

DONDURULMUŞ BOĞA SPERMASINI DEĞİŞİK ISI ve SÜRELERDE ÇÖZDÜRMEİNİN SPERMATOLOJİK ÖZELLİKLER ve PAYET İÇ ISISI ÜZERİNE ETKİSİ

Abdullah Kaya¹

Kenan Çoyan¹

Cengiz Yıldız²

Mehmet B. Ataman¹

The effect of various thawing temperatures and times on post-thaw sperm quality and terminal thaw temperatures in frozen bovine semen

SUMMARY

The objective of this study was to evaluate the effects of various thawing temperatures and times on post - thaw sperm motility, dead, abnormal spermatozoon rates and terminal thaw temperature of frozen bovine semen.

In the study, a total of 100 frozen straws of 0.25 ml. were used as material. Thawing was performed in a water bath at 38 °C, 50° C and 70 ° C for 25, 10 and 7 seconds, respectively, and on a thawmatic for 90 seconds. Average seminal temperatures were assessed for each straws.

Mean progressive motility of thawing at 38 °C / 25 sn, 50 °C / 10 sn, 70 °C / 7sn and on thawmatic / 90 sn were found to be 67.5, 72.5, 76.0 and 56.0 %, the rates of stained spermatozoa were 8.5, 9.4, 8.8 and 15.5 % and the rates of abnormal spermatozoa were 20.6, 23.7, 24.0 and 28.3 %, respectively. Post - twaw seminal temperatures of straws were found to be 24.45, 26.00, 29.40 and 19.52 °C, respectively.

Since thawing at the high temperatures (70 or 50° C) are difficult to control for technicians and thawing on thawmatic is not satisfactory sperm quality, they are not recommended for routine use. Results from this study indicate that thawing at 38 °C for 25 seconds was an adequate method for obtaining superior post - thaw sperm quality.

KEY WORDS: Bull, spermatozoa, thawing temperature and time, sperm quality

ÖZET

Bu çalışmada, dondurulmuş boğa spermasının değişik ısı ve sürelerde çözülmesinin çözüm sonu motilite, ölü ve anormal spermatozoon oranları ile çözüm sonu payet iç ısıları üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada 0.25 ml'lik toplam 100 adet dondurulmuş payet materyal olarak kullanıldı. Çözüm işlemi, 38 °C' de 25 sn., 50° C' de 10 sn., 70° C' de 7 sn süre ile su banyosunda ve 90 sn. süre ile oda ısısında Thawmatic üzerinde gerçekleştirildi ve daha sonra çözüm sonu payet iç ısıları ölçüldü.

Spermanın, 38 °C / 25 sn, 50 °C / 10 sn, 70 °C / 7sn süre ile su banyosunda ve Thawawtictte / 90 sn süre ile çözülmesi sonrası sırasıyla, ortalama spermatozoon motiliteleri, % 67.5, % 72.5, % 76.0 ve % 56.0, ölü spermatozoon oranları, % 8.5, % 9.4 , % 8.8 ve % 15.5, anormal spermatozoon oranları, % 20.6, % 23.7, % 24.0 ve % 28.3, payetlerin çözüldükten sonraki iç ısıları da 24.45 °C, 26.00°C, 29.40°C ve 19.52 °C olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak, spermanın yüksek ısılarda çözülmesinde ısı ve süreyi kontrol etme güçlüğünün bulunması ve Thawmaticte sperma kalitesinin yeterli olmaması nedeniyle rutin kullanılmasının uygun olmadığı, çalışmada uygulanan 38 °C' de 25 sn süre ile çözülmenin ise spermatojik özellikler ve payet iç ısıları açısından uygun bir metod olduğu kanısına varılmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Boğa, spermatozoon, çözme ısı ve süresi, sperma kalitesi

GİRİŞ

Dondurulmuş sperma ile yapılan tohumlamalardan yüksek oranda fertilitte sağlanabilmesi, spermanın tekniğine uygun olarak alınması, sulandırılması, dondurulması, nakledilmesi yanında uygun şekilde çözülmesine bağlıdır. Uygun olmayan sperma çözümleri infertiliteye neden olarak önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Dondurulmuş spermanın çözülmesindeki amaç, payet iç ısısının kısa bir süre içerisinde + 20 °C' ye ulaşması olarak bildirilmektedir (Çoyan ve Tekeli 1996). Yüksek fertilitte sağlanabilmesi için spermanın çözülme sonrası yeterli motilite ve sağlam akrozom oranına sahip olması gerekmektedir (İleri ve Ak 1993, Senger 1986).

Dondurulmuş spermatozoonların çözülme sonrası yaşamları üzerine payetlerin çözüldüğü ortamın (su, hava, vb.) ısısı ve çözülme süresi etkili olmaktadır (Correa ve ark. 1996, Pickett 1971).

Dondurma ve çözülme sırasında spermatozoonlarda fertilitteyi etkileyebilen membran hasarları şekillenebilmektedir. Bu hasarlar özellikle spermatozoonların çözülme ve sonrasında oluşmaktadır (Fiser ve Faureull 1984). Çünkü çözülme işlemi, spermanın dondurulması sırasında izlenen aşamaların tekrar geriye dönüşünü sağlayan ve hücrelerin olumsuz etkilenmesine neden olan bir aşamadır (Hammerstedt ve ark. 1990). Correa ve ark. (1996), spermanın dondurma-çözülme aşamalarına özen gösterilmediği takdirde spermatozoonların ozmotik şoka maruz kalabileceğini bildirmektedirler. Bu

1: S.U. Veteriner Fakültesi – KONYA

2: Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi – VAN

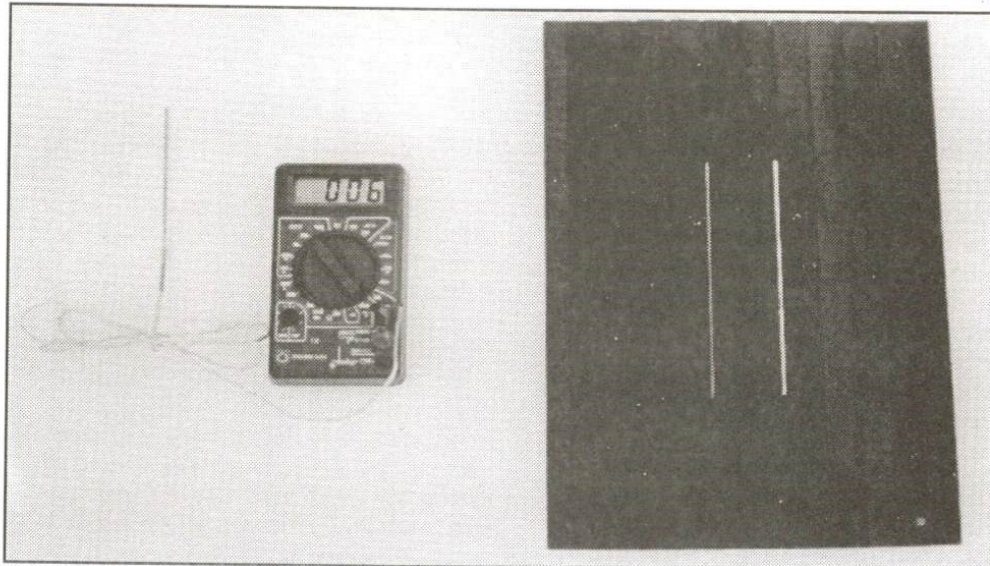
şokun, spermatozoonları dondurma hasarlarına karşı korumak amacıyla sulandırıcıya gliserol katılmasıyla başlangıçtaki izotonik koşulların hücre içine gliserol çekerek hipertonic bir ortam oluşması ve çözünme sırasında gliserolün hücre dışına çıkarak tekrar izotonik bir ortam oluşmasına bağlı olarak şekillenebileceği bildirilmektedir (Correa ve Zavos 1995, Correa ve ark. 1996).

Spermanın çözündürülmesi için uygulanan ısı ve süre ile çözünme sonrası ani ısı değişikliklerine karşı yeterli özen gösterilmediği durumlarda soğuk şoku şekillenerek spermatozoonlarda membran hasarları olduğu belirtilmektedir (Senger 1986). Su banyosunda 35°C' de çözündürüldüğünde canlı spermatozoon oranı artarken, yüksek ısılarda uzun süreli çözünmenin protein denatürasyonları yanında spermatozoon ölümlerine ve dolayısıyla fertilité düşüklüğüne yol açabileceği bildirilmektedir (Correa ve ark. 1996, Coulter 1992, Senger 1986). Özellikle protein denatürasyonlarına yol açan yüksek ısılarda sperma çözündürüldüğünde süre kısaltılarak zamanlamaya özen gösterilmesi gerekmektedir (Senger 1986).

Spermanın hızlı dondurulması, yüksek oranda donma sağlayarak dehidrasyon hasarlarını azaltmaktadır. Hızlı dondurulan spermanın aynı şekilde hızlı bir şekilde çözündürülmesi önerilmektedir (Correa ve ark. 1996, Coulter 1992, Krogenoes ve ark. 1994). Çünkü, hızlı çözündürülmesinin spermatozoonlardaki buz kristallerinin oluşturacağı hasarı azaltabileceği bildirilmektedir (Chandler ve ark. 1983, Smith ve Merilan 1991).

Dondurulmuş spermanın çözündürülmesi için buzlu su'dan + 75 °C 'ye kadar değişik ısı ve süreler üzerinde çalışılmıştır. Bir çok araştırmacı (Correa ve ark. 1996, Çoyan ve Tekeli 1996, İleri ve Ak 1993) çözünme sonrası sperma kalitesi ve yüksek fertilizasyon sağlanabilirnesi açısından uygun ısı ve sürenin su banyosunda 37 °C' de 30 sn olduğunu bildirmektedirler. Ancak çözünme sonrası gerek payet iç ısıları, gerekse payet iç ısılarının + 20°C civarına ulaşmasını sağlayan ısı ve süreler ile ilgili araştırmalar sınırlı sayıdadır. Ayrıca

Şekil 1: Thawmatic üzerinde spermanın çözündürülmesi (a) ve payet iç ısılarının ölçülmesi (b)



su banyosu dışında değişik payet çözünme ortamlarının kullanıldığı çalışmalarda yeterli düzeyde bulunmamaktadır.

Sunulan araştırmada, dondurulmuş boğa spermasının farklı ısı ve sürelerde su banyosunda ve Thawmatic kullanılarak çözündürülmesinin spermatozoon özellikleri ve payet iç ısılarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Materyal olarak Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsüne ait bir boğanın aynı ejakülatından 0.25 ml. lik payetlerde dondurulmuş toplam 100 adet payet kullanılmıştır.

Öncelikle 20 - 24 °C' lik bir ortamda Thawmatic™ (endotermik enerji ile çalışan ve dondurulmuş gıdaların çözündürülmesinde kullanılan) üzerinde uygun çözüm süresi tespit edildi (Şekil 1a). Bunun için Thawmatic üzerinde farklı sürelerde (30, 60, 90 sn) çözündürülen payetlerin çözüm sonu payet iç ısıları ölçülerek + 20 °C' ye en yakın olan 90 sn' lik süre kriter olarak alındı. Daha sonra donmuş spermaların çözünme işlemi, 38°C' de 25 sn., 50 °C' de 10 sn. ve 70 °C' de 7 sn süre ile su banyosunda ve 90 sn süre ile Thawmatic üzerinde olmak üzere 4 farklı uygulama şeklinde gerçekleştirildi. Kontrol olarak değerlendirilmeye alınan dondurulmuş payetler ise araştırmada uygulanan en uzun süre olan 90 sn'lik süre ile oda ısısında bir karton üzerinde çözündürülmeye bırakıldı. Her çözünme işlemi için toplam 20' şer adet payet çözündürülerek motilité, ölü ve anormal spermatozoon oranları ve çözünme sonrası payet iç ısıları ölçüldü. Payetlerin iç ısılarının belirlenmesi amacıyla elektronik termometre (Digital Multimeter®) kullanıldı. Bu amaçla payetler belirlenen sürelerde çözündürüldükten sonra, ortasından kesilerek cihazın probu payet içine yerleştirildi ve dijital göstergesinden iç ısının derecesi okunarak kaydedildi (Şekil 1b).

Spermatozoonların motilitesi, payetler çözdürüldükten sonra ortasından kesilerek lam üzerine bir damla sperma damlatılıp, lamel kapatıldıktan sonra ısıtma tablosu (37°C) ışık mikroskopunda (40' lık objektifte) subjektif olarak değerlendirildi. Ölü ve anormal spermatozoon oranlarının belirlenmesi için payetler çözdürüldükten sonra lam üzerine bir damla sperma, iki damla Eosin - Nigrosin boyası ile karıştırılıp froti hazırlandı. Daha sonra hazırlanan frotiler kurutuldu ve ışık mikroskopunda (40' lık objektifte) toplam 300 spermatozoon sayılarak ölü spermatozoon oranları belirlendi. Aynı preparatlar kullanılarak faz kontrast mikroskopta (100' lük objektifte) toplam 300 spermatozoon sayılarak

akrozom, baş, ortakısım ve kuyruk anormalitelerinin oranları belirlendi.

Çözüm sonu spermatolojik özellikler ve payet iç ısılarının karşılaştırılmasında varyans analizi kullanıldı ve Fisher' in gerçek P değeri hesaplandı. Payet iç ısı ile motilite arasında korelasyon analizi yapıldı.

BULGULAR

Araştırmada kullanılan payetlerin su banyosunda ve Thawmaticte değişik ısı ve sürelerde çözdürülmesi ile elde edilen spermatolojik özellikler tablo 1' de, payet iç ısısına ait bulgular ise tablo 2' de sunulmuştur.

Tablo, 1: Dondurulmuş spermanın değişik ısı ve sürelerde su banyosunda ve oda ısısında Thawmaticte çözdürülmesi sonrasında ait spermatolojik özellikler

Sperma Çözdürme ısı ve süresi	Motilite (%)	Ölü spermatozoon (%)	Anormal spermatozoon toplamı (%)	Anormal spermatozoon dağılımı (%)			
				Akrozom (%)	Baş (%)	Orta kısım (%)	Kuyruk (%)
38°C 25 sn	67.5 ± 1.9 ^a	8.5 ± 0.3 ^a	20.6 ± 2.3 ^a	11.9 ± 0.4 ^a	2.3 ± 0.3 ^a	4.3 ± 0.4 ^a	2.1 ± 0.3
50°C 10 sn	72.5 ± 1.7 ^b	9.4 ± 1.2 ^a	23.7 ± 2.2 ^b	12.0 ± 1.0 ^a	2.8 ± 0.3 ^a	6.8 ± 0.5 ^b	2.1 ± 0.4 ^a
70°C 7 sn	76.0 ± 1.2 ^b	8.8 ± 0.5 ^a	24.0 ± 2.5 ^b	13.1 ± 1.7 ^{ba}	2.5 ± 0.2 ^a	6.0 ± 1.2 ^b	2.4 ± 0.3 ^a
Thawmatic 90 sn	56.0 ± 1.9 ^c	15.5 ± 1.3 ^b	28.3 ± 2.7 ^c	15.1 ± 0.9 ^b	4.6 ± 0.1 ^b	5.7 ± 0.7 ^b	2.9 ± 0.6 ^a

* : Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir.

Tablo, 2: Çözdürme sonrası payet iç ısıları*

Sperma çözme ısı ve süreleri	Çözüm sonu payet iç ısı (°C)
38°C' de 25 sn	24.45 ± 0.2 ^a
50°C' de 10 sn	26.00 ± 0.2 ^b
70°C' de 7 sn	29.40 ± 0.2 ^c
Thawmatic' de 90 sn	19.52 ± 0.3 ^d

* Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir.

Araştırmada kontrol olarak değerlendirilen ve oda ısısında karton üzerinde 90 sn süre ile tutulan payetlerde çözünme sağlanamamış, bu nedenle de spermatolojik özellikleri değerlendirilememiştir. Bildirilen süreler sonunda bu payetlerin iç ısıları 0°C' nin altında (-3 °C) bulunmuştur.

Tablo 1' den de izlenebileceği gibi payetlerin 38°C, 50°C ve 70 °C' lerde su banyosunda ve oda ısısında Thawmaticte üzerinde gerçekleştirilen çözdürülmeleri sonrasında spermatozoon motilitesi 50 ve 70 °C'lerde yüksek olarak elde edilmiş ve diğer çözdürme ısı ve süreleri ile aralarında istatistiki açıdan önemli fark bulunmuştur (P<0.001). En düşük motilite ise Thawmaticte çözdürme ile sağlanmıştır (p< 0.001). Ölü spermatozoon oranı açısından su banyosunda uygulanan değişik ısı ve sürelerde yapılan

çözdürme işlemleri arasında fark bulunamamış, thawmaticte gerçekleştirilen çözdürmede ise ölü spermatozoon oranı yüksek bulunmuştur. Bu fark istatistiki açıdan önemli bulunmuştur (P< 0.001).

Anormal akrozom oranları, en yüksek 70 °C'de su banyosunda ve thawmaticte gerçekleştirilen çözdürme sonrasında elde edilmiştir. Bulunan değerler arasında fark bulunmazken thawmaticte çözdürmeden elde edilen değer ile 38°C ve 50°C'de elde edilen akrozom anormaliteleri arasındaki fark önemli olarak bulunmuştur (P<0.01). Su banyosundaki üç farklı çözdürme arasında farklılık olmamasına rağmen çözme ısısı arttıkça anormal akrozom oranında artış olduğu belirlenmiştir. Baş anormaliteleri yönünden su banyosundaki değişik ısı ve sürelerde yapılan çözdürme işlemleri sonucu elde edilen değerler arasında fark bulunmazken, Thawmaticte çözdürmeden elde edilen ortalama değer ile aralarında istatistiki açıdan önemli farklılık bulunmuştur (P< 0.001). Kuyruk anormaliteleri ise bütün çözdürme şekillerinde benzer bulunmuştur.

Çözüm sonu payet iç ısıları, 38°C, 50°C ve 70 °C' lerde su banyosunda ve thawmaticte sırasıyla, 24.45°C, 26.00°C, 29. 40°C ve 19.52°C olarak elde edilmiş ve bütün değerler arasındaki fark istatistiki açıdan önemli bulunmuştur (P<0.001). Ayrıca çözüm sonu payet iç ısı artışı ile motilite artışı arasında istatistiki açıdan önemli pozitif korelasyon gözlenmiştir (r = 0.98, P< 0.01).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu araştırma, dondurulmuş spermanın değişik ısı ve sürelerde su banyosunda ve thawmatic üzerinde oda ısısında çözödümlenen payetlerin spermatolojik özellikleri ve payet iç ısı üzerine etkilerinin karşılaştırılması amacıyla yapılmıştır.

Çalışmada, payetlerin 38 °C' de 25 sn, 50 °C' de 10 sn, 70 °C' de 7 sn süre ile su banyosunda ve thawmaticte 90 sn sürede çözödümlenmeleri sonrası ortalama spermatozoon motilitesi sırasıyla, % 67.5, % 72.5, % 76.0 ve % 56.0 olarak bulunmuş (Tablo 1), çözödürme sonrası payet iç ısıları da sırasıyla, 24.4°C, 26.0°C, 29.5°C ve 19.5 °C olarak belirlenmiştir (Tablo 2). Sunulan araştırmada çözödürme sonrası payet iç ısı artışı ile motilite arasında bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (r = 0.98).

Bazı araştırmacılar tarafından (Correa ve ark. 1996, Güney ve İleri 1991, Senger 1986) çözödürme sonrası en iyi sperma kalitesinin ve yüksek fertilitite oranlarının 37°C' de 30 sn' de yapılan ılık çözödümlerle sağlanabileceği bildirilmesine rağmen, bir çok araştırmacı (Ahmad 1984, Özkoca 1984, Tamyürek ve ark. 1984, Wiggın ve Almquist 1975) çözödürme sonrası en yüksek motilitenin, payetlerin yüksek ısılarında çözödümlenmesi ile elde edilebileceğini bildirmektedirler. Benzer şekilde dondurulmuş spermanın yüksek ısılarında hızlı çözödümlenmesinin spermatozoonlardaki buz kristallerinin neden olduğu hasarı azalttığı ifade edilmektedir (Coulter 1992). Sunulan araştırmada da bildirilen araştırmacılar ile uyumlu olarak yüksek ısılardaki çözödümlerde motilite daha yüksek bulunmuştur. El-Danasouri (1987), vücut ısısından daha yüksek ısılarda yapılan çözödümlerde spermatozoon hareketlerinin arttığını, ancak bu hareketlerin daha çok dairesel hareketler şeklinde olduğuna dikkat çekmektedir. Farklı çözödürme ısı ve sürelerinin etkilerini araştıran Danasouri (1988) ise spermatozoonlarda bulunan ve fertilizasyonda rol oynayan enzimlerin çözödürme sırasında extrasellüler ortama sızabileceğini ve 37°C civarında yapılan çözödümlerde bu sızmanın daha az olduğunu bildirmektedir. Wiggın ve Almquist (1975), spermanın düşük ısılarda uzun sürede çözödümlenmesi yerine yüksek ısılarda kısa süreli çözödümlenmesinin sağlam akrozom oranını artırdığını bildirmektedirler.

Correa ve ark. (1996) yavaş çözödürme sırasında hücre içinde bulunan sıvıların mikro kristallerinin yeniden kristalleşerek hücreye zarar verebileceğini, Senger (1986) ise orta derecedeki ısılarda (15 - 22°C) çözödümlenmenin spermatozoonları olumsuz yönde etkileyebileceğini bildirmektedirler. Çalışmada uygulanan ve prensip olarak bulunduğu çevre ısısını üzerine konan maddelere hızlı bir şekilde iletme özelliğine sahip olan thawmaticte çözödürme orta dereceli ısıda çözödürme olarak kabul edilebilir. Araştırmanın çevre ısısının 20-24°C olduğu dönemde yapılmış olması orta derecedeki ısıda çözödümlenmeyi göstermektedir. Sunulan çalışmada, thawmaticte gerçekleştirilen orta derecede çözödümlerde ölü ve anormal akrozom oranları yüksek (15.6± 1.3 ve 15.1 ± 0.9), motilite

oranı ise düşük (% 56.0 ± 1.9) bulunmuştur. Thawmaticteki çözödürme sonucu motilite oranının düşük, ölü ve anormal akrozom oranlarının yüksek olmasının muhtemel nedeninin, yukardaki araştırmacılar tarafından da işaret edildiği gibi orta derecedeki yavaş çözödümlenmeye bağlı olarak şekillenen hücre içi yeniden kristalleşme ve ozmotik basınçtaki değişikliklerden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu olumsuzluğa rağmen çevre ısısına maruz bırakılan kontrol grubuna ait payetlerde çözödümlenmenin şekillenmemesi, thawmaticteki çözödümlenmenin etkili olduğuna işaret etmektedir.

Spermanın 37 °C' de 12 ve 30 sn' sürelerde çözödümlenmesi ile yapılan tohumlamalardan 30 sn' de çözödümlenmeden daha yüksek gebelik elde edildiği bildirilmektedir (Senger 1986). Bunun nedeninin, 12 sn' deki çözödürme sonucu payet iç ısısının 0 °C' ye ancak ulaşması ve ineğin genital kanalında yeniden ısınmaya maruz kalması, oysa aynı ısıda 30 sn deki çözödürme sonunda payet iç ısısının 32 °C'ye ulaşması olarak ifade edilmektedir. Sunulan araştırmada da 38 °C' de 25 sn süre ile çözödürme sonunda ölü ve anormal akrozom oranları, kimi araştırmacılar (Smith ve Merilan 1991, Wiggın ve Almquist 1975) ile uyumlu olarak düşük bulunmuş ve çözüm sonu payet iç ısı da 24.45 ± 0.2 °C olarak bulunmuştur.

Smith ve Merilan (1991) yaptıkları araştırmada motilite, canlı spermatozoon ve sağlam akrozom oranlarının 37° C' de 20 sn ve 46 °C' de 12 sn' de yapılan çözödürme sonunda yüksek bulunduğunu bildirmektedirler. Sunulan araştırmada, yukardaki araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen çözödürme ısı ve sürelerine yakın olarak 38° C' de 25 sn ve 50 °C' de 10 sn' de yapılan çözödümlerde motilite oranlarının yüksek bulunmasının yanında canlı ve sağlam akrozom oranları da yüksek bulunmuştur. Yine çalışmada, 38° C' de 25 sn' de çözödürme sonucu elde edilen % 65.7' lik motilite, donmuş spermayı 37° C' de 30 sn' de çözödümlenen Tamyürek ve ark (1984)' nın bildirdiği % 62.1' lik motiliteye yakın olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak, dondurulmuş spermanın su banyosunda 50°C' de 10 sn ve 70°C' de 7 sn' de çözödümlenmeleri sonrası yüksek motilite sağlanmasına rağmen sağlam akrozom oranları su banyosunda 38° C' de 25 sn' deki çözödürme sonrası elde edilen sonuçlardan düşük bulunmuş, ayrıca bu ısı ve süreleri pratikte uygulama güçlüğünün de olabileceği kanısına varılmıştır. Thawmaticte gerçekleştirilen çözödürme sonucu elde edilen spermatolojik özellikler ise diğer metodlara göre daha olumsuz bulunmuştur. Buna göre thawmaticte gerçekleştirilen çözödümlenmenin pratikte kullanılabilirliğinin, fertilizasyonda rol oynayan enzimlerin extrasellüler ortama sızma oranları ve hücre içi elementlerin hasar görme oranları belirlenmeden yada fertilitite kontrolleri yapılmadan önerilemeyeceği, suni tohumlama uygulamalarında sperma çözödümlenmelerinin su banyosunda 35-38 °C civarındaki ısı ve 25-30 sn' lik sürelerle uyulmasının gerekli olduğu kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Ahmad K (1984) Effect of thaw rates on survival of buffalo spermatozoa frozen in straws. *J.Dairy Sci.*; 67 (7) 1535 - 1538.
- Chandler JE Nebel RL, Adkinson RW (1983) Optimum thawing temperature for bovine spermatozoa processed by three methods and packaged in 1ml ampules. *Theriogenology*, 19, 201 - 212.
- Correa JR, Zavos PM (1995) Frozen-thawed bovine spermatozoa diluted via slow or rapid dilution method: measurement on occurrence of osmotic shock and sperm viability. *Theriogenology*, 44, 963 - 971.
- Correa JR, Rodriguez MC, Patterson DJ, Zavos PM (1996) Thawing and processing of cryopreserved bovine spermatozoa at various temperatures and their effects on sperm viability, osmotic shock and sperm membran integrity. *Theriogenology*, 46, 413 - 420.
- Coulter GH (1992) Bovine spermatozoa in vitro: a review of storage, fertility estimation and manipulation. *Theriogenology*, 38, 197 - 207.
- Çoyan K, Tekeli T (1996) İneklerde Suni Tohumlama Bahcivanlar Basım San. A.Ş. Konya.
- Danasouri İE (1988) Effect of thawing temperature on the loss of acrosome and hyaluronidase enzymes from bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 29 (6), 1343 - 1346.
- El- Danasouri A (1987) Photogrammetric studies on the motility of cattle spermatozoa after thawing at various temperatures. *Anim Breed. Abs.*, 55 (2), 776.
- Fiser PS, Faireull RW (1984) The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. *Cryobiology*, 21, 542 - 551.
- Güney HÖ, İleri İK (1991) Paillette yöntemine göre dondurulmuş boğa spermasının, farklı ısı ve sürelerde eritilmesinin ve eritme sonrası düşük ısı uygulamalarının spermatozoitlerin motilite ve morfolojik yapıları üzerine etkisi. *İstanbul.Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 17 (1), 75 - 91.
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan P (1990) Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J. Androl*, 11, 73 - 88.
- İleri İK, Ak K (1993) Payet yöntemi ile dondurulmuş boğa spermasının eritilmesinde eritme ısı ve sürelerinin spermatozoitlerin motilite ve akrozom yapıları üzerinde etkileri. *İ. Ü. Vet. Fak. ve Münih Ludwig-Maximilan Ü. Vet. Fak., Türk - Alman Günleri*, 29-30 Nisan, İstanbul.
- Krogenoes BA, Andersen BA, Hafne AL, Engeland E (1994) Membrane alterations in bull spermatozoa after freezing and thawing and after in vitro fertilization. *Acta vet. scand.*, 35, 17 - 26.
- Özkoca A (1984) Çiftlik hayvanlarında reproduksiyon ve suni tohumlama. *İstanbul Üni. Vet. Fak.Yay.No: 4*, İstanbul.
- Pickett BW (1971) Factors affecting the utilization of frozen bovine semen for maximum reproductive efficiency. *AI Digest*, 19, 8 - 23.
- Senger PL (1986) Principles and procedures for storing and using frozen bovine semen. In " Current Therapy in Theriogenology " Ed., Morrow DA, 162 - 174, W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Smith JF, Merilan CP (1991) The effects of collection and processing procedures on post-thaw bovine spermatozoan characteristics. 35 (2), 375-380.
- Tamyürek F, İleri İK, Sayın T, Plevneli P (1984) Paillette yöntemiyle dondurulmuş boğa spermasının değişik sıcaklık ve sürede çözülmesinin motiliteye ve akrozom bozukluklarının oluşmasına etkisi. *İstanbul Üni. Vet. Fak. Derg.* 10 (1), 29 - 39.
- Wiggin HB, Almquist JO (1975) Effect of glycerol equilibration time and thawing rate upon acrosomal maintenance and motility of bull spermatozoa frozen in plastic straws. *J. Anim. Sci.*, 40 (2) 302-305.