

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ LOẠI ĐƯỜNG LÊN PHẨM CHẤT TINH DỊCH CHÓ TRONG QUÁ TRÌNH ĐÔNG LẠNH

ĐỖ VĂN THU, NGUYỄN ANH, NGUYỄN TUẤN ANH

1. MỞ ĐẦU

Ảnh hưởng có lợi của việc bổ sung đường vào môi trường đến sức sống của các tế bào tinh trùng động vật có vú sau đông lạnh đã được khẳng định trong nhiều công trình [6]. Đường có chức năng cung cấp cơ chất sinh năng lượng cho tế bào tinh trùng trong quá trình ủ, duy trì áp suất thẩm thấu của môi trường và hoạt động như một chất bảo vệ lạnh [20]. Nhiệt độ bảo tồn [10], trọng lượng phân tử của đường [12] và dạng đê mê [1] đã được sử dụng trong môi trường có ảnh hưởng đến khả năng bảo vệ lạnh của các loại đường. Nhiều nghiên cứu đã dùng đường glucose, fructose [5] trong môi trường Tris-citric acid trong khi đông lạnh tinh dịch chó ở dạng cộng rạ. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào kiểm tra ảnh hưởng của các loại đường được bổ sung vào môi trường Tris-citric acid. Trong công trình này, chúng tôi đã nghiên cứu ảnh hưởng của việc bổ sung các loại đường khác nhau (glucose, fructose, lactose, raffinose) vào môi trường Tris-citric acid đến khả năng vận động của tinh trùng, tỉ lệ sống và tỉ lệ kì hình của tinh trùng trong những giai đoạn khác nhau của quy trình đông lạnh.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Động vật và sự thu nhận tinh dịch

Tám chó đực giống Béc giê có tuổi từ 2-6 năm, trọng lượng 25-45 kg, đã phối giống thành thực được sử dụng làm động vật cho tinh dịch. Chó được nuôi tại Trung tâm Huấn luyện chó nghiệp vụ (C32) - Bộ Công an. Chó được luyện tập cho sự thu nhận tinh dịch. Khai thác tinh dịch một lần trong tuần. Tinh dịch được thu nhận bằng tay theo phương pháp của Christiansen [6]. Pha giàu tinh trùng của mỗi lần phóng tinh được thu nhận vào cốc thủy tinh âm, thể tích tinh dịch được ghi lại trước khi đặt tinh dịch vào trong nước ấm 34°C. Tổng số 7-10 lần khai thác tinh dịch ở mỗi chó được thu nhận trong quá trình thí nghiệm.

2.2. Kiểm tra tinh dịch

Hoạt lực tiến thẳng của tinh trùng được xác định nhờ kính hiển vi Olympus với độ phóng đại 100 – 400 lần, theo phương pháp của Milovanov (1962). Tỉ lệ sống của tinh trùng được tiến hành theo phương pháp (nhuộm màu với eosin/nigrosin) của Evans và Maxwell [4]. Một lượng tổng số 500 tinh trùng được đếm trên mỗi tiêu bản ở độ phóng đại 400 lần. Tỉ lệ kì hình của tinh trùng được xác định bởi sự đánh giá tiêu bản nhuộm tinh trùng với eosin/nigrosin dưới kính hiển vi với độ phóng đại 400 - 1000 lần.

2.3. Đông lạnh và giải đông tinh dịch

Những mẫu tinh dịch có hoạt lực tiến thẳng của tinh trùng cao hơn 70% và tỉ lệ sống của tinh trùng cao hơn 85%, tỉ lệ kì hình của tinh trùng thấp hơn 20% được sử dụng trong các thí nghiệm đông lạnh. Môi trường pha tinh dịch có thành phần như sau: 3,634 g tris, 1,99g citric acid, 0,5 mg đường, 6,5% (v/v) glycerol và 14% (v/v) lòng đỏ trứng gà, 50 mg penicillin, 50mg streptomycin, nước cất hai lần đủ 100 ml. Môi trường chuẩn bị không có đường được chia làm 5 phần như nhau, sau đó bổ sung vào 4 phần bởi một trong các loại đường (glucose, fructose, lactose, raffinose) với lượng 0,5 mg. Môi trường đối chứng không bổ sung đường. Lượng tinh dịch được chia thành 5 phần bằng nhau, mỗi phần tinh dịch được pha loãng với môi trường A (không có glycerol) theo bội số pha loãng 1:1 (1 tinh dịch: 1 môi trường) ở 34°C. Các mẫu tinh đã pha loãng được làm lạnh đến 4°C trong một giờ. Tiếp tục ủ tinh dịch ở 4°C trong một giờ. Bổ sung môi trường B (có 13% glycerol) vào tinh dịch pha loãng, lượng môi trường B bằng môi trường A, bội số pha loãng tổng thể là 1:2, tỉ lệ 6,5% (v/v) glycerol, nhiệt độ của môi trường B là 4°C. Ủ tinh dịch một giờ. Nạp tinh pha loãng vào cọng rạ loại 0,25 ml, sau đó ủ tinh cọng rạ ở 4°C với khoảng thời gian 2 giờ. Đông lạnh tinh cọng rạ trong nitơ lỏng bằng máy đông lạnh của hãng minitub. Tinh cọng rạ đông lạnh bảo quản trong nitơ lỏng -196°C.

Giải đông tinh đông lạnh: nhúng tinh đông lạnh cọng rạ vào nước ấm 37°C trong 60 giây, tinh đông lạnh được giải đông ủ ở 37°C. Đánh giá hoạt lực tiến thẳng, tỉ lệ sống, tỉ lệ kì hình của tinh trùng bằng kính hiển vi Olympus với độ phóng đại 400 - 1000 lần.

Đánh giá phẩm chất tinh dịch ở các thời điểm: sau 20 phút pha loãng, trước đông lạnh và sau đông lạnh, giải đông. So sánh hoạt lực tiến thẳng của tinh trùng, tỉ lệ sống của tinh trùng và tỉ lệ kì hình của tinh trùng giữa các môi trường được bổ sung đường khác nhau và nhóm đối chứng, đánh giá ở các giai đoạn khác nhau của quá trình thí nghiệm.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả

Tinh dịch chó thí nghiệm có một số đặc điểm sinh học như sau: thể tích tinh dịch $1,94 \pm 1,13$ ml, hoạt lực tiến thẳng của tinh trùng $70,42 \pm 18,34\%$, nồng độ tinh trùng $323,75 \pm 17,52 \times 10^6$ tinh trùng/ml, tỉ lệ sống của tinh trùng $82,58 \pm 16,83\%$, tỉ lệ kì hình của tinh trùng $18,65 \pm 2,69\%$.

Bảng 1. Ảnh hưởng của đường trong môi trường lên hoạt lực tiến thẳng, tỉ lệ sống, tỉ lệ kì hình của tinh trùng sau khi pha loãng

Đường	Hoạt lực tiến thẳng của tinh trùng (%)	Tỉ lệ sống của tinh trùng (%)	Tỉ lệ kì hình của tinh trùng (%)
Glucose	$76,60 \pm 8,69$	$87,57 \pm 13,64$	$16,62 \pm 2,57$
Fructose	$77,01 \pm 10,57$	$85,58 \pm 11,54$	$15,72 \pm 1,85$
Lactose,	$75,53 \pm 9,63$	$85,15 \pm 14,73$	$16,45 \pm 2,83$
Raffinose	$76,51 \pm 11,73$	$86,86 \pm 10,83$	$15,86 \pm 3,92$
Đối chứng (không đường)	$74,65 \pm 10,57$	$84,72 \pm 23,79$	$17,62 \pm 2,69$

Tinh dịch chớ được pha loãng với các môi trường (các môi trường bổ sung đường và môi trường không có đường) ở 34°C, sau 20 phút tiến hành đánh giá hoạt lực tiến thẳng, tỉ lệ sống, tỉ lệ kì hình của tinh trùng, kết quả nhận được trình bày ở bảng 1.

Nghiên cứu cho thấy không có sự khác nhau có ý nghĩa ($P > 0,05$) về hoạt lực tiến thẳng, tỉ lệ tinh trùng sống và tỉ lệ tinh trùng kì hình giữa các mẫu tinh dịch pha với môi trường chứa các loại đường khác nhau và với mẫu đối chứng.

Bảng 2. Ảnh hưởng của đường trong môi trường lên hoạt lực tiến thẳng, tỉ lệ sống, tỉ lệ kì hình của tinh trùng sau cân bằng

Đường	Hoạt lực tiến thẳng của tinh trùng (%)	Hoạt lực tiến thẳng so với đối trùng (%)	Tỉ lệ sống của tinh trùng (%)	Tỉ lệ sống của tinh trùng so với đối trùng (%)	Tỉ lệ kì hình của tinh trùng (%)	Tỉ lệ kì hình của tinh trùng so với đối trùng (%)
Glucose	72,25 ± 8,84	103,76	83,25 ± 12,68	105,97	19,47 ± 2,53	78,35
Fructose	75,17 ± 9,35	107,96	84,57 ± 13,63	107,65	17,70 ± 2,69	71,23
Lactose	71,46 ± 10,57	102,63	82,35 ± 13,54	104,82	20,53 ± 1,95	82,62
Raffinose	73,75 ± 11,95	105,92	83,58 ± 10,65	106,39	22,32 ± 2,58	89,82
Đối chứng (không đường)	69,63 ± 10,72	100,00	78,56 ± 11,58	100,00	24,85 ± 2,97	100,00

Sau thời gian ủ tinh dịch pha loãng với môi trường (có bổ sung đường hoặc không bổ sung đường) ở 4°C, kết quả về phẩm chất tinh pha loãng được trình bày ở bảng 2. Hoạt lực tiến thẳng, tỉ lệ sống của tinh trùng giảm trong quá trình ủ tinh dịch ở tất cả các nhóm môi trường bổ sung đường và môi trường không bổ sung đường. Ngược lại, tỉ lệ kì hình của tinh trùng tăng trong thời gian ủ tinh dịch ở tất cả các nhóm thí nghiệm. Bổ sung đường vào môi trường pha loãng tinh dịch có ảnh hưởng duy trì hoạt lực tiến thẳng của tinh trùng trong thời gian ủ ở 4°C tốt hơn so với môi trường không bổ sung đường. Bổ sung đường fructose hoặc raffinose vào môi trường pha loãng tinh dịch có ảnh hưởng lên hoạt lực tiến thẳng của tinh trùng (75,17%; 73,75%) sau ủ tốt hơn so với bổ sung đường glucose hoặc lactose vào môi trường (72,25%; 71,46%). Cụ thể tinh dịch được pha loãng và bảo quản trong các môi trường có bổ sung đường fructose hoặc raffinose có hoạt lực tiến thẳng cao hơn tương ứng là 7,96% và 5,92% so với mẫu đối trùng, trong khi môi trường được bổ sung đường glucose hoặc lactose chỉ cao hơn tương ứng là 3,76% và 2,63% so với mẫu đối trùng. Các môi trường được bổ sung đường có khả năng duy trì tỉ lệ sống của tinh trùng (82,35 - 84,57%) trong quá trình ủ tốt hơn so với môi trường không bổ sung đường (78,56%). Tỉ lệ sống của tinh trùng sau ủ đạt kết quả cao nhất khi pha loãng tinh dịch với môi trường bổ sung đường fructose, cao hơn 7,65% so với mẫu đối trùng. Tỉ lệ sống của tinh trùng đạt kết quả tương ứng là 83,25% và 83,58% (cao hơn tương ứng 5,97% và 6,39% so với mẫu đối trùng) dưới ảnh hưởng của glucose hoặc raffinose bổ sung vào môi trường. Đường bổ sung vào môi trường pha loãng tinh dịch không chỉ có khả năng duy trì sức sống của tinh trùng, mà còn có khả năng bảo tồn cấu trúc của tinh trùng trong thời gian ủ tinh dịch trước đông lạnh. Các mẫu tinh dịch pha với môi trường có bổ sung đường nhận được tỉ lệ kì hình của tinh trùng

sau ù từ 17,70% - 22,32% (thấp hơn từ 10,18% đến 28,77% so với mẫu đối chứng), thấp hơn có ý nghĩa so với môi trường không bổ sung đường.

Bảng 3. Ảnh hưởng của đường trong môi trường lên hoạt lực tiến thẳng, tỉ lệ sống tỉ lệ kì hình của tinh trùng sau đông lạnh và giải đông

Đường	Hoạt lực tiến thẳng của tinh trùng (%)	Hoạt lực tiến thẳng so với đối chứng (%)	Tỉ lệ sống của tinh trùng (%)	Tỉ lệ sống của tinh trùng so với đối chứng (%)	Tỉ lệ kì hình của tinh trùng (%)	Tỉ lệ kì hình của tinh trùng so với đối chứng (%)
Glucose	36,25 ± 8,95	118,93	72,51 ± 10,53	106,97	24,50 ± 3,71	90,57
Fructose	41,25 ± 9,37	135,33	75,73 ± 11,74	111,73	21,51 ± 2,68	79,52
Lactose,	35,51 ± 7,53	116,50	71,57 ± 9,85	105,60	23,95 ± 3,09	88,54
Raffinose	37,45 ± 10,81	122,87	73,84 ± 10,53	108,94	22,32 ± 3,17	82,51
Đối chứng (không đường)	30,48 ± 9,63	100,00	67,78 ± 10,58	100,00	27,05 ± 3,59	100,00

Nhiệt độ giảm nhiều trong quá trình đông lạnh tinh dịch có ảnh hưởng bất lợi lên sức sống của tinh trùng trong quá trình đông lạnh. Vì vậy, tỉ lệ tiến thẳng và tỉ lệ sống của tinh trùng sau đông lạnh, giải đông ở tất cả các nhóm thí nghiệm giảm có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$) so với trước đông lạnh. Tỉ lệ kì hình của tinh trùng sau đông lạnh, giải đông ở tất cả các nhóm thí nghiệm cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$) so với trước đông lạnh. Bổ sung đường vào môi trường pha loãng tinh dịch có ảnh hưởng tích cực lên khả năng duy trì sức sống của tinh trùng trong quá trình đông lạnh tinh dịch. Tỉ lệ tiến thẳng của tinh trùng cao hơn từ 16,50% đến 35,33% và tỉ lệ sống của tinh trùng cao hơn từ 5,60% đến 11,73% so với các mẫu đối chứng không được bổ sung đường ($P < 0,01$). Môi trường bổ sung đường có tác dụng bảo vệ cấu trúc của tinh trùng trong quá trình đông lạnh tốt hơn so với môi trường không bổ sung đường. Vì vậy, tỉ lệ kì hình của tinh trùng sau đông lạnh (21,51 - 24,50%) ở các môi trường có bổ sung đường thấp hơn có ý nghĩa ($p < 0,01$) so với môi trường không bổ sung đường (27,05%). Tinh dịch bảo quản trong các môi trường được bổ sung đường có tỉ lệ tinh trùng kì hình thấp hơn từ 9,43% đến 20,48% so với mẫu đối chứng không được bổ sung đường. Môi trường bổ sung fructose có ảnh hưởng duy trì hoạt lực tiến thẳng, tỉ lệ sống của tinh trùng sau đông lạnh, giải đông tốt hơn có ý nghĩa so với môi trường bổ sung đường glucose hoặc lactose hoặc raffinose. Fructose có khả năng bảo vệ cấu trúc của tinh trùng trong quá trình đông lạnh tốt hơn so với glucose hoặc lactose hoặc raffinose.

3.2. Thảo luận

Các môi trường khác nhau đã được sử dụng cho đông lạnh tinh dịch chó [8]. Các môi trường có chứa lactose được dùng để đông lạnh tinh dịch chó ở dạng viên [18] và các môi trường tris-citric acid được ưu tiên trong đông lạnh tinh dịch dạng cọng rạ [2]. Trong nghiên cứu này, khả năng bảo vệ lạnh của các loại đường đối với tinh trùng chó được đánh giá sau khi pha loãng trong môi trường có thành phần chính là tris và tiếp tục sau đông lạnh ở dạng cọng rạ. Oettle [13] chỉ ra rằng tỉ lệ tinh trùng chó có acrosome bị phá hủy tăng lên thực sự trong suốt quá trình làm lạnh và cân bằng. Sự giảm sút khả năng thụ thai, khả năng vận động và tính nguyên vẹn

acrosome đã được ghi nhận khi các tế bào tinh trùng chó được làm lạnh nhanh [7]. Các loại đường có ảnh hưởng bảo vệ chống lại sự phá huỷ xảy ra với các tế bào tinh trùng được làm lạnh nhanh và rằng sucrose bảo vệ tốt hơn trehalose đối với tinh trùng bò [21].

Khả năng bảo vệ lạnh của các loại đường đối với các tế bào tinh trùng có thể khác nhau theo nhiệt độ bảo tồn [10], trọng lượng phân tử [12] và dạng đậm [1] đã được nghiên cứu. Các monosaccarit ổn định hơn các disaccarit cho việc duy trì sức vận động của tinh trùng cừu được đông lạnh trong môi trường tris-citrate [12]. Trisaccarit không hiệu quả bằng monosaccarit hoặc disaccarit cho sự bảo tồn sức vận động sau giải đông của tinh trùng bò [6]. Ảnh hưởng của các loại đường khác nhau thực sự dựa trên sự đánh giá các tiêu chí ở các mẫu sau giải đông. Hầu hết các loại đường (ngoại trừ glucose, lactose, raffinose) làm giảm tỉ lệ acrosome bị phá huỷ. Tuy nhiên, chỉ sucrose và maltose làm giảm tỉ lệ tinh trùng chết và tỉ lệ acrosome bị phá huỷ mà không cải thiện sức vận động sau giải đông, trong khi các monosaccarit (ngoại trừ galactose và glucose) cải thiện khả năng vận động cùng với sức sống và tỉ lệ acrosome nguyên vẹn. Sự khác nhau trong cơ chế hoạt động giữa mono- và disaccarit xác định kiểu hoặc giai đoạn bảo vệ đối với tinh trùng chó. Vì vậy, có thể giả thuyết rằng việc sử dụng kết hợp mono- và disaccarit với nồng độ hợp lí có thể cung cấp sự bảo vệ tốt hơn so với dùng riêng mono- hoặc disaccarit.

Ảnh hưởng có lợi của xylose và fructose đối với khả năng vận động của tinh trùng bò [6], tinh trùng của cừu [12] sau giải đông đã được khẳng định. Ảnh hưởng bảo vệ của trehalose đối với cấu trúc và chức năng của các màng microsome mô tôm hùm trong quá trình đông lạnh [17]. Trehalose, nâng cao sức sống sau giải đông của tinh trùng bò được bảo quản ở 25°C trong 24 giờ [3]. Trehalose làm tăng tỉ lệ các tế bào tinh trùng chuột nguyên vẹn sau đông lạnh [19]. Các loại đường được thêm vào môi trường tris-citric acid không cải thiện khả năng vận động và sức sống của tinh trùng trong quá trình cân bằng. Tuy nhiên, galactose, lactose, trehalose, maltose, và sucrose làm giảm tỉ lệ acrosome bị phá huỷ ở các tế bào tinh trùng được cân bằng. Disaccarit làm giảm tỉ lệ tinh trùng chết sau khi đông lạnh, giải đông, đồng thời làm giảm tỉ lệ tinh trùng bị phá huỷ acrosome mà không cải thiện khả năng vận động của tinh trùng sau giải đông, trong khi đó monosaccarit, đặc biệt là fructose và xylose đã cải thiện khả năng vận động cùng với sức sống và tỉ lệ acrosome nguyên vẹn của tinh trùng sau giải đông. Trehalose, xylose và fructose làm tăng thực sự tỉ lệ tinh trùng hoạt động tổng số trong các mẫu tinh dịch đông lạnh, giải đông so với các loại đường khác và so với nhóm đối chứng không có đường [15].

Tinh trùng động vật có vú có thể nhận năng lượng qua chu trình đường phân và Krebs nhờ tiêu thụ năng lượng của các đường đơn như glucose, fructose, hay manose [11], hoặc các hợp chất khác như glycerol [9]. Nhưng mặc dầu tất cả các loài có thể sử dụng hầu hết các đường đơn, phương thức hô hấp đặc trưng lại rất khác nhau ở các loài [16]. Tinh trùng chó có khả năng sử dụng cả glucose và fructose, mặc dầu việc tạo thành các sản phẩm trung gian như gluco-6-phosphat hoặc ATP là khác nhau giữa 2 đường này [14]. Điều này chỉ ra những ảnh hưởng của glucose và fructose đối với trạng thái năng lượng của tinh trùng chó là khác nhau, vì vậy khả năng vận động của tinh trùng ở các mẫu là khác nhau [15].

Việc ủ tinh trùng trong môi trường có bổ sung fructose cho thấy sự gia tăng của lượng gluco-6-phosphat nội bào lớn hơn là khi ủ với glucose [14]. Ảnh hưởng này liên quan đến sự khác nhau rõ rệt về tỉ lệ trao đổi chất của hai loại đường [14]. Việc sử dụng gluco-6-phosphat như là một dấu hiệu để đánh giá về trao đổi chất của tinh trùng chó, ở các mẫu vận động khi không có mặt của các đường (mức gluco-6-phosphat/ mức ATP thấp) [14] khác biệt so với các chỉ số này ở các mẫu có glucose (mức gluco-6-phosphat/mức ATP trung bình) hoặc ở các mẫu có fructose (mức gluco-6-phosphat/ mức ATP cao). Khả năng của các đường hoạt động như một hệ thống điều chỉnh cũng đã được củng cố qua thực tế là những phản ứng đối với glucose và fructose xảy ra rất nhanh chóng. Cả hai loại đường này hoạt hoá con đường đường phân và sự

tạo thành ATP ở những nồng độ rất thấp (từ 1-5 mM) sau khi ủ chỉ khoảng 30 giây. Theo đó những nồng độ rất thấp của các đường trong ống sinh dục có thể mang lại một ảnh hưởng mạnh và nhanh đối với tinh trùng.

Đường ảnh hưởng đến chức năng của tinh trùng có thể là quan trọng khi quan tâm đến thành phần của môi trường sử dụng cho bảo quản lạnh tinh dịch. Các nồng độ của các đường đơn thông thường được sử dụng cho bảo quản tinh trùng chó ở 4°C thay đổi từ 15 mM đến trên 60 mM. Đây là một nồng độ cao hơn mức phản ứng tối đa của tinh trùng (từ 5-10 mM) [14]. Vì vậy việc dùng những nồng độ cao của các đường trong môi trường có thể không hỗ trợ cho sự bảo tồn tinh dịch khi các đường này làm bão hoà bộ máy thu nhận năng lượng của tinh trùng. Có thể là các đường ở các nồng độ thấp hơn sẽ có những ảnh hưởng có lợi hơn khi trạng thái năng lượng của tinh trùng gắn với dạng sinh lí [15].

Sự vận động của tinh trùng chó từ các mẫu tinh nguyên là khác nhau phụ thuộc vào loại đường có mặt trong môi trường ủ tinh dịch. Trong khi fructose tạo cho sự vận động thẳng mạnh và duy trì nó thì glucose gây ra nhiều chuyển động lắc. Những ảnh hưởng này xảy ra nhanh chóng và ở những nồng độ thấp. Cuối cùng, có những dạng phản ứng khác nhau đối với các đường, thể hiện qua sự xuất hiện các phân nhóm tinh trùng trong mẫu của một lần phóng [15].

4. KẾT LUẬN

Sử dụng 0,5 mg đường glucose, fructose, lactose hoặc raffinose bổ sung vào môi trường bảo quản có ảnh hưởng tích cực lên chất lượng tinh dịch sau khi cân bằng.

- Hoạt lực tiến thẳng của tinh trùng cao hơn 2,63% - 7,96% so với mẫu đối chứng không bổ sung đường.

- Tỷ lệ tinh trùng sống cao hơn 4,82% - 7,65% so với mẫu đối chứng không bổ sung đường.

- Tỷ lệ tinh trùng kì hình thấp hơn 10,18% - 28,77% so với mẫu đối chứng không bổ sung đường.

Đường fructose ảnh hưởng có lợi lên chất lượng tinh dịch sau đông lạnh tốt hơn so với các đường nghiên cứu còn lại. Hoạt lực tiến thẳng, tỷ lệ tinh trùng sống tương ứng cao hơn 35,33% và 11,73% so với mẫu đối chứng. Tỷ lệ tinh trùng kì hình thấp hơn 20,48% so với mẫu đối chứng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abdelhakeam A. A., Graham E. F., Vazquez I. A., Chaloner K. M. - Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: Development of an extender for freezing: Effects of osmotic pressure, egg yolk levels, type of sugars, and the method of dilution, *Cryobiology* **28** (1991) 43-49.
2. Battista M., Parks J., Concannon P. - Canine sperm post-thaw survival following freezing in straws or pellets using PIPES, lactose, tris or TEST extender, *Proc XI int Cong Anim Reprod Artif Insem.* **3** (1988) 229 abstr.
3. Chen Y., Foote R. H., Brockett C. C. - Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm, *Cryobiology* **30** (1993) 423-431.
4. Evans G., Maxwell W. M. C. - Handling and examination of semen. In: Maxwell WMC (ed), *Salomon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*, Sydney: Butterworths, 1987, pp. 93-106.

5. Farstad W., Andersen Berg K. - Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog, *J. Reprod Fert Suppl.* **39** (1989) 289-292.
6. Garcia M. A., Graham E. F. - Development of a buffer system of dialysis of bovine spermatozoa before freezing, II. Effects of sugars and sugar alcohols on post thaw motility, *Theriogenology* **31** (1989) 1029-1037.
7. Hay M. A., King W. A., Gartley C. J., Leibo S. P., Goodrowe K. L. - Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration oocytes by spermatozoa in dogs, *J. Reprod Fert Suppl.* **51** (1997) 99-108.
8. Ivanova-Kicheva M. G., Bobadov N., Somlev B. - Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5 ml aluminium tubes using three extenders, *Theriogenology* **48** (1997) 1343-1349.
9. Jones A. R., Chantrill i& Cokinakis A. - Metabolism of glycerol by mature boar spermatozoa, *J. Reprod Fertil.* **94** (1992) 129-134.
10. Lapwood K. R., Martin I. C. A. - The use of monosaccharides, disaccharides trisaccharides in synthetic diluents for the storage of ram spermatozoa at 37°C and 5°C, *Aust J Biol Sci.* **19** (1966) 655-617.
11. Mann T. - Biochemistry of semen. In: Greep RO, Astwood EB (ed): *Handbook of Physiology*, Washington DC, American Physiology Society **67** (5) (1975) 321-347.
12. Monilia F. C., Evans G., Maxwell W. M. C. - In vitro evaluation of zwitterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa, *Reprod Nutr Dev.* **34** (1994) 491-500.
13. Oettle E. E. - Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen, *Anim Reprod Sci.* **12** (1986) 145-150.
14. Rigau T., Camprubi M., Badia J., Ballester J., Palomo M. J., Rivera M., Izquierdo D., Pefia A., Rodriguez-Gil J. E. - Differential effects of fructose and glucose on energy metabolism in dog sperm from fresh ejaculates, *Proc. 14th ICAR, Stockholm, 2000*, p.90.
15. Rigau T., Farre M., Ballester J., Mogas T., Pena A., and Rodriguez-Gil J. E. - Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates, *Theriogenology* **56** (2001) 801-815.
16. Rikmenspoel R., Caputo R. - The Michaelis-Menten constant for fructose and for glucose of hexokinases in bull spermatozoa, *J. Reprod Fertil* **12** (1966) 437-444.
17. Rudolph A. S., Crowe J. H. - Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline, *Cryobiology* **22** (1985) 367-377.
18. Seager S. W. J., Platz C. C., Fletcher W. S. - Conception rates and related data using frozen dog semen, *J. Reprod Fert* **45** (1975) 189-192.
19. Storey B. T., Noiles E. E., Thompson K. A. - Comparison of glycerol, other polyols, trehanose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation, *Cryobiology* **37** (1998) 46-58.
20. Watson P. F. - The preservation of semen in mammals. In: Finn CA (ed), *Oxford Reviews of Reproduction Biology*, Oxford: Oxford University Press, 1979, 283-351.
21. Woelders H, Matthijs A, Engel B. Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology* **35** (1997) 93-105.