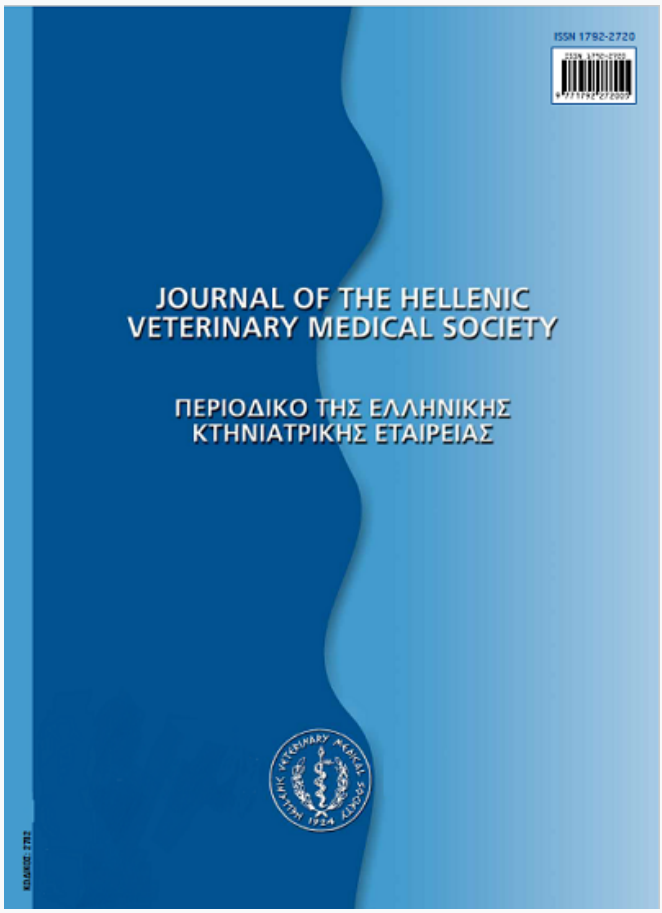
ePublishing

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 61, No 2 (2010)




# A new swift method for ram ejaculate enrichment

*S. G. PIPERELIS (Σ.Γ. ΠΙΠΕΡΕΛΗΣ), D. Vafiadis (Δ. ΒΑΦΕΙΑΔΗΣ), C. Alexopoulos (Κ. ΑΛΕΞΟΠΟΥΛΟΣ)*

doi: 10.12681/jhvms.16101

Copyright © 2018, S. G. Piperelis (Σ.Γ. Πιπερέλης), D. Vafiadis (Δ. Βαφειάδης), C. Alexopoulos (Κ. Αλεξόπουλος)

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.

**To cite this article:**

PIPERELIS (Σ.Γ. ΠΙΠΕΡΕΛΗΣ) S. G., Vafiadis (Δ. ΒΑΦΕΙΑΔΗΣ) D., & Alexopoulos (Κ. ΑΛΕΞΟΠΟΥΛΟΣ) C. (2018). A new swift method for ram ejaculate enrichment. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, *61*(2), 120–126. https://doi.org/10.12681/jhvms.16101

https://epublishing.ekt.gr | **e-Publisher:** EKT | **Downloaded at:** 16/02/2026 23:41:50

Ethiopia, pp 268.

Morand-Fehr P and Boyazoglu J (1999) Present state and future outlook of the small ruminant sector. Small Ruminant Research 34:175-188.

Neimann-Sorensen A and Tribe DE (1982) Very intensive systems In: World Animal Science, Subseries C: Production-System approach. Sheep and goat production, Elsevier scientific publishing company, pp 401.

NRC (2007) Nutrient Requirements of Small Ruminants. Sheep, Goats, Cervids and New World Camelids. The National Academy Press.

Thomas DL and Rowe C (1998) Proc. 4$^{0}$ Great Lakes Dairy Sheep Symposium. Spooner Agric. Res. Stn. Publ., Spooner, WI. pp 64.

Tsiboukas K, Spathis P, Tsoukalas S, Vainas A, Sklavos T, Nellas E (1998) Farm Accountancy Data Network (FADN) Development of basic economic indicators of the agricultural enterprises in Greece during the years 1989-1993 (in Greek).

Valergakis GE, Arsenos G, Basdagianni Z, Banos G (2008) Grouping strategies and lead factors for ration formulation in milking ewes of the Chios breed. Livestock Science 115:211-218.

Zygoyiannis D (2006a) Sheep production in the world and in Greece. Small Runinant Research 62:143-147.

Zygoyiannis D (2006b) "Sheep Husbandry" 2$^{nd}$ edition (in Greek), Contemporary Education, Thessaloniki.

JOURNAL OF THE HELLENIC VETERINARY MEDICAL SOCIETY 2010, 61(2): 120-126
ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 2010, 61(2): 120-126

*Original article*
*Ερευνητική*

# A new swift method for ram ejaculate enrichment

**Piperelis S. G.**[1], DVM, PhD, **Vafiadis D.**[2], DVM, PhD,
†**Alexopoulos C.**[1], DVM, PhD, DipECAR, DipEPCHM

[1] *Clinic of Obstetrics & A.I., Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki*
[2] *National Institute of Animal Reproduction & Artificial Insemination, Ionia Thessaloniki*

# Μέθοδος εμπλουτισμού σπέρματος κριού σε ζωηρά κινούμενα σπερματοζωάρια

**Σ. Γ. Πιπερέλης**[1], DVM, PhD, **Δ. Βαφειάδης**[2], DVM, PhD,
†**Κ. Αλεξόπουλος**[1], DVM, PhD, DipECAR, DipEPCHM

[1]*Κλινική Παραγωγικών Ζώων, Κτηνιατρική Σχολή ΑΠΘ*
[2]*Ινστιτούτο Αναπαραγωγής & Τεχνητής Σπερματέγχυσης, Ιωνία Θεσσαλονίκης*

**ABSTRACT**. Semen availability in ram semen production facilities is of great importance and a method that would increase viability in low viability ejaculates could be useful. In this study the possibility of a glass beads filtration method estimating the beads total surface provided (TSP) for adhesion of spermatozoa is evaluated. Initially, two different TSP (102cm$^2$, 154cm$^2$) achieved by various sizes of beads were tested and no significant difference in viability improvement appeared for the same TSP by different beads ($p<0.05$). An optimization test followed in which three different funnels were evaluated using standard TSP (154cm$^2$). The only parameter improved was filtrate volume, while filtration time, density and viability improvement remained the same ($p<0.05$). Finally, different TSP were evaluated and significant differences in viability improvement ($p<0.01$) and filtrate volume ($p<0.05$) for 102cm$^2$ appeared. Increase in initial value 25% for viability and ejaculate recovery 65% all in time less than 6 minutes strongly suggest that through further development this method can be used in ram semen production facilities.

***Keywords:*** ram semen, ejaculate filtration, sperm enrichment method

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ.** Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διεύρυνση της δυνατότητας αξιοποίησης υποβαθμισμένων εκσπερματισμάτων κριών (με ζωτικότητα <70%), που κατά κανόνα απορρίπτονται ως ακατάλληλα. Η βελτίωση της αναλογίας του εκσπερματίσματος σε ζωηρά κινούμενα σπερματοζωάρια (εμπλουτισμός) επιχειρείται με τη χρήση φίλτρου γυάλινων σφαιριδίων κατακράτησης των νεκρών σπερματοζωαρίων. Καθοριστικός παράγοντας για τη διαμόρφωση του φίλτρου θεωρείται η Συνολική Προσφερόμενη Επιφάνεια των Σφαιριδίων (Σ.Π.Ε.Σ.), ανεξάρτητα από το μέγεθός τους. Η πειραματική ομάδα συγκροτήθηκε από τους είκοσι επτά (27) σπερματοδότες κριούς φυλής Χίου του Ι.Α.Τ.Σ. Τα ζώα, ηλικίας 2-6 ετών, στεγάζονταν και διατρέφονταν κάτω από τις ίδιες συνθήκες σε όλη τη διάρκεια του πειραματισμού. Χρησιμοποιήθηκαν τα εκσπερματίσματα που απορρίπτονταν ως ακατάλληλα για περαιτέρω επεξεργασία από το Ι.Α.Τ.Σ. λόγω χαμηλής ζωτικότητας, αλλά με κινητικότητα και πυκνότητα φυσιολογικές. Ακολουθούσε η διαδικασία ανάμιξης του κάθε δείγματος των 3 ml με προεπιλεγμένη ποσότητα γυάλινων σφαιριδίων (Worf Glasskugeln GmBh, Meinz Germany), διαμέτρου 1.500, 2.000 ή 3.000 μm, με συγκεκριμένη συνολική επιφάνεια. Ο προσδιορισμός της Σ.Π.Ε.Σ., μιας δεδομένης ποσότητας σφαιριδίων συγκεκριμένης διαμέτρου (απαραίτητη για την διεξαγωγή των πειραματισμών), έγινε με τη χρήση της «αρχής της Άνωσης» του Αρχιμήδη. Αρχικά, για τον έλεγχο της ακρίβειας της υπόθεσης ότι η Σ.Π.Ε.Σ. είναι το καθοριστικό μέγεθος διαμόρφωσης του φίλτρου σφαιριδίων,

*Correspondence:* Piperelis S. G.
Philips County Veterinary Clinic, PO Box 1345, 59538 Malta, MT, USA
E-mail: spiperelis@gmail.com

*Αλληλογραφία:* Σ. Γ. Πιπερέλης
Εθνικής Αντιστάσεως 199, 161 22 Αθήνα
E-mail: spiperelis@gmail.com

*Submission date: 05.11.2009*
*Approval date: 04.02.2010*

*Ημερομηνία υποβολής: 05.11.2009*
*Ημερομηνία εγκρίσεως: 04.02.2010*

ως συσκευή υποδοχής του μίγματος σφαιριδίων/εκσπερματίσματος χρησιμοποιήθηκε μια απλή χοάνη με την προσθήκη ενός γυάλινου σφαιριδίου διαμέτρου 5 mm στο στόμιό της για τον έλεγχο της ροής και τη συγκράτηση του φίλτρου. Σε όλα τα δείγματα που ήρθαν σε επαφή με Σ.Π.Ε.Σ. ίσης έκτασης παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση της ζωτικότητας ανεξάρτητα από τη διάμετρο των σφαιριδίων που χρησιμοποιήθηκαν (P<0,05). Στην αξιολόγηση συσκευών τοποθέτησης και συγκράτησης των σφαιριδίων του φίλτρου, εκτός από την απλή χοάνη χρησιμοποιήθηκαν η γυάλινη απιοειδής προχοΐδα και η σωληνωτή διαχωριστική χοάνη. Με τη χρησιμοποίηση γυάλινης απιοειδούς διαχωριστικής χοάνης ανακτήθηκε σημαντικά μεγαλύτερος όγκος από εκείνον της χοάνης και της σωληνωτής διαχωριστικής χοάνης (P<0,05).
Για την επιλογή της καταλληλότερης Σ.Π.Ε.Σ. χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια διαμέτρου 1.500 μm, 2.000 μm και 3.000 μm, για τη διαμόρφωση επιφανειών προσκόλλησης σπερματοζωαρίων έκτασης από 16 $cm^2$ έως και 154 $cm^2$ και γυάλινη απιοειδής διαχωριστική χοάνη για την τοποθέτησή τους. Σε όλες τις περιπτώσεις, ο όγκος των δειγμάτων που ανακτήθηκε μετά από τη δίοδο από φίλτρο ήταν σημαντικά μικρότερος συγκριτικά με τον αρχικό (P<0,05). Φίλτρα με Σ.Π.Ε.Σ. σφαιριδίων έκτασης 103 $cm^2$ αποδείχθηκαν τα πλέον αποτελεσματικά με βάση τη συνεκτίμηση όλων των παραμέτρων που εξετάστηκαν (ανακτώμενος όγκος εκσπερματίσματος, ζωτικότητα σπερματοζωαρίων και πυκνότητα εκσπερματίσματος) (P<0,05).

***Λέξεις ευρετηρίασης:*** σπέρμα κριού, εκσπερμάτισμα, μέθοδος εμπλουτισμού εκσπερματίσματος

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στα πρόβατα, οι μεταβολές στη διάρκεια του ημερήσιου φωτισμού, καθώς και άλλες μεταβολές στην εξέλιξη των εποχών του έτους, επηρεάζουν καθοριστικά τον άξονα υποθαλάμου - υπόφυσης - ωοθηκών (Kafi et al. 2004) και την αναπαραγωγική δραστηριότητα (Avdi et al. 2004). Στους κριούς οι πλέον εμφανείς αλλαγές αφορούν στις μεταβολές της γενετήσιας ορμής (libido), στις αυξομειώσεις του μεγέθους των όρχεων, καθώς και στις μεταβολές των ποσοτικών και των ποιοτικών χαρακτηριστικών του εκσπερματίσματός τους. Έτσι, σε περιόδους μειωμένης αναπαραγωγικής δραστηριότητας αναμένεται συρρίκνωση του μεγέθους των όρχεων με επακόλουθα τη μείωση του όγκου του εκσπερματίσματος και την αύξηση του ποσοστού των νεκρών σπερματοζωαρίων σε αυτό (Gastel et al. 1995; Nowakowski and Cwikkla 1994). Όμως, και σε περιόδους αυξημένης αναπαραγωγικής δραστηριότητας παράγοντες, όπως η ηλικία, η διατροφή, το περιβάλλον κ.ά., οδηγούν σε αυξημένα ποσοστά νεκρών σπερματοζωαρίων, σε σημαντικό ποσοστό εκσπερματισμάτων (D'Alessandro and Martemucci 2003; Windsor 1997).

Από έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί κυρίως στον άνθρωπο, αλλά και στα ιπποειδή έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία μεγάλου αριθμού νεκρών σπερματοζωαρίων σε ένα εκσπερμάτισμα αποτελεί σημαντική πηγή παραγωγής ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) (Henkel et al. 2005; Williams and Ford 2005). Οι ROS ενοχοποιούνται για την οξείδωση των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης των ζωντανών σπερματοζωαρίων (Wang et al. 2003b), που συμβάλλει στην ταχύτερη μείωση της ζωτικότητας του εκσπερματίσματος (Wang et al. 2003a). Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ένας κύκλος αντιδράσεων αφού η ύπαρξη νεκρών σπερματοζωαρίων επισπεύδει το θάνατο ζωντανών, που με τη σειρά τους θα επισπεύσουν την καταστροφή ακόμη περισσότερων ζωντανών σπερματοζωαρίων του εκσπερματίσματος (Said et al. 2004). Σε τέτοιες περιπτώσεις λύση θα προσέφερε η αφαίρεση των νεκρών σπερματοζωαρίων από το εκσπερμάτισμα και οι επιστημονικές προσπάθειες επικεντρώνονται στην εξεύρεση των κατάλληλων μεθόδων γι' αυτό (Valcarcel et al. 1996).

Τις τελευταίες δεκαετίες, στον άνθρωπο, όπου βρίσκουν εφαρμογή πρωτόκολλα εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF) στα οποία απαιτείται μικρός αριθμός ζωντανών σπερματοζωαρίων, έχουν αναπτυχθεί αρκετές αξιόλογες μέθοδοι διαχωρισμού των νεκρών από τα ζωντανά σπερματοζωάρια (Larson-Cook et al. 2003). Αντίθετα, στα παραγωγικά ζώα ιδιαιτερότητες, όπως οι ανάγκες για μεγάλο αριθμό σπερματοζωαρίων, για διατήρηση της σύστασης του σπερματικού πλάσματος, για υψηλή απόδοση και ταχύτητα των χρησιμοποιούμενων μεθόδων κ.ά. (Januskauskas et al. 2005; Mustafa et al. 1998; Rho et al. 2001), δεν επέτρεψαν ανάλογη πρόοδο.

Στον κριό, όπου η εποχικότητα σε συνδυασμό με την απουσία αξιόπιστου πρωτοκόλλου κατάψυξης του σπέρματος (Gil et al. 2003) περιορίζουν σημαντικά τις δυνατότητες των Κέντρων Σπερματοπαραγωγής στην κάλυψη των απαιτήσεων, ιδιαίτερα σε περιόδους αιχμής, η ανάγκη εξεύρεσης λύσεων για την καλύτερη δυνατή αξιοποίηση των διαθέσιμων εκσπερματισμάτων καθίσταται ιδιαίτερα σημαντική. Σύμφωνα με τους Fernandez-Abella et al. (2003), οποιαδήποτε μέθοδος που θα συντελούσε στην αύξηση της διαθεσιμότητας σπέρματος σε δεδομένη στιγμή θα ήταν ιδιαίτερα χρήσιμη.

Στο πλαίσιο της αξιοποίησης υποβαθμισμένων

εκσπερματισμάτων κριών (με ζωτικότητα <70%) που κατά κανόνα απορρίπτονται ως ακατάλληλα, εντάσσονται και οι προσπάθειες του Ινστιτούτου Αναπαραγωγής και Τεχνητής Σπερματέγχυσης (Ι.Α.Τ.Σ). και της Μαιευτικής Κλινικής της Κτηνιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ. Ο εμπλουτισμός του σπέρματος σε ζωηρά κινούμενα σπερματοζωάρια επιχειρείται με τη χρήση φίλτρου γυάλινων σφαιριδίων κατακράτησης των νεκρών σπερματοζωαρίων. Καθοριστικός παράγοντας για την διαμόρφωση του φίλτρου θεωρείται η Συνολική Προσφερόμενη Επιφάνεια των Σφαιριδίων (Σ.Π.Ε.Σ.), ανεξάρτητα από το μέγεθός τους.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η πειραματική ομάδα συγκροτήθηκε από τους είκοσι επτά (27) σπερματοδότες κριούς φυλής Χίου του Ι.Α.Τ.Σ. Τα ζώα, ηλικίας 2-6 ετών, στεγάζονταν και διατρέφονταν κάτω από τις ίδιες συνθήκες σε όλη τη διάρκεια του πειραματισμού.

Οι πειραματισμοί διήρκεσαν από το Νοέμβριο του 2003 έως το Δεκέμβριο του 2004 [συνολικά δεκατρείς (13) μήνες] ώστε να περιληφθούν η ένοιστρη, η μεταβατική και η άνοιστρη περίοδος δραστηριότητας των σπερματοδοτών κριών. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν ενενήντα οκτώ (98) πειραματισμοί.

Χρησιμοποιήθηκαν τα εκσπερματίσματα που απορρίπτονταν ως ακατάλληλα για περαιτέρω επεξεργασία από το Ι.Α.Τ.Σ. λόγω χαμηλής ζωτικότητας [<70%, υποκειμενική εκτίμηση σε οπτικό μικροσκόπιο NIKON Eclipse E200 (x100)], αλλά με κινητικότητα > 3,5 [υποκειμενική εκτίμηση σε οπτικό μικροσκόπιο NIKON Eclipse E200 (x100)] και πυκνότητα > 2.600x106 σπερματοζωάρια/ml (μέτρηση με τη βοήθεια πυκνόμετρου DR LANGE LP1).

Σε κάθε επιμέρους πειραματισμό τα επιλεχθέντα εκσπερματίσματα αναμειγνύονταν μεταξύ τους (pooling). Ακολουθούσε επαναξιολόγηση της ζωτικότητας, της κινητικότητας και της πυκνότητας του ενιαίου δείγματος. Στη συνέχεια, το δείγμα διαχωριζόταν σε ίσα μέρη όγκου 3 ml.

Κάθε δείγμα των 3 ml ελεγχόταν εκ νέου ως προς:

- **τη ζωτικότητα**, μετά από χρώση με Eosin-Nigrosin (Brito et al. 2003) για τη διαφοροποίηση και καταμέτρηση των ζωντανών και των νεκρών σπερματοζωαρίων. Από κάθε παρασκεύασμα μετρούνταν 2x400 σπερματοζωάρια, με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου (NIKON Eclipse E200) και καταδυτικού φακού (x400).

- **την κινητικότητα**, με υποκειμενική εκτίμηση σε οπτικό μικροσκόπιο (x100) και τη χρήση κλίμακας αξιολόγησης από το 0 έως το 5 (0: ακίνητα σπερματοζωάρια, 5: σπερματοζωάρια με ζωηρή κίνηση προς τα εμπρός).

- **την πυκνότητα**, με τη χρήση πυκνόμετρου τύπου DR LANGE LP1.

Ακολουθούσε η διαδικασία ανάμιξης του κάθε δείγματος των 3 ml με προεπιλεγμένη ποσότητα γυάλινων σφαιριδίων (Worf Glasskugeln GmBh, Meinz Germany), διαμέτρου 1.500, 2.000 ή 3.000 μm, με συγκεκριμένη συνολική προσφερόμενη επιφάνεια 102 $cm^2$ ή 154 $cm^2$.

Στον πρώτο πειραματισμό (Πίνακας 1), ως συσκευή υποδοχής του μίγματος σφαιριδίων/εκσπερματίσματος χρησιμοποιήθηκε η απλή χοάνη με την προσθήκη ενός γυάλινου σφαιριδίου διαμέτρου 5mm για τον έλεγχο της ροής και τη συγκράτηση του φίλτρου. Η συγκεκριμένη συσκευή περιγράφεται από τον Foote (2001) και είναι η μόνη που εξασφαλίζει ελεύθερη ροή σε αποδεκτά χρονικά πλαίσια. Στην αξιολόγηση συσκευών φιλτραρίσματος (Πίνακας 2), εκτός από την απλή χοάνη χρησιμοποιήθηκαν η γυάλινη απιοειδής προχοΐδα και η σωληνωτή διαχωριστική χοάνη. Βιβλιογραφική αναφορά υπήρχε μόνο για την απλή χοάνη (Foote 2001). Οι υπόλοιπες δυο συσκευές επιλέχθηκαν με βάση τη δυνατότητα συγκράτησης των σφαιριδίων σε αυτές χωρίς την ανάγκη προσαρμογών. Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκε ως συσκευή υποδοχής του μίγματος σφαιριδίων/σπέρματος (φίλτρο) γυάλινη χοάνη ή σωληνωτή διαχωριστική χοάνη, το δείγμα και τα σφαιρίδια τοποθετούνταν πρώτα σε γυάλινη κωνική φιάλη χωρητικότητας 100 ml, όπου και αναδεύονταν ήπια για 1 min, τουλάχιστον. Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκε ως συσκευή φίλτρου γυάλινη απιοειδής προχοΐδα, η ανάμειξη και ανάδευση δείγματος και σφαιριδίων γινόταν ευθύς εξ αρχής σε αυτήν. Ο διαχωρισμός του σπέρματος από τα σφαιρίδια (φιλτράρισμα) γινόταν με ελεύθερη ροή του πρώτου και η διαδικασία ολοκληρωνόταν όταν σταματούσε η ροή στο σωλήνα συλλογής. Ακολουθούσε επανέλεγχος του συλλεχθέντος υλικού ως προς τις παραμέτρους που ήδη αναφέρθηκαν (πυκνότητα, ζωτικότητα, κινητικότητα).

Στη διάρκεια όλων των προαναφερθέντων χειρισμών τα εκσπερματίσματα/ δείγματα διατηρούνταν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C.

Ο προσδιορισμός της Σ.Π.Ε.Σ., μιας δεδομένης ποσότητας σφαιριδίων συγκεκριμένης διαμέτρου (απαραίτητη για τη διεξαγωγή των πειραματισμών), έγινε

**Table 1.** Mean (± SEM) sperm viability before and after filtration using beads of different diameters (1.500 μm, 2.000 μm and 3.000 μm), standardised in two filtration surfaces (102 $cm^2$ and 154 $cm^2$) with the same apparatus.
**Πίνακας 1.** Αποτελεσματικότητα φίλτρων αποτελούμενων από γυάλινα σφαιρίδια διαμέτρου 1.500 μm, 2.000 μm και 3.000 μm, Σ.Π.Ε. 102 $cm^2$ και 154 $cm^2$, τοποθετημένων σε χοάνη, για τη βελτίωση των χαρακτηριστικών υποβαθμισμένων εκσπερματισμάτων κριών με κατακράτηση νεκρών σπερματοζωαρίων (Μ.Ο.±S.E.M.).

| Διάμετροσφαιριδίων (μm) | Συνολική προσφερόμενη επιφάνεια προσκόλλησης | n | Ζωτικότητα (%) | |
|---|---|---|---|---|
| | | | πριν | μετά |
| 1500 | 154 $cm^2$ | 7 | 52,3cy±4,9 | 64,0cy±3,1 |
| 2000 | | 7 | 60,1cy±2,0 | 69,3dy±2,8 |
| 3000 | | -- | -- | -- |
| 1500 | 102 $cm^2$ | 6 | 62,7ax±0,9 | 76,7bx±1,0 |
| 2000 | | 6 | 65,2ax±0,7 | 79,9bx±1,6 |
| 3000 | | 6 | 64,3ax±1,3 | 77,1bx±2,0 |

(a,b,c,d): Τιμές στην ίδια σειρά με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους (P<0.05)
(x,y): Τιμές στην ίδια στήλη με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους (P<0.05)

**Table 2.** Mean (± SEM) semen parameters before and after filtration using different funnels with the same filtration surface (154 $cm^2$).
**Πίνακας 2.** Αξιολόγηση συσκευών τοποθέτησης γυάλινων σφαιριδίων σταθερής Σ.Π.Ε. (154 $cm^2$) για τη δημιουργία φίλτρων βελτίωσης των χαρακτηριστικών υποβαθμισμένων εκσπερματισμάτων κριών με κατακράτηση νεκρών σπερματοζωαρίων (Μ.Ο.±S.E.M.).

| Συσκευή | n | χρόνος (sec) | Όγκος (ml) | | Πυκνότητα ($10^6$ spz/ml) | | Ζωτικότητα (%) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | πριν | μετά | πριν | μετά | πριν | μετά |
| **Απιοειδής προχοΐδα** | 8 | $330^{x}$±48 | $2,8^{ax}$±0,1 | $2,2^{bx}$±0,1 | $4460^{ax}$±225 | $3904^{ax}$±316 | $58,2^{ax}$±3 | $68,0^{bx}$±2,6 |
| **Χοάνη** | 7 | $336^{x}$±54 | $2,8^{ax}$±0,1 | 1,3by±0,1 | $4331^{ax}$±267 | $3913^{ax}$±250 | $60,9^{ax}$±3,8 | $72,1^{bx}$±3,2 |
| **Σωληνωτή διαχωριστική χοάνη** | 7 | $336^{x}$±54 | $2,8^{ax}$±0,1 | $1,4^{by}$±0,2 | $4437^{ax}$±262 | $4025^{ax}$±213 | $57,8^{ax}$±3,8 | $68,5^{ax}$±3,4 |

(a,b): Τιμές στην ίδια σειρά με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους (P<0.05)
(x,y): Τιμές στην ίδια στήλη με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους (P<0.05)

**Table 3.** Mean (± SEM) semen parameters before and after filtration through different surfaces (102 $cm^2$ and 154 $cm^2$) with the same apparatus.
**Πίνακας 3.** Αξιολόγηση αποτελεσματικότητας φίλτρων από γυάλινα σφαιρίδια Σ.Π.Ε. 102 $cm^2$ και 154 $cm^2$ τοποθετημένων σε απιοειδή προχοΐδα για τη βελτίωση των χαρακτηριστικών υποβαθμισμένων εκσπερματισμάτων κριών με κατακράτηση νεκρών σπερματοζωαρίων (Μ.Ο.±S.E.M.).

| Επιφάνεια (ΣΠΕ) | n | Όγκος (ml) | | Πυκνότητα ($10^6$ spz/ml) | | Ζωτικότητα (%) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | πριν | μετά | πριν | μετά | πριν | μετά |
| **102 cm2** | 22 | $3,0^{ax}$±0,1 | $2,2^{bx}$±0,1 | $4068^{ax}$±127 | $4066^{ax}$±180 | $62,5^{ax}$±0,8 | $76,5^{bx}$±1,0 |
| **154 cm2** | 22 | $2,8^{ax}$±0,1 | $1,6^{by}$±0,1 | $4412^{ax}$±138 | $3945^{bx}$±148 | $58,9^{ax}$±1,9 | $69,5^{by}$±1,7 |

(a,b):Τιμές στην ίδια σειρά με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά (P<0.05)
(x,y):Τιμές στην ίδια στήλη με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά (P<0.05)

με τη χρήση της «αρχής της Άνωσης» του Αρχιμήδη.

**Στατιστική Επεξεργασία**

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) του στατιστικού πακέτου SPSS, ver 12.00, για Windows XP.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στον πίνακα 1 παρατίθενται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη δίοδο υποβαθμισμένων εκσπερματισμάτων από φίλτρα σφαιριδίων διαμέτρου 1.500 μm, 2.000 μm και 3.000 μm, με συνολική επιφάνεια προσκόλλησης 102 $cm^2$ και 154 $cm^2$, τοποθετημένων σε γυάλινη χοάνη. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν δεν διέφεραν μεταξύ τους ως προς τη ζωτικότητα πριν από την υποβολή τους στη διαδικασία διόδου από τα φίλτρα σφαιριδίων.

Σε όλα τα δείγματα που ήρθαν σε επαφή με Σ.Π.Ε.Σ. έκτασης 102 $cm^2$ παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση της ζωτικότητας που ήταν ανεξάρτητη από τη διάμετρο των σφαιριδίων που χρησιμοποιήθηκαν ($P<0,05$). Από τα δείγματα που ήρθαν σε επαφή με Σ.Π.Ε.Σ. έκτασης 154 $cm^2$ σημαντική βελτίωση της ζωτικότητας παρατηρήθηκε μόνο στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια διαμέτρου 2.000 μm ($P<0,05$), ενώ στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια διαμέτρου 1.500 μm παρατηρήθηκε μόνο τάση βελτίωσης της ζωτικότητας ($P=0,069$).

Στον πίνακα 2 παρατίθενται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη χρησιμοποίηση τριών διαφορετικών συσκευών (γυάλινη χοάνη, γυάλινη σωληνωτή διαχωριστική χοάνη και γυάλινη προχοΐδα) για την τοποθέτηση φίλτρου σταθερής Σ.Π.Ε.Σ. έκτασης 154 $cm^2$, αποτελούμενου από σφαιρίδια διαμέτρου 2.000 μm. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους ως προς τον όγκο, την πυκνότητα και τη ζωτικότητα πριν από την υποβολή τους στη διαδικασία διόδου από τα φίλτρα σφαιριδίων.

Ο χρόνος στον οποίο ολοκληρώθηκε η ελεύθερη ροή των δειγμάτων από τα φίλτρα δεν επηρεάστηκε από το είδος της συσκευής που χρησιμοποιήθηκε. Ο όγκος των δειγμάτων που ανακτήθηκε ήταν σημαντικά μικρότερος από τον αρχικό ($P<0,05$) σε όλες τις συσκευές. Με τη χρησιμοποίηση γυάλινης προχοΐδας ανακτήθηκε σημαντικά μεγαλύτερος όγκος από εκείνον της χοάνης και της σωληνωτής διαχωριστικής χοάνης ($P<0,05$). Η πυκνότητα των δειγμάτων σε σπερματοζωάρια δεν επηρεάστηκε σημαντικά από τις συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν και δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των ομάδων μετά το τέλος της διαδικασίας. Τέλος, η ζωτικότητα των σπερματοζωαρίων βελτιώθηκε σημαντικά στις περιπτώσεις χρησιμοποίησης γυάλινης προχοΐδας και γυάλινης χοάνης ($P<0,05$), ενώ στην περίπτωση της σωληνωτής διαχωριστικής χοάνης διαπιστώθηκε τάση βελτίωσης ($P=0,059$).

Στον πίνακα 3 παρατίθενται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη χρησιμοποίηση σφαιριδίων διαμέτρου 1.500 μm, 2.000 μm και 3.000 μm για την επίτευξη επιφανειών προσκόλλησης σπερματοζωαρίων έκτασης 102 $cm^2$ και 154 $cm^2$ και γυάλινης απιοειδούς προχοΐδας για την τοποθέτησή τους. Για την επίτευξη των συγκεκριμένων Σ.Π.Ε.Σ. χρησιμοποιήθηκαν όλα τα διαθέσιμα μεγέθη σφαιριδίων σε ίσους αριθμούς για την κάθε Σ.Π.Ε.Σ. χωρίς να υπάρξει διαφορά μεταξύ τους στην αποτελεσματικότητα του φιλτραρίσματος και γι' αυτό τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συνολικά. Και στην περίπτωση αυτή τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν δεν διέφεραν σημαντικά ως προς τον όγκο, την πυκνότητα και τη ζωτικότητα πριν από την υποβολή τους στη διαδικασία διόδου από τα φίλτρα σφαιριδίων.

Σε όλες τις περιπτώσεις, ο όγκος των δειγμάτων που ανακτήθηκε μετά από τη δίοδο από φίλτρο ήταν σημαντικά μικρότερος συγκριτικά με τον αρχικό ($P<0,05$), αλλά με τη χρησιμοποίηση Σ.Π.Ε.Σ. έκτασης 102 $cm^2$ ανακτήθηκε σημαντικά μεγαλύτερος όγκος συγκριτικά με εκείνον που ανακτήθηκε με τη χρησιμοποίηση Σ.Π.Ε.Σ. έκτασης 154 $cm^2$ ($P<0,05$). Η πυκνότητα των δειγμάτων σε σπερματοζωάρια μειώθηκε σημαντικά όταν χρησιμοποιήθηκε Σ.Π.Ε.Σ. έκτασης 154 $cm^2$ ($P<0,05$). Τέλος, η ζωτικότητα των σπερματοζωαρίων βελτιώθηκε σημαντικά και στις δύο περιπτώσεις που εξετάστηκαν ($P<0,05$).

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Προσπάθειες για τη βελτίωση χαρακτηριστικών του σπέρματος με τη χρησιμοποίηση γυάλινων επιφανειών με τη μορφή σφαιριδίων πραγματοποιήθηκαν κατά το παρελθόν στον άνθρωπο (Daya et al. 1987), στα τρωκτικά (Lui et al. 1979) και στον ταύρο (Foote 2001) και οδήγησαν σε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Όμως, σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα σφαιρίδια (Foote 2001) ή σφαιρίδια σιλικόνης (Ahmad et al. 2003; Januskauskas et al. 2005), πολύ μικρού μεγέθους και συγκεκριμένου όγκου, χωρίς να ληφθεί υπ' όψιν η Σ.Π.Ε.Σ. Φαίνεται ότι η χρήση των μικροσφαιριδίων

αποσκοπούσε στην παρεμπόδιση της ελεύθερης ροής των σπερματοζωαρίων ώστε να κατακρατηθούν τα νεκρά που στερούνταν της ικανότητας ελιγμών (Anzar and Graham 1996; Bangham and Hancock 1955).

Στον παρόντα πειραματισμό χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια με πολύ μεγαλύτερες διαστάσεις με βάση την παρατήρηση του Foote (2001) ότι τα σπερματοζωάρια προσκολλώνται στις γυάλινες επιφάνειες εξαιτίας μόνιμων και μη αναστρέψιμων βλαβών της κυτταρικής μεμβράνης τους, ενώ δεν υπεισέρχεται ο παράγοντας κίνηση. Η επιλογή αυτή συνέβαλε αφενός στην αύξηση της ταχύτητας της ελεύθερης ροής του εκσπερματίσματος και αφετέρου στην ευκολότερη συγκράτηση των σφαιριδίων στο χώρο του φίλτρου που αποτελούσε πρόβλημα σε προηγούμενες προσπάθειες (Ralf and Schill 2003). Τα αποτελέσματα που παρατίθενται στον πίνακα 1 επιβεβαιώνουν ότι η συγκράτηση των νεκρών σπερματοζωαρίων δεν είναι μηχανική και ότι οι μεταβολές που υφίσταται το εκσπερμάτισμα μετά από τη δίοδό του από φίλτρο γυάλινων σφαιριδίων καθορίζονται μάλλον από τη Σ.Π.Ε.Σ. και όχι από το μέγεθος των σφαιριδίων που επιλέγονται.

Οι συσκευές που χρησιμοποιούνται για την υποδοχή του μίγματος σφαιριδίων/σπέρματος προφανώς επηρεάζουν την ταχύτητα διόδου και το ποσοστό ανάκτησης του εκσπερματίσματος (Πίνακας 2). Οι παράμετροι αυτές, καθώς και η διατήρηση της σύστασης και της ποσότητας του σπερματικού πλάσματος, είναι ζωτικής σημασίας για κάθε μέθοδο εμπλουτισμού σπέρματος που προορίζεται να χρησιμοποιηθεί στη ζωική παραγωγή (Valcarcel et al. 1996). Στις συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στον παρόντα πειραματισμό, ο χρόνος διόδου του εκσπερματίσματος ήταν ο ίδιος περίπου (μικρότερος από 6 min), για σφαιρίδια ίδιας διαμέτρου και για την ίδια Σ.Π.Ε.Σ. Ανάλογοι χρόνοι αναφέρονται στη βιβλιογραφία, αλλά σε προσπάθειες εμπλουτισμού αραιωμένου σπέρματος (Anzar et al. 1997; Correa and Zavos 1996; Januskauskas et al. 2005) και όχι νωπού εκσπερματίσματος.

Από προπειράματα που διενεργήθηκαν διαπιστώθηκε ότι η ανάμειξη των εκσπερματισμάτων με τα σφαιρίδια, για μικρό χρονικό διάστημα, πριν από την τοποθέτησή τους στη συσκευή φίλτρου, βελτίωνε το τελικό αποτέλεσμα. Προφανώς, η ανάμειξη αυτή συνέβαλε στη γρήγορη επαφή των σπερματοζωαρίων με τη Σ.Π.Ε.Σ. των σφαιριδίων, στη γρηγορότερη προσκόλληση των νεκρών και τελικά, στη μείωση του χρόνου διόδου από τα φίλτρα που επιλέχθηκαν. Στους πειραματισμούς που χρησιμοποιήθηκε απλή χοάνη ή σωληνωτή χοάνη για την τοποθέτηση των σφαιριδίων, το σχήμα τους επέβαλε την προηγούμενη ανάμιξη σφαιριδίων/σπέρματος σε κωνική φιάλη. Διαπιστώθηκε ότι η επαφή του υλικού με ένα επιπλέον γυάλινο σκεύος και η αναπτυσσόμενη επιφανειακή τάση αύξανε τις απώλειες όγκου του εκσπερματίσματος, μειώνοντας έτσι το ποσοστό ανάκτησής του. Αντίθετα, το σχήμα της απιοειδούς προχοΐδας επέτρεπε την απευθείας ανάμιξη σφαιριδίων/σπέρματος. Εκτιμάται ότι αυτός είναι ο κύριος λόγος για τον οποίο με τη συσκευή αυτή παρατηρήθηκαν σημαντικά μικρότερες απώλειες στον όγκο των ανακτηθέντων δειγμάτων (Πίνακας 2). Τελικά, με βάση το ποσοστό ανάκτησης των δειγμάτων, η απιοειδής προχοΐδα επιλέχθηκε ως η καταλληλότερη συσκευή υποδοχής των φίλτρων σφαιριδίων.

Από τον έλεγχο φίλτρων σφαιριδίων Σ.Π.Ε.Σ. έκτασης 102 $cm^2$ και 154 $cm^2$, που συγκροτούνταν από σφαιρίδια διαφόρων μεγεθών τοποθετημένων σε συσκευή απιοειδούς προχοΐδας (Πίνακας 3), επιβεβαιώθηκε η αποτελεσματικότητα της μεθόδου καθώς διαπιστώθηκε σημαντική βελτίωση της ζωτικότητας όλων των υπό εξέταση δειγμάτων. Ο σημαντικά μεγαλύτερος όγκος των δειγμάτων που ανακτήθηκε με τη Σ.Π.Ε.Σ. 102 $cm^2$ ενδέχεται να οφείλεται στη μειωμένη απώλεια όγκου σπέρματος λόγω ανάπτυξης επιφανειακής τάσης μεταξύ σφαιριδίων-εκσπερματίσματος.

Από όλα τα παραπάνω διαφαίνεται ότι η επιφανειακή τάση που αναπτύσσεται μεταξύ των σφαιριδίων του φίλτρου και του εκσπερματίσματος επηρεάζει την ποσότητα του σπέρματος που ανακτάται. Επίσης, διαφαίνεται ότι η ανεπαρκής έκταση της γυάλινης επιφάνειας ενός φίλτρου και ο κορεσμός της από νεκρά σπερματοζωάρια μπορεί να περιορίσει τα περιθώρια βελτίωσης. Έτσι, σε ένα εκσπερμάτισμα δεδομένης ζωτικότητας και όγκου, η χρησιμοποίηση Σ.Π.Ε.Σ. μεγαλύτερης από την απαιτούμενη, αναμένεται να οδηγήσει σε υπερβολική απώλεια όγκου, ενώ αντίθετα, η χρησιμοποίηση μικρότερης Σ.Π.Ε.Σ. αναμένεται να οδηγήσει σε περιορισμένη βελτίωση των χαρακτηριστικών του. Ανάλογες επιπτώσεις μπορεί να υπάρξουν και όταν ο συνολικός όγκος των γυάλινων σφαιριδίων του φίλτρου βρίσκεται σε δυσαναλογία με τον όγκο του εκσπερματίσματος (για δεδομένη Σ.Π.Ε.Σ.). Επομένως, γίνεται φανερό ότι το αποτέλεσμα της χρησιμοποίησης φίλτρου γυάλινων σφαιριδίων με στόχο τη βελτίωση των χαρακτηριστικών ενός εκσπερματίσματος εξαρτάται από διάφορες

παραμέτρους, η αλληλεπίδραση των οποίων θα πρέπει να διευκρινιστεί περαιτέρω (Piperelis et al. 2005).

Συμπερασματικά προκύπτει ότι η χρήση φίλτρου γυάλινων σφαιριδίων με υπολογισμό της Σ.Π.Ε.Σ. μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εμπλουτισμό υποβαθμισμένων εκσπερματισμάτων κριού. Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά (βελτίωση ζωτικότητας επί της αρχικής τιμής, ~20%, ανάκτηση εκσπερματίσματος επί του αρχικού όγκου, ~65%, σε χρόνο <6 min), αλλά απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την οριστικοποίηση παραμέτρων που θα επιτρέψουν την ευρεία χρησιμοποίησή του.

## REFERENCES - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ


Ahmad, Z., Anzar, M., Shahab, M., Ahmad, N. and Andrabi, S.M.H. (2003) Sephadex and sephadex ion-exchange filtration improves the quality and freezability of low-grade buffalo semen ejaculates. Theriogenology 59, 1189-1202.

Anzar, M. and Graham, E.F. (1996) Role of sperm motility and acrosome integrity in the filtration of bovine semen. Theriogenology 45, 513-520.

Anzar, M., Graham, E.F. and Iqbal, N. (1997) Post-thaw plasma membrane integrity of bull spermatozoa separated with a sephadex ion-exchange column. Theriogenology 47, 845-856.

Avdi, M., Banos, G., Stefos, K. and Chemineau, P. (2004) Seasonal variation in testicular volume and sexual behaviour of Chios and Serres rams. Theriogenology 62, 275-282.

Bangham, A. and Hancock, J. (1955) A new method for counting live and dead spermatozoa. Nature 176, 656.

Brito, L.F.C., Barth, A.D., Bilodeau-Goeseels, S., Panich, P.L. and Kastelic, J.P. (2003) Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. Theriogenology 60, 1539-1551.

Correa, J.R. and Zavos, P.M. (1996) Preparation and recovery of frozen-thawed bovine spermatozoa via various sperm selection techniques employed in assisted reproductive technologies. Theriogenology 46, 1225-1232.

D'Alessandro, A.G. and Martemucci, G. (2003) Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Leccese ram. Animal Reproduction Science 79, 93-102.

Daya, S., Gwatkin, R. and Bissessar, H. (1987) Separation of motile human spermatozoa by means of a glass bead column. Gamete Research 17, 375-380.

Foote, R. (2001) Inhibition of sperm motility does not affect live-dead separation of bull sperm by glass beads. Asian Journal of Andrology Sep,3: 193-198.

Gastel, T., Bielli, A., Perez, R., Lopez, A., Castrillejo, A., Tagle, R., Franco, J., Laborde, D., Forsberg, M. and Rodriguez-Martinez, H. (1995) Seasonal variations in testicular morphology in Uruguayan Corriedale rams. Animal Reproduction Science 40, 59-75.

Gil, J., Lundeheim, N., Soderquist, L. and Rodriguez-Martinez, H. (2003) Influence of extender, temperature and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. Theriogenology 59, 1241-1255.

Henkel, R., Kierspel, E., Stalf, T., Mehnert, C., Menkveld, R., Tinneberg, H.-R., Schill, W.-B. and Kruger, T.F. (2005) Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. Fertility and Sterility 83, 635-642.

Januskauskas, A., Lukoseviciute, K., Nagy, S., Johannisson, A. and Rodriguez-Martinez, H. (2005) Assessment of the efficacy of Sephadex G-15 filtration of bovine spermatozoa for cryopreservation. Theriogenology 63, 160-178.

Kafi, M., Safdarian, M. and Hashemi, M. (2004) Seasonal variation in semen characteristics, scrotal circumference and libido of Persian Karakul rams. Small Ruminant Research 53, 133-139.

Larson-Cook, K.L., Brannian, J.D., Hansen, K.A., Kasperson, K.M., Aamold, E.T. and Evenson, D.P. (2003) Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. Fertility and Sterility 80, 895-902.

Lui, C., Mrsny, R. and Meizel, S. (1979) Procedures for obtaining high percentages of viable in vitro capacitated hamster sperm. Gamete Research 2, 207-211.

Mustafa, G., Anzar, M. and Arslan, M. (1998) Separation of motile spermatozoa from frozen-thawed buffalo semen: Swim-up vs filtration procedures. Theriogenology 50, 205-211.

Nowakowski, P. and Cwikkla, A. (1994) Seasonal variation in testes size in Polish Merino rams and its relationship to reproductive performance in spring. Theriogenology 42, 613-622.

Piperelis, S., Vafiadis, D., Alexopoulos, C. and Boscos, C. ( 2005) Development of a new rapid method for ram semen enrichment. In: 6th International Sheep Veterinary Congress, Krete, Greece. p 269 (Abstr.).

Ralf, R. and Schill, H. (2003) Sperm preparation for ART. Reprod Biol Endocrinol 1, 108.

Rho, G.J., Hahnel, A.C. and Betteridge, K.J. (2001) Comparisons of oocyte maturation times and of three methods of sperm preparation for their effects on the production of goat embryos in vitro. Theriogenology 56, 503-516.

Said, T.M., Agarwal, A., Sharma, R.K., Mascha, E., Sikka, S.C. and Thomas, J., Anthony J. (2004) Human sperm superoxide anion generation and correlation with semen quality in patients with male infertility. Fertility and Sterility 82, 871-877.

Valcarcel, A., de las Heras, M.A., Moses, D.F., Perez, L.J. and Baldassarre, H. (1996) Comparison between Sephadex G-10 and Percoll for preparation of normospermic, asthenospermic and frozen/thawed ram semen. Animal Reproduction Science 41, 215-224.

Wang, X., Sharma, R.K., Gupta, A., George, V., Thomas, J., Anthony J., Falcone, T. and Agarwal, A. (2003a) Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. Fertility and Sterility 80, 844-850.

Wang, X., Sharma, R.K., Sikka, S.C., Thomas, J., Anthony J., Falcone, T. and Agarwal, A. (2003b) Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. Fertility and Sterility 80, 531-535.

Williams, A.C. and Ford, W.C.L. (2005) Relationship between reactive oxygen species production and lipid peroxidation in human sperm suspensions and their association with sperm function. Fertility and Sterility 83, 929-936.

Windsor, D.P. (1997) Variation between ejaculates in the fertility of frozen ram semen used for cervical insemination of merino ewes. Animal Reproduction Science 47, 21-29.