

Dondurulmuş Tavşan Spermasında Spermatozoon Separasyonu ve Dölverimi*

Ö.Orkun DEMİRAL¹, Ali DAŞKIN²

¹ Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE
² Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Ankara-TÜRKİYE

Özet: Bu çalışmanın amacı; dondurulmuş çözdürülmüş tavşan spermasında glass wool filtrasyon (GWF), swim-down (SD) yöntemleri ile glass wool filtrasyon ve swim - down yöntemlerinin kombinasyonunun (GWFSO), spermatozojik parametreler ve dölverimi üzerine olan etkilerinin araştırılmasıdır.

Dondurulmuş-çözdürülmüş tavşan spermaları 4 eşit hacme bölünmüştür. İntrauterin tohumlama (IUT) öncesi spermalardan üçüne sırasıyla GWF (Grup I), SD (Grup II) ve GWFSO (Grup III) uygulanmıştır. Dördüncü spermalar kontrol grubu olarak (Grup IV) direk IUT'da kullanılmıştır. Separasyon öncesi ve sonrası spermatozojik örnekler alınmış ve motilite, ölü/canlı spermatozoa oranı ve yoğunluk parametreleri değerlendirilmiştir.

En yüksek ortalama motilite ve en düşük ölü spermatozoa oranı SD yöntemi sonunda elde edilirken, en yüksek yoğunluklar GWF yöntemi sonunda elde edilmiştir ($P < 0,05$). Gebelik oranları kontrol grubunda, GWF, SD ve GWFSO sonunda, sırasıyla; % 70, % 50, % 70 ve % 60 olarak belirlenmiş ve aralarında önemli bir fark bulunamamıştır.

Çalışma sonunda dondurulmuş çözdürülmüş tavşan spermasına uygulanan separasyon yöntemleri arasında SD yönteminin spermatozojik parametreler açısından diğer iki yöntem (GWF ve GWFSO) göre daha etkin olduğu sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, gebelik oranları açısından separasyon yöntemleri arasında istatistiksel bir farka rastlanmaması bu konu üzerine daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Dölverimi, glass wool filtrasyon, sperma, swim-down, tavşan

Spermatozoon Separation and Fertility of Frozen- Thawed Rabbit Semen

Summary: The aim of this study was to evaluate the effect of glass wool filtration (GWF), swim - down (SD) and combination of glass wool filtration and swim - down techniques (GWFSO) on frozen - thawed rabbit semen parameters and fertility.

Frozen - thawed rabbit semen were divided into four equal aliquots. Before intrauterine insemination (IUI) 3 of 4 aliquots were processed by GWF (Group I), SD (Group II) and GWFSO (Group III) techniques. Fourth aliquots were used directly for IUI as a control group (Group IV). Semen samples were taken before and after sperm separation techniques and motility, live-dead spermatozoa ratio and concentration parameters were evaluated.

While the highest mean percentage of motility and lowest live-dead spermatozoa ratios were detected after SD technique ($P < 0,05$), the highest concentrations were obtained by GWF ($P < 0,05$). Pregnancy rates in the control group, after GWF, SD and GWFSO were detected as 70%, 50 %, 70 % and 60 % respectively ($P > 0,05$).

In conclusion; swim - down technique was found to be more effective in improving the quality of frozen thawed rabbit semen than the other two techniques (GWF and GWFSO). However there was no significant difference in the pregnancy rates between separation techniques. We have concluded that, further studies need be carried out on this subject.

Key Words: Fertility, glass wool filtration, rabbit, sperm, swim-down

Giriş

Bir çok araştırmacı ideal bir separasyon yönteminin; hızlı, ucuz, kolay yapılabilen, spermadaki motil ve olgun spermatozoonları selekte edebilen, spermada hasar ve fizyolojik bir değişikliğe sebep olmayan, ölü spermatozoonları, mikroorganizmaları, hücre

artıkları ile diğer hücreleri arındırabilen, toksik ve biyoaktif maddeleri temizleyebilen, yüksek hacimlerde spermayı işleyebilen, separe edilmiş spermanın kontrol edilebilir hacimde olmasını sağlayabilen ve seminal plazmayı spermadan uzaklaştırarak kapasite veya fertilizasyon için gerekli faktörleri ortaya çıkarabilen özelliklere sahip olması gerektiğini bildirmektedir (11,14,23,25,33).

Separasyon yöntemleri, spermanın sulandırılması ve yıkama işlemi (santrifüj, sulandırma), seçilmiş subpopülasyonların oluşturulması (density-gradient santrifüj), yapışma (cam iplikçik, cam ve

Geliş Tarihi/Submission Date : 27.10.2003

Kabul Tarihi/Accepted Date : 08.04.2004

* Bu çalışma, TÜBİTAK'ca desteklenmiş, II. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresinde tebliğ edilmiş ve aynı başlıklı doktora tezinden özetlenmiştir.

polysakkarit kolonlarından geçirme) ve self migrasyon yöntemleri (swim-up , swim-down) olarak dört ana grupta ele alınmaktadır. (26,31).

Filtrasyon yöntemleri, spermanın glass wool, glass bead veya polisakkarit (sephadex) taneciklerinden oluşan kolonlardan, uygun tekniklerle filtre edilmesidir (8,12,37). Prensip, ölü veya hasar görmüş spermatozoonların cam yüzeylere yapışma özelliği ile değişik filtre matriksleri tarafından bu tür spermatozoa geçişinin yavaşlatılması veya alıkonulması şeklinde açıklanabilir (6,21).

Self migrasyon yöntemlerinin temeli, sperma içerisinde bulunan spermatozoonların kendisine temas eden sıvılara penetre olma özelliğidir. Spermatozoon canlılığı ile yoğun sıvılardan kültür medyumlarına penetre olma özellikleri arasında pozitif bir ilişkinin olduğu da bilinmektedir (3,23,31). Self migrasyon yönteminde genel olarak swim-up (SU) ve swim-down yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler farklı kombinasyonlarda veya tek başına uygulanabilmektedir (Migrasyon-sedimentasyon, Simultane SU/SD) (2,13,32,34).

Swim-down yönteminde sperma hücreleri yerçekiminin ve motilite güçlerinin kullanılması ile yoğun sıvılar içine aşağı yönde yüzdürülmektedir (13). Bu yöntemde spermalara yıkama işlemi yapılarak veya yapılmadan; separasyon uygulanabilir. Santrifüj sayısının azaltılması separasyon yöntemlerinde elde edilecek başarıyı olumlu yönde etkilemektedir. Bu durum SD yönteminin tercih edilme sebepleri arasında gösterilmektedir (2,5,9,10,27,33,37). SD yönteminde % 5, % 10, %7,5 BSA içeren Ham's F-10, saf kan serumu, seminal plazma, follüküler sıvı, serum albumini içeren tubal sıvı ve Percoll gibi sıvılar kullanılabilir (5,13,21).

Bu çalışmada dondurulmuş çözündürülmüş tavşan spermasında GFW, SD ve GWFSFD yöntemlerinin spermatolojik parametreler ve dölverimi üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada altı ay ve üzeri yaşlı 6 adet erkek, 40 adet dişi Yeni Zellanda Beyazı ırkı tavşan kullanılmıştır. Spermalar, erkek tavşanlardan haftada iki kez suni vagen ile alınmıştır. Alınan miks ejakülatların motilite ve yoğunlukları belirlenmiştir. Daha sonra natif spermalar 0,25 ml'lik payetlerin her birinde 10 milyon motil spermatozoon olacak şekilde sulandırılarak (Vicente ve Viudes-De-Castro (36) tarif ettiği sulandırıcı ile), sıvı azot buharında dondurulmuştur.

Çalışmanın her bir uygulaması için 8-10 adet payet 37°C'de 30 saniye süre ile çözündürülmüştür. Çözürülen sperma örnekler alındıktan sonra otomatik pipet ile 0,5 ml'lik 4 eşit hacme bölünmüştür.

Birinci grup spermaya GWF, ikinci grup spermaya SD ve üçüncü grup spermaya GWFSFD uygulanmıştır. Separasyon işlemleri sonunda elde edilen spermalar, örnekler alındıktan sonra tamamı Intra Uterin Tohumlama (IUT)'da kullanılmıştır. Dördüncü grup sperma ise hiçbir separasyon işlemi yapılmadan, kontrol grubu olarak IUT'da kullanılmıştır.

Glass Wool Filtrasyon Yöntemi : Glass wool (GW) kolonlarının hazırlanması için 1ml'lik steril insülin enjektörleri kullanılmıştır. Steril 15 mg GW enjektör tabanından 3 mm yükseklikte olacak şekilde yerleştirilmiştir. Kolonlar 3mg/ml bovine serum albumin (BSA) içeren Ham's F-10 medyumunu ile en az iki kez yıkamıştır.

Spermalar 1/1 oranında 3mg/ml BSA içeren Ham's F-10 ile sulandırılarak 1600 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda üst süpernatant atıldıktan sonra sperma peleti tekrar 0,5 ml 3mg/ml BSA içeren Ham's F-10 ile sulandırılmıştır. Sulandırılan spermalar ıslak kolonların üzerine bırakılmıştır. Kolonlar 45°'lik eğim verilerek filtrasyon işleminin tamamlanmasına kadar 37 C°'lik % 5 CO₂ 'li inkübatörde bekletilmiştir. Filtrasyon işlemi tamamlandıktan sonra tüpler inkübatörden alınmış, 0,2 ml 3mg/ml BSA içeren Ham's F-10 ilave edilerek kolonlar yıkanmış ve elde edilen filtratlar numuneler alındıktan sonra IUT'da kullanılmıştır.

Swim - down Yöntemi : Dondurulmuş çözündürülmüş spermalara SD yönteminin uygulanması için, 0,5 ml sperma 1 ml serum fizyolojik ile sulandırılmış ve oda ısısında 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra üst süpernatant başka bir deney tüpüne aktarılmış, deney tüpüne 45 derecelik açı verilerek spermanın altına 1 ml inaktive edilmiş saf tavşan kan serumu (STKS) verilmiştir. Tüp aynı açı ile inkübatöre (37°C, %5 CO₂) konularak spermatozoanın STKS'na penetrasyonu için 5 dakika süre ile bekletilmiştir. Bekleme sonunda serum spermatolojik örnekler alındıktan sonra IUT kullanılmıştır.

Glass wool filtrasyon ve Swim - down yöntemlerinin birlikte uygulanması : Dondurulmuş çözündürülmüş spermalara yukarıda anlatıldığı şekilde GWF yöntemi uygulandıktan sonra elde edilen filtrata yine yukarıda anlatıldığı şekilde, SD işlemi uygulanmıştır. Spermatolojik incelemeler amacıyla örnekler alındıktan sonra IUT işlemi gerçekleştirilmiştir.

Dişi tavşanların tohumlanması : Çalışmada her bir deneme grubu için 10 adet dişi tavşana IUT yapılmıştır. Kontrol grubu olarak hiçbir separasyon yöntemi uygulanmamış dondurulmuş-çözdürülmüş spermalarla IUT yapılmıştır. Tohumlamalardan beş saat önce dişi tavşanlara kas içi yolla 0,3mg GnRH enjeksiyonu yapılmıştır. Tohumlamalar yapıldıktan 15 gün sonra abdominal palpasyonla gebelik teşhisi yapılmış ve kaydedilmiştir.

İstatistiksel analiz : Değişkenler ortalama ve standart sapma değerleri kullanılarak karşılaştırılmıştır. Gruplar arasında farklılığın ortaya konması için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Analiz sonucunda anlamlı farklılık bulunduğu, farklılığı yaratan grupları belirlemek için DUNCAN ikili karşılaştırma testi yapılmıştır.

Gebelik oranlarının karşılaştırılmasında Pearson Khi Kare testi kullanılmıştır.

Bulgular

Yapılan çalışmada çözüm sonu ortalama motilite oranı, ölü spermatozoa oranı ve yoğunluk parametreleri sırasıyla % 36,0 ± 9,6, % 53,9 ± 9,8 ve 48,0 ± 5,8 x 10⁶/ml.olan spermalardan GWF yöntemi sonunda sırasıyla % 49,0 ± 9,9, % 43,8 ± 9,7 ve 26,4 ± 8,4 x 10⁶/ml, SD yöntemi sonunda sırasıyla % 64,5 ± 8,6, % 29,9 ± 9,2 ve 14,0 ± 8,4 x 10⁶/ml ve GWFSO sonunda ise % 53,5 ± 9,4, % 41,6 ± 7,6 ve 12,4 ± 5,8 x 10⁶/ml değerleri elde edilmiştir. Spermatozoa özellikleri gruplara göre önemli farklılıklar göstermiştir (Tablo1).

Separasyon sonunda yapılan IUT' lardan elde edilen gebelik oranları tablo 2 'de özetlenmiştir. Yapılan çalışmada elde edilen gebelik oranları arasında istatistiki bir farka rastlanmamıştır

Tablo 1. Separasyon öncesi ve sonrası elde edilen spermatozoa parametreleri.

SPERMATOZOLOJİK PARAMETRELER	ÇÖZÜM SONU Grup IV	GWF SONU Grup I	SD SONU Grup II	GWFSO SONU Grup III	n	F	P
Motilite (%)	36,0 ± 9,6 ^c	49,0 ± 9,9 ^b	64,5 ± 8,6 ^a	53,5 ± 9,4 ^b	10	15,6	P < 0,05
Ölü spermatozoa oranı (%)	53,9 ± 9,8 ^a	43,8 ± 9,7 ^b	29,9 ± 9,2 ^c	41,6 ± 7,6 ^b	10	50,6	P < 0,05
Yoğunluk (10 ⁶ /ml)	48,0 ± 5,8 ^a	26,4 ± 8,4 ^b	14,0 ± 8,4 ^c	12,4 ± 5,8 ^c	10	11,5	P < 0,05

^{abc} aynı satırda farklı harf taşıyan spermatozoa özellikleri arasındaki fark önemlidir.

Tablo 2. Separasyon yapılan spermalarla tohumlanan tavşanlardan elde edilen döl verimi

Grup No	Gebelik Oranları (%)	n
I (GWF)	50	10
II (Swim Down)	70	10
III (GWFSO)	60	10
IV (Kontrol)	70	10

$\chi^2 = 1.17, P = 0,76 (P > 0,05)$

Tartışma ve Sonuç

Çalışmada çözdürülmüş tavşan spermalarında swim-down ve glass wool filtrasyon yöntemi başarı ile uygulanabileceği saptanmıştır. Raymond ve ark. (28) insan spermasında uyguladıkları SD sonunda ortalama % 28 motilite artışı elde ettiklerini bildirirken, yine insan spermasına SD yöntemi uygulayan Kobayashi ve ark. (21) ise uyguladıkları farklı bir SD yöntemi ile % 50 oranında motilite artışı elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen motilite artışı Raymond ve ark.'nın elde ettikleri motilite artışı ile uyum içerisindeyken Kobayashi ve ark.'nın bildirdiklerinden daha düşüktür. Gonzales ve ark. (13) ise penetrasyon medyumunu olarak serumu kullanarak yaptıkları SD yönteminde % 25 motilite artışı sağladıklarını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada separasyon sonrası tüm gruplarda motilite artışları kaydedilmiş, en yüksek motilite değeri SD grubunda saptanmıştır ($P < 0,05$).

Motilite değerlerinde olduğu gibi araştırmacılar; separasyon öncesi ve sonrası sperma yoğunluklarında meydana gelen azalmalarda da farklı sonuçlar bildirilmektedir. Çalışma sonunda sperma yoğunluklarında meydana gelen azalma oranları Kobayashi ve ark.'nın (21) bildirdikleri değerler ile uyum içerisindeyken Gonzales ve Pella'nın (13) bulguları ile uyumsuzluk göstermektedir.

Araştırmacıların aynı türün sperması ile çalışmalarına rağmen farklı spermatolojik değerler bildirdikleri göz önünde bulundurulursa, bu çalışma sonunda elde edilen değerler arasındaki bazı uyumsuzlukların uygulanan tekniklerden ve tür farklılıklarından kaynaklanmış olabileceği ifade edilebilir.

Glass wool filtrasyon yönteminin uygulanmasında farklı özelliklerde dizayn edilmiş GW filtreleri kullanılmaktadır (1,18,22,29). Bu çalışmada ise 1ml'lik enjektör içerisine tabandan 3mm yükseklikte olacak şekilde 15 mg GW yerleştirilmiş filtreler kullanılmıştır. Araştırmacılar GWF yöntemi sonunda, separasyon işlemi öncesi ve sonrası spermanın durumuna, türüne ve kalitesine göre farklı motilite, ölü spermatozoa oranı ve yoğunluk değerleri bildirmektedirler (7,12,16,33).

Çalışmada çözdürülmüş tavşan spermalarına uygulanan GWF yöntemi sonunda ortalama % 13,03 oranında motilite artışı elde edilmiştir. Elde edilen ortalama motilite oranındaki artış, kimi araştırmacıların farklı tür spermalarında ve filtrelerle elde ettikleri ile uyum içerisindeyken (4,12,26,33); kimi araştırmacıların elde ettikleri değerlerden daha düşük (1,17,29), kimilerinin bildirdiği sonuçlardan ise daha yüksek

olduğu görülmüştür (22). Yoğunluk olarak GWF işlemi öncesi $48 \pm 5,8 \times 10^6$ /ml olan spermalarından filtrasyon sonunda $26,4 \pm 8,4 \times 10^6$ /ml yoğunlukta spermalar elde edilmiştir. Bu azalma oranı bazı yazarların farklı tür, filtre ve kalitedeki spermalara uyguladıkları GWF işlemi sonunda elde ettikleri azalma ile uyum içerisindeyken (12,16,29) kimi araştırmacıların bildirdikleri değerlerden daha yüksektir (4,33). Bu çalışmada elde edilen dondurulmuş-çözdürülmüş tavşan spermalarının GWF yöntemi ile separe edilmesi sonunda elde edilen ortalama ölü spermatozoa oranındaki iyileşme kimi araştırmacıların farklı tür spermalarda bildirdikleri değerlerle uyum içerisindeyken (22).

Elde edilen sonuçlar arasındaki uyumsuzlukların, GWF esnasında kullanılan spermanın durumu, kalitesi, filtrasyon tekniği ve kullanılan filtrelerin farklı dizayn edilmiş olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Araştırmacılar separasyon yöntemlerinin etkinliklerinin karşılaştırılması açısından yaptıkları çalışmalar sonunda farklı görüşler bildirmişlerdir. Johnson ve ark. (18) yaptıkları bir çalışmada GWF yöntemini yapısı bozulmamış spermatozoa değeri olarak mini Percoll gradient yöntemine göre daha üstün bulduklarını bildirmişlerdir. Buna benzer şekilde Larson ve ark. (22) density gradient yöntemini GWF yöntemine göre motil spermatozoa, normal morfolojik yapıdaki spermatozoa oranı ve olgun spermatozoa oranı olarak daha üstün bulmalarına rağmen kromatin bütünlüğü açısından GWF yöntemini daha iyi bulduklarını bildirmişlerdir. Rhemrew ve ark. (29) ise GWF yöntemi ve 2 katlı devamlı olmayan Percoll gradient santrifüj yöntemini karşılaştırdıkları bir çalışmada asthenozoospermik spermalarda GWF yönteminin daha uygun olduğunu bildirmişlerdir.

Almagor ve ark. (2) swim up ve swim down yöntemlerinin kombinasyonu ile yaptıkları bir çalışmada swim-down yöntemini morfolojik olarak daha üstün olduğunu bildirmişlerdir. Carrell ve ark. (5) ise swim-up yöntemini swim-down yöntemine göre gebelik oranları açısından daha iyi bulduklarını bildirmişlerdir. Araştırmacıların bu yöntemlerin karşılaştırmasında farklı görüş bildirmelerinin uygulanan yöntemlerde kullanılan farklı tekniklerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Self migrasyon ve filtrasyon yöntemlerinin karşılaştırılmasının yapıldığı bazı çalışmalarda elde edilen değerler ile bu çalışmada tavşan spermasından elde edilen değerler arasında bir uyum olduğu düşünülmektedir (7).

Ayrıca kimi araştırmacılar farklı sperma separasyon yöntemleri uyguladıkları spermalar ile yaptıkları dölleme çalışmaları sonunda elde ettikleri fertilizasyon, embriyonik gelişim ve gebelik sonuçları arasında istatistiki farka rastlamadıklarını bildirmişlerdir (15,16, 30). Bu çalışma sonunda elde edilen gebelik oranları arasında da istatistiki bir farka rastlanmamış olması nedeniyle çalışmalar arasında bir uyum olduğu düşünülmektedir. Ancak Katayama ve ark. (19) yaptıkları bir çalışmada self migrasyon yöntemlerinden SU ve GWF yöntemleri ile sperma separasyonu sonunda elde ettikleri in vitro fertilizasyon kapasitesi olarak GWF yönteminin daha iyi sonuç verdiğini ve istatistiki olarak da fark elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Çalışmada olarak dondurulmuş-çözdürülmüş tavşan spermalarında SD, GWF ve GWFSD yöntemlerinin başarıyla uygulanabileceği ve SD yönteminin daha iyi sonuçlar verdiği bulunmuş, separasyon sonrası daha fazla sayıda potansiyel fertiliteye sahip spermatozoon elde edilmesine yönelik farklı kombinasyonların ve yeni yöntemlerin denendiği yeni araştırmalara ihtiyaç olduğu ve böylece daha fazla dölverimi alınabileceği sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

1. Al-Hasani S, Alpüstün S, Ludwig M, Diedrich K, Bauer O, Küpker W, Wolff A, Krebs D, 1996. The combination of two semen preparation techniques (glass wool filtration and swim-up) and their effect on the morphology of recovered spermatozoa and outcome of İVF – ET. *Int J Androl.*, 19 : 55 – 60.
2. Almagor M, Benbenishti D, Rosenak D, Mogle Y, Yaffe H, 1993. Simultaneous swim-up, swim-down of sperm in assisted reproduction procedures. *J Assist Reprod Genet.*, 10 : 261 – 265.
3. Babbo CJ, Hecht MD, Jeyendran RS, 1999. Increased recovery of swim-up spermatozoa by application of ‘antigravitational’ centrifugation. *Fertil Steril.*, 72: 556–558.
4. Baguhl VF, Flieb R, Bernt D, 1989. Effekt der glaswollfiltration auf humane spermatozoen ein vergleich mit der swim up technik. *Zentb Gynakol.*, 111: 1613–1616.
5. Carell DT, Kuneck PH, Peterson M, Hatasaka HH, Jones KP, Campbell BF, 1998. A randomized, prospective analysis of sperm preparation techniques before intrauterine insemination of husband sperm. *Fertil Steril.*, 69: 122 - 126.
6. Chapeau C, Gagnon C, 1987. Nitrosellulose and polyvinyl coatings prevent sperm adhesion to glass without affecting the motility of intact and demembrated human spermatozoa. *J Androl.*, 8: 34 – 40.
7. Coetzee K, Erasmus EL, Kruger TF, Menkveld R, Lombard CJ, 1994. Glass wool filter preparation of cryopreserved spermatozoa. *Andrologia*, 26 : 33 – 34.
8. Daya S, Awatkin BL, 1987. Improvement in semen quality using glass bead column. *Arch Androl.*, 18 : 241 – 244.
9. Dickey R, Pyrzak R, Taylor S, Rye PH, Lu PY, Belinda SM, K, 2001. Decision to do IUI or İVF sperm count? *Fertil Steril.*, 76 : 1086.
10. Dickey RP, Pyrzak R, Lu P, Taylor S, Rye P, 1999. Comprasion of the sperm quality necessary for successful intrauterine insamination with world health orgnization threshold values for normal sperm. *Fertil Steril.*, 71 : 684 - 689.
11. Drobniş EZ, Zhong CQ, Overstreet JW, 1991. Seperation of cryopreserved human semen using sephadex columns, washing, or percoll gradients. *J Androl.*, 12 (3): 201–208.
12. Engel S, Weber H, Petzoldt R, Seidl B, Wieher W, Sperl J, 2001. An improved method of sperm selection by glass wool filtrasyon. *Andrologia.*, 33 : 223 – 230.
13. Gonzales GF, Pella RE, 1993. Swim-down: A rapid and easy method to select motile spermatozoa. *Arch Androl.*, 30 : 29 – 34.
14. Hall JA, Fishel SB, Timson JA, Dowell K, Klemtzeris LD, 1995. Human sperm morphology evaluation pre-and post-Percoll gradient centrifugation. *Hum Reprod.*, 10 (2) : 342 – 346.
15. Hammadeh, ME, Kuhnel, A, Stieber, M, Rosenbaum, P, Schmidt W, 1998. Chromation condensation and morphology recovery rate after sperm selection with Swim – up, percoll and glass wool techniques and their influence on ivf outcome. *Fertil Steril.*, 70 (2S) : 492.
16. 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 fertilizasyon embryo transfer. *Int J Androl.*, 24 : 360 – 368.
17. Jeyendran RS, Perez M, Crabo BG, 1986. Concentration of viable spermatozoa for artificial insemination. *Fertil Steril.*, 45 : 132 - 134.
 18. Johnson DE, Confino E, Jeyendran RS, 1996. Glass wool column filtration versus mini - percoll gradient for processing poor quality semen samples. *Fertil Steril.*, 66 : 459 - 462.
 19. Katayama KP, Stehlig E, Jeyendran RS, 1989. In vitro fertilization outcome : glass wool - filtered sperm versus swim - up sperm. *Fertil Steril.*, 52 : 670 - 672.
 20. Katila, T, 2001 In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen : arewiev. *Actavet. Scand.* 42 : 199 – 217.
 21. Kobayaski T, Kaneko S, Hara I, Aoki R, Ohno T, Nozawa S, 1991. Swim- down separation of progressively motile sperm from poor quality human semen by the modified funnel procedure. *Andrologia*, 23 : 17 –20.
 22. Larson KL, Brannian JD, Timm BK, Lost LK, Evenson DP, 1999. Density gradient centrifugation and glass wool filtration of semen remove spermatozoa with damaged chromatin structure. *Hum Reprod.*, 14(8): 2015 –2019.
 23. Levay PF, Fourie R, Bezuidenhout C, Koch A, 1995. Effectiveness of various sperm processing methods in removing seminal plasma from insemination media. *Human Reprod.*, 10 : 2056 – 2060.
 24. Makler A, Stoller J, Blumenfeld Z, Feigin PD, Brandes JM, 1993. Investigation in real time of the effect of gravitation on human spermatozoa and their tendency to swim-up and swim-down. *Int. J. Androl.*, 16 : 251 - 257.
 25. Makler A, Stoller J, Makler – Shiran E, 1998. Dynamic aspects concerned with the mechanism of separating motile sperm from nonmotile sperm, leukocytes, and debris with the use of high density percoll gradients. *Fertil Steril.*, 70 : 961 - 966.
 26. Pereira RJTA, Tuli RK, Wallenhorst S, Holtz WK, 2000. The effect of heparin, caffeine and calcium ionophore a 23187 on in vitro induction of the acrosome reaction in frozen-thawed bovine and caprine spermatozoa. *Theriogenology*, 54 : 185 - 192.
 27. Pyrzak R, Dickey RP, Taylor DN, Curole DN, Rye PH, Potts AS, 2001 Effectiveness of swim-down sperm preparation on the pregnancy outcome of intra uterine insemination and art procedures. Erişim: <http://www.google.com>.
 28. Raymond MY, Li DQ, Harding AM, Hons B, Jones WR. 1991. A comparison of swim-down and swim-up methods for the extraction of high motility sperm. *Fertil Steril.*, 55 : 817 - 819.
 29. Rhemrev J, Jeyendran RS, Vermeidan JPW, Zanaveld LJD, 1989. Human sperm selection by glass wool filtration and two - layer, discontinuous percoll gradient centrifugation. *Fertil Steril.*, 51 : 685 - 690.
 30. Rho GJ, 1998. Effect of sperm preparation technique on subsequent in vitro development of bovine embryos. *J Emb Trans.*, 13(2) : 117 - 125.
 31. Rodriguez - Martinez H, Larsson B, Pertoft H, 1997. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean - up. *Reprod Fertil Dev.*, 9: 297 - 308.
 32. Sanchez R, Stalf T, Khanaga O, Turley H, Gips H, Schill W, 1996. Sperm selection methods for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in andrological patients. *J Assist Reprod Genet.*, 13 : 228 - 233.
 33. Sherman JK, Paulson JD, Liu KC, 1981. Effect of glass wool filtration on ultrastructure of human spermatozoa. *Fertil Steril.*, 36 (5) : 643 - 647.
 34. Szerman-Joly E, Sauvalle A, Izard J, Drossowsky M, 1989. Comparison of two techniques used to collect normal and motile sperm. *Int J Androl.*, 12 : 199 - 205.
 35. Valcarcel A, De Las Heras MA, Moses DF, Perez LJ, Baldassarre H, 1996. Comparison between Sephadex G - 10 and Percoll for preparation of normospermic, asthenozoo spermic and frozen / thawed ram semen. *Anim Reprod Sci.*, 41 : 215 - 224.

36. Vicente JS, Viudes-De-Castro, M.P, 1996. A sucrose-DMSO extender for freezing rabbit semen. *Reprod. Nutr. Dev.*, 36: 485 - 492.
37. Vijayakumar R, Ndubisi B, Prien S, Leon F, Heine, Wayne, 1986. Quantitative ultramorphological evaluation of swim-up spermatozoa used in human in vitro fertilization and transcervical intrauterine insemination. *Arch Androl.*, 17 : 223 - 230.

Yazışma Adresleri:

Ö. Orkun DEMİRAL
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı
Kocasinan / KAYSERİ
Tel : 0 352 330006
E-mail : odemral@erciyes.edu.tr