ผลของความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่อคุณภาพอสุจิในน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง

Effect of speed and time of centrifugation for seminal plasma separation on sperm quality in frozen goat semen

ภูเบศวร์ เศรษฐสุข[1] สุกัญญา รัตนทับทิมทอง[1] ศรีสุวรรณ ชมชัย[1] จักรภพ จันทร์สะอาด[2] และวิศิษฐ ทองเที่ยง[2]

Phubet Satsook[1], Sukanya Rattanatabtimtong[1], Srisuwan Chomchai[1], Chakkapob Chansaard[2] and Visid Tongteang[2]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อประเมินผลของความเร็วและเวลาที่แตกต่างกันในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่อคุณภาพของอสุจิของแพะหลังการแช่แข็ง ใช้แผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลในสุ่มสมบูรณ์ เพื่อทดสอบปัจจัยหลัก 2 ปัจจัย คือ ความเร็ว (500 และ 1500 รอบต่อนาที) และเวลา (3 และ 10 นาที) ผลการประเมินคุณภาพอสุจิหลังผ่านการแช่แข็ง 24 ชั่วโมง พบว่า อสุจิที่ผ่านการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที มีการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวตรง ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวโค้ง และอสุจิมีชีวิตสูงกว่าอสุจิที่ผ่านการปั่นด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที นอกจากนี้ ยังพบอิทธิพลร่วมระหว่างการปั่นโดยใช้ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ส่งผลดีต่อลักษณะการเคลื่อนที่ทั้งหมด และอสุจิมีชีวิต การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็วสูงและใช้เวลาน้อยส่งผลดีทั้งลักษณะการเคลื่อนที่และตัวอสุจิมีชีวิตในน้ำเชื้อที่ผ่านกระบวนการแช่แข็ง

Abstract

The aim of present study was to evaluate effect of different speed and time of centrifugation to separate spermatozoa from the seminal plasma on the post-thawed goat sperm quality. The experiment was conducted using 2x2 factorial in completely randomized design. The centrifugation speed (500 and 1500 rpm) and time (3 and 10 mins), were two major factors tested. The results of sperm quality evaluation after cryopreserved 24 h revealed that total motility, progressive motility, average path velocity, straight-line velocity, curve-line velocity and viability of sperms centrifuged 1500 rpm were significantly higher than those of sperms centrifuged 500 rpm. In addition, the interaction between speed (1500 rpm) and time (3 mins) was detected and significantly improved the percentages of total sperm motility and viability. This study indicates that the centrifugation with high speed and short time enhances both sperm motility and viability in frozen semen.

Key words: goat, frozen goat semen, sperm quality, seminal plasma

E-mail address: fern_ku49@hotmail.com

[1]ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จ.นครปฐม 73140

[1]Department of Animal Science, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140

[2]ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสงขลา จ.สงขลา 90110

[2]Songkhla Artificial Insemination and Biotechnology Research Center, Songkhla 90110

คำนำ

ในกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง จำเป็นต้องมีการเติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง (cryprotectant) จากความสำเร็จในการทำน้ำเชื้อโคแช่แข็ง สารที่นิยมใช้ในการป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง คือ ไข่แดง และนมไขมันต่ำ (skim milk) (Leboeuf *et al*., 2000) ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้สามารถทำปฏิกิริยากับ Egg Yolk Coagulating Enzyme (EYCE) (Roy, 1957) และ Secreted Bulbourethral III (SBUIII) (Nunes *et al*., 1982) ตามลำดับ ที่ปะปนอยู่ในเซมินอลพลาสมา (seminal plasma) ซึ่งมีการหลั่งจากต่อมบัลโบยูเรทรอล (Bulbourethral gland) ในระบบสืบพันธุ์แพะเพศผู้

โดยบัลโบยูเรทรอลซีครีชั่นไกลโคโปรตีน 60 (bulbourethral secretion glycoprotein-60; BUSgp60) ในเซมินอลพลาสมามีความสามารถในการสลายไขมันชนิดไตรกลีเซอไรด์ (triacylglycerol) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหนึ่งของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ เป็นผลให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ลดความสามารถในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (Pellicer-Rubio and Combarnous, 1998) ส่วน EYCE ในเซมินอลพลาสมาเมื่อทำปฏิกิริยาคาตาไลส์ (catalyse) กับฟอสฟาทิดิลโคลีน (phosphatidylcholine) ในไข่แดง ได้ผลผลิตเป็นไลโซฟอสฟาทิดิลโคลีน (lysophosphatidylcholine) มีฤทธิ์ที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ลดความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และความสามารถในการเคลื่อนที่ของอสุจิ ส่งผลให้อัตราการปฏิสนธิลดลง (Upreti *et al*., 1999)

เพื่อหลีกเลี่ยงข้อจำกัดดังกล่าว จึงได้ตระหนักถึงการลดปริมาณการใช้ไข่แดงในสารเจือจางน้ำเชื้อ (Bispo *et al.,* 2011) การใช้สารเจือจางน้ำเชื้อที่ไม่มีส่วนประกอบของไข่แดง (รพีพรรณ และคณะ, 2548) หรือการกำจัดเซมินอลพลาสมา โดยการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาก่อนเติมสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็ง (อนนท์ และคณะ, 2551; เฉลิมพล, 2552; Niang *et al*., 2011) อย่างไรก็ตาม ชนิดและปริมาณของสารละลายที่ใช้เจือจางก่อนการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา รวมถึงความเร็วและระยะเวลาที่ใช้ในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา เป็นปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพของอสุจิหลังการแช่แข็งเช่นกัน (Leboeuf *et al*., 2000) วัตถุประสงค์ของการทดลองในครั้งนี้เพื่อประเมินคุณภาพของอสุจิหลังการแช่แข็งที่ผ่านกระบวนการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็วและเวลาที่แตกต่างกัน

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

พ่อพันธุ์แพะสายพันธุ์แองโกลนูเบียน จำนวน 1 ตัว อายุประมาณ 3-4 ปี มีน้ำหนักประมาณ 50-70 กก. มีระบบสืบพันธุ์ปกติ โดยแพะพ่อพันธุ์ได้รับหญ้าแห้งอย่างเต็มที่ และอาหารข้นที่มีโปรตีนไม่น้อยกว่า 12 เปอร์เซ็นต์ วันละ 2 กก. รวมถึงน้ำและแร่ธาตุก้อนตลอดการทดลอง

การรีดเก็บน้ำเชื้อ

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อโดยใช้ช่องคลอดเทียม (artificial vagina) สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ตามวิธีการของ อนนท์ และคณะ (2551) ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น โดยน้ำเชื้อต้องมีการเคลื่อนที่ของอสุจิมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ และมีความผิดปกติไม่เกิน 15 เปอร์เซ็นต์ จึงสามารถนำมาแช่แข็งสำหรับการศึกษาครั้งนี้

การแช่แข็งและการละลายน้ำเชื้อ

น้ำเชื้อที่ผ่านการตรวจคุณภาพเบื้องต้น นำมาเติมน้ำเกลือ (normal saline) ในอัตราส่วน 1:19 (v/v) ทำการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็วและเวลาที่แตกต่างกัน โดยแบ่งกลุ่มการทดลองดังนี้

กลุ่มที่ 1 ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา โดยใช้ความเร็ว 500 รอบ/นาที นาน 3 นาที

กลุ่มที่ 2 ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา โดยใช้ความเร็ว 500 รอบ/นาที นาน 10 นาที

กลุ่มที่ 3 ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา โดยใช้ความเร็ว 1500 รอบ/นาที นาน 3 นาที

กลุ่มที่ 4 ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา โดยใช้ความเร็ว 1500 รอบ/นาที นาน 10 นาที

หลังการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา แยกส่วนใสด้านบนทิ้ง นำน้ำเชื้อที่ได้มาเติมสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็ง ประกอบด้วย ทริส 250 มิลลิโมล กรดซิตริค 90 มิลลิโมล น้ำตาลฟรุคโตส 70 มิลลิโมล ไข่แดง 20 % (v/v) และกลีเซอรอล 7 % (v/v) ตามวิธีการของ Choe *et al*. (2006) กำหนดให้น้ำเชื้อหลังการเจือจางมีความเข้มข้นของอสุจิ 600 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร โดยทำการแช่แข็งน้ำเชื้อตามวิธีการของ อนนท์ และคณะ (2551) ทำการบ่มน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาที แล้วจึงนำเข้าตู้ควบคุมความเย็น (cooling chamber) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นทำการบรรจุน้ำเชื้อลงหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.25 มิลลิลิตร อุดหลอดบรรจุน้ำเชื้อด้วย polyvinyl alcohol เรียงหลอดน้ำเชื้อบนถาดเรียงน้ำเชื้อ และนำไปแช่ไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟมเหนือระดับไนโตรเจนเหลว ประมาณ 5 เซนติเมตร อุณหภูมิประมาณ -120 องศาเซลเซียส นาน 13 นาที สุดท้ายจึงนำหลอดน้ำเชื้อแช่ในถังไนโตรเจนเหลว

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลาย

หลังจากการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อตรวจคุณภาพของตัวอสุจิ ตามวิธีการของอนนท์ และคณะ (2551) โดยทำการประเมินการเคลื่อนที่ทั้งหมด (total motility; MOT) การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motility; PMOT) ความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ (average path velocity; VAP) ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวตรง (straight-line velocity; VSL) และความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวโค้ง (curve-line velocity; VCL) ด้วยเครื่อง Computer Assisted Sperm Analyzer (CASA) ประเมินตัวอสุจิที่มีชีวิต (viability) ตามวิธีของ Niang *et al*. (2010)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้วิธี Analysis of variance ด้วย one-way anova และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของแต่และทรีตเมนท์ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ด้วยโปรแกรมสถิติสำเร็จรูป

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาความเร็วและเวลาที่ใช้ในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็งหลังการละลาย แสดงดังตารางที่ 1 พบว่า กลุ่มน้ำเชื้อที่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที มีการเคลื่อนที่ทั้งหมด (MOT) การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (PMOT) ความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ (VAP) ความเร็ว

การเคลื่อนที่ในแนวตรง (VSL) ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวโค้ง (VCL) และอสุจิมีชีวิต (viability) สูงกว่ากลุ่มน้ำเชื้อที่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เนื่องจากการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที ทำให้เกิดแรงเหวี่ยงที่ช่วยแยกชั้นระหว่างเซมินอลพลาสมาด้านบนกับตะกอนอสุจิด้านล่างได้อย่างชัดเจน จึงสามารถกำจัดเซมินอลพลาสมาทิ้งได้ปริมาณมาก และเหลือเซมินอลพลาสมาที่ปะปนกับตัวอสุจิน้อย (Len *et al*., 2010) โดยหาก Egg Yolk Coagulating Enzyme ในเซมินอลพลาสมาทำปฏิกิริยากับ egg yolk phosphatidylcholine ในสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งได้สาร lysophosphatidylcholine ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ทำให้อสุจิหลังผ่านการแช่แข็งมีการเคลื่อนที่และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ลดลง (Ritar and Salamon, 1982; Niang *et al*., 2011) นอกจากนี้การตกตะกอนของอสุจิอย่างชัดเจนยังช่วยลดการสูญเสียตัวอสุจิมีชีวิตในระหว่างกระบวนการกำจัดเซมินอลพลาสมา (violeta and pana, 2007) กำจัดสิ่งปลอมปนที่ติดมากับน้ำเชื้อ และอสุจิตัวตายออกจากอสุจิที่ตกตะกอนอยู่ด้านล่าง โดยอสุจิตัวตายสามารถปลดปล่อยรีแอคทีฟออกซิเจนสปีชี่ (reactive oxygen species; ROS) (Upreti *et al*., 1999) โดยหากพบ ROS ในระดับสูง จะเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นของฟอสโฟลิปิดที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ก่อให้เกิดความเสียหายและส่งผลต่อการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ (Shekarriz *et al*., 1995)

ตารางที่ 1 ลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิและอสุจิมีชีวิตหลังการละลายที่ผ่านกระบวนการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็วและเวลาที่แตกต่างกัน

	MOT (%)	PMOT (%)	VAP (μm/s)	VSL (μm/s)	VCL (μm/s)	Viability(%)
<u>ความเร็ว</u> (รอบต่อนาที)						
500	31.6 [b]	12.8 [b]	56.14 [b]	47.06 [b]	107.17 [b]	39.20 [b]
1500	38.1 [a]	15.3 [a]	77.04 [a]	55.03 [a]	148.11 [a]	47.05 [a]
P-value	0.0181	0.0246	<0.0001	0.0002	<0.0001	0.0037
<u>เวลา</u> (นาที)						
3	33.9	13.9	67.64	51.27	129.13	41.25
10	35.8	14.2	65.54	50.83	126.15	45.00
P-value	0.4526	0.7697	0.7933	0.7933	0.1885	0.1239
<u>ความเร็ว x เวลา</u>						
500 x 3	27.2[c]	11.6	57.32	47.20	107.40	31.8[c]
500 x 10	36.0[b]	14.0	54.96	46.92	106.94	46.6[b]
1500 x 3	40.6[a]	16.2	77.96	55.34	150.86	50.7[a]
1500 x 10	35.6[b]	14.4	76.12	54.72	145.36	43.4[b]
P-value	0.0129	0.0535	0.8725	0.9211	0.2625	0.0002

หมายเหตุ: [a, b, c] อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

แต่อย่างไรก็ตาม เวลาที่ใช้ในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาไม่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อในด้านการเคลื่อนที่ทั้งหมด การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวตรง ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวโค้ง และอสุจิมีชีวิต เนื่องจากการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยเวลาที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อการ

แยกชั้น ในขณะที่อิทธิพลร่วมระหว่างความเร็วและเวลาที่ใช้ในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา มีผลต่อการเคลื่อนที่ทั้งหมด และอสุจิมีชีวิต โดยการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที ส่งผลให้การเคลื่อนที่ทั้งหมด และอสุจิมีชีวิตสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สอดคล้องกับการทดลองในแพะพันธุ์บอร์ โดยพบว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็วสูงในเวลาสั้น ช่วยเพิ่มการเคลื่อนที่ทั้งหมดและอสุจิมีชีวิต (Niang *et al*., 2011)

สรุป

การปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที ส่งผลให้มีการเคลื่อนที่ทั้งหมด การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ ความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ในแนวตรง ความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ในแนวโค้ง และอสุจิมีชีวิตสูงขึ้น นอกจากนี้ การปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที ส่งผลให้มีการเคลื่อนที่ทั้งหมด และอสุจิมีชีวิตดีขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณนายสัตวแพทย์จักรภพ จันทร์สะอาด ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสงขลา จ.สงขลา ที่สนับสนุนแพะทดลองและสถานที่ในการทำน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง ตลอดจนเจ้าหน้าที่ พนักงานราชการของศูนย์ฯ ที่คอยช่วยเหลือจนการทำน้ำเชื้อแช่แข็งสำเร็จด้วยดี และ รศ.น.สพ.ดร. อนุชัย ภิญโญภูมิมินทร์ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเซลล์วิทยาในระบบสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่สนับสนุนการเครื่อง CASA เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ

เอกสารอ้างอิง

เฉลิมพล มหามาตร. 2552. **การศึกษาการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาและการเสริม** Equex STM Paste **ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล, ณรงค์ เลี้ยงเจริญ และ อนนท์ เทืองสันเทียะ. 2548. คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งแพะที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Biociphos Plus® Bioexcel® และ Egg Yolk Tris. **ประมวลผลงานการประชุมวิชาการปศุสัตว์ ครั้งที่** 20. กรมปศุสัตว์

อนนท์ เทืองสันเทียะ, จตุพร พงษ์เพ็ง, บันลือ กล่ำพูล และมาลี อภิเมธีธำรง. 2551. คุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งแพะจากการผลิตโดยวิธีปั่นและไม่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา. **รายงานประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ ครั้งที่** 9. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

Bispo, C.A.S., G. Pugliesi, P. Galvao, M.T. Rodrigues, P.G. Ker, B. Filgueiras and G.R. Carvalhob. 2011. Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen cryopreservation. **Small Rumin. Res.** 100: 54-58.

Choe, C.Y., J.G. Kim, S.R. Cho, D.S. Son, Y.K. Kim, S. Balasubramanian, S.Y. Choe and G.J. Rho. 2006. Influence of season, extenders, slow and rapid freezing on seminal characters in Korean native bucks. **Reprod. Dom. Anim.** 41: 55-60.

Leboeuf, B., B. Restall and S. Salamon. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Anim. Reprod. Sci.** 62: 113–141.

Len, J.A., J.A. Jenkins, B.E. Eilts, D.L. Paccamonti, S.K. Lyle and G. Hosgood. 2010. Immediate and delayed (after cooling) effects of centrifugation on equine sperm. **Theriogenology** 73: 225–231.

Naing, S.W., A.W. Haron, M.A.K. Goriman, R. Yusoff, M.Z.A. Bakar, K. Sarsaifi, M.M. Bukar, M. Thein, T. Kyaw and M.M. San. 2011. Effect of seminal plasma removal, washing solutions, and centrifugation regimes on Boer goat semen cryopreservation. **J. Trop. Agric. Sci.** 34: 271-279.

Naing, S.W., H. Wahid, K. Mohd Azam, Y. Rosnina, A.B. Zuki, S. Kazhal, M.M. Bukar, M. Thein, T. Kyaw and M.M. San. 2010. Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. **Anim. Reprod. Sci.** 122: 23–28.

Pellicer-Rubio, M.T., T. Magallon and Y. Combarnous. 1997. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalt on glycoprotein with triglyceride lipase activity. **Biol. Reprod.** 57: 1023–1031.

Ritar, A.J. and S. Salamon. 1982. Effects of seminal plasma and its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. **Aust. J. Biol. Sci.** 35: 305-312.

Roy, A. 1957. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. **Nature** 179: 318-319.

Shekarriz, M., D.M. Dewire, A.J. Thomas Jr. and A. Agarwal. 1995. A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. **Eur. Urol.** 28 :31-35

Upreti, G.C., E.L. Hall, D. Koppens, J.E. Oliver and R. Vishwanath. 1999. Studies on the measurement of phospholipase A2 (PL A2) and PL A2 inhibitor activities in ram semen. **Anim. Reprod. Sci.** 56:107-121.

Violeta, I. and R. Pana. 2007. The influence of different centrifugation regimes on dog spermatozoa. **Bulletin USAMV-CN** 64:1-2.