiology 1992; 29:26-38.
19. **Fahy GM.** The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. Cryobiology 1986; 23:1-13.
20. **Fisher PS, Fairfull RW.**The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. Cryobiology 1984; 21:542-51.
21. **Pontbriand D, Howard JG, Schiewe MC, Stuart LD, Wildt DE.** Effect of cryoprotective diluent and method of freeze – thawing on survival and

acrozomal integrity of ram spermatozoa. Cryobiology 1998; 26: 341-54.

22. **Colas G.** Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep – freezing ram semen. J Reprod Fertil 1975; 42:277-85.
23. **Salamon S, Lightfoot RJ.** Freezing of ram spermatozoa by the pellet method I. The effect of diluent composition on survival of spermatozoa. Aust J Biol Sci 1969; 22:1527-46.
24. **Gabriella A., Martemucci G.** Post-them survival and acrosome integrity of spermatozoa of lecese ram frozen in different seasons with a milk-egg yolk extendex. Ital J Anim SC: 2005; 4: 139-4.