

Köpek ve koçlarda akrozom bozukluklarının belirlenmesi amacıyla farklı tespit ve boyama yöntemlerinin karşılaştırılması

Cengiz YILDIZ¹ M. Bozkurt ATAMAN² Abdullah KAYA² Cafer TEPELİ³ Necdet LEHİMCİOĞLU⁴

¹ Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı-VAN

² Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı-KONYA

³ Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Zootekni Anabilim Dalı-KONYA

⁴ Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı-KARS

ÖZET

Bu çalışmada, köpek ve koçların taze ve dondurulmuş-çözdürülmüş spermalarında farklı yöntemler kullanılarak akrozom morfolojilerinin değerlendirilebilirlik olanaklarının araştırılması amaçlanmıştır. Koçlardan suni vajen ve köpeklerden ise penis masajı ile alınan taze sperma örnekleri Eosin-nigrosin, Nigrosin-eosin, Giemsa, Rose-bengal boyaları ve Hancock ile Hancock+Eosin fikzasyon yöntemleri kullanılarak akrozom bozuklukları oranları belirlendi. Ejakülatlarının geri kalan kısımları köpeklerde Tris-Fruktoz, koçlarda ise Tris-glikoz sulandırıcısı kullanılarak 0.25 ml'lik payetler içerisinde donduruldu. Payetler çözdürüldükten sonra taze spermada anormal akrozom oranını tespit etmek amacıyla kullanılan aynı yöntemler tekrar edildi. Taze ve dondurulmuş-çözdürülmüş spermanın anormal akrozom oranlarının tespiti için kullanılan yöntemler arasında istatistiksel fark gözlenemezken ($p>0.05$), kullanılan yöntemler arasında akrozom anormalitesini belirleme açısından önemli pozitif korelasyonların varlığı saptanmıştır ($p<0.05$, 0.01 ve 0.001). Sonuç olarak ; araştırmada kullanılan tüm boyama ve fikzasyon yöntemlerinin, köpek ve koçlara ait taze ve dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların akrozom muayenelerinde güvenle kullanılabileceği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Koç, Köpek, akrozom bozuklukları, boyama, taze ve çözünmüş sperma

Comparison of various fixation and staining methods in detecting abnormal acrosome rates in dogs and rams

SUMMARY

Effectiveness of various staining methods to detect abnormal acrosome rates in fresh and frozen-thawed ram and dog semens were studied. Semen samples were collected by artificial vagina and digital manipulation in rams and dogs, respectively. Abnormal acrosome rates of fresh semen samples were determined following fixation in the Hancock or Hancock+Eosin solutions and in the smears stained by Eosin-nigrosin, Nigrosin-eosin, Giemsa and Rose-bengal stains. Morphological examination of the semen samples were also determined following freezing and thawing in Tris-glucose and Tris-fructose extender in 0.25 ml of French straw in rams and dogs, respectively. There were significant positive correlations between methods used for determining acrosomal defects ($p<0.05$, 0.01 and 0.001). However, statistical differences among the methods used for determining acrosomal abnormality ratios in fresh or frozen-thawed ram and dog semen were not present ($p>0.05$). In conclusion; all staining and fixation methods investigated in the present study, can be used to detect morphologically abnormal acrosome in fresh and frozen-thawed semen obtained from rams and dogs.

Key Word: Ram, dog, abnormal acrosome, staining, fresh and thawed semen

GİRİŞ

Dondurulmuş-çözdürülmüş koç spermaları ile yapılan tohumlamalarda fertilitite oranı taze spermaya göre oldukça düşüktür. Bunun sebebi olarak dondurma etkilerine bağlı şekillenen akrozom bozuklukları gösterilmektedir. Suni tohumlama ya da doğal aşımında kullanılan erkek damızlık hayvanlara bağlı olarak şekillenen infertilite veya sterilite büyük ölçüde ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu nedenle fertilititeyi yakından ilgilendiren çalışmalarda erkek hayvanların potansiyel fertilitelerinin de bilinmesi önem taşımaktadır. Evcil hayvanlarda spermatozoanın şekli ve büyüklüğü hayvan türleri arasında değişmekle birlikte temel olarak morfolojik yapıları birbirlerine benzemektedir (21). Normal yapıdan farklı tip yapı gösteren spermatozoonlar atipik, anormal ya da patolojik spermatozoon olarak adlandırılmaktadır (23). Erkek hayvanlarda infertilitenin en önemli sebebinin spermadaki morfolojik bozukluklar ve bu bozuklukların ejakülattaki oranına bağlı olduğu ortaya konmuştur (2).

Spermanın fertilitite oranını önceden tahmin etmede birçok yöntem geliştirilmiştir. Bunlar spermatozoon motilitésinin tespiti (34), membran bütünlüğünün tespiti (31), hypoosmotic swelling test (19), zona-free hamster ovum test (35), hemizona assay (HZA) (16) testi gibi yöntemlerdir. Sperma kalitesinin değerlendirilmesinde kullanılan yöntemlerden bir diğeri de spermatozoon akrozomunun morfolojik muayene-

sidir (11,5,27). Çünkü akrozom fertilizasyonda önemli rol oynamaktadır. Ayrıca dondurulmuş spermanın depolanması sırasında spermatozoonlarda şekillenen yaşlanma ve dejenerasyonu tespit etmede değerli bir indikatördür. Ancak saha şartlarında henüz yaygın bir şekilde kullanılmamaktadır. Eğer saha şartlarında akrozom morfolojisinin değerlendirilebilmesi sağlanırsa sperma kalitesinin belirlenmesi daha kolay olacaktır.

Ejakülatta ya da spermada bulunan anormal yapıları spermatozoonların tespitinde Eosin-nigrosin, Nigrosin-eosin (6, 7), Methylene blue, Opalblue, Fast green, Çini mürekkebi (27), Caserett's (21), Giemsa (11), Rose-bengal (18,32) gibi boyama yöntemlerinin yanı sıra sıvı fikzasyon (12,11,27) yöntemlerinin'de kullanılabileceği belirtilmektedir. Bazı türlerin spermatozoonlarının baş yapılarının morfolojik (memeli, kanatlı) ve büyüklük farklılıklarından kaynaklanan özelliklerinden dolayı çeşitli boyama, sıvı fikzasyon yöntemleri ve hatta kullanılan mikroskopun faz kontrast veya ışık mikroskop olmasına göre yapılan akrozom muayenelerinde avantaj ve dezavantajların meydana geldiği bildirilmiştir (5). Ayrıca dondurulmuş-çözdürülmüş spermada taze spermaya göre sulandırıcının kompozisyonunda yer alan kimyasal (Tris, Pipes, Gliserol ve DMSO) ve doğal (yumurta sarısı ve süt) maddelerden dolayı spermatozoonların boya alması daha güç olup, bu özellik kullanılan sperma boyama yöntemine ve

hayvan türüne göre de farklılıklar oluşturabilmektedir (6). Rauhaus (20), boğa, domuz, koç, keçi ve aygır spermalarını sırasıyla Bromfenol blue-nigrosin, Anilin blue+kristal violet ve Spermac (Hazır boyama kiti - Stain Enterprise / G.Afrika) boya ile boyama sonrasında aygır dışındaki türlerin spermalarının tüm boya ile, buna karşın aygır spermalarının sadece Spermac boyası ile başarılı bir şekilde boyanabildiğini saptamışlardır. Buttelman (3), taze boğa spermalarını Hancock, Spermac, Karras, Farelly ve Wels boya ile, dondurulmuş-çözdürülmüş boğa spermalarını ise sadece Hancock ve Spermac yöntemlerini kullanarak karşılaştırmıştır. Sonuçta taze sperma için kullanılan yöntemler arasında önemli bir fark bulunmazken, çözdürülmüş spermada kullanılan iki boya arasında önemli farklılıkların olduğunu tespit etmiştir. Çeşitli araştırmacılar muayene amaçlı olarak seçilen yöntemlere göre, taze veya özellikle dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların akrozomları etrafında artifaktların (yanıltıcı görüntüler) şekillenebildiği ve sağlıklı bir değerlendirilmenin yapılabilmesi için bu artifaktlardan kaçınılması gerektiği bildirilmişlerdir (14,15).

Sunulan bu çalışmada, köpek ve koçların taze ve dondurulmuş-çözdürülmüş spermalarında farklı boyama ve fizyasyon yöntemleri kullanılarak akrozom morfolojilerinin değerlendirilebilme olanaklarının araştırılması ve saha şartları için en uygun yöntemlerin belirlenebilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada sperma vericisi olarak Kangal ırkı 6 köpek ve Merinos ırkı 6 baş koç kullanıldı. Sperma köpeklerden kızgın bir dişi bulunmaksızın penis masajı yöntemiyle (28) üç'er gün aralıklarla, koçlardan ise suni vajen yardımıyla (7) gün aşırı olarak alındı. Köpeklerde ejakülatın spermatozoon

yönünden zengin ikinci fraksiyonu ve koçlardan ejakülatın tamamı 32 °C'lik su banyosuna nakledildi. Elde edilen ejakülatların dondurulmaya elverişli olup olmadıklarının tespiti amacıyla spermatolojik muayeneleri gerçekleştirildi. Dondurmaya elverişli ejakülatlardan frotiler hazırlanarak kurutuldu. Her bir taze sperma örneğinden 6 farklı muayene için (boyama ve sıvı fizyasyon) örnekler alındı. Kurutulan frotiler Giemsa (11), Rose-bengal (32) boyama yöntemleri ile boyandı. Ayrıca bir damla sperma üç damla Eosin-nigrosin (100 ml distile su için ; 1.67 gr eosin+10 gr nigrosin+2.9 gr sodyum sitrat)(7), ve yine bir damla sperma üç damla Nigrosin-eosin (100 ml distile su için ; 0.67 gr eosin+10 gr nigrosin) boyası ile homojen bir şekilde karıştırılarak frotiler hazırlandı (6). Yine taze ejakülatlardan Hancock ve Hancock+Eosin (0.167 gr eosin 10 ml distile su içerisinde çözdürülerek elde edilen stok eosin solusyonundan iki damla, 1 ml hancock solusyonu ile karıştırıldı) solusyonları içerisine örnekler alındı. Hazırlanan tüm örneklerde akrozoma ait morfolojik muayeneler gerçekleştirildi. Ejakülatları geri kalan kısımları köpeklerde Andersen (1)'in bildirdiği yöntemle Tris-fruktoz, koçlarda ise Evans ve Maxwell (7)'e göre Tris-glikoz solusyonu ile 1/4 oranında sulandırılarak 0.25 ml'lik payetlerde donduruldu. Dondurma işlemi takiben payetler 35 °C'lik su banyosunda 30 saniye süre ile çözdürüldü. Taze spermalarda gerçekleştirilen akrozom muayene işlemleri dondurulup çözdürülerek elde edilen spermaların tamamında tekrarlandı. Morfolojik muayenelerin tamamı 10 x oküler ve 100 x immersiyon objektif özellikleri taşıyan bir mikroskop kullanılarak gerçekleştirildi. Taze ve çözdürülmüş spermalarda her bir örnekten farklı sahalarda olmak koşuluyla 500 adet spermatozoon muayene edildi. İstatistiki hesaplamalarda t-testi ve korelasyon analizi yöntemlerinden yararlanıldı.

BULGULAR

Çalışmada elde edilen bulgular tablolar halinde özetlenmiştir.

Tablo 1. Köpeklere Ait Taze ve Dondurulmuş-Çözdürülmüş Spermalara İlişkin Akrozom Anormalite Oranları* (n:18)

| | EN | NE | GS | RE | HS | HE |
|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Taze Sperma | 1.2±0.11 | 1.3±0.12 | 1.2±0.12 | 1.3±0.15 | 1.3±0.12 | 1.3±0.12 |
| Çözdürülmüş Sperma | 36.4±0.55 | 36.9±0.65 | 35.9±0.50 | 36.2±0.38 | 36.3±0.42 | 36.3±0.58 |

*: Akrozom anormalite oranını tespit etmede kullanılan farklı yöntemler arasındaki istatistiki farklılık önemsizdir (p>0.05).

EN: Eosin-nigrosin, NE: Nigrosin-eosin, GS: Giemsa, RB: Rose-Bengal, HS: Hancock solusyonu, HE: Hancock + Eosin

Tablo 2. Koçlara Ait Taze ve Dondurulmuş-Çözdürülmüş Spermalara İlişkin Akrozom Anormalite Oranları* (n:18)

| | EN | NE | GS | RB | HS | HE |
|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Taze Sperma | 0.99±0.06 | 0.97±0.07 | 0.94±0.07 | 0.92±0.08 | 0.97±0.08 | 0.97±0.06 |
| Çözdürülmüş Sperma | 21.3±0.61 | 22.0±0.45 | 20.6±0.39 | 21.0±0.46 | 21.7±0.51 | 21.8±0.52 |

*: Akrozom anormalite oranını tespit etmede kullanılan farklı yöntemler arasındaki istatistiki farklılık önemsizdir (p>0.05).

EN: Eosin-nigrosin, NE: Nigrosin-eosin, GS: Giemsa, RB: Rose-Bengal, HS: Hancock solusyonu, HE: Hancock + Eosin

Tablo 3. Taze Köpek Spermalarına İlişkin Akrozom Anormalite Oranlarını Tespit Etmede Kullanılan Farklı Yöntemler Arasındaki Korelasyon (n:18)

| | EN | NE | G | RB | HS |
|----|---------|---------|---------|---------|---------|
| NE | 0.86*** | | | | |
| G | 0.78** | 0.89*** | | | |
| RB | 0.83** | 0.89*** | 0.96*** | | |
| HS | 0.93*** | 0.83** | 0.81** | 0.91*** | |
| HE | 0.87*** | 0.77** | 0.85*** | 0.88*** | 0.92*** |

** : p<0.01 *** : p<0.001 EN: Eosin-nigrosin, NE: Nigrosin-eosin, GS: Giemsa, RB: Rose-Bengal, HS: Hancock solusyonu, HE: Hancock + Eosin

Tablo 4. Köpeklere Ait Dondurulmuş-Çözdürülmüş Spermalara İlişkin Akrozom Anormalite Oranlarını Tespit Etmede Kullanılan Farklı Yöntemler Arasındaki Korelasyon (n:18)

| | EN | NE | G | RB | HS |
|----|---------|---------|---------|--------|---------|
| NE | 0.88*** | | | | |
| G | 0.84*** | 0.93*** | | | |
| RB | 0.53* | 0.53* | 0.71*** | | |
| HS | 0.82*** | 0.61** | 0.74*** | 0.62** | |
| HE | 0.90*** | 0.77*** | 0.87*** | 0.64** | 0.92*** |

* : p<0.05 ** : p<0.01 *** : p<0.001 mEN: Eosin-nigrosin, NE: Nigrosin-eosin, GS: Giemsa, RB: Rose-Bengal, HS: Hancock solusyonu, HE: Hancock + Eosin

Tablo 5. Taze Koç Spermalarına İlişkin Akrozom Anormalite Oranlarını Tespit Etmede Kullanılan Farklı Yöntemler Arasındaki Korelasyon (n:18)

| | EN | NE | G | RB | HS |
|----|---------|---------|--------|---------|-------|
| NE | 0.67** | | | | |
| G | 0.51* | 0.73*** | | | |
| RB | 0.55* | 0.68** | 0.66** | | |
| HS | 0.50* | 0.58** | 0.64** | 0.64** | |
| HE | 0.73*** | 0.79*** | 0.61** | 0.74*** | 0.56* |

* : p<0.05 ** : p<0.01 *** : p<0.001 EN: Eosin-nigrosin, NE: Nigrosin-eosin, GS: Giemsa, RB: Rose-Bengal, HS: Hancock solusyonu, HE: Hancock + Eosin

Tablo 6. Koçlara Ait Dondurulmuş-Çözdürülmüş Spermalara İlişkin Akrozom Anormalite Oranlarını Tespit Etmede Kullanılan Farklı Yöntemler Arasındaki Korelasyon (n:18)

| | EN | NE | G | RB | HS |
|----|---------|---------|---------|--------|---------|
| NE | 0.94*** | | | | |
| G | 0.82*** | 0.93*** | | | |
| RB | 0.89*** | 0.75*** | 0.57* | | |
| HS | 0.76*** | 0.80*** | 0.89*** | 0.48* | |
| HE | 0.82*** | 0.92*** | 0.96*** | 0.59** | 0.85*** |

* : p<0.05 ** : p<0.01 *** : p<0.001 EN: Eosin-nigrosin, NE: Nigrosin-eosin, GS: Giemsa, RB: Rose-Bengal, HS: Hancock solusyonu, HE: Hancock + Eosin

Çalışmada köpek ve koçlarda gerek taze gerekse dondurulmuş-çözdürülmüş spermalarda morfolojik olarak akrozom anormalitesini tespit etmede kullanılan yöntemler arasında istatistiksel farklılık tespit edilemedi ($p>0.05$). Bununla birlikte çalışmada her iki tür için taze ve dondurulmuş-çözdürülmüş spermalarda kullanılan yöntemler arasında akrozom anormalite oranını tespit etme açısından pozitif yönlü önemli korelasyonlar ($p<0.05$, 0.01 ve 0.001) belirlendi.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Erkek hayvanlarda potansiyel fertilitiyi tespit etmede spermatolojik muayenelerin önemi büyüktür (23). Koyunlarda (22) ve köpeklerde (4) dondurulmuş-çözdürülmüş sperma ile yapılan tohumlamaları takiben fertilitite oranlarının düştüğü, bu düşüklüğün en önemli sebeplerinden birinin de dondurma işlemi aşamalarında akrozom bozukluklarının şekillenmesi olduğu belirtilmektedir (33). Tablo 1 ve 2'den de izlenebildiği gibi, araştırmada kullanılan köpek ve koçların taze spermalara ait belirlenen anormal akrozom oranları, çeşitli araştırmacıların köpek (10,9,36) ve koçların (25,30) taze spermalarına ait bildirdikleri değerlerine benzer bulunmuştur. Dondurulmuş-çözdürülmüş spermalara ait saptanan anormal akrozom oranları ise değişik araştırmacıların köpek (17,8,10,36) ve koç spermaları (13,29,24,25) için çözüm sonrası tespit ettikleri değerlerine yakın bulunmuştur. Yapılan araştırmada

köpek ve koçlar için, taze sperma ve dondurulmuş-çözdürülmüş spermalarda morfolojik olarak akrozom bozukluğunu belirlemede kullanılan yöntemler arasında önemli bir istatistiksel farklılık bulunamamış ($p>0.05$) (Tablo 1 ve 2), bununla birlikte boyalar arasında akrozom bozukluğu oranını tespit etme açısından ise pozitif yönlü önemli korelasyonların varlığı tespit edilmiştir ($p<0.05$, 0.01 ve 0.001) (Tablo 3,4,5 ve 6). Kullanılan bu yöntemler arasında akrozom bozukluğunu tespit etmede önemli farklılıklar bulunamamasına karşılık kullanım ve pratiklik açısından yöntemler arasında çeşitli avantaj ve dezavantajlar meydana geldiği gözlenmiştir.

Eosin-nigrosin boyasının ölü-canlı spermatozoon oranlarının saptanabilmesi amacıyla sıklıkla kullanıldığı bilinmektedir (7,11,27). Gerek köpek gerekse koç spermalarında Eosin-nigrosin boyası kullanılarak yapılan muayenelerde canlı spermatozoonların baş kısımlarının boya almamaları bir avantaj oluştururken, özellikle çözüm sonrası artan ölü oranlarına bağlı olarak ölü spermatozoonların baş kısımlarının tamamen boya alması her iki türde de akrozom muayenelerini güçleştirmektedir. Buna karşın Nigrosin-eosin boyası ile yapılan muayenelerde canlı spermatozoonların yanı sıra ölü spermatozoonların bile çok daha az eosin boyası alması nedeniyle akrozom muayenesi daha net bir şekilde yapılabilmektedir. Her iki boyama yönteminde de froti hazırlamanın kolay, süresinin kısa ve özellikle sulandırıcı ile birlikte gelen doğal ve kimyasal maddelerle boyaların tam bir karışım sağlayabil-

mesinden dolayı (homojen görünüm) net bir görüntü zemininin oluşması yapılan akrozom muayenelerini kolaylaştırmaktadır. Giemsa boyama yönteminin yaklaşık 40 dakikalık boyama süresi saha şartlarında önemli bir dezavantaj oluştururken, boyama süresinin daha kısa tutulduğu durumlarda ise akrozom muayenesi zorlaşmaktadır. Bu yöntemle her iki türe ait taze spermaların akrozom muayeneleri net bir şekilde yapılabilirken, özellikle sulandırıcı ile birlikte gelen doğal ve kimyasal maddelerle boyaların tam bir karışım sağlayamaması nedeniyle görüntü zemininde heterojen alanların oluştuğu belirlenmiştir. Buna ek olarak yine muhtemelen sulandırıcı faktörüne bağlı olarak bazı akrozomların etrafında artifaktlar oluştuğu gözlenmiş, bu da yapılan muayeneleri güçleştirmiştir. Nitekim değişik araştırmacılar (14,15) tarafından Giemsa boyasının akrozom etrafında artifakt oluşturabileceği bildirilmiştir. Papa ve ark (18), Rose-bengal boyama yönteminin boğa, koç, keçi, aygır ve köpeklerin dondurulmuş-çözdürülmüş spermalarının, Talbot ve Dudenhausen (26) ise, insan spermasının morfolojisinin değerlendirilmesinde güvenle kullanılabilirliğini saptamışlardır. Rose-bengal boyama yönteminin boyama süresi gerek eosin-nigrosin gerekse nigrosin-eosin boyama yöntemlerine göre biraz daha uzun olmasına rağmen, Giemsa boyama yöntemine göre süre oldukça kısadır. Ayrıca boyanın sulandırıcı içeriği ile homojen bir karışıma girerek görüntü zemininin net olarak gözlenebilmesi ve akrozom etrafında artifaktların meydana gelmemesi nedeniyle akrozom muayenesinin oldukça rahat yapılabilmesi önemli bir avantaj oluşturmaktadır. Kimi araştırmacılar (12,14,11,27) sıvı fikzasyon yöntemlerinin akrozom muayenesi amacıyla güvenle kullanılabilirliğini vurgulamışlardır. Ancak diğer bir araştırmacı (3) ise, taze boğa spermasından farklı olarak Hancock solusyonundaki donmuş-çözdürülmüş spermaya ait anormal akrozom oranını Spermac boyasına göre daha yüksek tespit ettiğini bildirmiştir. Yapılan araştırmada Hancock solusyonu kullanılarak yapılan muayenelerde akrozom ayrıntılı olarak değerlendirilebilmiştir. Buna ek olarak Hancock solusyonuna eosin ilavesinin görüntü zemininde meydana getirdiği pembe fon ve özellikle hücrenin materyal kısmının bulunduğu post-akrozomal bölgenin daha açık bir pembe renk almasından dolayı yalnız hancock solusyonu kullanılarak yapılan muayenelere göre daha net ve rahat bir muayene ortamı oluşturduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, köpek ve koçlara ait taze spermanın akrozom muayenelerinde araştırmada kullanılan tüm yöntemlerin güvenle kullanılabilirliği belirlendi. Dondurulmuş-çözdürülmüş spermada ise sulandırıcı faktöründen dolayı daha net bir görüntü zemininin oluşması, akrozom etrafında artifaktların meydana gelmemesi, hazırlama işleminin kolay ve kısa süreli olmasından dolayı Nigrosin-eosin, Roze-bengal ve sıvı fikzasyon yöntemlerinin laboratuvar ve saha şartlarında diğer yöntemlere göre daha iyi kullanılabilir olduğu kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

- 1.Andersen K (1975) : Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. Zuchthygiene, 10:1-4.
- 2.Blom E (1981) : Ocena morfologiczna wad plemnikow buhaja. II. Propozycja nowej klasyfikacji wad plemnikow. (Morphological evaluation of sperm abnormalities in bulls. 2.

Aproposal for a new classification of sperm abnormalities) Medycyna Weterynaryjna, 37 : 239-241.

- 3.Buttelman A (1989) : Comparative investigations on the morphological evaluation of bull semen. Thesis, Tierärztliche Hochschule Hannover, Germany.

- 4.Concannon PW (1991) : Reproduction in the Dog and Cat In "Reproduction in Domestic Animals" Ed by PT Cupps, 16: 517-554, Academic Press Inc, San Diego.

- 5.Cross NL and Meizel S (1989) : Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. Biol. Reprod., 41 : 635-641.

- 6.Dott HM and Foster GC (1972) : A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential live/dead stain. J. Reprod. Fert., 29 : 443-445.

- 7.Evans G and Maxwell WMC (1987) : Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Ed by WMC Maxwell, Butterworths, Sydney.

- 8.Ferguson JM., Renton JP., Farstad W and Douglas TA (1989) : Insemination of beagle bitches with frozen semen. J. Reprod. Fert. Suppl., 39 : 293-298.

- 9.Gökçen H., Soylu MK., Tümen H (1991) : Erkek köpeklerin kimi spermatolojik özellikleri üzerinde araştırmalar, U.Ü. Vet. Fak. Derg., 10 : 1-2-3, 67-73.

- 10.Günay Ü (1998) : Farklı sulandırıcılarla sulandırılıp dondurulan köpek spermasının spermatolojik özellikleri. Doktora tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa.

- 11.Hafez ESE (1987) : Semen Evaluation. In 'Reproduction in Farm Animals' Edited by E.S.E. Hafez, Fifth Edition, 455-481, Lea Febiger, Philadelphia.

- 12.Hancock JL (1952) : The morphology of bull spermatozoa. J. Exp. Biol., 29 : 445-453.

- 13.İleri İK (1981) : Koç spermasının dondurulması ve özellikle dondurulmadan ileri gelen akrozom bozuklukları üzerine araştırmalar. İ.Ü. Vet. Fak. Derg., 8 : 1, 79-85.

- 14.Knaus E and Shandomo MN (1977) : Preparation of pathological rabbit and boar spermatozoa. Wien. Tierärztl. Mschr., 64 (12) / 350-355.

- 15.Kovacs A and Foote RH (1992) : Viability and acrosoma staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. Biotechnic and Histochemistry, 67 (3) / 119-130.

- 16.Mayenco-Aguime AM and Perez Cortes AB (1998) : Preliminary results of hemizonassay (HZA) as a fertility for canine spermatozoa. Theriogenology, 50 : 195-204.

- 17.Oettle EE (1986) : Changes in the acrosoma morphology during cooling and freezing of dog semen. Anim. Reprod. Sci. 12 : 145-150.

- 18.Papa FO, Bicudo SD, Alvarenga MA and Meira C (1990) : Substituting bengal rose for metachrome yellow staining solution in the evaluation of sperm morphology in thawed semen. Zootecnia, 42 (5) / 455-456.

- 19.Perez LJ, Valcarcel A, Heras MA and Baldassarre H (1997) : Comparative study of four techniques for evaluation of sperm quality in ovine and bovine frozen-thawed semen. Reprod. Dom. Anim., 32 : 157-160.

- 20.Rauhaus H (1990) : Studies on the morphology and live-dead staining of spermatozoa of some species of domestic animals. Thesis, Tierärztliche Fakultät, München.

- 21.Roberts SJ (1986) : Veterinary Obstetrics and Genital Diseases. Third Edition, Ithaca, New York.

22.Salamon S and Visser D (1974) : Recent advances in the deep-freezing of ram semen. S. Afr. J. Sci., 4 : 275-288.

23.Salisbury GW, Van Demark NL and Rodge JR (1978) : Morphology and motility of spermatozoa. In 'Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle' Edited by G.W. Salisbury and W.H. Freeman, 286-328, San Francisco.

24.Sinha S, Deka BC, Tamulu MK and Borgohain BN (1992) : Effect of equilibration period and glycerol level in tris extender on quality of frozen goat semen. Indian vet. J., 69 : 1107-1119.

25.Soylu MK (1988) : Çeşitli sulandırıcılar ve yöntemler kullanılarak dondurulan koç spermalarının bazı spermatolojik özellikleri üzerinde araştırmalar. Doktora Tezi, I.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

26.Talbot P and Dudenhausen E (1981) : Factors affecting triple staining of human sperm. Stain Technol, 56 : 307-309.

27.Tekin, N (1994) : Spermanın Muayenesi ve Değerlendirilmesi. In 'Reproduksiyon Suni Tohumlama Doğum ve İnfertilite' Editör : E Alaçam, 69-81, Birinci Baskı, Dizgievi, Ankara.

28.Tekin N, İzgür H ve Özyurt M (1987) : Köpeklerde penis masajı yöntemiyle sperma alma ve başlıca spermatolojik özellikler üzerinde araştırmalar. S. Ü. Vet. Fak. Derg., 3,1 / 89-95.

29.Thomas CP, Merilan CP and Keisler DH (1991) :

The effects of filiform appendage removal on semen collection in the ram. Theriogenology, 35 : 309-315.

30.Tümen H ve Özkoca A (1994) : Çeşitli tekniklerle sulandırılıp tohumlamada kullanılan koç spermasının spermatolojik özellikleri ve döl verimi üzerinde araştırmalar. J. of Vet. and Anim. Sci, 18 : 287-291.

31.Valcarcel A, Heras M, Perez L, Moses DF and Baldassarre H (1994) : Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. Theriogenology, 41: 483-489.

32.Vazquez JM, Martinez E, Roca J, Coy P and Ruiz S (1992) : Use of triple stain technique for simultaneous assesment of vitality and acrosomal status in boar spermatozoa. Theriogenolgy, 38 : 843-852.

33.Watson PF and Martin ICA (1972) : A comparison of changes in the acrosomes of deep frozen ram and bull spermatozoa. J. Reprod. Fert., 28 : 99-101.

34.Wierzbowski S and Kareta W (1993) : An assessment of sperm motility estimation for evaluation in rams. Theriogenology, 40 : 205-209.

35.Yanagimachi R, Yanagimachi H and Rogers BJ (1976) : The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. Biol. Reprod., 15 : 471-476.

36.Yıldız C (1998) : Fruktöz, galaktoz ve glikozun köpek spermasının dondurulabilirliği üzerine etkileri. Doktora tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.