

Dondurulmu Bo a Spermasında Glass Wool Filtrasyon Yöntemi Üzerine Çalı malar*

Ali DA KIN¹, Orkun DEM RAL², Sava YILDIZ³

1 Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama ABD, Ankara-TÜRK YE

2 Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama ABD, Kayseri-TÜRK YE

3 Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama ABD, Kars-TÜRK YE

Özet : Bu çalı mada dondurulmu -çözdürülmü bo a spermasında farklı glass wool (GW) filtrelerinin spermatolojik parametreler üzerine etkinliklerinin ara tırılması hedeflendi

Ara tırmada farklı yüksekliklerde 3 grup filtre yapıldı. Her bir grupta farklı a ırlıklarda GW içeren filtreler olu turuldu. Birinci grup (Grup 1) filtreler 15 (Filtre 1A), 20 (Filtre 1B), 25 (Filtre 1C) ve 30 (Filtre 1D) mg GW 1 ml'lik plastik enjektör tabanından 3mm yüksekli e kadar bastırılarak hazırlandı. İkinci grup filtreler (Grup 2) 50 (Filtre 2A), 75 (Filtre 2B), 100 (Filtre 2C) ve 125 (Filtre 2D) mg GW enjektör tabanından 17mm yüksekli e kadar bastırılarak hazırlandı. Üçüncü grupta ise, (Grup 3) 150 (Filtre 3A), 175 (Filtre 3B) ve 200 (Filtre 3C) mg GW enjektör tabanından 24mm yüksekli e kadar bastırılarak hazırlandı. Dondurulmu çözdürülmü bo a spermaları santrifüj edilerek yıkandı. Yıkanan spermalar filtre kolonlarından geçirildi. Filtrasyon öncesi ve sonunda spermatolojik özellikler ara tırıldı.

Çalı mada birinci, ikinci ve üçüncü grup filtreler içinde sırasıyla 30 mg GW içeren filtre (Filtre 1D); 75 mg GW içeren filtre (Filtre 2B); 200 mg GW içeren filtre (Filtre 3C), di erlerine oranla daha iyi sonuçlar verdi i bulundu. Bununla birlikte kendi grubu içinde en iyi olan filtreler kar ıla tırıldı ında filtre 3C'nin daha etkin oldu u bulundu.

Sonuç olarak, farklı ekilde düzenlenen GW filtrelerinin de ik biyoteknolojik uygulamalarda bo a spermasının separasyonu amacıyla kullanımının pratik ve ucuz bir yöntem oldu u kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Bo a sperması, Glass wool filtrasyon, Sperma separasyonu.

Studies on Glass Wool Filtration of Frozen Thawed Bull Semen

Summary : In the present study it was aimed to investigate the effectiveness of different glass wool (GW) filters on spermatological parameters of frozen-thawed bull semen.

In the research three filter groups at different heights were prepared. In each group, filters contain GW in different weights were prepared. In the first group filters were prepared by pushing (Group1)15 (Filter 1A), 20 (Filter 1B), 25 (Filter 1C) and 30 (Filter 1D) mg GW gently further to a depth of 3 mm from the bottom of 1ml plastic syringes. Filters in the second group (Group 2) were prepared by pushing 50 (Filter 2A), 75 (Filter 2B), 100 (Filter 2C) and 125 (Filter 2D) mg GW further to a depth of 17mm from the bottom of 1ml plastic syringes. In the third group (Group 3) 150 (Filter 3A), 175 (Filter 3B) and 200 (Filter 3C) mg GW gently pushed further to a depth of 24mm from the bottom of 1ml plastic syringes.

Frozen thawed bull sperms were washed by centrifugation. Washed sperms were filtrated through the filter columns. The spermatological parameters were investigated before and after filtration.

In the study, it was found out that in first, second and third groups the filters including 30 mg GW (Filter 1D), 75 mg GW (Filter 2B) and 200 mg GW (Filter 3C) were better than the others respectively. However, when the best filters in their own groups were compared the filter 3C was found more effective than others.

In conclusion, it was found that the usage of GW filters designed in different features in varied biotechnological applications for the separation of bull semen has been cheaper and more practical.

Keywords: Bull semen, Glass wool filtration, Sperm separation.

Giri

Sperma kalitesi, tüm reproduktif biyoteknolojilerde ba arı için önemli bir faktördür. Spermada anormal ve ölü spermatozoa oranlarının fazla olması, organik ve inorganik hücre artıkları sperma kalitesini dü ürdü ü gibi; fertilite gücünü de azaltır (14). n

vivo artlarda, fertilizasyon potansiyeli yüksek spermatozoa di i genital kanalında göçü esnasında seleksiyona u rar ve en kaliteli spermatozoa ile fertilizasyon sa lanır. Yardımcı reproduktif tekniklerin geli mesi spermanın in vitro ortamda seleksiyonu gereklili ini do urmu tur (2).

Spermada bulunan zararlı maddelerin veya seminal plazmanın uzakla tırılması amacıyla birçok separasyon yöntemi geli tirilmi ve halen yeni yöntemler geli tirilmeye çalı ılmaktadır. Sperma separasyon yöntemleri genel olarak, bazı yazarla-

Geli Tarihi/Submission Date : 12.10.2005
Kabul Tarihi/Accepted Date : 24.11.2006

* Bu yayın II. Ulusal Sun'i Tohumlama Kongresinde (Konya 2002) bildiri olarak sunulmu tur.

ra göre, yıkama (dilüsyon ve santrifüj), sperma subpopülasyonlarının ayrılması (yo unluk farklı santrifüj (percoll gibi maddelerle) yapı tırma (filtrasyon) ve self migrasyon (yukarı veya a a ıya yüzdürme) yöntemleri olarak dört ana grupta toplanmakta (11) iken bazı ara tırmacılar spermanın yapı ve motiliteye dayalı separasyon yöntemleri olarak iki ana grupta toplamaktadır (2).

Filtrasyon yöntemlerinde temel prensip; ölü, hasarlı ve anormal spermatozoanın yüzeylere yapı ma özelli inin kullanılmasıdır. Bununla birlikte, sperma içerisinde bulunan yabancı hücrelerin, hücre artıklarının ve anormal yapıdaki spermatozoanın filtre matrislerinden geçi lerinin engellenmesi ve durdurulması olarak tanımlanabilir (3).

Sperma filtrasyonu amacıyla genellikle cam, polisakarit bilyecikler ve cam yün (Glass Wool) gibi malzemeler kullanılmaktadır. Sperma bu malzemelerden olu turulan kolonlardan geçirilerek filtrasyonu i lemi yapılmaktadır (4,5).

Bu çalı ma, farklı ekilde düzenlenen GW filtrelerinin dondurulmuş çözdürülmü bo a spermasında, spermatolojik parametreler üzerine etkilerinin ara - tırılması amacıyla yapıldı.

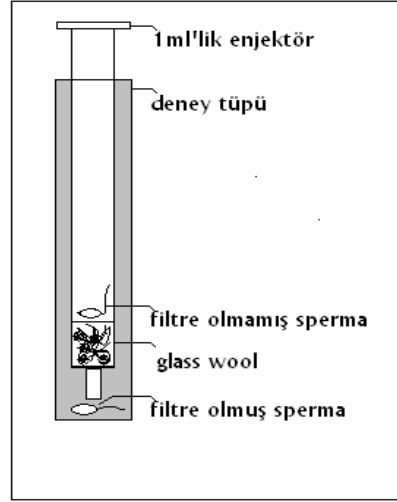
Materyal ve Metot

Çalı ma düzeni ve filtrelerin hazırlanması

Çalı mada üç farklı grupta de i ik a ırlık ve yükseklikte hazırlanan GW filtreleri kullanıldı.

Birinci grupta (Grup 1) 15 (Filtre 1A), 20 (Filtre 1B), 25 (Filtre 1C), 30 (Filtre 1D) mg GW (Merck Katalog No: K28370986 049) tartılarak, 1 ml'lik, steril plastik enjektör içerisine tabandan 3 mm yükseklikte olacak ekilde yerle tirildi. kinci grupta; enjektör tabanından 17 mm yükseklikte 50 (Filtre 2A), 75 (Filtre 2B), 100 (Filtre 2C) ve 125 (Filtre 2D) mg GW içeren filtreler hazırlandı. Üçüncü grupta ise enjektör tabanından 24mm yükseklikte 150 (Filtre 3A), 175 (Filtre 3B) ve 200 (Filtre 3C) mg GW içeren filtreler hazırlandı (Figür 1).

Bütün gruplarda, hazırlanan filtreler mikroskop sahasında GW parçacıklarına rastlanmayana kadar serum fizyolojik ile yıkanmı tır. Ayrıca tüm filtreler sperma filtrasyonu öncesi Tris-sitrat (300 mOsmol) ile yıkandı.



Figür 1. Glass wool filtresi.

Spermanın çözdürülmesi ve yıkanması

Aynı ırka ait, 0,25 ml'lik payetlerdeki farklı bo a spermaları 40 °C'lik su banyosunda 20 saniye süre ile çözdürüldü. Çözdürülen spermalar 1/1 oranında Tris sitrat (300 mM) ile sulandırıldı. Sulandırılan sperma 1800 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüj edilerek yıkandı. Yıkama sonrası sperma üzerindeki sıvı atılarak, spermatozoa peleti tekrar tris sitrat ile sulandırıldı.

Glass wool filtrasyon i lemi

Yıkanan sperma her bir grupta bulunan filtre sayısına e it hacimde bölünerek ıslak GW filtreleri üzerine kondu. Filtreler, her bir uygulamada sperma geçi i tamamlanana kadar % 5'lik CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı.

Spermatolojik muayene numunelerinin alınması ve de erlendirilmesi

Tüm filtre gruplarında sperma numuneleri filtrasyon öncesi ve sonrası alındı. Alınan numuneler spermatolojik olarak motilite, anormal spermatozoa, ölü/canlı spermatozoa oranı ve yo unluk parametreleri açısından de erlendirildi.

Sperma parametrelerinin belirlenmesinde Tekin'in (13) bildirdi i yöntemler kullanıldı.

statistiksel Analiz

Çalı mada elde edilen parametrelerin normal da ı- lıma uygunlu u test edildi. Veriler normal da ılma- dı ı için Kruskal Wallis H varyans analizi kullanıldı; istatistiki fark olan gruplarda farkı yaratan grubun belirlenmesi amacıyla da Dunn's (çoklu kar ıla tır- ma) testi yapıldı.

Bulgular

Tüm gruplarda GW filtrasyon i lemi öncesi ve son- rasında elde edilen spermatolojik parametreler Tablo 1, 2 ve 3'te özetlenmi tir.

Filtrasyon sonunda, birinci grup filtreler kontrol grubu ile kar ıla tırıldı nda, sadece sperma- tozoon yo unlu unda önemli azalmalar saptandı (P< 0, 001) (Tablo 1). kinci grupta ise kontrol gru- buna göre motilite oranında artı , ((P<0,01), ölü spermatozoa oranında (P<0,01), ve yo unlukta önemli düzeyde azalma gözlemlendi (P<0,01). Üçün- cü grupta ise filtrasyon i lemleri sonunda kontrol grubuna göre motilite oranında önemli düzeyde artı , (P<0,001), ölü spermatozoa (P<0,001) ve yo unluk oranlarında (P<0,001) önemli düzeyde azalma gözlemlendi (Tablo 3).

Tablo 1. Birinci grup filtrelerle elde edilen spermatolojik parametreler.

Spermatolojik Özellikler n=10		Filtrasyon Öncesi (Kontrol)	Filtre 1A	Filtre 1B	Filtre 1C	Filtre 1D	KW (X ²)	P
MOT (%)	Ortanca (Min.-Maks.)	37.5 ^a (25-50)	40 ^a (30-60)	40 ^a (25-65)	40 ^a (35-60)	50 ^a (30-70)	6.26	P>0.05
ÖSO (%)	Ortanca (Min.-Maks.)	58.25 ^a (36-71.5)	53-50 ^a (20-67)	51.50 ^a (25.5-68.5)	48.50 ^a (31.5-62.5)	43.75 ^a (21.5-53.5)	6.70	P>0.05
ASO (%)	Ortanca (Min.-Maks.)	13.75 ^a (11-19.5)	14.75 ^a (6-35)	13.75 ^a (11-20)	16 ^a (8.5-23)	14.75 ^a (8-27.5)	1.26	P>0.05
KON (x10 ⁶ /ml)	Ortanca (Min.-Maks.)	50 ^a (37.5-75)	37.50 ^{a,b,c} (25-50)	30 ^{b,c,d} (25-37.5)	25 ^{c,d} (12.5-37.5)	25 ^d (12.5-35)	35.56	P<0.001

- Anormal Spermatozoa Oranı (ASO), Motilite (MOT), Ölü Spermatozoa Oranı (ÖSO), Konsantrasyon (KON)
- ^{a,b,c,d} Aynı satırda farklı harfler ta ımayan kolonlar istatistiki olarak farklıdır.

Tablo 2. kinci grup filtrelerle elde edilen spermatolojik parametreler.

Spermatolojik Özellikler n=10		Filtrasyon Öncesi (Kontrol)	Filtre 2A	Filtre 2B	Filtre 2C	Filtre 2D	KW (X ²)	P
MOT (%)	Ortanca (Min.-Maks.)	40 ^a (25-50)	50 ^{a,b,c,d} (45-60)	60 ^{b,c,d} (50-80)	60 ^{c,d} (40-75)	62.5 ^d (50-75)	27.32	P<0.01
ÖSO (%)	Ortanca (Min.-Maks.)	55.25 ^a (46.5-66.5)	48.75 ^{a,b,c} (34.5-56.5)	38 ^{b,c,d} (17.5-38.5)	39.25 ^{c,d} (17.5-50.5)	34 ^d (20-42.5)	26.89	P<0.01
ASO (%)	Ortanca (Min.-Maks.)	12.25 ^a (10.5-19.5)	12 ^a (7-18)	10.75 ^a (8-15.5)	13.75 ^a (12-21)	13.5 ^a (9.5-20)	7.50	P>0.05
KON (x10 ⁶ /ml)	Ortanca (Min.-Maks.)	50 ^a (40-80)	26.25 ^{a,b,c} (10-40)	20 ^b (10-25)	12.5 ^c (7.5-25)	10 ^d (7.5-125)	34.07	P<0.01

- Anormal Spermatozoa Oranı (ASO), Motilite (MOT), Ölü Spermatozoa Oranı (ÖSO), Konsantrasyon (KON)
- ^{a,b,c,d} Aynı satırda farklı harfler ta ımayan kolonlar istatistiki olarak farklıdır.

Tablo 3. Üçüncü grup filtrelerle elde edilen spermatolojik parametreler.

Spermatolojik Özellikler N=10		Filtrasyon Öncesi (Kontrol)	Filtre 3A	Filtre 3B	Filtre 3C	Filtre 3D	KW (X ²)	P
MOT (%)	Ortanca (Min.-Maks.)	40 ^a (25-60)	57.5 ^{a,b,c} (45-75)	67.5 ^{b,c} (50-80)	70 ^c (60-80)	62.5 ^d (50-75)	23.02	P<0.01
ÖSO (%)	Ortanca (Min.-Maks.)	54 ^a (32.5-66.5)	39.25 ^{a,b,c} (18.5-48.5)	25 ^{b,c} (13-43)	20.5 ^c (6.5-33.5)	34 ^d (20-42.5)	23.6	P<0.01
ASO (%)	Ortanca (Min.-Maks.)	12.25 ^a (5.5-19.5)	13.75 ^a (7-19.5)	11.5 ^a (5-15.5)	11 ^a (5-23)	13.5 ^a (9.5-20)	6.71	P>0.05
KON (x10 ⁶ /ml)	Ortanca (Min.-Maks.)	60 ^a (40-80)	12.5 ^{b,c,d} (10-20)	12.5 ^{c,d} (7.5-15)	10 ^d (5-17.5)	10 ^d (7.5-125)	24.80	P<0.01

- Anormal Spermatozoa Oranı (ASO), Motilite (MOT), Ölü Spermatozoa Oranı (ÖSO), Konsantrasyon (KON)
- ^{a,b,c,d} Aynı satırda farklı harfler taşıyan kolonlar istatistiki olarak farklıdır.

Anormal spermatozoa oranında ise tüm filtre gruplarında önemli düzeyde bir azalma olmadığı tespit edildi (P> 0,05) (Tablo 3).

Gruplar kendi içlerinde motilite, ölü spermatozoa oranı, anormal spermatozoa oranı ve yoğunluk parametreleri kümülatif olarak değerlendirildiğinde; Filtre 1D, Filtre 2B ve Filtre 3C'nin kendi grupları içerisinde, diğer filtrelerle göre daha etkin oldukları tespit edildi.

Gruplar içerisinde en iyi olan filtrelerin kendi aralarında, spermatolojik parametreler açısından yapılan kümülatif değerlendirilmesi sonucunda ise filtre 2B ve 3C'nin en etkili olduğu ve dondurulmuş bo a spermasının filtrasyonu amacıyla kullanımlarının başarılı sonuçlar verebileceği kanaatine varıldı.

Tartışma ve Sonuç

Sperma separasyonu amacıyla, birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden spermaya veya kullanılacak biyoteknolojik uygulamalara uygun olanının belirlenmesi ve yöntemin uygulanma teknikleri üzerine birçok araştırma yapılmıştır (1,6,12,15).

Günümüzde en eski en çok kullanılan yöntemler percoll ve swim up yöntemleri olarak gösterilmekle birlikte percoll yönteminin belirli hekimlikte kullanımının üşheli olması ve swim up yönteminde elde edilen sperma sayısı ve yöntemin oksidatif stresi gibi faktörler nedeniyle yeni arayışlar olmaktadır (2). Bu çalışmada özellikle bo a spermasında percoll ve swim up yöntemlerine alternatif olacak GW filtrasyon yönteminin etkinliği araştırıldı.

Çalışmada kullanılan dondurulmuş bo a spermalarının çözüm sonu spermatolojik olarak kalitesinin düşük olduğu gözlemlendi. Bu durumun spermanın dondurulması, çözündürülmesi, muhafazası veya uygulamalar esnasında meydana gelen strese (santrifüj ve yıkama işlemi gibi) kaynaklanabileceği düşünüldü.

Spermanın filtrasyonu amacıyla farklı veya aynı türe ait spermalarda, değişik tasarımlarda (farklı ağırlık ve yüksekliklerde) GW filtreleri kullanılmaktadır (5,7,8,9,12). Bu çalışmada kullanılan filtreler hazırlanmaları esnasında cam yünün yerleştirildiği yüksekliklere göre gruplara bölünerek değişik yoğunlukta (ağırlıkta) filtreler oluşturuldu.

Çalışmada genel olarak veya her bir grup filtreler içerisinde, ölü spermatozoa oranı ve spermay yoğunluk parametrelerinde azalma meydana gelirken; anormal spermatozoa oranlarında önemli bir iyileşme meydana gelmediği gözlemlendi. Motilite değerlerinde ise separasyon öncesine göre, yine filtre yoğunluklarına paralel bir şekilde artış görüldü.

Glass wool filtrasyonu ile leminin spermatolojik parametreler üzerine etkinliğini araştırmak için çalışmaları bulunmaktadır. Pereira ve ark. (9) pastör pipetinin tabanından 40 mm yükseklikte 80 – 100 mg ağırlığında GW içeren filtrelerle yaptıkları GW filtrasyon sonucunda; dondurulmuş -çözündürülmüş bo a ve keçi spermalarında yaklaşık % 19 oranında motilite artışı elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise 75 ve 100 mg GW içeren filtrelerle % 20 oranında motilite artışı elde edilmiştir. Bu çalışmanın motilite artışı oranı olarak uyum içerisinde olduğu düşünüldü.

Rho ve ark. (10) keçilerde in vitro inkübasyon sürelerini ve sperma separasyon yöntemlerini karşılaştırdıkları bir çalışmada 1 ml'lik enjektörlerle, enjektör tabanından 3.5 mm yükseklikte dönenmi, 15 mg cam yün içeren filtrelerle, filtrasyon sonunda separasyon öncesine oranla % 80 azalma olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise, 15 mg GW içeren filtre ile boğa spermasında yaklaşık % 20 oranında yoğunluk azalması elde edilmiştir. Çalışmanın uyum içerisinde olmadığı, sonuçlar arasındaki farkın kullanılan filtre, sperma türü ve uygulama tekniğinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Sieme ve ark. (12); natif at spermasında 5 ml'lik plastik enjektörü tamamen GW ile doldurulan ve enjektör tabanından 1.5 ml çizgisine kadar sıkıştırılmış GW içeren filtreler kullanılmışlardır. Çalışmalarında GW filtrasyon sonunda motilite oranında % 14.2 artışı, anormal spermatozoa oranında % 3.6-1.5 arasında azalma, ölü spermatozoa oranında % 3.1 artışı ve yoğunluk olarak yaklaşık 1/3 oranında azalma elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen motilite artışı oranı sunulan çalışmada elde edilen artışa göre daha düşük, anormal spermatozoa oranındaki azalma daha yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte, yoğunluk azalması olarak sunulan çalışma ile uyum içerisinde olduğu düşünülmüştür.

Hammadeh ve ark. (6) ise insan spermasında sperma separasyon yöntemlerini karşılaştırdıkları çalışmalarında, GW filtrasyon yönteminin PureSperm® ve swim up yöntemlerine oranla kromatin yapısı açısından daha iyi sonuç verdiğini ve özellikle intrastoplazmik sperm enjeksiyonu uygulamalarında öncelikle tercih edilmesi gereken bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, çalışmaları 15 mg GW içeren filtrelerle natif insan spermasında uyguladıkları GW filtrasyon sonunda spermatolojik olarak yoğunluk olarak % 9.9 oranında azalma, anormal spermatozoa oranında % 5.8 artışı elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise tüm grup filtrelerde anormal spermatozoa oranında belirgin bir iyileşme belirlenmemiştir. Bununla birlikte, 15 mg GW içeren filtrelerle yapılan filtrasyon sonunda boğa spermasında yoğunluklu insan spermasında oranla daha fazla düzleşme tespit edilmiştir. Çalışmalar arasındaki farkın; tür, dondurulmuş çözülmesi sperma ile natif sperma kullanımı ve uygulama tekniklerinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Çalışmada her bir grup kendi içerisinde ve kendi arasında spermatolojik özellikler üzerine yaptıkları etkiler değerlendirildiğinde; birinci grup filtrelerden elde edilen sonuçlar metodun kullanılabilirliği ve

sonuçlarında yansımaları bulundu. istatistiksel sonuçlarda bu doğrultudadır. Sperma yoğunluklarındaki düşmenin tek başına bir anlam ifade etmediği düşünülmüştür. Ancak, ikinci ve üçüncü gruplarda anlamlı sonuçlar alınmıştır. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, filtre 2D ile yeterli sonuçlar alındığı görülmüştür. Bununla birlikte, çalışmadaki en başarılı sonuçlar filtre 3C ile elde edilmiştir. Bu filtre ile elde edilen motilite oranındaki artış ve ölü spermatozoa oranındaki azalmanın son derece (P<0,001) belirgin olduğu gözlemlendi ve tavsiye edilebilir özellikte olduğu kanaatine varıldı.

Sonuç olarak dondurulmuş boğa spermasının kullanılacağı değerlendirilerek reproduktif biyoteknolojilere, eldeki spermanın kalitesine ve kullanım amacına göre farklı özelliklerde düzenlenen GW filtrelerinin kullanılabilmesi ve yöntemin diğer separasyon yöntemlerine oranla daha pratik, ucuz bir yöntem olduğu kanaatine varıldı.

Kaynaklar

1. **Cary JA, Madill S, Farnsworth K, Hanya JT, Duos L, Fahning ML.**, 2004. A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. *Can Vet J.*, 45:35-41.
2. **Cesari A, Kaiser GG, Mucci N, Mutto A, Vincenti A, Forne's MW, Alberio RH.**, 2006. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production in vitro. *Theriogenology.*
3. **Cheapau C, Gagnon C**, 1987. Nitrocellulose and polyvinyl coatings prevent sperm adhesion to glass without affecting the motility of intact and demembrated human spermatozoa. *J Androl.*, 8:34-40.
4. **Daya S, Awatkin RBL**, 1987. Improvement in semen quality using glass bead column. *Archives of Andrology.* 18:241-244.
5. **Engel S, Weber H, Petozoldt R, Seidl B, Wiehe W, Sperl J**, 2001. An improved method of sperm selection by glass wool filtration. *Andrology.* 33:223-230.
6. **Hammadeh ME, Kühnen A, Amer AS, Rosenbaum P, Schmidt W**, 2001. Comparison of sperm preparation methods: Effect on chromatin and morphology recovery rates and their consequences on the clinical outcome after in vitro fertilization embryo transfer. *Int J Androl.*, 24(6):360-368.

7. **Katila T**, 2001. In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: a Review. *Acta Vet Scand.*, 42(2):199-217.
8. **Larson KL, Brannian JD, Timm BK, Jost LK, Evenson DP**, 1999. Density gradient centrifugation and glass wool filtration of semen remove spermatozoa with damaged chromatin structure. *Human Reproduction*. 14 (8):2015-2019.
9. **Peraira RJTA, Tuli RA, Wallenhorst S, Holtz W**, 2000. The effect of heparin, caffeine, calcium ionophore A 23187 on in vitro induction of the acrosome reaction in frozen-thawed bovine and caprine spermatozoa. *Theriogenology*. 54:185-192.
10. **Rho GJ, Hahnel AC, Betteridge KJ**, 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.
11. **Rodriguez-Martinez H, Larsson B, Pertoft H**, 1997. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reprod Fertil Dev.*, 9:297-308.
12. **Sieme H, Martinsson G, Rauterberg H, Walter K, Aurich C, Petozoldt R, Klug E**, 2003. Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen thawed stallion semen. *Reprod Dom Anim.*, 38:134-140.
13. **Tekin N**, 1994. Spermanın muayenesi ve de erlendirilmesi. Alaçam E. ed. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Suni tohumlama, Do um ve nfertilite. 1. Baskı. Konya: Dizgievi. ss. 69-79.
14. **Valcarcel A, De las Heras MA, Moses DF, Peraz LJ, Balddassare H**, 1996. Comparison between Sephadex G-10 and Percoll for preparation of normospermic, asthenospermic and frozen / thawed ram semen. *Anim Reprod Sci.*, 41: 215-224.
15. **Van den Bergh M, Revelard P, Bertrand E, Biramane J, Vanin AS, Englert Y**, 1997. Glass wool column filtration, an advantageous way of preparing semen samples for intracytoplasmic sperm injection: an auto-controlled randomized study. *Human Reproduction*. 12(3):509-513.

Yazı ma Adresi:

Yrd. Doç. Dr. Ö. Orkun DEM RAL
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dölerme ve Sun'i Tohumlama ABD.
Mevlana Mah. Barı MANÇO Cad.
38090 Kocasinan/KAYSER
Tel: 0 352 338 00 06/122
Faks: 0 352 337 27 40
e-mail: odemiral@erciyes.edu.tr