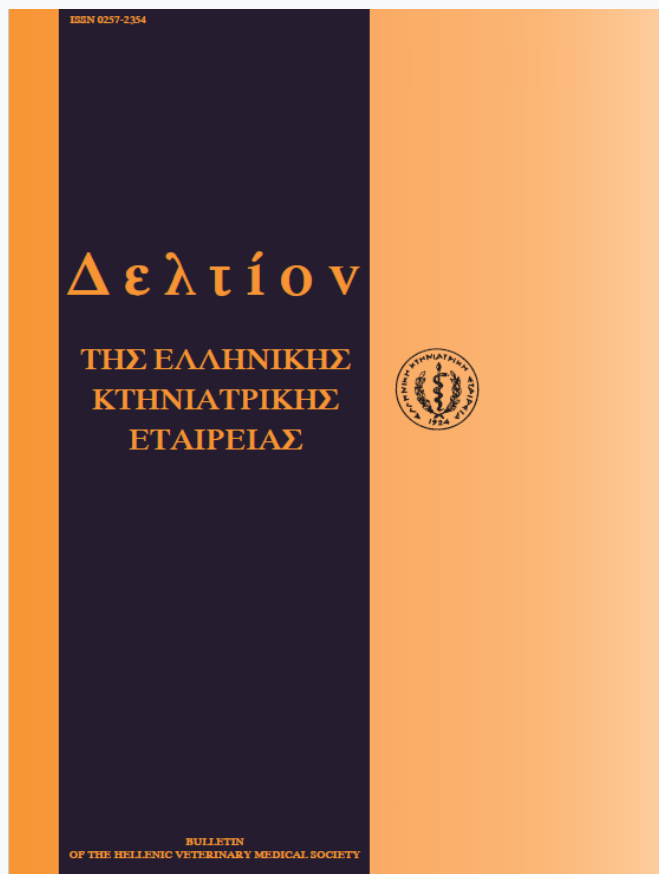


## Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 52, No 4 (2001)



### Freezing of rabbit semen after the addition of glycerol and dimethylsulfoxide in the extender

S. SAMOUILIDIS (Σ. ΣΑΜΟΥΗΛΙΔΗΣ), K. SAOULIDIS (Κ. ΣΑΟΥΛΙΔΗΣ), A. FOUKOS (Α. ΦΟΥΚΟΣ), P. YPSILANTIS (Π. ΥΨΗΛΑΝΤΗΣ), A. DEMERTZIS (Α. ΔΕΜΕΡΤΖΗΣ), A. P. SBIRAKI (Α.Π. ΣΜΠΙΡΑΚΗ)

doi: [10.12681/jhvms.15461](https://doi.org/10.12681/jhvms.15461)

Copyright © 2018, S SAMOUILIDIS, K SAOULIDIS, A FOUKOS, P YPSILANTIS, A DEMERTZIS, AP SBIRAKI



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

### To cite this article:

SAMOUILIDIS (Σ. ΣΑΜΟΥΗΛΙΔΗΣ) S., SAOULIDIS (Κ. ΣΑΟΥΛΙΔΗΣ) K., FOUKOS (Α. ΦΟΥΚΟΣ) A., YPSILANTIS (Π. ΥΨΗΛΑΝΤΗΣ) P., DEMERTZIS (Α. ΔΕΜΕΡΤΖΗΣ) A., & SBIRAKI (Α.Π. ΣΜΠΙΡΑΚΗ) A. P. (2018). Freezing of rabbit semen after the addition of glycerol and dimethylsulfoxide in the extender. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 52(4), 299–302. <https://doi.org/10.12681/jhvms.15461>

## Κατάψυξη σπέρματος κουνελιού μετά την προσθήκη γλυκερόλης και dimethylsulfoxide στο αραιωτικό μέσο

Σ. Σαμουηλίδης<sup>1</sup>, Κ. Σαουλίδης<sup>2</sup>, Α. Φούκος<sup>1</sup>, Π. Υψηλάντης<sup>1</sup>, Α. Δεμερτζής<sup>1</sup>, Α. Π. Σμπιράκη<sup>2</sup>

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ.** Κατά τη διεξαγωγή αυτής της έρευνας, καταψύχθηκε σπέρμα 10 κουνελιών μετά από την αραιώσή του σε δύο διαφορετικά αραιωτικά μέσα, τα Α και Β. Το αραιωτικό Α αποτελούνταν από Tris-buffer στο οποίο προστέθηκε κρόκος αυγού σε ποσοστό 20% και γλυκερόλη σε ποσοστό 3%, ενώ το αραιωτικό Β είχε την ίδια σύνθεση με το Α αλλά επιπλέον και dimethylsulfoxide (DMSO). Με το σπέρμα που παρουσίασε την υψηλότερη κινητικότητα σπερματοζωαρίων μετά την κατάψυξη / αποψύξη του και στα δύο αραιωτικά, διενεργήθηκε τεχνητή σπερματέγχυση σε δύο αντίστοιχες ομάδες (Ι και ΙΙ) των 20 κουνελών. Η μέση κινητικότητα των σπερματοζωαρίων του νωπού σπέρματος (77%) μειώθηκε σημαντικά ( $P < 0.05$ ) μετά την κατάψυξη του τόσο στο αραιωτικό Α (47%) όσο και στο αραιωτικό Β (54%). Η κινητικότητα των κατεψυγμένων / αποψυγμένων σπερματοζωαρίων στο αραιωτικό Β ήταν σημαντικά υψηλότερη ( $P < 0.05$ ) από εκείνη που είχαν στο αραιωτικό Α. Το ποσοστό τοκετών των ζώων της ομάδας ΙΙ (60%) παρουσίασε αύξηση σε σχέση με εκείνο των ζώων της ομάδας Ι (50%), αλλά αυτή δεν ήταν σημαντική ( $P > 0.05$ ). Επίσης, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ( $P > 0.05$ ) μεταξύ των μέσων όρων του μεγέθους των τοκετοομάδων της ομάδας Ι ( $6,8 \pm 1,7$ ) και της ομάδας ΙΙ ( $7,0 \pm 1,9$ ). Τα συμπεράσματα αυτής της έρευνας συνοψίζονται στο ότι η κατάψυξη σπέρματος κουνελιού σε αραιωτικό που περιέχει συνδυασμό των κρυοπροστατευτικών ουσιών DMSO και γλυκερόλης σε αναλογία 3% από το καθένα, έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική βελτίωση της κινητικό-

τητας του κατεψυγμένου / αποψυγμένου σπέρματος, ενώ δεν έχει σημαντική επίδραση στη γονιμότητά του ούτε και στο μέγεθος των τοκετοομάδων.

**Λέξεις ευρετηρίασης:** κουνέλι, σπέρμα, κατάψυξη, DMSO, γλυκερόλη

**ABSTRACT.** Samouilidis S.<sup>1</sup>, Saoulidis K.<sup>2</sup>, Foukos A.<sup>1</sup>, Ypsilantis P.<sup>1</sup>, Demertzis A.<sup>1</sup>, Sbiraki A. P.<sup>2</sup> Freezing of rabbit semen after the addition of glycerol and dimethylsulfoxide in the extender. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 2001, 52(4):299-302. In this study, semen from 10 rabbits was frozen after it was diluted in two different extenders, A and B. Extender A consisted of Tris-buffer in which 20% of egg yolk and 3% of glycerol were added, while extender B had the same composition, plus 3% of dimethylsulfoxide (DMSO). The semen of the buck exhibiting the best post-thaw motility in the two extenders, was used for the insemination of two corresponding groups (I and II) of 20 does each. The average sperm motility of fresh semen (77%) was significantly reduced ( $P < 0.05$ ) after it was frozen in the extender A (47%) and B (54%). The post-thaw sperm motility in extender B was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than that in extender A. The percentage of the animals that gave birth in group II (60%) was increased compared to that of the animals in group I (50%), but not significantly ( $P > 0.05$ ). Also, no significant difference ( $P > 0.05$ ) was observed between the average litter size of group I ( $6,8 \pm 1,7$ ) and group II ( $7,0 \pm 1,9$ ). Thereafter, it is concluded that freezing rabbit semen in an extender that contains a combination of the cryoprotective agents glycerol and DMSO, in the proportion of 3% and 3%, respectively, results in a significant improvement of post-thaw sperm motility, while it doesn't affect significantly its fertility value neither the size of the litters.

**Keywords:** rabbit, semen, freezing, DMSO, glycerol

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η τεχνητή σπερματέγχυση (Τ.Σ.) με κατεψυγμένο σπέρμα αποτελεί μέθοδο αναπαραγωγής που μπορεί να προσφέρει σημαντικά οφέλη στην εκτροφή των κουνελιών. Αν και έχει σημειωθεί πρόοδος τα τελευταία χρόνια στις προ-

<sup>1</sup>Κλινική Μαιευτικής και Τεχνητής Σπερματέγχυσης

<sup>2</sup>Κλινική Παθολογίας Παραγωγικών Ζώων, Τμήμα Κτηνιατρικής, Α.Π.Θ., 540 06 Θεσσαλονίκη

<sup>1</sup>Clinic of Obstetrics and AI

<sup>2</sup>Clinic of Productive Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, 540 06 Thessaloniki, Greece.

σπάθειες ανεύρεσης ικανοποιητικής μεθόδου κατάψυξης του σπέρματος του κουνελιού, εν τούτοις τα επίπεδα γονιμότητας που επιτυγχάνονται εξακολουθούν να είναι χαμηλά με αποτέλεσμα την περιορισμένη εφαρμογή της<sup>1-8</sup>.

Έχει βρεθεί ότι οι καταλληλότερες κρυοπροστατευτικές ουσίες για την κατάψυξη του σπέρματος του κουνελιού είναι αυτές που φέρουν αμιδικές ή μεθυλικές ομάδες, όπως το dimethylsulfoxide (DMSO), η λακταμίδα και η ακεταμίδα, παρά εκείνες που φέρουν υδροξυλικές ομάδες, όπως είναι η γλυκερόλη. Εξάλλου, η σημαντική τοξικότητα της τελευταίας δεν επιτρέπει αύξηση της συγκέντρωσής της πάνω από 3% στο αραιωτικό μέσο.

Στην έρευνα αυτή καταψύχθηκε σπέρμα κουνελιού σε αραιωτικό μέσο Tris-buffer μετά από ταυτόχρονη προσθήκη DMSO και γλυκερόλης, με σκοπό την επίτευξη υψηλής κινητικότητας σπερματοζωαρίων και γονιμότητας.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στην έρευνα χρησιμοποιήθηκαν 10 αρσενικά κουνέλια της φυλής Νέας Ζηλανδίας ηλικίας 8-14 μηνών και βάρους 4,5-5,5 Kg, καθώς και 40 θηλυκά της ίδιας φυλής, ηλικίας 6-10 μηνών και βάρους 3,5-4,5 Kg. Τα πειραματόζωα σταβλίζονταν σε ατομικά υπερυψωμένα κλουβιά, όπου τους παρέχονταν τροφή σε μορφή συμπύκνων και με συγκέντρωση πρωτεϊνών 16%, μία φορά την ημέρα. Η λήψη του νερού γινόταν κατά βούληση από αυτόματες ποτίστρες. Η φωτοπερίοδος ρυθμίστηκε στις 16 ώρες<sup>9</sup> με τη βοήθεια τεχνητού φωτισμού, ενώ η θερμοκρασία του περιβάλλοντος ήταν 16-18°C.

Για την έρευνα επιλέχθηκαν αρσενικά αποδεδειγμένης γονιμότητας, με εκσπερμάτισμα ικανοποιητικού όγκου (>0,8 ml), πυκνότητας (>200 x 10<sup>6</sup> σπερματοζωάρια/ml σπέρματος) και κινητικότητας σπερματοζωαρίων (>70%). Τα θηλυκά ήταν επίσης αποδεδειγμένης γονιμότητας με ιστορικό ενός τουλάχιστο τοκετού.

Από κάθε αρσενικό κουνέλι συλλεγόταν σπέρμα 2 φορές/εβδομάδα για διάστημα 2 εβδομάδων, με τη χρήση τεχνητού κόλπου. Αμέσως μετά τη συλλογή του σπέρματος, γινόταν μέτρηση του όγκου του σε ογκομετρικό σωλήνα και υπολογισμός της πυκνότητάς του με τη βοήθεια αιμοκυτταρόμετρου. Ακολουθούσε εκτίμηση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων με παρατήρηση σταγόνας σπέρματος σε μικροσκόπιο θερμοιζόμενης πλάκας (37°C).

Το εκσπερμάτισμα, αφού χωριζόταν σε δύο ίσα μέρη, αραιωνόταν σε ισάριθμα αραιωτικά μέσα, τα Α και Β. Η αραιώση γινόταν σε φιάλες Erlenmayer 25 ml σε αναλογία 1:10-1:20, ώστε η τελική πυκνότητα του σπέρματος να φτάνει τα 20 x 10<sup>6</sup> σπερματοζωάρια/ml. Η σύνθεση του αραιωτικού Α ανά 100 ml ήταν η παρακάτω:

- Αραιωτικό Tris-buffer 77 ml (3,028 g τρις-υδροξύλη μεθυλ-αμινο-μεθάνη, 1,675 g κιτρικό οξύ, 1,250 g D-γλυκόζη, 100 ml δις απεσταγμένο νερό)

- Κρόκος αυγού 20 ml
- Πενικιλίνη 120.000 IU
- Στρεπτομυκίνη 120 mg
- Γλυκερόλη 3 ml

Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στο 7 με την προσθήκη σταγόνων κανονικού διαλύματος καυστικού νατρίου.

Το αραιωτικό Β είχε επίσης την παραπάνω σύνθεση με τη διαφορά ότι σε αυτό προστέθηκε επιπλέον και 3% DMSO (Sigma).

Μετά την αραιώση, οι φιάλες Erlenmayer τοποθετούνταν σε φιάλες ζέσεως πλήρεις νερού θερμοκρασίας 30°C και μεταφέρονταν σε περιβάλλον θερμοκρασίας 5°C, όπου παρέμεναν για 60 min. Στη θέση αυτή γινόταν αναρρόφηση του αραιωμένου σπέρματος στο εσωτερικό πλαστικών σωληναρίων χωρητικότητας 0,5 ml (paillette), το ανοικτό άκρο των οποίων σφραγιζόταν στη συνέχεια με σκόνη πολυβινυλικής αλκοόλης. Τα σφραγισμένα σωληνάρια τοποθετούνταν οριζόντια πάνω σε μεταλλική ράμπα και διατηρούνταν στην ίδια θερμοκρασία για επιπλέον 10 min.

Στη συνέχεια, η ράμπα με τα σωληνάρια μεταφερόταν σε οριζόντια θέση πάνω από το πλέγμα τράπεζας υγρού αζώτου με ανοικτό στόμιο TA-21, στην οποία το υγρό άζωτο έφθανε μέχρι το ύψος του πλέγματος. Στη θέση αυτή διατηρούνταν σε προοδευτικά φθίνουσα απόσταση από το πλέγμα, ως εξής: σε απόσταση 20 cm για 1 min, 10 cm για 2 min και 5 cm για 3 min. Αμέσως μετά, τα σωληνάρια τοποθετούνταν σε δοχείο μέσα στο υγρό άζωτο και τελικά μεταφέρονταν σε τράπεζα συντήρησης με υγρό άζωτο, όπου παρέμεναν για μία εβδομάδα.

Η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων εκτιμόταν για δεύτερη φορά μετά την απόψυξη του σπέρματος. Η τελευταία γινόταν με τη βύθιση των σωληναρίων σε νερό θερμοκρασίας 39°C για 30 sec. Στη συνέχεια, το περιεχόμενό τους μεταγγιζόταν σε δοκιμαστικό σωλήνα, που βρισκόταν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C.

Με το σπέρμα που είχε την υψηλότερη κινητικότητα σπερματοζωαρίων μετά την κατάψυξη / απόψυξή του στα αραιωτικά Α και Β, διενεργήθηκε τεχνητή σπερματέγχυση σε δύο αντίστοιχες ομάδες (I και II) των 20 θηλυκών η κάθε μία. Η γονιμότητα του σπέρματος εκτιμήθηκε με βάση το ποσοστό των τοκετών και το μέγεθος των τοκετοομάδων. Τελικά, χρησιμοποιήθηκε το σπέρμα ενός μόνο αρσενικού (από τους 10 που επιλέχθηκαν αρχικά), ώστε να ελαχιστοποιηθεί η επίδραση ατομικών παραγόντων στα αποτελέσματα της έρευνας και γιατί το σπέρμα του αρσενικού που επιλέχθηκε πληρούσε τις προϋποθέσεις ομαλής κατάψυξης.

Σε κάθε θηλυκό που συμμετείχε στην έρευνα χορηγούνταν 15 IU PMSG (Intergonan - Intervet) υποδόρια, 96 ώρες πριν από την Τ.Σ., για τη διασφάλιση της επαρκούς ανάπτυξης των ωοθυλακίων τους και 3 μg GnRH

(Ovarelin - Rowsselot), ενδομυϊκά, ταυτόχρονα με την Τ.Σ., για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας.

Σε κάθε σπερματέγχυση, η δόση του σπέρματος περιείχε  $10 \times 10^6$  σπερματοζωάρια με προοδευτική κίνηση.

## ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για τη διαπίστωση των διαφορών σε ό,τι αφορά την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων εφαρμόστηκε η μέθοδος της ανάλυσης της διακύμανσης (One Way Anova) και η σύγκριση των μέσων όρων της κινητικότητας μεταξύ των ομάδων έγινε με τη βοήθεια του Duncan test. Επίσης, η σύγκριση των ποσοστών των τοκετών έγινε με το  $\chi^2$ -test, ενώ των μέσων όρων του μεγέθους των τοκετοομάδων με το Student-test (t-test). Στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι διαφορές όπου  $P < 0,05$ .

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η μέση κινητικότητα των σπερματοζωαρίων του νωπού σπέρματος ( $n=40$ ) ήταν 77%, ενώ μετά την κατάψυξη / απόψυξη του μειώθηκε σημαντικά ( $P < 0,05$ ) σε 47% για το σπέρμα σε αραιωτικό Α ( $n=40$ ) και σε 54% για το σπέρμα σε αραιωτικό Β ( $n=40$ ) (σχήμα 1). Η μέση κινητικότητα των σπερματοζωαρίων διέφερε σημαντικά ( $P < 0,05$ ) μεταξύ των δύο κατηγοριών κατεψυγμένου σπέρματος.

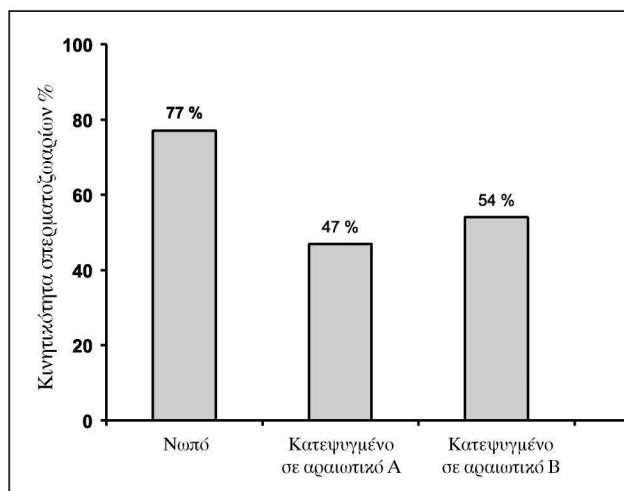
Το ποσοστό τοκετών των ζώων της ομάδας Ι ήταν 50% (10/20), ενώ εκείνο της ομάδας ΙΙ 60% (12/20). Τα ποσοστά δε διέφεραν σημαντικά ( $P > 0,05$ ) μεταξύ τους (πίνακας 1).

Οι μέσοι όροι του μεγέθους των τοκετοομάδων, που ήταν για την ομάδα Ι  $6,8 \pm 1,7$  και για την ομάδα ΙΙ  $7,0 \pm 1,9$ , δε διέφεραν σημαντικά ( $P > 0,05$ ) μεταξύ τους (πίνακας 1).

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Λαμβάνοντας υπόψη τα χαρακτηριστικά που θα πρέπει να έχει μια κρυοπροστατευτική ουσία, δηλαδή μικρό μοριακό βάρος, υψηλή διάβαση στις κυτταρικές μεμβράνες ζωντανών κυττάρων, υψηλή διαλυτότητα σε υδατικά διαλύματα ηλεκτρολυτών και απουσία τοξικότητας<sup>10</sup>, θεωρείται ότι η γλυκερόλη είναι η κρυοπροστατευτική ουσία επιλογής για τα σπερματοζωάρια πολλών ειδών ζώων. Όμως, τα σπερματοζωάρια του κουνελιού παρουσιάζουν μικρή ικανότητα διάβασης σε αυτή<sup>11</sup> και ευαισθησία στις απότομες μεταβολές της συγκέντρωσής της στο αραιωτικό μέσο<sup>12</sup>, με αποτέλεσμα η κατάψυξη σπέρματος σε αραιωτικά με υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης να μην οδηγεί σε βελτίωση της γονιμότητάς του αλλά, αντίθετα, σε σημαντική μείωση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων<sup>13,14,15</sup>.

Μία ακόμη ιδιαιτερότητα των σπερματοζωαρίων του κουνελιού είναι ότι βλάπτονται εύκολα από υπέρτονα δια-



**Σχήμα 1.** Κινητικότητα σπερματοζωαρίων νωπού και κατεψυγμένου σπέρματος

**Figure 1.** Motility of spermatozoa of fresh and thawed semen

**Πίνακας 1.** Ποσοστό τοκετών και μέγεθος τοκετοομάδων μετά από Τ.Σ. με κατεψυγμένο / αποψυγμένο σπέρμα

**Table 1.** The percentage of births and the size of litters after the artificial insemination with frozen / post-thaw semen

Κατηγορία σπέρματος	Ποσοστό τοκετών	Μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση μεγέθους τοκετοομάδων
Κατεψυγμένο σε αραιωτικό Α	50%	$6,8 \pm 1,7$
Κατεψυγμένο σε αραιωτικό Β	60%	$7,0 \pm 1,9$

λύματα αλάτων σε θερμοκρασίες μικρότερες από  $0^\circ \text{C}$ <sup>11,16</sup>. Παρ' όλα αυτά, η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων που καταψύχθηκαν σε αραιωτικό μέσο υπέρτονου διαλύματος DMSO 1 M, διατηρήθηκε σε καλά επίπεδα, υποδηλώνοντας έτσι ότι αυτή η ουσία διαπερνά ελεύθερα την κυτταρική μεμβράνη τους και ταυτόχρονα δεν είναι τοξική<sup>3</sup>.

Στην έρευνα αυτή μελετήθηκε η χρησιμοποίηση αραιωτικού Tris-buffer, στο οποίο περιεχόταν η ανώτερη μη τοξική συγκέντρωση γλυκερόλης (3%) και επιπλέον 3% DMSO (αραιωτικό Β). Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα, η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων που καταψύχθηκαν στο παραπάνω αραιωτικό ήταν σημαντικά ( $P < 0,05$ ) υψηλότερη (54%) από ό,τι εκείνων σε αραιωτικό χωρίς DMSO (αραιωτικό Α) (47%). Η τιμή αυτή βρέθηκε να είναι μεγαλύτερη από τις αντίστοιχες άλλων ερευνών (19%, 44%)<sup>14,3</sup>, όπου είχε χρησιμοποιηθεί επίσης αραιωτικό με DMSO, καθώς και από εκείνη (32%) της μελέτης των Chen et al.<sup>6</sup> όπου χρησιμοποιήθηκε παρόμοιο αραιωτικό Tris-buffer στο οποίο προστέθηκαν 1% γλυκερόλη και 4,5% DMSO.



Το ποσοστό των τοκετών των ζώων στα οποία έγινε Τ.Σ. με κατεψυγμένο/αποψυγμένο σπέρμα με αραιωτικό Β ήταν υψηλότερο (60%), αν και όχι σημαντικά ( $P>0,05$ ), από εκείνο με αραιωτικό Α (50%), αλλά σαφώς χαμηλότερο από το ποσοστό που αναφέρεται σε σχετική έρευνα των Hanada και Nagase<sup>3</sup> (93%). Θα πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι τα συμπεράσματα των τελευταίων βασίζονται σε έρευνα όπου συμμετείχε μικρός αριθμός θηλυκών ζώων (14 ζώα). Αξιολογώντας συνοπτικά το ποσοστό των τοκετών 60%, συμπεραίνουμε ότι είναι πολύ ικανοποιητικό συγκρινόμενο με εκείνο προηγούμενων μελετών όπου είχε χρησιμοποιηθεί κατεψυγμένο σπέρμα κουνελιού (29,8%, 44%, 46%, 53%)<sup>17, 18, 19, 20</sup>.

Επιπλέον, η προσθήκη γλυκερόλης και DMSO στο αραιωτικό μέσο αύξησε, αν και όχι σημαντικά ( $P>0,05$ ), το μέγεθος των τοκετοομάδων.

Συμπερασματικά, η έρευνα αυτή οδήγησε στη διαπίστωση ότι η προσθήκη συνδυασμού των κρυοπροστατευτικών ουσιών γλυκερόλης και DMSO, στην αναλογία 3% και 3% αντίστοιχα, στο αραιωτικό μέσο του σπέρματος κουνελιού, μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την κινητικότητα του κατεψυγμένου / αποψυγμένου σπέρματος και να αυξήσει, αν και όχι σημαντικά, τη γονιμότητά του καθώς επίσης και το μέγεθος των τοκετοομάδων. Τα συμπεράσματα αυτά συμβάλλουν θετικά προς την κατεύθυνση της πρακτικής εφαρμογής της τεχνητής σπερματέγχυσης με κατεψυγμένο σπέρμα σε συνεχώς αυξανόμενο αριθμό εκτροφών κουνελιών, αν και πιστεύουμε ότι είναι απαραίτητη και η επιβεβαίωσή τους με την εφαρμογή της μεθόδου σε μεγαλύτερο αριθμό ζώων.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Maurer RR, Stranzinger GF, Paufler SK. Embryonic development in rabbits after insemination with spermatozoa stored at 37,5 or -196°C for various periods. *J Reprod Fertil* 1976, 48: 43-49
- Weitze KF. Untersuchungen zur Tiefgefrierkonservierung von Kaninchensperma. Tier(rztlichen Hochschule, Hannover, Habilitationsschrift 1977
- Hanada A, Nagase H. Cryopreservative effects of some amides on rabbit spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1980, 60: 247-252
- Arriola J. Interaction of formaldehyde and of sodium and triethanolamine lauryl sulfate on the motility and fertilizing ability of rabbit and bull spermatozoa frozen in egg yolk and milk extenders. Ph.D. Thesis, Cornell University, Ithaca, New York 1982
- Weitze KF, Scharnholz A, Bader H. Tiefgefrierkonservierung von Kaninchen-sperma. II. Einfluss der Langzeitlagerung auf die Befruchtungsfähigkeit. *Zuchthyg* 1982, 17: 172-177
- Chen Y, Yang X, Foote RH. Timed breeding of rabbits with fresh and frozen-thawed semen and evidence of acrosome alteration following freezing and thawing. *Anim Reprod Sci* 1989, 18: 35-41
- Bamba K. Freezing rabbit semen by the use of BF5 diluent. *Lab Anim* 1990, 24: 172-175
- Chen Y, Foote RH. Survival of rabbit spermatozoa frozen and thawed at different rates with and without seeding. *Anim Reprod Sci* 1994, 35: 131-143
- Σφαριόπουλος Α. Κονικλοτροφία. Υπηρεσία Δημοσιευμάτων ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη, 1991, σ. 55
- Lovelock JE. Biophysical aspects of the freezing of living cells. In "The Preservation and Transportation of Normal Tissues" (edited by Wolstenholme GEW and Cameron J). Edinburgh, 1953, p. 131-138
- Nagase H, Tomizuka T. Studies on the permeability of sperm cell membrane. I. Sperm survival in hypertonic solution of polyols. *Jap J Zootech Sci Suppl* 1969, 4: 2-3
- Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, London, 1949: 666-671
- Smith AU, Polge C. Survival of spermatozoa at low temperatures. *Nature*, London, 1950, 166: 668-690
- Smith AU. Biological effect of freezing and supercooling. Williams & Wilkins, Baltimore, 1961, p. 14-16, 34, 373
- Sawada Y, Chang MC. Motility and fertilizing capacity of rabbit spermatozoa after freezing in a medium containing dimethylsulphoxide. *Fertil Steril* 1964, 15: 222-229
- Lovelock JE, Bishop MWH. Prevention of freezing damage to living cells by dimethylsulphoxide. *Nature (London)* 1959, 183: 1394-1399
- Stranzinger GF, Maurer RR, Paufler SK. Fertility of frozen rabbit semen. *J Reprod Fertil* 1971, 24: 111-113
- Götze VG, Paufler S. Besamungsergebnisse und pr(natale Mortalität nach Verwendung von Flüssig und Tiefgefriersperma beim Kaninchen bei normaler Ovulationsauslösung und Superovulation. *Zuchthyg* 1976, 11: 109-174
- Parrish JJ, Foote RH. Fertility of cooled and frozen rabbit sperm measured by competitive fertilization. *Biol Reprod* 1986, 35: 253-257
- Σαμουηλίδης Σ, Σαράτσης Φ, Υψηλάντης Π, Αδαμοπούλου Β. Κατάψυξη σπέρματος κουνελιού. *Δελτίον Ελλ Κτην Εταιρείας* 1996, 47 (2): 124-128