

Teke Spermasının +4 °C'de Payet, Ependorf ve Falcon Tüplerinde Saklanması Spermatolojik Parametreler Üzerine Etkisi

Muhammed Enes İNANÇ*, Şükrü GÜNGÖR, Fatıma DİNÇ, Ayhan ATA

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Burdur, Türkiye.

Geliş Tarihi: 05.03.2018

Kabul Tarihi: 07.06.2018

Özet: Bu çalışmanın amacı, Honamlı teke spermasının kısa süreli saklanmasında farklı büyüklükteki payet ve deney tüplerinin spermatolojik parametrelere etkisini araştırmaktır. Araştırmada beş baş Honamlı tekesi kullanıldı. Tekelerden haftada iki kez suni vagina yardımıyla üreme sezonu içinde sperma alındı. Her bir tekeden alınan nativ ejakülatlar birleştirilerek tris yumurta sarısı sulandırıcısı ile sulandırıldı ve payet (0.25; 0.5 ml), Ependorf tüpü (0.5; 1.5 ml), Falcon tüpü (15; 50 ml) olarak 6 farklı grup oluşturuldu ve +4 °C'de saklandı. Gruplar oluşturulduktan sonra 24 saat aralıklarla spermatolojik parametreler 96. saate kadar sperma motilitesi (%), morfolojik bütünlük (%), membran bütünlüğü (HOS test, %) yönünden incelendi. Morfolojik bütünlük yönünden gruplar arasında istatistiki olarak farklılık bulunmazken ($P>0.05$); 96. saatin sonunda en yüksek motilite (57.50 ± 2.50) ve membran bütünlüğü (56.00 ± 3.73) 0.5 ml'lik payet grubunda tespit edildi ($P<0.05$). Sonuç olarak +4 °C'deki saklama koşullarında motilite ve membran bütünlüğü açısından en iyi sonuç 0.5 ml'lik payet grubunda tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Teke sperması, Kısa süreli saklama, Payet, Ependorf tüpü, Falcon tüpü.

Effect of Straw, Eppendorf and Falcon Tubes on Buck Semen Spermatological Parameters at +4 °C Storage

Abstract: The purpose of this study was to investigate the effect of different sized straws and test tubes on spermatological parameters during the short-term storage of the Honamli buck semen. In this study, five Honamli bucks were used. Semen was taken twice a week with artificial vagina during the breeding season. The native ejaculates collected from each individual were mixed and diluted with tris egg yolk diluent. The diluted sperm samples were filled into straws (0.25; 0.5 ml), Eppendorf tubes (0.5; 1.5 ml) and Falcon tubes (15; 50 ml) so as to form 6 different groups. stored at +4 °C. Sperm motility (%), morphologic integrity (%), membrane integrity (HOS test, %) were examined at 24 hour intervals until 96. hour. Although there were no statistically significant differences between the groups on morphological integrity ($P>0.05$); the highest motility ($57.50\pm 2.50\%$) and membrane integrity ($56.00\pm 3.73\%$) were detected in 0.50 ml straw group ($P<0.05$). As a result, in terms of motility and membrane integrity the best results were determined in 0.5 ml straw group under storage conditions at +4 °C.

Keywords: Buck semen, Liquid storage, Straw, Eppendorf tube, Falcon tube.

Giriş

Üremeye yardımcı biyoteknolojik yöntemler, hayvan ıslahını hızlandırmak ve üstün verimli ırkların oluşturulması ile hayvanların verimlerinin artırılmasının yanı sıra, genetik özelliklerini dışı popülasyonlara hızlı bir şekilde aktarımını sağlamaktadır. (Birler ve ark., 2001). Bu aktarım sırasında saha koşullarında teke spermasının dondurulması ve daha sonra çözülmesi aşamalarında yeterli düzeyde başarıya hala ulaşamamıştır (Kulaksız ve Daşkın, 2009). Spermanın dondurulmasına bağlı olarak hücre fonksiyonlarını yerine getirememesi sonucu oksidatif stres oluşmakta ve bunun sonucu olarak ise kademeli olarak motilitede azalma, ile birlikte morfolojik bozukluklar ve fertilizasyon kabiliyetinde azalmalar görülmektedir (Alçay ve ark., 2016). Dondurulma sırasında ortaya çıkan bu problemler

ise bizi teke spermasının +4 °C'de saklanmasına yöneltmiştir. Spermanın +4 °C'de saklanmasında daha kademeli olarak motilitede, membran bütünlüğünde ve fertilizasyonda kayıplar gözlemlenmektedir (Avdatek ve ark., 2018; Maxwell ve Watson 1996).

Hayvan türlerine göre değişmekle birlikte spermanın dondurulması günümüz teknolojisinde farklı büyüklüklerdeki payetlerde (0.25 ml [boğa, koç, teke], 0.50 [boğa, aygır, koç, teke, domuz], 1.2; 1.7; 2.5; 4.0; 5.0 ml [balıklarda]) gerçekleştirilmektedir. Farklı büyüklüklerdeki payetlerle yapılan bilimsel çalışmalarda in vitro ve in vivo farklı sonuçlar elde edilmektedir (Ansari ve ark., 2011, Christensen ve Tiersch, 1997; Eriksson ve Rodriguez-Martines, 2000; Lahnsteiner, 1997). Koçlarda spermanın mini ya da maxi payette

dondurulması çalışmasında motilite hız parametrelerinin etkilendiği görülmüştür (Joshi ve ark., 2000). Bu farklılığın, ortamda bulunan oksijenden kaynaklandığı (aerobik ve anarobik ortam) düşünülmektedir. Aerobik sistem sonucu reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi kaçınılmazdır (Sadhan ve ark., 2004). Magnus ve Anand (2010) teke spermasını 2 ml ve 5 ml'lik hava boşluğu olan ve olmayan tüplere koyarak kısa süreli sakladığında hava boşluğu olmayan grubun motilitesini daha iyi koruduğunu tespit etmiştir. Spermatozoanın ROS üretiminin sınırlanmasının bu duruma yol açtığı sonucuna varmışlardır. Ayrıca, literatürlerde farklı paketleme ve çözündürme yöntemlerinin spermanın canlılığını etkilediğini belirten çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Paulenz ve ark., 2004). Genel olarak geniş yüzey ve miktar oranının (pellet, 0.25, 0.5'lik payetler) sperma için daha homojenize bir saklama ortamı sağladığı belirtilmektedir (Buranaamnuay et al., 2009). Bunun sonucu olarak, spermatozoonların dondurulması sırasında kullanılan düşük hacimli saklama koşullarının yüksek hacimlilere göre daha az zarar görmesini sağlayacaktır (Eriksson ve Rodriguez-Martines, 2000).

Tüm bu bilgiler ışığında bu çalışmanın amacı, Honamlı teke spermasının +4 °C'de kısa süreli saklanmasında farklı büyüklükteki payet, Ependorf ve Falkon tüplerinin spermatolojik parametrelere etkisinin incelenmesidir.

Materyal ve Metot

Çalışmada hayvan materyalini 5 baş Honamlı Tekesi oluşturdu. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (05.10.2016 tarih ve 215 sayılı kararı) izni ile, tekelerden haftada iki defa suni vagina yardımıyla sezon içinde sperma alındı. Her bir tekedan alınan nativ ejakülatlar makroskopik ve mikroskopik yönden muayene edilerek normo-spermi değerleri gösteren (%80 motilite, 2×10^9 /ml yoğunluk, sperma miktarı en az 0.5 ml) ejakülatlar birleştirildi. Birleştirilen ejakülatlar temel tris yumurta sarısı sulandırıcısı (3.63 gr Tris; 1.82 gr Sitrik asit, 0.5 gr glikoz/100 ml distile su, %20 yumurta sarısı) ile konsantrasyonu 500×10^6 /ml olacak şekilde sulandırıldı. Sulandırma sonrası sperma grupları payet (0.25 ml, 0.5 ml), Ependorf tüpü (0.5 ml, 1.5 ml) ve Falkon tüp (15 ml, 50 ml) olarak 6 farklı grup şeklinde oluşturuldu. Payetlere sulandırılmış sperma çekildikten sonra uçları polivinil alkol ile kapatıldı. Ependorf deney tüpleri tamamen; Falkon tüplere ise standart 5 ml sulandırılmış spermalar ile doldurularak kapakları kapatıldı. Gruplar oluşturulduktan sonra saat 0. saat olarak kabul edildi ve 96. saate kadar +4 °C'de saklandı. Saklama

sırasında 24 saat aralıklar ile spermatozoa motilitesi (%) ve membran bütünlüğü (HOS test, %); çalışmanın başlangıcında ve sonunda (0. ve 96. Saatlerde) ise anormal spermatozoa oranı (%) incelendi.

Spermatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi:

Motilite muayenesi, subjektif olarak, faz-kontrast mikroskopta x40'lık büyütmede ısıtma tablası (37°C) kullanılarak 7 farklı mikroskop sahası incelenerek ortalamaları alındı ve motilite sonucu (%) belirlendi. Anormal spermatozoa oranı Hancock solüsyonu (62.5 ml formalin (37%), 150 ml salin solüsyonu, 150 ml tampon solüsyonu ve 500 ml bi-distile su) kullanarak faz kontrast mikroskopunda immersiyon yağı kullanılarak x100'lük büyütmede toplam 200 adet spermatozoa incelendi ve sonuç % olarak belirlendi (Schafer ve Holzmann, 2000). Fonksiyonel membran bütünlüğünün belirlenmesi için Hypo Osmotic Swelling (HOS) test kullanıldı. 37 °C'deki 100 mOsm'lük HOS sıvısından (1.35 gr fruktoz, 0.735 gr trisodyum sitrat/100 ml distile su) 100 µl alınarak üzerine sulandırılmış spermadan 10 µl eklendi ve 37 °C'ta 60 dakika inkübasyonu sonrası, lam üzerine bu karışımdan 5 µl alınıp üzerine lamel kapatıldı. Hazırlanan preparatlar mikroskop altında (x40 büyütmede) incelenerek 200 hücre sayıldı ve kuyruktaki kıvrımlar dikkate alınarak HOS teste yanıt veren spermatozoonlar % olarak değerlendirildi. Kuyruğu kıvrık olan spermatozoonlar membran bütünlüğü sağlam olarak belirlendi (Kulaksız, 2009).

İstatistik Analiz: Önemlilik testlerinden önce, tüm değişkenler parametrik test varsayımlarından normallik yönünden Shapiro Wilks test ile, varyansların homojenliği yönünden ise Levene's testi ile incelendi. Normal dağılan değişkenler arası farklılığın istatistiksel açıdan kontrolü tek varyans analizi (ANOVA) ile, normal dağılmayan değişkenler arası farklılığın istatistiksel açıdan kontrolü ise Kruskal Wallis testi ile yapıldı. Gruplar arası farklılığın anlamlı çıktığı değişkenler için ileri aşama (post-hoc) testi olarak Tukey testi'nden yararlanıldı. Tüm istatistiksel analizler minimum %5 hata payı ile incelendi. SPSS 22.0 paket programından yararlanıldı. P<0.05 düzeyi anlamlı olarak kabul edildi. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verildi.

Bulgular

Sulandırma sonrası farklı büyüklükteki payet, Ependorf ve Falkon tüplerinde saklanan spermaların spermatolojik özellikleri Tablo 1, Tablo 2 ve Tablo 3'de verilmiştir. Tablo 1'de 0. ve 24. saatlerde motilite açısından gruplar arasında istatistiksel

olarak farklılık bulunamadı ($P>0.05$). 96. saatin sonunda en yüksek motilite 57.50 ± 2.50 ile 0.5 ml payet grubunda, en düşük motilite 4.00 ± 1.69 ile 1.5 ml Ependorf grubunda tespit edildi ($P<0.05$). Tablo 2'de 0., 24., 48. ve 72. saatlerde HOS test açısından gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık

bulunmazken ($P>0.05$), 96. saatin sonunda en yüksek membran bütünlüğü 56.00 ± 3.73 ile 0.5 ml payet grubunda tespit edildi ($P<0.05$). Tablo 3'de morfolojik bütünlük açısından 0. ve 96. saatin sonunda gruplar arasında bir fark bulunamadı ($P>0.05$).

Tablo 1. Spermanın +4 °C 'de farklı saklama koşullarında 96 saat süresince motilite (%) değerleri.

GRUPLAR	0. Saat	24. Saat	48. Saat	72. Saat	96. Saat
0.25 ml Payet	82.85±2.40	77.85±2.85	57.57±4.32 ^{ab}	45.71±4.93 ^{ab}	31.00±4.75 ^b
0.5 ml Payet	82.85±2.40	77.50±3.22	65.75±2.80 ^a	63.75±3.75 ^a	57.50±2.50 ^a
0.5 ml Ependorf	82.85±2.40	65.71±6.21	36.42±5.53 ^c	18.57±4.59 ^{cd}	5.42±1.81 ^c
1.5 ml Ependorf	82.85±2.40	65.00±6.33	32.14±3.05 ^c	12.85±3.24 ^{cd}	4.00±1.69 ^c
15 ml Falkon	82.85±2.40	68.57±5.08	38.00±6.84 ^{bc}	10.42±5.32 ^d	7.57±3.33 ^c
50 ml Falkon	82.14±2.64	66.42±6.33	45.00±3.27 ^{abc}	33.57±6.61 ^{bc}	10.42±4.49 ^c
P	-	-	*	*	*

a-d:Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar istatistiksel olarak farklıdır ($P<0.05$).

Tablo 2. Spermanın +4 °C 'de farklı saklama koşullarında 96 saat süresince membran bütünlüğü (% HOS test) değerleri.

Gruplar	0. Saat	24. Saat	48. Saat	72. Saat	96. Saat
0.25 ml Payet	59.93±3.20	54.99±4.25	52.41±5.61	48.74±4.03	43.48±2.90 ^{ab}
0.5 ml Payet	57.93±2.87	61.56±5.52	55.01±3.55	51.87±3.15	56.00±3.73 ^a
0.5 ml Ependorf	58.36±3.00	52.66±2.69	45.10±2.84	38.96±4.36	35.05±2.12 ^{bc}
1.5 ml Ependorf	57.76±2.94	50.48±2.84	45.56±4.93	37.67±4.75	27.73±4.04 ^c
15 ml Falkon	58.67±3.07	47.27±5.00	42.99±4.37	34.14±4.25	28.12±3.01 ^c
50 ml Falkon	58.49±3.09	44.80±6.22	41.55±4.66	36.71±4.07	29.26±4.52 ^{bc}
P	-	-	-	-	*

a-c: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar istatistiksel olarak farklıdır ($P<0.05$).

Tablo 3. Spermanın +4 °C 'de farklı saklama koşullarında 0. ve 96. saatteki morfolojik bütünlük (% normal spermatazoon) değerleri.

Gruplar	0. Saat	96. Saat
0.25 ml Payet	87.26±1.50	78.62±2.97
0.5 ml Payet	86.86±1.30	82.22±1.76
0.5 ml Ependorf	84.50±1.10	74.47±2.03
1.5 ml Ependorf	87.31±1.19	80.09±1.93
15 ml Falkon	87.32±1.40	80.03±0.45
50 ml Falkon	84.14±1.84	76.43±1.96
P	-	-

-: Gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunmamaktadır ($P>0.05$).

Tartışma ve Sonuç

Spermanın fertilite yeteneğini kaybetmeden ve maliyetlerin azaltılarak etkili saklama koşullarının elde edilmesi suni tohumlama organizasyonlarında hala araştırılmaya devam edilmekte olup, payet, deney tüpü, ampul gibi metot ve yöntemler ile sperma saklanmaktadır (Ansari ve ark., 2011). Yapılan çalışmalarda spermanın mini payette (0.25 ml) dondurulması ile daha fazla hayvan tohumlanabileceği, sıvı azotta saklama sırasında daha az yer kaplayacağı bildirilmiş, bu sayede daha az sulandırıcı ve antibiyotik maliyetinin olacağı tespit edilmiştir (Johnson ve ark., 1995). Fakat +4 °C 'de kısa süreli saklama koşullarında farklı

büyükteki deney tüpü ve payetlerin spermatolojik parametrelere etkisi tam anlamı ile açıklanmamıştır. Yapılan bu çalışmada, 0. saatte motilite ve membran bütünlüğü açısından payet gruplarında (0.25 ve 0.5 ml) kademeli bir azalma tespit edilirken, 96. saatin sonunda en düşük motilite Ependorf ve Falkon tüpleri gruplarında tespit edildi ($P<0.05$). Manda ve domuzlarda yapılan çalışmalarda geniş hacimli saklama koşullarının motiliteyi düşürdüğü tespit edilmiştir (Ansari ve ark., 2011; Weitze ve ark., 1987). Yapılan bu çalışmalar ile sonuçlarımızın örtüştüğü görülmüştür. Senger ve ark. (1983) 0.5 veya 0.25'lik payetlerde spermanın dondurulmasının başarıyı etkileyebileceğini bildirmiş, fakat bu etkinin

sulandırıcı ve soğutma oranına bağlı olarak değiştiğini belirtmiştir. Boğa sperma endüstrisinde 0.25 ve 0.50 ml'lik payetler standart büyüklük olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Yaptığımız çalışmada anormal spermatozoa oranında gruplar arasında bir farklılık bulunmamasına rağmen ($P>0.05$), bunlara paralel olarak en yüksek motilite ve membran bütünlüğü 96. saatin sonunda 0.5 ml'lik payet grubunda tespit edildi ($P<0.05$). Motilite ve membran bütünlüğündeki bu etki, saklama koşullarında payet içinde bulunan spermatozoa oranına göre farklılık gösterdiği bildirilmiştir (Jamieson, 1991). Buna ek olarak, Christensen ve Tiersch (1997) 0.25 ml'lik payetlerdeki hızlı donma olayının hücrelerin dehidrasyonunu önleyebileceği bildirilmiştir. Yapılan çalışmada payetlerin sıcaklığının daha hızlı düştüğü belirlenmiştir. Spermanın sıcaklığının bu şekilde azalması çalışmamızda görülmüştür.

Domuzlarda yapılan bir çalışmada maksı payetlerin (5 ml) hızlı dondurma ve çözündürme için uygun olmadığı belirlenmiş, Flatpack adı verilen plastik malzemelerde çözüm sonu daha yüksek motilite ve çeşitli CASA kinetik parametreleri tespit edilmiştir (Eriksson ve Rodriguez-Martinez, 2000). Bunun yerine 0.25 ml ve 0.50 ml'lik payetlerin ve değişik boyutlardaki flat packlerin daha uygun olacağı bildirilmiştir (Berger ve Fischerleitner, 1992; Simmet, 1993). Ayrıca, payetlerin tek tohumlama dozu olarak paketlenmesinin suni tohumlama uygulamaları açısından daha kullanışlı olacağı düşünülmektedir. Tekelerde yapılan bir çalışmada, teke sperması keçi sütü sulandırıcısı ile sulandırılmış ve +5 °C'de 2 ml ve 5 ml'lik deney tüplerine konularak 24. ve 48. saatlerde motilite muayenesi yapılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda hava boşluğu bırakılmadan deney tüplerinde saklanan grupta motilitenin daha iyi olduğu tespit edilmiştir (Magnus ve Anand, 2000).

Glikolizis spermatozoa için enerji kaynağı olduğu belirtilmektedir. Aerobik ve anaerobik ortamlarda glikolizis spermatozoanın hareketi için önemlidir. Oksijen varlığında anaerobik glikolizis azalarak aerobik glikolizis artar. Ortamdaki şeker varlığında aerobik glikolizis vasıtası ile ROS'un türevlerinden olan süper-oksit anyonları (O_2^-), hidrosil radikalleri (-OH) ve hipo-klorit radikaller (-OHCl) spermatozoa tarafından üretilmektedir (Anderson, 2001). Ortaya çıkan bu ürünler sulandırılmış spermalarda ve seminal plazmada bulunan lökositler ile temasa geçerek spermatozoa motilitesinde ve fertilizasyonunda olumsuz etkiler sebep olmaktadır (Verna ve Kanwar, 1999). Yaptığımız bu çalışmada ise Ependorf ve Falkon tüpü gruplarında payet gruplarına göre motilite ve membran bütünlüğü açısından daha düşük sonuçlar tespit edilmiştir. Bu sonuç ise, kısa süreli saklama

sırasında kalan hava boşluğunun spermatolojik parametreler üzerine olumsuz etkisinin olduğunu göstermiştir. Bu durum, ROS'un spermatozoa üzerine toksik etki yapması ile açıklanabilir. Ayrıca, 15 ve 50 ml falkon tüplerde saklama süresinin uzamasına bağlı olarak spermatozoonlar tüpün alt kısmına çökmekte, bu durumda da, spermanın pH dengesini bozarak toksikasyona neden olmaktadır. Bu etmeden dolayı, büyük hacimli tüplerde sperma saklanırken belirli aralıklar ile tüpün çalkalanması gerektiği ve spermatolojik parametrelerin azalmasının buna bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, farklı saklama koşullarında ortaya çıkan hava boşluğunun ve yüzey alanının spermatolojik parametreleri etkilediği ve Honamlı teke spermasının +4°C'de kısa süreli saklanmasında motilite ve membran bütünlüğü açısından 0.5 ml payet grubunun en iyi sonuç verdiği tespit edildi. İleride yapılacak çalışmalarda bu sonuçların in vivo fertilizasyon ile desteklenmesi gerektiği düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma, Tübitak 2209-A (Proje no:1919B011602543) tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Alçay S, Gökçe E, Toker MB, Önder NT, Üstüner B, Uzabacı E, Gül Z, Çavuş S, 2016: Freeze-dried egg yolk based extenders containing various antioxidants improve post-thawing quality and incubation resilience of goat spermatozoa. *Criobiology*, 72, 269-273.
- Anderson J, 2001: The Semen of Animal and Its Use for Artificial Insemination. 1st ed., Green World Publishers, Lucknow.
- Ansari MS, Rakha BA, Andrabi SMH, Akhter S, 2011: Effect of straw size and thawing time on quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Reproductive biology*, 11, 49-54.
- Avdatek F, Yeni D, Gündoğan M, 2018. Merinos koçlarda spermaya katılan antioksidanların kısa süreli saklama sırasında spermatolojik parametreler ve DNA hasarı üzerine etkileri. *Kocatepe Vet J*, 11, 126-133.
- Berger B, Fischerleitner F, 1992: On deep freezing of boar semen: investigations on the effects of different straw volumes, methods of freezing and thawing extenders. *Reprod Dom Anim*, 27, 266-270.
- Birler S, Pabuccuoğlu S, Atalla H, Alkan S, Özdaş ÖB, Bacinoğlu S, Cirit Ü, Zavar İ, Sönmez MEC, İleri İK, 2002: Transfer of in vitro produced sheep embryos. *Türk J Vet Anim Sci*, 26, 1421-1426.
- Buranaamnuay K, Tummaruk P, Singlor J, Rodriguez-Martinez H, Techakumphu M, 2009: Effects of straw volume and Equex-STM® on boar semen quality after cryopreservation. *Reprod Dom Anim*. 44, 69-73.

- Christensen JM, Tiersch TR, 1997: Cryopreservation of channel cat fish spermatozoa: Effect of cryoprotectant, straw size, and formulation of extender. *Theriogenology*, 47, 639-645.
- Eriksson BM, Rodriguez-Martinez H, 2000: Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in FlatPacks and Maxi-straws. *Anim Reprod Sci*, 63, 205-220.
- Jamieson GM, 1991: Fish Evolution and Systematics: Evidence From Spermatozoa. Cambridge University Press, New York.
- Johnson MS, Senger PL, Allen CH, Hancock DD, Alexander BM, Sasser RG, 1995: Fertility of bull semen packaged in 0.25 and 0.5 milliliters French Straws. *Journal of Animal Science*, 73, 1914-1919.
- Joshi A, Bag S, Mittal JP 2000: Freezability of ram spermatozoa packaged in mini and medium size straw. *Indian J Anim Prod*, 32, 25-26.
- Kulaksız R, 2009: Farklı antioksidanlar eklenmiş sulandırıcılarla dondurulmuş Saanen teke spermasının in vitro değerlendirilmesi. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kulaksız R, Daşkın A, 2009: Farklı antioksidanlarla dondurulan Saanen teke spermasının in vitro ve in vivo değerlendirilmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 56, 201-205.
- Lahnsteiner F, 1997: Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquaculture Research*, 28, 471-479.
- Magnus PK, Anand LF, 2010: Effect of air space in storage vials on motility of spermatozoa in chilled buck semen. *Veterinary World*, 3, 422-423.
- Maxwell WMC, Watson PF, 1996: Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci*, 42, 55-65.
- Paulenz H, Söderquist L, Andoy T, Nordstoga A, Gulbrandsen B, Berg KA, 2004: Fertility results after different thawing procedures for ram semen frozen in minitubes and mini straws. *Theriogenology*, 61, 1719-1727.
- Sadhan B, Anil J, Naqvi SMK, Mittal JP, 2004: Effect of post-thaw incubation on sperm kinematics and acrosomal integrity of ram spermatozoa cryopreserved in medium-sized French straws. *Theriogenology*, 62, 415-424.
- Schafer S, Holzmann A, 2000: The use of transmigration and spermac stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 59, 201-211.
- Senger PL, Mitchell JR, Almquist JO, 1983: Influence of cooling rates and extenders upon post-thaw viability of bovine spermatozoa packaged in 0.25- and 0.5-ml French straws. *J Anim Sci*, 56, 1261-1268.
- Simmet C, 1993: Kältphysikalische aspekte der gefrierkonservierung von ebersperma in ihrer auswirkung auf samenqualität und befruchtungsrate. Thesis, Hannover Veterinary College, Hannover.
- Verna A, Kanwar KC, 1999: Effect of vitamin E on human sperm motility and lipid peroxidation in vitro. *Asian J. Androl*, 1, 151-154.
- Weitze KF, Rath D, Baron G, 1987: Deep freezing of boar semen in plastic straws (in German). *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 94, 485-488.
- *Yazışma Adresi: Muhammed Enes İNANÇ
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi,
Dölerme ve Suni Tohumlama AD. Burdur, Türkiye
e-mail: enesinanc@hotmail.com