

Donmuş Spermanın Saklanması ve Eritilmesi

Zekariya NUR* Kemal AK**

Geliş Tarihi: 23.01.2003

Kabul Tarihi: 17.03.2003

Özet: Günümüzde genetik kaynakların saklanarak gelecek yıllara aktarılması önemli bir konudur. Hayvancılık, biyoteknoloji, türlerin soyunun korunması ve klinik uygulamaları gibi geniş bir kullanıma sahip spermanın dondurularak saklanması süt sığırcılığı alanında büyük bir potansiyele sahiptir. Donmuş spermanın uygun koşullarda saklanması ve eritilmesi üzerine sun'i tohumlama alanında çalışanlar tarafından çok sayıda çalışma yapılmıştır.

Bu derlemede donmuş spermanın saha koşullarında saklanması ve eritilmesi sırasında fertilitiyi düşürebilecek hatalı uygulamaların önüne geçmek için dikkat edilmesi gereken kritik noktalara değinilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Sperma, saklama, eritme şekli.

Storing and Thawing of Frozen Semen

Summary: Preserving genetic resources for next millenium is of greet importance, whereas the major contribution of conserving sperms has the potential in many applications such as agriculture, biotechnology, species conservation and clinical medicine. The artificial insemination industry has been carried out many studies on proper handling and thawing procedures for frozen semen.

The ultimate objective of this review has been to provide accurate recommendations for semen handling under field conditions so that fertility is not limited due to semen handling errors.

Key Words: Semen, handling, thawing procedure.

Giriş

Hızla artan dünya nüfusu, bilim adamlarını yaşam için gerekli kaynaklardan daha verimli yararlanma olanaklarını araştırmaya yöneltmiştir. Hayvancılık sektöründe vazgeçilmez öneme sahip olan reproduksiyon biyoteknolojisi; sun'i tohumlama, in-vitro fertilizasyon, gen transferi ve klonlama gibi birtakım yenilikleri kapsamaktadır. Bu teknikler arasında en etkin ve yaygın olanı, değerli erkek gamet hücrelerinin dondurulması ve dişi hayvanların sun'i yolla tohumlanması esasına dayanan sun'i tohumlama biyoteknolojisidir. Günümüzde sığırcılık alanında sun'i tohumlama yöntemiyle elde edilen yüksek fertilitite oranları

doğal aşım ile karşılaştırılabilecek düzeye ulaşmış ve dondurulmuş boğa sperması uzun yıllardır süt sığırcılığı endüstrisinde ticari amaçla kullanım alanı bulmuştur. Bu teknik sayesinde mevcut hayvan populasyonunda kısa sürede istenen yönde genetik ilerleme sağlanabilmekte, yetiştirici erkek damızlık besleme külfetinden kurtulmakta, değerli bir damızlık bireyden geniş ölçüde yararlanılabilmekte, veneral yolla bulaşan hastalıkların önüne geçilebilmekte ve mevcut sürüde bir örneklilik sağlanabilmektedir²³. Sun'i tohumlama endüstrisi alanındaki gelişmeler hızla ilerlemiş ve günümüzde uygulamalar bütün dünyaya yayılmıştır. Bu reproduksiyon biyoteknolojisi yılda ortalama 100 milyon dişi sığıra uygulanmaktadır³⁰.

* Araş. Gör. Dr., Dölerme ve Sun'i Tohumlama A.B.D., Bursa, TÜRKİYE.

** Prof. Dr., Dölerme ve Sun'i Tohumlama A.B.D., İstanbul, TÜRKİYE.

Gliserolün kriyoprotektif etkisinin keşfedilmesiyle spermanın dondurulması alanında önemli gelişmeler kaydedilmiş ve 1950'li yılların başında sınırlı olan sun'i tohumlama uygulamaları yaygınlaşmıştır. Bu biyoteknolojinin özellikle 1958 yılından sonra gelişimi hayvancılık endüstrisi ve özellikle sığır yetiştiriciliği üzerinde büyük bir etki oluşturmuştur^{8,11,16,30,34}.

Günümüzde gamet hücrelerinin saklanması, 5°C'de sıvı saklama ve dondurma olmak üzere başlıca iki yöntem kullanılmaktadır³⁸. Her iki yöntemde de spermanın yaşamsal fonksiyonlarını saklama ısısı, soğutma hızı, sulandırıcının kimyasal bileşenleri ve kullanılan kriyoprotektif maddeler belirler^{1,2,8,12,13,27,28,33,35}. Sıvı saklama yöntemi, spermayı sulandırdıktan sonra 5°C gibi düşük ısılarda saklama esasına dayanan bir metottür. Bu yöntem ile sperma yaşamsal aktivitesini ancak 2-3 gün koruyabilmektedir^{19,29}. Dondurma yöntemi ise spermanın daha düşük ısılarda saklanması temeline dayanır. Hücreyi soğuk şokunun etkilerinden koruyan kriyoprotektif maddelerle sulandırılan sperma, ampul (etil alkol banyosunda), pellet (-79°C kuru buzda) veya payet (-110°C sıvı azot buharında) yöntemiyle dondurularak -196°C'ta saklanır^{3,5}. Uygun saklama koşullarında spermanın potansiyel fertilitesi yıllarca korunabilir^{15,29}.

Sun'i tohumlama organizasyonu spermanın alınmasından dondurulmasına, depolanmasından tohumlama işlemlerine kadar bir dizi hassas uygulamaları gerektirir¹⁹. Sahada tohumlama yapan veteriner hekimler ve teknisyenler bazı kuralları göz ardı edebilmekte ve zamanla kendilerine göre pratik ama hatalı alışkanlıklar edinebilmektedirler. Özellikle konteynerdeki azot seviyesi ve konteynerden payetlerin alımı sırasında uyulması gereken kuralların dışına çıkılmasına bağlı olarak spermatozoonlar olumsuz yönde etkilenmektedir²⁹. Bir çok araştırmacı sun'i tohumlama uygulamaları sırasında hatalı uygulamalara bağlı olarak değişik çevre faktörü ve manipülasyonların etkilerini incelemiştirler^{7,14,31,32}.

Konteyner Kullanımı

Donmuş sperma kullanımında ortaya çıkan fertilitite sorunlarının çoğu sun'i tohumlamayı yapan uygulayıcının saklama ve uygulama koşullarındaki teknik hatalarından kaynaklanmaktadır²⁴. Bu konuda değişik araştırmalar yapılmıştır^{7,14,29}.

Seri üretime uygunluğu, saklama kolaylığı, yüksek gebelik oranları gibi birçok avantaja sahip olmasından dolayı payet metodu ile dondurma tekniği tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır^{19,29}. Payet metoduna göre dondurulan sperma donma aşamasından eritme veya sun'i tohumlama zamanına kadar çok sayıda farklı uygulamaya bağlı olarak değişik aşamalarda ısı yükselmesine maruz kalır^{17,18,19,24,29}. Buna bağlı olarak payetlerin iç ısısı;

- payetlerin saha konteynerine aktarılması,
- payetler alınırken kanisterin kaldırıldığı yükseklik,
- payet alınırken geçen süre,
- konteyner içindeki azot miktarı ve
- bu uygulamalar sırasında geçen süre ve tekrarlama sayısına bağlı olarak değişim gösterebilir¹⁹.

Konteyner kullanımı esnasında konteynerdeki nitrojen hareket ederek konteynerin boyun kısmında çatlamalara yol açabileceğinden dolayı konteynerin eğilmesi ve sallanmasından kaçınılmazdır. Ayrıca konteynere azot ikmal yapılırken konteynerde bulunan payetlerin ısınmasına yol açabilecek yüksek miktarda ısınmış azot buharının kap içinde birikmesine izin verilmemelidir. Konteyner kullanılmadığı anlarda azot kaybını ve çevreden köken alan mikroorganizmaların bulaşmasını engellemek için konteynerin ağzı sürekli kapalı tutulmalıdır. Sıvı azot çok sayıda mikroorganizmayı içerebileceğinden rutin olarak konteyner temizliği yapılmalıdır. Konteynerdeki azot miktarı sürekli olarak kontrol edilmeli, azot miktarında düşüş olması halinde tamamlanmalıdır. Eğer konteynerde bir hata söz konusu ise sperma derhal başka bir konteynere aktarılmalıdır. Konteynerin iç ısısı -120°C'ın üstüne çıkmadığı müddetçe spermanın fertilitesi etkilenmez. Eğer bu durumdan şüphe ediliyorsa gerekli spermatojik incelemeler yapılmalıdır. Bir teknisyen payeti alırken daha sonra kullanılacak payetlerin tekrarlı ısınmalarına izin vermemelidir. Eğer sperma başka konteynere transfer edilecekse tek bir payetin taşınması daha büyük bir risk taşır. İçinde payet bulunan goblette azot olmaması halinde kanisterin 1 dakikalık kaldırılması spermada zararlı etkilerin oluşmasına neden olur. Spermanın gobletten alınması sırasında pens kullanılmalı, kanister 30 saniyeden fazla yukarıda tutulmamalı ve payet 10 sn içinde alınmalıdır. Donmuş sperma saha konteynerinde depo konteynerine göre daha çok zararlı etkiye maruz kalır. Bu ne-

denle saha konteynerinde çok fazla sayıda payet bulundurulmamalıdır. Bazı durumlarda sun'ı tohumlama yapan teknisyenler payetleri eritme kabına veya depo konteynerinden saha konteynerine aktarırken aktarma işlemini elleri ile yapmaktadırlar. Bu tür uygulamalar saha konteynerindeki azot seviyesini düşürebilmekte ve buna bağlı olarak spermada hasarlar oluşabilmektedir¹⁷.

Payetler hacimlerine göre fazla yüzey alanına sahip olmalarından dolayı ısı değişimlerine çok duyarlıdır^{18,19}. Yapılan araştırmalarda -196°C'ta saklanan spermaların herhangi bir nedenden -100°C'a ısınmasının spermatozoonlardaki buz kristallerinin yapısının etkilendiği, ve ısı tekrar -196°C'a indirildiğinde kristalleşme olayının tekrar şekillendiği (mikrotorik rekristalizasyon) hatta bu termodinamik olayların -130°C'de bile oluşabileceği bildirilmiştir^{18,19,24}.

Konteyner içinde saklanan payetlerin ısı farklılıklarına maruz kalması spermatozoon motilitesini ve sağlam akrozom oranını azaltmaktadır^{18,22}. Konteynerdeki azot seviyesine, kanisterin kaldırıldığı yüksekliğe ve bu yükseklikte kaldığı süreye bağlı olarak değişen ölçülerde ısı farklılıkları oluşmakta ve kanisterde bulunan spermının potansiyel fertilitesi azalmaktadır^{18,22,32}.

Senger²⁶, -196°C'ta sakladığı 0.25ml'lik payetleri çevre ısısına (20±6°C) maruz bırakmış, payetin iç ısısının 30. saniyede -45°C'a, 60. saniyede ise -15°C'a kadar yükseldiğini saptamıştır. Araştırmacı, 1 dakika çevre ısısına maruz bırakıldıktan sonra 37°C ısıdaki su banyosunda eritilen payetlerde motilitenin kontrol grubuna göre %25'ten %5'e düştüğünü saptamıştır. Araştırmacı, konteyner sıvı azot ile tam dolu iken payetlerin konteynerin ağız hizasında 1 dakika bekletilmesi durumunda ısının sadece 15°C yükseldiğini, düşük azot içeren konteynerde (14 cm) aynı uygulama sonucunda ısının 72°C yükseldiğini bildirmiş, düşük azot içeren konteynerde yapılan kaldırma indirme uygulamalarının ısının olumsuz etkilerini artırdığını, konteynerin ağız hizasına kadar getirilip bu yükseklikte 1 dk tutulan bir payetin sıvı azot içine tekrar daldırılması ile ısının tekrar -196°C'a ulaşması için belli bir süre gerektirdiğini açıklamıştır. Araştırmacı, sıvı azot konteyneri içinde depolanan, 6 ay boyunca kaldırma indirme manipülasyonuna maruz bırakılan payetlerde spermatozoon motilitesi ve akrozom bütünlüğünün olumsuz etkilendiğini, ayrıca üst üste 2 goblet alan kanisterlerde üst goblette sak-

lanan spermada altta bulunana göre daha fazla akrozomal bozukluk görüldüğünü bildirmiştir.

İleri ve Ak¹⁸, payetlerin konteynerden alınırken kanisterlere yapılan manipülasyonların ve bu manipülasyonların sıklığının spermatolojik özelliklerinin korunmasında önemli olduğunu, eritme sonrasında spermaların maruz kalabileceği ısı değişikliklerinin spermatozoon motilitesine ve özellikle akrozom başta olmak üzere sperma morfolojisine zarar verebileceğini bildirmişlerdir. Bu riskler göz önünde bulundurularak İleri ve ark¹⁹, konteyner yapılacak manipülasyonlarda; payetlerin donma kazanından veya depo konteynerinden saha konteynerine aktarılırken gobletlerin içinin sıvı azot ile dolu olmasını, aktarma işleminin çok kısa sürede gerçekleştirilmesini, payet alınırken kanisterin kaldırıldığı yüksekliğin konteyner ağız içinde olmasını, payetin kanisterden mümkün olan en kısa sürede alınmasını, gerektiği durumlarda kanister tekrar sıvı azot içine daldırıldıktan sonra payetin alınmasını, konteynerdeki sıvı azot miktarının konteyner hacminin 2/3'den az olmamasını ve azot seviyesinin haftada iki kez kontrol edilmesini önermişlerdir. Horward ve Pace¹⁷, payet alınırken kanisterin fazla kaldırılmamasını, 10 saniye içerisinde kanisterden payetin alınmasını, azot miktarının sürekli kontrol edilmesini ve payet içindeki spermaların -120°C'den daha fazla ısındığından şüphe edildiğinde spermatolojik özelliklerin tekrar incelenmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Yapılan bir çalışmada düşük azot seviyede azot içeren konteynerlerde saklanan, içinde payet bulunan kanisterin konteyner ağızından fazlaca dışarıya çıkartılması ve bu yükseklikte 20 saniye gibi uzunca süre tutulmasının, spermayı eritme sonrası soğuk şoklarına karşı daha duyarlı hale getirdiği saptanmıştır²².

Konteynerde bulunan azot seviyesi, payet alınırken kanisterin kaldırıldığı yükseklik ve payet alınırken geçen sürenin etkilerini araştıran Uzey ve ark.³², kanisterin kullanılmasına bağlı olarak oluşan ısı farklılıklarının spermatozoon motilitesine zarar verdiğini, bu zararın kanisterin kaldırıldığı yükseklik ve geçen süreye göre değişmediğini saptamışlardır.

Donmuş Spermının Eritilmesi

Spermaların fizikokimyasal yapısı hem donma hem de eritme işlemleri sırasında şekillenen buz kristalleri nedeniyle zarar görür^{25,35}. Spermatozoonların yaşama yetenekleri ve morfolojik bütünlüklerinin korunmasında eritme işle-

minin ayrı bir yeri ve önemi vardır^{21,18,27}. Bu nedenle dondurulmuş spermanın en ideal eritme tekniği konusunda çok sayıda çalışma yapılmıştır^{4,6,7,9,14,20,21,25,27,37}.

İleri ve Ak¹⁸, 25, 15, 5 ve 0°C gibi düşük ısılarda eritme tekniklerine göre vücut ısısındaki su banyosunda payetlerin eritilmesiyle en iyi sonuç elde edildiğini bildirmişlerdir. Correa ve ark.⁷, fizyolojik ısıda (37°C'de) eritmenin motilitenin devamlılığı için zorunlu olduğunu bildirmişlerdir. Blackshaw⁵, spermayı sitrat, sitrat+%12.5 yumurta sarısı, sitrat+lipoprotein içeren sulandırıcılarla sulandırdıktan sonra ampul yöntemi ile dondurduğu sığır ve koç spermasını 5°C ve 40°C'ta eritmiş ve 40°C'ta eritmenin daha iyi sonuç verdiğini bildirmiştir.

Payetlerde dondurulan spermanın, payetlerin hacim/yüzey alanı oranının oldukça yüksek olması nedeniyle ısı değişikliğine karşı oldukça duyarlı olduğunu bildiren Senger²⁶, su banyosu ısısının yükseltilmesiyle eritme hızının arttığını ve dolayısıyla canlı hücre sayısının olumlu yönde etkilendiğini saptamış, saha koşullarında spermanın 35°C'ta eritilmesi gerektiğini, yüksek ısılarda eritme tekniğinin canlılık oranını artırır da sürenin aşılması halinde ölümlere yol açtığından riskli olduğunu açıklamıştır.

Eritme sonrası oluşan soğuk şoklarının morfolojik bozuklukları artırdığı ve motiliteyi olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir^{10,22}. Güney ve İleri¹⁴, dondurulmuş boğa spermasını 37°C/30 sn, 20°C/45 sn, 15°C/60 sn ve 5°C/90 sn'de eriterek sırasıyla ortalama motiliteyi %57.1, 42.3, 36.8 ve 29.2 akrozomal bozukluğu %3.22, 11.8, 17.78 ve 31.4; diğer morfolojik bozuklukları %, 3.72, 6.96, 8.89, 9.2 ve total morfolojik bozuklukları %6.94, 18.04, 26.67, 40.6 olarak bulmuşlar, en iyi sonucu ise 37°C/30 sn'de eritmede saptamışlardır. Araştırmacılar, deneysel olarak soğuk şokuna uğrattıkları boğa spermasında spermatolojik özelliklerin zarar gördüğünü, spermanın 20°C'nin altındaki ısılarla maruz bırakılmaması gerektiğini bildirmişlerdir.

Sonuç olarak yüksek gebelik oranları elde edilmesinde veteriner hekimin önemli görevleri vardır. Tohumlama için en uygun zamanın belirlenmesi, spermanın kurallara ve tekniğine uygun olarak saklanması, taşınması, eritilmesi ve tohumlama tekniklerinin eksiksiz uygulanması bunlardan bazılarıdır. Donmuş spermanın potansiyel fertilitésinin korunmasından sorumlu olan veteriner hekimler (veya teknisyenler) kendilerine

göre pratik ama hatalı uygulamalar edinmekte ve bu hatalı uygulamalar giderek alışkanlıklara dönüşmektedir¹⁹. Konteynerin kullanımı^{22,32}, eritme^{14,22} ve eritme sonrasındaki^{22,36} aşamalarda hatalı manipülasyonlardan kaynaklanan ısı farklılıklarının spermatolojik özellikleri olumsuz yönde etkilediği araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur. Günümüzde değişik sulandırıcı ve dondurma metotları uygulanarak (Payet, pellet) sperma dondurulmaktadır. Pratikte kullanılabilirliği en uygun olan payet yöntemi yaygınlaşmıştır. Saha koşullarında sun'i tohumlama yapacak veteriner hekim ve teknisyenler donmuş spermayı eritirken spermayı temin ettikleri sperm dondurma merkezinin eritme yöntemini göz önünde bulundurarak eritme işlemini yapmaları başarılarını artıracaktır. Aynı şekilde kullandıkları konteynerin özelliklerini göz önünde bulundurarak konteynerlerini kullanmaları başarılarını olumlu yönde etkileyecektir.

Kaynaklar

1. AISEN, E.G., ALVAREZ, H.L., VENTURINO, A., GAEDE, J.J. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*, 2000; 53, 1053-1061.
2. AN, T.Z., IVAKIRI, M., EDASHIGE, K., SAKURAI, T., KASAI, M. Factors affecting the survival of frozen-thawed mouse spermatozoa. *Cryobiology*, 2000, 40, 237-249.
3. BAHAMONDES, L., FAZANO, F., DE LUCIO, M.A., NEVES, P.A., BOTTOCHER LUIZ, F., LORENZETTI, G.B. Evaluation of human sperm membrane integrity using the water test and the hypoosmotic test. *Andrologia*, 2001; 33: 75-77.
4. BARTH, A.D., BOWMAN, A.P. Determination of the best practical method of thawing bovine semen. *Can. Vet. J.* 1988; Vol. 29: April. 366-369.
5. BLACKSHAW, A.W. Factors effecting the reveal of bull and ram spermatozoa after freezing to -79°C. *The Australian Veterinary Journal*, 1995; September 238-241.
6. BORG, K., COLENBRANDER, B., FAZELI, A., PARLEVLIET, J., MALMGREN, L. Influence of thawing method on motility, plasma membrane integrity and morphology of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 1997; 48:531-536.
7. CORREA, J.R., PACE, M.M., ZAVOS, P.M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology*, 1997; 48: 721-731.

8. CORREA, J.R., RODRIGUEZ, M.C., PATTERSON, D.J., ZAVOS, P.M. Thawing and processing of cryopreserved bovine spermatozoa at various temperatures and their effects on sperm viability, osmotic shock and sperm membrane functional integrity. *Theriogenology*, 1996; 46:413-420.
9. DE JARNETTE, J.M., BARNES, D.A., MARSHALL, C.E. Effects of pre-and post-thaw thermal insults on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. *Theriogenology*, 2000; 53: 1225-1238.
10. ERIKSON, B.M., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in flat packs and maxi-straws. *Animal Reproduction Science*, 2000; 63:205-220.
11. FABROCINI, A., DEL SORBO, C., FASANO, G., SANSONE, G. Effect of differential addition of glycerol and pyruvate to extender on cryopreservation of Mediterranean buffalo (*B. Bubalis*) spermatozoa. *Theriogenology*, 2000; 54: 193-207.
12. GIL, J., LUNDEHEIM, N., SÖDERGUIST, L., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Influence of extender, temperature, and addition of glicerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*, 2003, 59, 1241-1255.
13. GİL, J., RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M., LUNDEHEIM, N., SÖDERGUIST, L., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Fertility of ram semen frozen in Bioexell and used for cervical artificial incemination. *Theriogenology*, 2003, 59, 1157-1170.
14. GÜNEY, H.Ö., İLERİ, İ.K. 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.*, 1991; 17 (11): 75-91.
15. HAFEZ, E. S. E. Semen evaluation in Hafez, E. S. E. (Ed) *Reproduction in Farm Animals*. 6. ed. Lea and Fabiger, Philadelphia, 405-423 1993.
16. HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Reproduction Science*, 2000; vol. 62: 3-22.
17. HORWARD, T.H., PACE, M.M. Seminal evaluation and artificial incemination In: Laing, J.A. (ed). *Fertility and Infertility in Veterinary Practice*. 4. ed. Bailliere Tindal, London. 1988.
18. İLERİ, İ.K., AK, K. Payet yöntemine göre dondurulmuş boğa spermasının eritilmesinde eritme ısısı ve sürelerinin spermatozoitlerin motilite ve akrozom yapıları üzerine etkileri. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi ve Münih Ludwig-Maximilian Üniversitesi Veteriner Fakültesi Türk-Alman Günleri 1993*; 29-30 Nisan Mayıs Tebliğler, 58-62.
19. İLERİ, İ.K., AK, K., PABUÇÇUOĞLU, S., BİRLER, S. *Reproduksiyon ve sun'i Tohumlama*. İstanbul Üniv. Vet. Fak. Yayını. Ders Notu No: 23. 2000.
20. KAYA, A., ÇOYAN, K., YILDIZ, C., ATAMAN, M.B. Dondurulmuş boğa spermasını değişik ısı ve sürelerde çözürmenin spermatozojik özellikler ve payet içi ısısı üzerine etkisi. *Hayvancılık Araştırma Derg.* 1998; 8, 1-2: 29-33.
21. KOSIMOTO, C., MAZUR, P. Effects of warming rate, temperature, and antifreeze proteins on survival of mouse spermatozoa frozen at an optimal rate. *Cryobiology*, 2002, 45, 49-59.
22. NUR, Z. Donmuş boğa spermasına uygulanan ısı farklılıklarının eritme sonrası oluşturulan soğuk şokuna etkileri: İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez (2001).
23. ÖZKOCA, A. Çiftlik Hayvanlarında Reproduksiyon ve Sun'i Tohumlama. İ.Ü. Vet. Fak. Yayınları, İstanbul 1984.
24. PICKETT, B.W., BERNDTSON, W.E. Procedures for handling frozen bovine semen in the field. in. Morrow, D.A. (ed) *Current Therapy in Theriogenology: Diagnosis, Treatment and Prevention of Reproductive Diseases in Animals*. W.B. Saunders Company, Philadelphia London Toronto, 354-370, 1980.
25. SAINT JALME, M., LACOQ, R., SEIGNEURIN, F., BLESBOSİS, E., PLOUZEAU, F. Cryopreservation of semen from endangered pheasants: the first step towards a cryobank for endangered avian species. *Theriogenology*, 2003, 59, 875-888.
26. SENGER, P.L. Handling frozen bovine semen-factors wich influence viability and fertility. *Theriogenology*, 1980 13: No: 1; 51-62.
27. SILVA, A.R., CARDOSO, R.C.S., UCHOA, D.C., SİLVA, L.D.M. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*, 2003, 59, 821-829.
28. SZTAIN, J.M., NOBLE, K., FARLEY, J. S., MOBRAATEN, L.E. Comparison of permeating and non permeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation, *Cryobiology*, 41, 28-39, 2001.
29. TEKELİ, T., ÇOYAN, K. İneklerde Sun'i Tohumlama. *Bahçıvanlar Basım San. A. Ş. Konya* 1996.
30. THIBER, M., GUERIN, B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Reproduction Science*, 2000; vol. 62: 233-251.

31. THURSTON, L.M., HOLT, W.V., WATSON, P.F. Post-thaw functional status of boar spermatozoa cryopreserved using three controlled rate freezers: a comparison. *Theriogenology*, 2003, 8829, 1-13 in press.
32. UZEY, N., AK, K., İLERİ, İ.K. Konteynerde saklanan boğa spermasına çevre faktörlerinin etkileri. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.* 2000; 26: (82), 519-526.
33. VIDAMENET, M., YVON, J.M., COUTY, I., ARNAUD, G., NGUEKAM-FEUGANG, J., NOUE, P., COTTRON, S., LE TELLEIER, A., NOEL, F., PALMER, E., MAGISTRINI, M. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA82 *Animal Reproduction Science*, 2001; 68: 201-218.
34. WATSON P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Reproduction Science*, 2000; vol. 60-61, 481-492.
35. WOELDERS, H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Vet. Quart.* 1997; Vol. 19: 135-8.
36. YAVAŞÇA, İ., AK, K., İLERİ, İ.K. Einwirkungen verschiedener Umgebungstemperaturen und Besamungszeiten auf die Fertilität der nach Paillettenverfahren tiefgefrorenen und aufgetauten Bullenspermien. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.* 1999; 25 (2), 215-223.
37. YILMAZ, N., YURDAYDIN, N. Değişik süre ve ısılarda çözölmüş boğa spermalarının akrozom yapısı ve dölvürimi üzerine etkisi. *Lalahan Hay. Arş. Ens. Der.* 1993; 33 (1-2), 20-27.
38. YOSHIDA, M. Conservation of sperms: Current status and new trends. *Animal Reproduction Science*, 2000; vol. 60-61: 349-355.