

PAPER DETAILS

TITLE: Dondurulmus - Çözdürülmüs Köpek Spermasinin Boyama ve Fikzasyon Islemlerinden Sonra Degerlendirilmesi (The Evaluation of Frozen - Thawed Dog Semen After Staining and Fixation)

AUTHORS:

PAGES: 0-0

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/144534>

Dondurulmuş-Çözündürülmüş Köpek Spermasının Boyama ve Fikzasyon İşlemlerinden Sonra Değerlendirilmesi

Ülgen GÜNAY* Zekariya NUR** M. Kemal SOYLU***

Geliş Tarihi: 04.04.2003

Kabul Tarihi: 10.06.2003

Özet: Bu çalışmada dondurulmuş-çözündürülmüş köpek spermasındaki morfolojik bozuklukların saptanmasında iki farklı boyama yöntemi ve bir sıvı-fikzatif solusyonun etkileri ve bu yöntemlerin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bulgular incelendiğinde boyama grupları ve fikzatif solusyon arasında akrozomal ve toplam morfolojik bozukluklar arasında istatistiksel fark saptanmamıştır. Sonuç olarak morfolojik bozuklukların belirlenmesinde Hancock solusyonu yanında diğer boyama yöntemlerinin de kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Köpek, çözündürülmüş sperma, boyama yöntemleri.

The Evaluation of Frozen-Thawed Dog Semen After Staining and Fixation

Summary: In this study, it is aimed to detect the effects of the various staining methods and a fixative solution on morphological defects in frozen-thawed dog semen. Analyses of the data showed that there were no significant differences ($P>0.05$) between the fixation and staining groups for acrosomal and total morphological defects. In conclusion, in addition to Hancock's solution, different staining methods can be used to detect morphological defects on frozen-thawed dog semen.

Key Words: Dog, thawing semen, staining procedure.

Giriş

Evcil hayvanlarda spermatolojik özellikler potansiyel fertilitenin belirlenmesinde önemli bir kriterdir. Köpeklerde fertilitayı etkileyen pek çok faktör vardır. Ancak erkek köpeklerde başlıca faktör testiste üretilip ejaküle edilen spermatozoa olup, sağlam spermatozoa morfolojisi ile fertilita arasında pozitif bir korelasyon bulunmaktadır¹⁵.

Erkek köpekte fertilizasyon yeteneğinin belirlenmesi spermatozoit konsantrasyonu, motilite ve morfoloji gibi rutin sperma analizlerine bağlıdır. Bu analizler spermanın potansiyel fertilitasını ve erkek köpekte spermatogenezisin durumu hakkında bilgi sağlarlar^{1,5,25}. Bu nedenle spermatozoitlerin mikroskopik bakıda morfolojik değeri-

lendirilmesi önemlidir ve spermatolojik muayene sun'i tohumlama çalışmalarında esastır¹³. Morfolojik değerlendirmenin başlıca amacı normal ve anormal spermatozoitlerin ayırt edilmesidir²⁴. Çünkü anormal yapıdaki spermatozoitlerin fertilita yetenekleri yoktur. Sağlıklı spermada her zaman morfolojik bozukluğa sahip hücreler bulunabilmesine karşın bu oran %20'yi geçmemelidir^{12,13}. Feldman ve Nelson⁸ ile Meyers-Wallen¹⁶, köpeklerde primer anomalilerin %10'dan, sekonder anomalilerin ise %20'den fazla olmaması gerektiğini ve yüksek orandaki sekonder anomalilerin epididimal hastalıklardan veya spermanın toplanması ve işlenmesi sırasında oluştuğunu belirtmişlerdir. Ayrıca köpeklerde çift baş ve çift kuyruk anomalilerinin diğer evcil memelilerden daha fazla oranda gözlemlendiği belirtilmektedir²⁶.

* Yard.Doç.Dr.; U.Ü. Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Bursa-TÜRKİYE.

** Araş.Gör.Dr.; U.Ü. Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Bursa-TÜRKİYE.

*** Prof.Dr.; U.Ü. Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Bursa-TÜRKİYE.

Akrozomal bütünlüğün fertilizasyonda temel olduğu^{14,22} ve köpeklerde dondurma ve çözüm sonrasında önemli ölçüde düştüğü ifade edilmiştir^{9,18}. Erkek köpeklerde fertilitenin değerlendirilmesinde morfolojinin en iyi kriter olduğunu bildiren araştırmacılar da bulunmaktadır^{4,19}. Köpek spermasındaki morfolojik bozuklukların saptanması amacıyla eosin-nigrosin^{8,20,30}, nigrosin-eosin^{6,23,27,31}, opal blue³⁰, fast green^{19,30}, giemsa^{8,12,13,20} gibi boyama yöntemleri dışında sıvı fizkasyon yöntemlerinin de kullanılabileceği bildirilmektedir^{12,13,21}. Çeşitli araştırmacılar tarafından sıvı fizkasyon yöntemlerinin de köpeklerde akrozomal bütünlük ve dejenerasyonların saptanmasında kullanılabileceği vurgulanmaktadır^{12,22,30}. Tespit solusyonlarını pH, ısı, boyama süresi gibi faktörler etkileyebilmekte ve buna bağlı olarak sonuçlar arasında varyasyonlar oluşabilmektedir¹². Yıldız ve ark.³⁴, dondurulmuş-çözündürülmüş köpek spermasında sulandırıcı faktöründen dolayı daha net bir görüntü zemininin oluştuğunu, akrozom etrafında artefaktların meydana gelmediğini ve hazırlama işleminin kolay ve kısa süreli olmasından dolayı nigrosin-eosin, rose-bengal ve sıvı fizkasyon yöntemlerinin laboratuvar ve saha şartlarında elverişli olarak kullanılabileceğini vurgulamışlardır. Araştırmacılar^{26,28,33}, dondurulmuş-çözündürülmüş köpek spermasının morfolojik muayenesinde eosin-nigrosin boyama yönteminin ölü-canlı spermatozoit oranını saptamada güvenilir bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Wong ve Dhaliwal³³, eosin-nigrosin boyasının akrozomal bütünlüğü değerlendirmede yeterli boyama sağlayamadığını vurgulamışlardır. Bu çalışmada köpek sperması 2 farklı sulandırıcıda dondurulmuş, çözünme sonrası morfolojik incelemelerde iki boyama ve bir sıvı fizkasyon yönteminin karşılaştırılması ve bu özelliklerin sulandırıcılara göre değişip değişmediğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada toplam 2 adet Alman Çoban Köpeği materyal olarak kullanıldı. Sperma iki günde bir olmak üzere toplam 5 kez, önünde kızgın bir dişi bulundurulmuş köpeklerden penis masajı yöntemiyle alındı. Ejakulatın sadece spermatozoitlerden zengin olan ikinci fraksiyonu renk ve kıvam değişiklikleri gözlenip diğer fraksiyonlardan ayrılarak değerlendirmeye alındı ve spermatolojik özellikleri incelendi. Spermatolojik muayeneler sonucunda motilitesi %80'in üzerinde olan ve morfolojik bozukluk oranı %20'yi

geçmeyen sperma örnekleri Tris-yumurta sarısı (T-YS) ve Sodyum sitrat yumurta sarısı (SS-YS) sulandırıcıları ile sonuçta %4 gliserol içerecek şekilde sulandırılarak 0.5 ml.lik payetlerde donduruldular. Her bir grup için toplam 28 adet payet 37°C'lik su banyosunda 30 sn'de çözündürüldü.

Çözüm sonrası morfolojik bozukluk oranlarını saptamak için Eosin-nigrosin ve Giemsa boyama yöntemleri ile Hancock sıvı fizkasyon yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı. Eosin-nigrosin¹³ ve Giemsa¹² boyama teknikleri ile frotiler hazırlandı. Hancock solüsyonu¹³ hazırlanarak eppendorf tüpleri içerisine 0.5 ml. alındı ve solüsyon ile tespit edilen spermadan bir damla alınıp lama damlatılarak üzerine lamel kapatıldı ve sonra faz kontrast mikroskopun immersiye objektifi ile (x100) morfolojik incelemeler gerçekleştirildi. Morfolojik bozukluklar akrozoma ait bozukluklar, diğer morfolojik bozukluklar (DMB) ve toplam morfolojik bozukluklar (TMB) olarak üç kısımda incelendi. Her preparat için toplam 200 spermatozoit sayılarak yüzde oranları kaydedildi. Sunulan araştırmada farklı yöntemlerle boyama sonrası saptanan bulguların (Tablo I ve III) istatistiksel değerlendirmesinde Varyans Analizi (ANOVA) General Linear Model kullanıldı (SPSS for Windows 10.0). Farklı yöntemlerle boyama sonrası sulandırıcı çeşidine göre saptanan bulguların (Tablo II) istatistiksel değerlendirilmesinde ise Simple-T Testi kullanıldı.

Bulgular

Sunulan çalışmadan elde edilen bulgular Tablo I ve Tablo II.'de sunulmuştur.

Tablo I. Farklı Yöntemlerle Boyama Sonrası ve Sulandırıcı Çeşidine Göre Saptanan Morfolojik Bozukluk Oranları

Sulandırıcı	n	Morfolojik Bozukluk Oranı (%)	Boyama Yöntemi		
			Eosin-nigrosin	Giemsa	Hancock
Tris	28	Akrozomal	20.73±6.1	17.4±4.0	20.0±4.2
		DMB	8.47±4.0 ^b	9.77±4.1 ^{ab}	10.8±3.0 ^a
		TMB	29.2±7.6	27.16±5.5	30.8±5.2
Sodyum sitrat	28	Akrozomal	19.62±3.4	21.0±2.9	20.8±3.7
		DMB	9.23±2.6 ^b	11.89±3.7 ^a	11.42±3.3 ^a
		TMB	28.8±4.6	32.89±4.8	32.27±6.0
Toplam	56	Akrozomal	20.21±5.1 ^a	19.07±4.0 ^a	20.3±3.9 ^a
		DMB	8.82±3.4 ^b	10.75±4.0 ^{ab}	11.09±3.1 ^a
		TMB	29.04± 6.3 ^a	29.82±5.9 ^a	31.48±5.6 ^a

^{a,b} Aynı satırda ortak harf taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0.05)

DMB: Diğer morfolojik bozukluk oranı

TMB: Toplam morfolojik bozukluk oranı

Tablo II. Farklı Boyama Yöntemleri Sonrası Saptanan Morfolojik Bozukluk Oranları Arasındaki Varyans Analiz Tablosu (ANOVA)

Faktörler	Akrozom	DMB	TMB
Sulandırıcılar	1.437	0.652	2.187
Boyama yöntemleri	2.301	3.412*	0.383
Boyama yöntemleri-sulandırıcılar	6.234	1.349	2.048

* P<0.05

DMB: Diğer morfolojik bozukluk oranı

TMB: Toplam morfolojik bozukluk oranı

Tartışma ve Sonuç

Sunulan araştırmada çözüm sonrası elde edilen değerlerin genel olarak birçok araştırmacının elde ettiği değerlerle benzerlik gösterdiği saptanmıştır^{7,10,29,35}. Dondurulmuş-çözündürülmüş sperma örneklerinde kullanılan farklı boyama yöntemleri karşılaştırıldığında akrozomal bozukluk oranları ve toplam morfolojik bozukluk oranları arasında istatistiksel olarak fark saptanmamış (P>0.05), diğer morfolojik bozukluk oranları incelendiğinde ise Eosin-nigrosin ile Hancock arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur (P<0.05) (Tablo I). T-YS ve SS-YS sulandırıcılarının boyama yöntemleri üzerine bir etkisi saptanmamıştır. Ancak T-YS sulandırıcısındaki diğer morfolojik bozukluk oranları incelendiğinde Eosin-nigrosin ile Hancock arasında, SS-YS sulandırıcısındaki diğer morfolojik bozukluk oranları incelendiğinde ise Eosin-nigrosin ile diğer yöntemler arasında istatistiksel olarak fark saptanmıştır (P<0.05) (Tablo I)..

Varyans Analiz Tablosu (Tablo II) incelendiğinde ise sadece boyama yöntemleri arasında diğer morfolojik bozukluklar açısından istatistiksel olarak fark saptanmış (P<0.05), sulandırıcılar ve boyama yöntemleri ile sulandırıcılar arasında istatistiksel fark bulunmamıştır.

Ataman ve ark.², köpeklerde taze ve dondurulmuş spermada anormal spermatozoit tiplerini saptamak amacıyla 4 farklı boyama yöntemi kullanmışlardır. Araştırmacılar Tris sulandırıcısı ile dondurulmuş spermada Hancock ve Eosin-nigrosin boyama sonrasında akrozomal, baş, orta, kuyruk ve toplam anormal spermatozoit oranlarını sırasıyla %14.1±0.61, %4.9±0.48, %10.6±1.29, %11.4±1.16, %40.9±2.66; %13.4±0.50, %4.1±0.32, %10.7±1.23, %11.2±1.10 ve %39.3±2.66 olarak bulduklarını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada Hancock ve Eosin-nigrosin

boyama yöntemlerinde hem Tris ve sodyum sitrat sulandırıcılarından, hem de sulandırıcılar göz önünde bulundurulmadan boyama yöntemlerinden elde edilen (Tablo I) akrozomal bozukluk oranları Ataman ve ark.'nın² değerleri ile karşılaştırıldığında yüksek, diğer morfolojik ve toplam morfolojik bozukluk oranları ise düşük bulunmuştur.

Yıldız ve ark.³⁴, köpek ve koçlarda taze spermadaki ve Tris-fruktoz sulandırıcısı ile dondurdıkları sperma örneklerindeki akrozomal bozukluk oranlarını saptamak için 6 farklı boyama yöntemini denemişler, köpeklere ait çözüm sonrası akrozomal bozukluk oranlarını Eosin-nigrosin'de %36.4±0.55, Hancock'ta %36.3±0.42, Giemsa'da ise %35.9±0.50 olarak saptamışlardır. Sunulan araştırmada farklı yöntemlerle boyama sonrası saptanan akrozomal bozukluk oranları Yıldız ve ark.'nın³⁴ bulgularından daha düşük bulunmuştur. Ayrıca Tris ve sodyum sitrat sulandırıcılarından elde edilen akrozomal bozukluk oranları da anılan değerlerden düşük saptanmıştır. Bulgular arasındaki farklılıkların kullanılan köpek ırklarının farklı oluşundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Hafez¹², tespit solüsyonlarını pH, ısı, boyama süresi gibi faktörlerin etkileyebileceğini ve bu duruma bağlı olarak ta morfolojik muayenelerde sonuçlar arasında farklılıkların oluşabileceğini vurgulamaktadır.

Köpek spermasını pellet yöntemine göre %4 ve %8 gliserol içeren sütlü sulandırıcı ve Tris sulandırıcısıyla donduran Baran³, sperma örneklerinin morfolojik değerlendirmesinde Hancock solüsyonunu kullanmıştır. Araştırmacı akrozom, baş, orta, kuyruk, ve toplam morfolojik bozukluk oranlarını %4 ve %8 gliserol içeren Tris sulandırıcısında sırasıyla %33.62±12.86, %4.68±3.79, %1.39±1.99, %4.33±3.31, %44.03±12.51; %55.23±15.51, %4.69±3.54, %1.14±1.67, %3.78±3.03 ve %64.85±14.85 olarak bulmuştur. Sunulan araştırmada Hancock solüsyonundaki akrozomal ve toplam morfolojik bozukluk oranları hem boyama yöntemlerinde hem de sulandırıcı çeşidine göre boyama yöntemlerinde Baran'ın³ değerlerinden düşük, diğer morfolojik bozukluk oranları ise benzer bulunmuştur.

Payet yöntemiyle dondurduğu köpek spermalarında Günay¹¹, çözüm sonrası akrozom, baş, orta, kuyruk ve toplam morfolojik bozukluk oranlarını Tris ve sodyum sitrat sulandırıcılarında sırasıyla %23.6±1.12, %5.4±0.28, %2.4±0.08, %8.8±0.34, %40.6±1.35; %26.9±1.18, %5.9±0.28, %2.8±0.09, %9.7±0.34 ve

%45.4±1.39 olarak saptamıştır. Araştırmacı akrozomal bozukluk oranı için Giemsa, diğer morfolojik bozukluk oranlarını saptamak için Eosin-nigrosin boyama yöntemlerini kullandığını bildirmiştir. Sunulan araştırmada Giemsa boyama yönteminde Tris ve sodyum sitrat sulandırıcılarında ve sulandırıcı göz önünde bulundurulmadan boyama yöntemlerinden elde edilen akrozomal bozukluk oranları Günay'ın¹¹ bulduğu değerden biraz düşük olmakla beraber uyumlu bulunmuştur. Diğer ve toplam morfolojik bozukluk oranları ise araştırmacının değerlerinden düşük bulunmuştur.

England ve Ponzio⁶, Tris-yumurta sarısı ile dondurduğu köpek spermasında çözüm sonrası sağlam akrozom oranını köpeklerde % 52-84 olarak bulduklarını belirtmişlerdir. Sunulan araştırmada tüm boyama yöntemlerinde hem Tris ve sodyum sitrat sulandırıcılarındaki hem de sulandırıcı göz önüne alınmadan bulunan akrozomal bozukluk oranları England ve Ponzio'nun⁶ belirttiği değerle uyum içerisindedir. Elektron mikroskop kullanılarak yapılan muayenelerde akrozomal içerik kaybını ve akrozomal membranların vezikülasyonunu içeren akrozomal hasarın daha yüksek oranda saptanabileceğini açıklayan Rodriguez-Martinez ve ark²⁴, faz kontrast mikroskop kullanımında ise akrozomal anomalilerin daha düşük oranda bulunduğunu bildirmişlerdir.

Kullanılan farklı boyama yöntemleri arasında önemli istatistiksel farklılıklar bulunmamasına karşın Hancock sıvı fiksasyon yönteminin uygulanması sırasında Tris sulandırıcısıyla dondurulmuş örneklerde solüsyon ile temas sırasında çökelti oluştuğu ve mikroskopik muayenede görüntünün bulanıklığı gözlemlendi. Bu nedenle Hancock sıvı fiksasyon yönteminde diğer yöntemlere göre muayene biraz daha zor gerçekleşmiştir. Sodyum sitrat sulandırıcısı ile dondurulan sperma örneklerinde ise Tris sulandırıcısında karşılaşılan durumla karşılaşılmamıştır. Bunun yanı sıra Hancock solüsyonunda boya olmadığından ve dolayısıyla spermatozoitlerin boya alması gibi bir durumla karşılaşılması nedeniyle akrozomal ve diğer morfolojik muayenelerin ayrıntılı olarak yapılması avantaj olarak değerlendirilmiştir. Gliserol¹⁷ ve yumurta sarısı³² içeren sulandırıcıların spermatozoitlerin boyanma özelliğini etkilediği bildirilmiştir. Ayrıca eosin-nigrosin boyama yönteminde yapılan akrozomal muayeneler diğer yöntemlere oranla daha zor gerçekleşmiştir.

Sunulan araştırmada, dondurulmuş-çözündürülmüş köpek spermasının morfolojik değerlendirilmesinde kullanılan sulandırıcıların boyama yöntemleri üzerine etkisinin olmadığı ve kullanılan üç farklı boyama yönteminin de güvenle kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

1. AMANN UP. Can fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? J. Androl. 1989; 89-98.
2. ATAMAN MB, YILDIZ C, KAYA A, AKSOY M, LEHİMCİOĞLU N. Köpeklerde taze ve donmuş-çözünmüş spermada anormal spermatozoon tiplerinin ve oranlarının tespit edilmesinde farklı yöntemlerin kullanılması. Vet. Bil. Derg. 1998; 14 (2): 121-129.
3. BARAN, A. Köpek spermasının farklı oranlarda glycerol içeren sulandırıcılarda dondurulması. (Doktora Tezi). İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 1997.
4. CONCANNON PW, BATTISTA M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: KIRK RW, ed. Current Veterinary Therapy X. Small Animal Practice, W.B. Saunders Company, Philadelphia. 1247-1259, 1989.
5. CORREA JR, PACE MM, ZAVOS PM. 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.
6. ENGLAND GCW, PONZIO P. Comparison of the a quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. Theriogenology. 1996; 46: 165-171.
7. FARSTAD W. Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen. J. Small Anim. Pract. 1984, 25: 561-565
8. FELDMAN EC, NELSON RN. Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 481-525, 1987.
9. FERGUSON JM, RENTON JP, FARSTAD W, DOUGLAS TA. Insemination of Beagle bitches. J. Reprod. Fertil. 1989; 39: 293-298.
10. GILL HP, KAUFMAN CF, FOOTE RH, KIRK RW. Artificial insemination of Beagle bitshes with freshly collected, liquid-stored and frozen stored semen. Am. J. Vet. Res. 1970, 31(10): 1807-1813.
11. GÜNAY, Ü. Farklı sulandırıcılarla sulandırılıp dondurulan köpek spermasının spermatolojik özellikleri. U.Ü. Vet. Fak. Derg. 1999; 3 (18): 149-166.

12. HAFEZ ESE. Semen evaluation. In: HAFEZ ESE, ed. *Reproduction in Farm Animals*, 5th edit. Lea and Febiger, Philadelphia. 405-481, 1987
13. İLERİ K, AK K, PABUÇÇUOĞLU S, BİRLER S. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. İstanbul Üniv.Vet. Fak. Yayını. Ders Notu No:23, 2000.
14. LARSEN RE. Evaluation of fertility problems in the male dog. *Vet. Clin. North. Am.* 1977; 7: 735-745.
15. LONG PL, SAWYER HR, PICKETT BW. Teaching aid for preparation and evaluation of slides for equine spermatozoal morphology. *Equine Veterinary Science*.1990; 10 (5): 360-362.
16. MEYERS-WALLEN V.N. Clinical approach to infertile male dog with sperm in the ejaculate. *Vet. Clinics of N. Am. Small Anim. Prac.*1991, 21 (3): 609-633.
17. MIXNER JP, SAROFF J. Interference by glycerol with differential staining of bull spermatozoa. *J. Dairy Sci.* 1954; 37: 652.
18. NOTHLING JO, VOLKMANN D.H. Effect of addition of autologous prostatic fluid on the fertility of frozen-thawed dog semen after intravaginal insemination. *J. Reprod. Fertil.* 1993; 47: 329-333.
19. OETTLE, EE. Sperm morphology and fertility and fertility in the dog. *J. Reprod. Fertil.*1993; 47: 257-260.
20. OLIVIA SF. Cryopreservation of canine semen: Technique and performance. *Dissertation Abstracts International*. 1985; 45: 3441.
21. ÖZKOCA A. Çiflik Hayvanlarında Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. İ.Ü. Vet. Fak. No. 3209, İstanbul, 1984.
22. PENA AI, BARRIO F, QUINTELA LA, HERRADON PG. Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. *Theriogenology*. 1998; 50:163-174.
23. PLUMMER JM, WATSON PF, ALLEN WE. A spermatozoal midpiece abnormality associated with infertility in a Lhasa Apso dog. *J. Small Anim. Pract.* 1987; 28: 743-751.
24. RODRIGUEZ-MARTINEZ H, EK WALL H, LINDE-FORSBERG C. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1993;47: 279-285.
25. SAACKE RG. Semen quality in relation to semen preservation. *J. Dairy Sci.* 1983; 66: 2635-2644.
26. SETTERGEN I. Examination of the canine genital system. *Veterinary Clinics of North America*. 1971;1: 103-116.
27. SILVA LDM, VERSTEGEN JP. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*. 1995; 44: 571-579.
28. SOBERBERG SF. Canine breeding management. *Vet. Clin.of North Amer. Small Anim. Prac.* 1986;16:419-433.
29. STROM B, ROTA A, LINDE-FORSBERG C. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected two methods of cryopreservation. *Theriogenology*. 1997; 48 (2): 247-256.
30. TEKİN N. Spermanın Muayenesi ve Değerlendirilmesi. In: ALAÇAM E, ed. *Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Doğum ve İnfertilite*, 1. baskı. Dizgievi, Ankara. 69-81, 1994.
31. THOMAS PGA, LARSEN RE, BURNS JM, HAHN CN. A comparison of three packaging techniques using two extenders for the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*. 1993; 40:1199-1205.
32. TULI RK, SCHMIDT-BAULAIN R, HOLTZ W. Influence of thawing temperature on viability and release of glutamic oxaloacetic transaminase in frozen semen from Boer goat. *Anim. Reprod. Sci.* 1991; 25: 125-131.
33. WONG WT, DHALI WAL GK. Observation on semen quality of dogs in the tropics. *Veterinary Record*.1985; 116 (12): 313-314.
34. YILDIZ C, ATAMAN MB, KAYA A, TEPELİ C, LAHİMCİOĞLU N. Köpek ve koçlarda akrozom bozukluklarının belirlenmesi amacıyla farklı tespit ve boyama yöntemlerinin karşılaştırılması. *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg.* 2000; 11 (2): 7-11.
35. YURDAYDIN N., KOTZAB E. Köpek spermasının dondurulması üzerinde araştırmalar. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.* 1987, 34 (3): 534-540.