

FARKLI SULANDIRICILARLA DONDURULAN KÖPEK SPERMATOZOONLARINDA MORFOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER

(Morphological changes in dog' s sperm frozen with
different diluents)

Ongun KESKİN

Nafiz YURDAYDIN

Necmettin TEKİN

İ. Sefa GÜRÇAN

SUMMARY

The aim of this research was to display the morphological changes in dog' s spermatozoa which were caused by freezing procedures using different diluents.

İn this experiment, semen was collected from dogs by manual stimulation. The percentage of abnormal sperm in fresh semen was $15.3 \pm 6.0 \%$, acrosome, head, middle piece (spermatozoa with protoplasmic droplet and other middle piece defects) and tail defects (%) was averaged 0.5 ± 0.2 , 0.1 ± 0.1 , 10.3 ± 3.8 (3.4 ± 0.8 and 6.9 ± 3.0), 4.4 ± 2.3 respectively

Ejaculates from dogs were diluted by Tris, Sodium citrate and Ringer. Post-equilibration middle piece defects were established $14.4 \pm 4.0 \%$, $13.3 \pm 4.4 \%$ and $15.2 \pm 3.5 \%$. The percentage of spermatozoa with protoplasmic droplet and other middle piece defects (%) were recorded as 3.7 ± 1.1 and 10.7 ± 2.9 , 3.9 ± 1.6 and 9.4 ± 2.8 , 4.1 ± 1.1 and 11.0 ± 2.4 respectively.

Post-thawing middle piece defects were 16.2 ± 7.3 , 14.7 ± 4.2 and 20.3 ± 6.9 respectively for frozen semen with the same diluents. The percentage of spermatozoa with protoplasmic droplet and other middle piece defects (%) were recorded as 2.9 ± 1.6 and 13.3 ± 5.7 , 1.8 ± 0.8 and 12.9 ± 3.4 , 1.5 ± 0.9 and 18.8 ± 6.0 respectively.

* : AÜ. Vet. Fak., Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Arş. Gör., ANKARA

** : AÜ. Vet. Fak., Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Prof. Dr., ANKARA

*** : AÜ. Vet. Fak., Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Doç. Dr., ANKARA

**** : AÜ. Vet. Fak., Biyometri Anabilim Dalı, Arş. Gör., ANKARA

ÖZET

Bu çalışma farklı sulandırıcılar kullanarak köpek spermalarında dondurma işlemlerinin neden olduğu morfolojik değişiklikleri ortaya koymak amacıyla yapılmıştır.

Araştırmada masaj yöntemiyle alınan ejakülatlarda saptanan anormal spermatozoa oranı % 15.3 ± 6.0 olurken, akrozom, baş, orta kısım (protoplazmik damlacıklı spermatozoa ve diğer bozukluklar) ve kuyruk bozuklukları (%) sırasıyla 0.5 ± 0.2 , 0.1 ± 0.1 , 10.3 ± 3.8 (3.4 ± 0.8 ve 6.9 ± 3.0), 4.4 ± 2.3 saptanmıştır.

Tris, Sodyum sitrat ve Ringerle sulandırılan köpek spermalarında ekilibasyondan sonra orta kısım bozuklukları sırasıyla % 14.4 ± 4.0 , % 13.3 ± 4.4 ve % 15.2 ± 3.5 bulunurken, protoplazmik damlacıklı spermatozoa oranı ve diğer orta kısım bozuklukları (%) sırasıyla 3.7 ± 1.1 ve 10.7 ± 2.9 , 3.9 ± 1.6 ve 9.4 ± 2.8 , 4.1 ± 1.1 ve 11.0 ± 2.4 kaydedilmiştir.

Aynı sulandırıcılarla dondurulan spermalarda çözüm sonu orta kısım bozuklukları sırasıyla % 16.2 ± 7.3 , % 14.7 ± 4.2 ve % 20.3 ± 6.9 saptanırken, protoplazmik damlacıklı spermatozoa oranı ve diğer orta kısım bozuklukları (%) sırasıyla 2.9 ± 1.6 ve 13.3 ± 5.7 , 1.8 ± 0.8 ve 12.9 ± 3.4 , 1.5 ± 0.9 ve 18.8 ± 6.0 bulunmuştur.

GİRİŞ

Köpeklerde ilk sun'i tohumlama uygulamasını 1780 yılında Lazzaro Spallanzani yapmıştır (19). Köpek yetiştiriciliğinde sun'i tohumlama uzun yıllardan beri yapılmaktadır (3). Köpek sperması için uygun dondurma teknik ve yöntemlerinin geliştirilmesi, dünyanın birçok ülkesinde sperma bankalarının kurulmasına yol açarak üstün nitelikli damızlıklardan daha fazla yararlanılmasını sağlamıştır.

Dondurulmuş spermalardan elde edilecek dölverimi kuşkusuz sperma kalitesiyle doğrudan ilişkilidir. Spermatolojik özelliklerin istenen ölçüler içinde olması spermanın dondurulabilirliğinin saptanmasında ve dolayısıyla fertilizasyon kapasitesinin değerlendirilmesinde spermatozoa motilitesi ve spermatozoa morfolojisi en önemli kriterlerdir (23). Ancak, spermanın dondurulabilirliğine karar vermek için bilinen kriterlerin dışında başka faktörlerin olduğu da düşünülmektedir. Bu kapsamda kimi spermatozoa anomalilerinin bazı türlerin spermalarında yüksek oranda bulunması ve yine bazı fertil köpeklerden alınan spermaların dondurulamamasının nedeni araştırılması gereken konulardır.

Köpek spermatozoonunun şekli genel olarak diğer memeli türlerinininkine benzerse de genişlik ve uzunlukları değişir. Köpek spermatozoonu toplam 55 -70 μ .m., baş 7 μ .m. uzunlukta, 5 μ .m. genişlikte, orta kısım 11 μ .m., kuyruk 50 μ .m. uzunluktadır (Şekil 1).Kapasitasyon süresi 7 saattir. Köpek spermatozoonu invitro koşullarda, olgun oosistlere olduğu kadar, olgunlaşmamış ve dejenere olmuş oosistlere de penetre olabilmektedir (10).

Her hayvan türünden alınan ejakülatta belli bir oranda anormal spermatozoa bulunur. Ancak, spermatozoondaki morfolojik bozuklukların in vivo ya da invitro koşullarda artması yanında bir hayvandan optimum fertilitate elde etmek için k.imi spermatozoa anomalilerinin kalıtsal olduğu da düşünülmelidir (27).

Spermatozoa anomalileri primer ve sekonder olarak ikiye ayrılır. Primer anomaliler fertilitenin düşmesine neden olur, sekonder olanlar ise yalnızca çok fazla olduklarında aynı etkiyi gösterirler. Bir spermatozoa birden fazla anomaliye de sahip olabilir (8). Bartlett (6) üç normal köpekte anormal spermatozoa dağılımını aşağıdaki şekilde belirlemiştir.

Total anomaliler	% 15.0 \pm 1.6
Baş anomalileri	% 11.0
Boyun Anomalileri	% 15.0
Orta kısım ve protoplazmik damlacık	% 21.0
Kuyruk anomalileri	% 7.0

Erkek köpeklerde uzun seksüel dinlenme periyodu, sekonder anomalilerin (% 2.4' den % 88.1' e) yükselmesine neden olur. Ayrıca anormal spermatozoanın saf ırklarda melezlere göre daha yaygın olduğu görülmüştür (27). Birçok araştırmacı da, ejakülattaki primer ve sekonder spermatozoa anomalilerinin % 30-40' 1 geçmemesi gerektiğini kaydetmektedirler (21).

Köpeklerden sun'i vajen (2) ve elektroejakülasyon (18, 30) yöntemiyle sperma alınabilmektedir. Pratikte yaygın olan Boucher ve arkadaşlarının (7) kullandığı masaj yöntemidir. Kızgın bir dişi bulundurulmuş masaj yöntemiyle alınan normal bir köpek sperması gri-süt bayazı renginde, kokusuz, sulu kıvamda bir yapı gösterir (17). Üç fraksiyonda

ayırddilebilen köpek ejakülatında ilk fraksiyon, 0.2-5 ml., ikinci fraksiyon, asıl spermatozoa bulunduran kısım 0.5-3.5 ml., üçüncü fraksiyon ise 2-30 ml.' dir (10). İlk ve üçüncü fraksiyon prostat orijinlidir, hatta bir çok araştırmacı (5, 12) bu fraksiyonlarda kan bulunduğunu da bildirmişlerdir. Dubiel (11), ejakülat miktarının köpeğin vücut ağırlığına bağlı olarak değiştiğini söylemiş ve küçük köpeklerde ortalama 5.4 ml., 20 kg.' dan büyüklerde ise 12.7 ml. olduğunu bildirmiştir.

Spermatozoa motilitesi sperma kalitesinin belirlenmesinde önemli bir kriterdir ve normal bir sperma örneğinde % 70' i geçmelidir (10).

Fertil köpeklerde spermatozoa yoğunluğu $22-6000 \times 10^6$ /ml., ortalama $500-900 \times 10^6$ /ml. arasındadır. Orta büyüklükteki bir köpekte yaklaşık 0.2×10^6 /ml.' dir (10).

Normal bir köpek spermasının pH' sı 5.8-6.9 arasında değişir. Üç fraksiyon ayrı ayrı değerlendirilirse birinci fraksiyon 6.4, ikinci fraksiyon 6.1 ve üçüncü fraksiyon 7.2' dir (10). Köpek spermasında sodyum ve klorid konsantrasyonları yüksek, kalsiyum, magnezyum ve potasyum düşüktür. Fruktoz ise % 2 mg.' in altındadır. Bunun da nedeni, köpeklerde ek cinsiyet bezlerinden yalnızca prostatın olması, dolayısıyla vezikula seminalisin bulunmamasındandır. Spermanın içerdiği aminotransferaz ve fosfataz enzim aktiviteleri spermanın fraksiyonları arasında değişir ve bu enzimler sperma kalitesi ve fertilitasını etkileyebilir (10).

Köpek spermalarında spermatolojik özellikleri değerlendiren Hendrikse ve Antonisse (20) spermatozoa motilitesini % 71.4, anormal spermatozoa oranını % 14.0 olarak kaydederken, motilitenin yaşın ilerlemesiyle düştüğünü, morfolojik bozuklukların ise arttığını bildirmişlerdir.

Poole ve ark. (29), Beagle ırkı köpeklerde ejakülat miktarını 1.2-5.0 ml., spermatozoa yoğunluğunu 68.9×10^4 /ml., anormal spermatozoa oranını % 15.8 ve primer spermatozoa anomalilerini % 3.7, Chatterjee ve ark. (9) spermatozoa motilitesini % 85.3, spermatozoa yoğunluğunu 161.6×10^6 /ml. ve anormal spermatozoa Oranını % 14.7, Dubiel (11) primer ve sekonder anomalileri % 30.4, Souza (35) primer anomalileri % 9.9, sekonder olanları % 7.6 bulmuşlardır.

Köpek sperması değişik sulandırıcılar içinde (22) kısa süreli (33) ya da pellet (31), payet (25, 28) ve ampul (32) biçiminde dondurularak uzun süreli saklanabilmektedir.

Köpek spermalarını 0 °C' da 5 dakika bekleten Aguirre ve ark. (1) sağlam akrozomlu spermatozoa oranını % 35.0 ± 2.0 bulmuşlardır.

Beagle ırkı köpek spermalarını Trisle donduran Oettle (26) çözüm sonu spermatozoa motilitesinin düştüğünü (% 35.1), akrozom bozukluklarının arttığını (% 68.2) gözlemiştir.

Köpek spermalarını glyserollü Trisle donduran Yurdaydın ve Kotzab (39) çözüm sonu spermatozoa motilitesini % 46.2, anormal spermatozoa oranını % 27.9 ve ölü spermatozoa oranını % 3.1 bulmuşlardır.

MATERYAL VE METOT

Çalışmada farklı ırktan toplam 11 erkek köpek kullanılmıştır. Spermaları alınacak köpekler aynı ırktan bir dişi köpek kullanılarak uyarılmıştır.

Spermalar elle masaj yöntemiyle alınmıştır. Ejakülasyon üç fraksiyonda gerçekleşmiş ve her fraksiyon ayrı kadehlerde toplanmıştır. Spermatozoa bulunduran ikinci fraksiyon sperma alma yerinde hazırlanan laboratuvarında başlıca spermatolojik özellikler yönüyle incelenmiştir.

Spermaların dondurulması için Tris, Sodyum sitrat ve Ringer olmak üzere üç ayrı sperma sulandırıcısı kullanılmıştır. Spermatolojik özellikleri saptanan ejakülatlar üç eşit kısma bölünerek % 7 glyserol bulunduran sulandırıcılarla 1:2 oranında sulandırılmıştır. Payetlere çekilen spermalar + 4 °C' da 2.5 saat ekilibrasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda spermalar -120 °C' daki sıvı azot buharında 15 dakika bekletilerek dondurulmuş ve sıvı azot içinde -196 °C' da saklanmıştır.

Ekilibrasyondan sonra ve 38 °C' da 15 saniyede çözülen payetlerden her bir sulandırıcı için anormal spermatozoa oranı ve anormal spermatozoa tipleri saptanmıştır. Bu çalışmada Chi-Square ve Duncan testi uygulanarak gruplar arası farklılıklar değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Çalışmada, farklı ırktan köpeklere ait başlıca spermatolojik özelliklerin genel ortalama değerleri sırasıyla ejakülat miktarında (ml.) 1.6 ± 0.2 , spermatozoa motilitesinde (%) 77.3 ± 1.9 , spermatozoa yoğunluğunda ($\times 10^6$ /ml.) 531.8 ± 80.5 , anormal spermatozoa oranında (%) 15.3 ± 6.0 , ölü spermatozoa oranında (%) 29.8 ± 4.1 ve spermanın pH değerinde 6.4 ± 0.1 kaydedilmiştir.

Araştırma süresince elde edilen toplam 11 ejakülatta ekilibrasyondan sonra anormal spermatozoa oranı Tris, Sodyum sitrat ve Ringerle sırasıyla % 22.6 ± 7.6 , % 23.7 ± 8.3 , % 27.4 ± 7.5 bulunurken, aynı spermatolojik özellik çözüm sonu % 34.7 ± 12.1 , % 46.9 ± 15.0 ve % 52.9 ± 12.5 saptanmıştır.

Ekilibrasyondan sonra Tris, Sodyum sitrat ve Ringerle akrozom bozukluğu % 4.3 ± 1.6 , % 4.2 ± 0.8 ve % 9.2 ± 2.6 olurken, çözüm sonu % 14.9 ± 2.7 , % 17.3 ± 2.8 ve % 28.4 ± 3.8 bulunmuştur.

Aynı sulandırıcılarla. protoplazmik damlacıklı spermatozoa oranı ekilibrasyondan sonra % 3.7 ± 1.1 , % 3.9 ± 1.6 ve % 4.1 ± 1.1 , çözüm sonu ise % 2.9 ± 1.6 , % 1.8 ± 0.8 ve % 1.5 ± 0.9 olurken, diğer orta kısım bozuklukları ekilibrasyondan sonra sırasıyla % 10.7 ± 2.9 , % 9.4 ± 2.8 ve % 11.0 ± 2.4 , çözüm sonu % 13.3 ± 5.7 , % 12.9 ± 3.4 ve % 18.8 ± 6.0 belirlenmiştir.

TARTIRMA VE SONUÇ

Araştırmada farklı ırk köpeklerden alınan toplam 11 ejakülatta başlıca spermatolojik özellikler değerlendirilmiştir. Bu özelliklere ilişkin değerlerin kimi araştırmacıların sonuçlarından değişik (16, 34) olması, ayrı ırktan köpeklerde (14, 15), farklı amaçlarla (20, 38) ya da değişik laboratuvar koşullarında (36) farklı değerlendirme yöntemlerinden kaynaklanmış olabilir.

Spermanın dondurulmasında spermatozoonların soğuk şokundan etkilenmeleri nedeniyle spermatolojik özelliklere ait değerler değişebilmektedir. Dondurma işlemleri sırasında sulandırma, ekilibrasyon süresi, donma ısısına ulaşma ile çözme ısı ve süresi de spermatozoonların etkilenmelerine neden olmaktadır. Değişik ve çeşitli oranlarda kryoprotektan-

ları içeren sperma sulandırıcılarının spermatozoonun değişik kısımlarına farklı koruyucu etki gösterdiği bilinmektedir. Sperma sulandırıcıları ve kryoprotektanlar bulunduğu ortamda madde alışverişini düzenleyerek, spermatozoa membranları çevresinde buz kristalizasyonlarının oluşmasını önleyerek, spermatozoonlara enerji vererek, ortamın ozmotik basıncını ve pH' sını ayarlayarak etkilerini gösterirler (26).

Genellikle 1:3 - 1:5 oranında sulandırılan köpek spermalarının dondurulmasında sulandırıcıya kryoprotektan olarak glyserol katılır. DMSO'nun yalnız başına ya da glyserolle birlikte kullanılması spermatozoa motilitesini ve anormal spermatozoa oranını olumsuz yönde etkilediğinden tercih edilmemektedir. Ayrıca köpek sperması sulandırıcıya değişik oranlarda katılan glyserol düzeylerini tolere edebilmektedir. Ancak optimal glyserol oranı % 4 -8 arasında kabul edilmektedir (28, 31).

Dondurulmuş köpek spermalarında spermatozoa motilitesi ile akrozom bütünlüğünün ve dolayısıyla fertilitenin korunması için payetlerin yüksek ısıda (75 °C) ve kısa sürede (6.5-12 saniye) çözülmesi önerilmektedir (23, 29). Andersen (4) Tris-fruktoz-sitratla dondurduğu spermaları 75 °C' da 6.5 saniyede çözerek % 40 çözüm sonu spermatozoa motilitesi saptamıştır.

Köpek spermalarında başlıca spermatozoa anomalileri orta kısımda meydana gelir ve çoğunlukla proksimal damlacıklar bulunur (25). Vesterlund-Carlsson (37) köpeklerde yaptığı bir çalışmada başa bağlı morfolojik bozukluklar, proksimal damlacıklar ve distal sitoplazmik damlacıkları sırasıyla % 20, % 60 ve % 28 saptamış ve proksimal damlacıklı spermatozoa oranı yüksek spermalardan düşük fertilitate elde ettiğini bildirmiştir. Çok fazla proksimal damlacıklı spermatozoa bulunduran sperma başarıyla dondurulamamaktadır. Dondurma işlemleri sırasında bu damlacıkların bütünlüğü bozulmakta, spermatozoanın baş ve boynuna yakın bölgelere yüksek konsantrasyonlarda yapılarındaki hidrolitik (lyzozomal) enzimler salınarak spermatozoa membranlarının parçalanmasına, erimesine ve değişik derecelerde morfolojik bozukluklara neden olmaktadır (Şekil 2). Oysa distal damlacıkların orta kısma bağlantısı sıkı değildir, ejakülasyondan sonra buldukları pozisyonlardan sıyrılıp seminal plazmaya geçerler. Böylece spermatozoa membranlarına daha az zararlı etkisi olur (24). Bundan dolayı distal sitoplazmik damlacıklar fertilitateyi etkilememektedir (13).

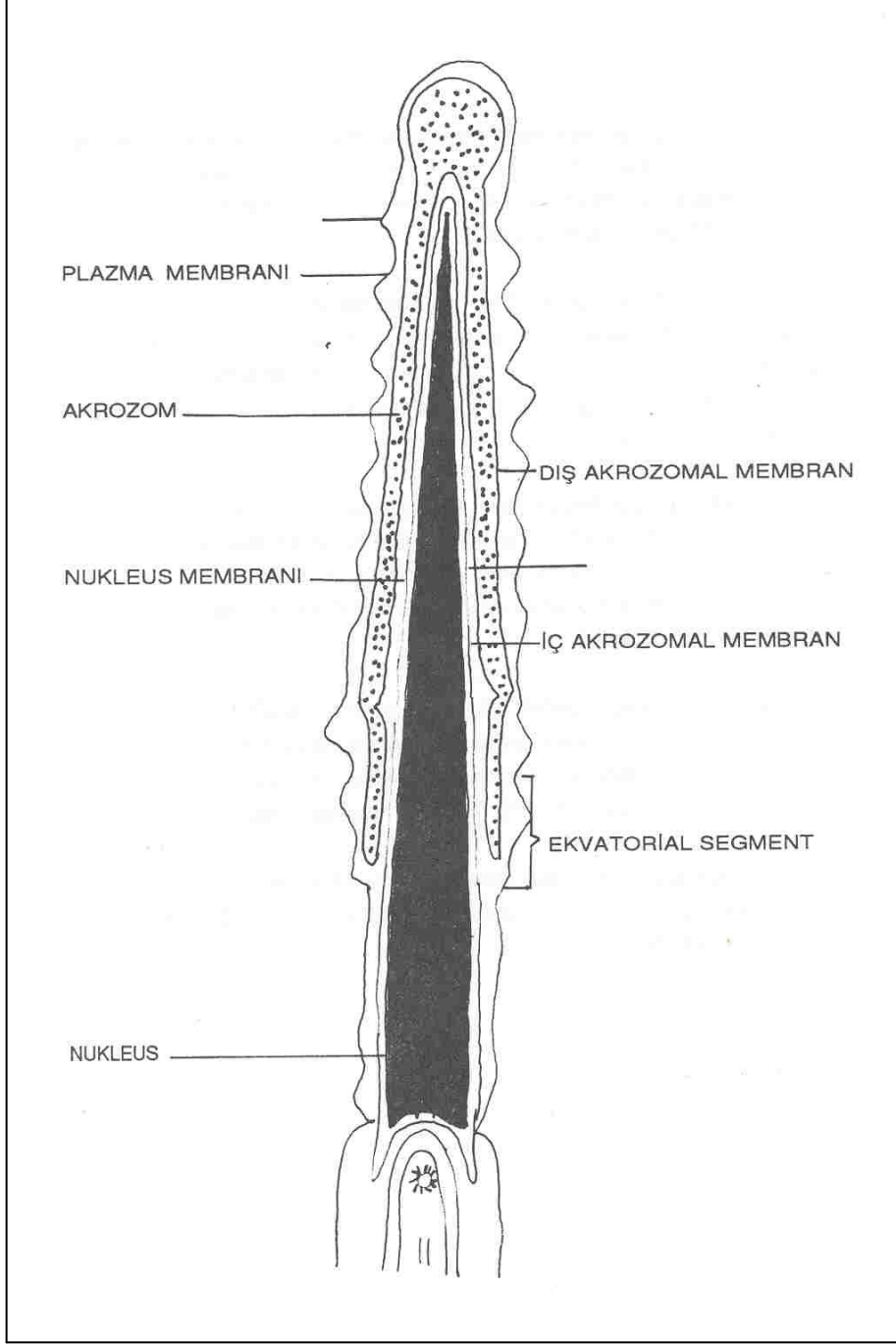
Sunulan çalışmada, nativ köpek spermalarında anormal spermatozoa oranı (% 15.3 ± 6.0) fertilitiyi etkilecek (% 20) boyutlara ulaşmamıştır. Orta kısım bozuklukları spermatozoanın diğer kısımlarına göre oldukça yüksek (% 10.3 ± 3.8) bulunmuştur.

Her üç sulandırıcı ile (Tris, sodyum sitrat, ringer) ekilibrazyondan sonra orta kısım bozuklukları artmış, ancak bu bozukluklar içinde protoplazmik damlacıklı spermatozoa oranı çok fazla değişmemiş (% 3.7 ± 1.1 , % 3.9 ± 1.6, % 4.1 ± 1.1), diğer orta kısım bozuklukları oldukça yükselmiştir (% 10.7 ± 2.9, % 9.4 ± 2.8, % 11.0 ± 2.4).

Dondurma işlemlerinin etkisiyle kullanılan üç sulandırıcı için spermatozoanın orta kısmına ait bozukluklar içinde protoplazmik damlacıklı spermatozoonların oranı çözüm sonu düşerken (% 2.9 ± 1.6, % 1.8 ± 0.8, % 1.5 ± 0.9), diğer orta kısım anomalileri önemli ölçüde artmıştır (% 13.3 ± 5.7, % 12.9 ± 3.4, % 18.8 ± 6.0).

Nativ spermada genel ortalama anormal spermatozoa oranı % 15.3 ± 6.0 saptanırken, ekilibrazyondan sonra sulandırıcıların spermatozoa morfolojisine etkisinde gözlenen farklılıklar önemsiz bulunmuş, oysa çözüm sonu bu farklılıklar önemli (P<0.01) kaydedilmiştir.

Sonuç olarak, çalışmada kullanılan sulandırıcılardan Trisin spermatozoa morfolojisindeki bütünlüğü koruması yönüyle diğerlerine üstün olduğu ortaya konmuştur.



Şekil 1. Köpekte spermatozoon başının dikey kesiti (27)

FARKLI SULANDIRICILARLA DONDURULAN KÖPEK SPERMATOZONLARINDA MORFOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER

Tablo 1. Taze köpekte spermalarında anormal spermatozoon tipleri ve yüzdeleri (%).

SPERMA KÖPEK	AKROZOM		BAŞ		ORTA KISIM				KUYRUK		TOPLAM		
	\bar{X}	\pm S \bar{x}	\bar{X}	\pm S \bar{x}	Protop Daml.		Diğer bozukl.		\bar{X}	\pm S \bar{x}	n	\bar{X}	\pm S \bar{x}
Genel Ortalama	0.5	0.2	0.1	0.1	10.3		3.8		4.4	2.3	11	15.3	6.0
					3.4	0.8	6.9	3.0					

Tablo 2. Köpekte spermalarında ekilibrazyondan sonra anormal spermatozoon tipleri ve yüzdeleri (%).

SPERMA SULANDIRICI	AKROZOM		BAŞ		ORTA KISIM				KUYRUK		TOPLAM		
	\bar{X}	\pm S \bar{x}	\bar{X}	\pm S \bar{x}	Protop Daml.		Diğer bozukl.		\bar{X}	\pm S \bar{x}	n	\bar{X}	\pm S \bar{x}
TRİS	4.3	1.6	0.5	0.3	14.4		4.0		3.4	1.7	11	22.6	7.6
					3.7	1.1	10.7	2.9					
SODYUM SİDRAT	4.2	0.8	0.3	0.1	13.3		4.4		5.9	3.0	11	23.7	8.3
					3.9	1.6	9.4	2.8					
RİNGER	9.2	2.6	0.4	0.2	15.2		3.5		2.6	1.2	11	27.4	7.5
					4.1	1.1	11.0	2.4					
Ö.D	-		-		-		-		-			-	

Ö.D. : Önemlilik Derecesi

-: Grup ortalamaları arası fark önemsiz.

Tablo 3. Köpekte spermalarında çözüm sonu anormal spermatozoon tipleri ve yüzdeleri (%).

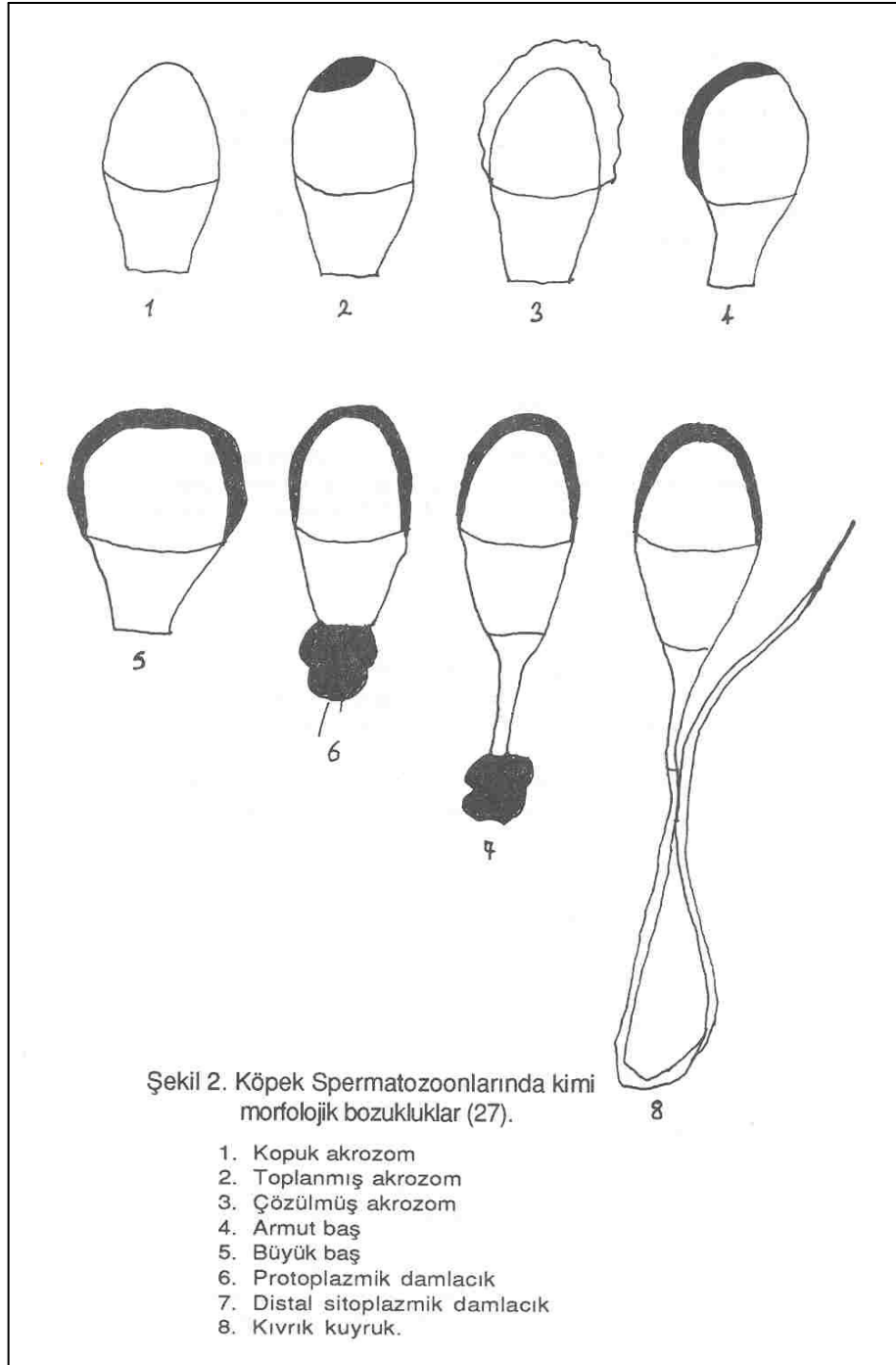
SPERMA SULANDIRICI	AKROZOM		BAŞ		ORTA KISIM				KUYRUK			TOPLAM		
	\bar{X}	\pm S \bar{x}	\bar{X}	\pm S \bar{x}	Protop Daml.		Diğer bozukl.		\bar{X}	\pm S \bar{x}	n	\bar{X}	\pm S \bar{x}	
TRİS	14.9 ^a	2.7	0.4	0.2	16.2		7.3		3.2 ^a	1.9	11	34.7 ^a	12.1	
					2.9	1.6	13.3	5.7						
SODYUM SİDRAT	17.3 ^a	2.8	0.5	0.2	14.7		4.2		14.4 ^b	7.8	11	46.9 ^{bc}	15.0	
					1.8	0.8	12.9	3.4						
RİNGER	28.4 ^b	3.8	1.3	0.4	20.3		6.9		2.9 ^a	1.4	11	52.9 ^c	12.5	
					1.5	0.9	18.8	6.0						
Ö.D	**		-		-		-		**			**		

Ö.D. : Önemlilik Derecesi

a,b,c : P<0.01 Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arası fark önemli.

** : P<0.01 Grup ortalamaları arası fark önemli

- : Grup ortalamaları arası fark önemsiz.



LİTERATÜR LİSTESİ

1. AGUIRRE, S. M., CAPAUL, E., LUCA, L. DE (1987) : Morphological and biochemical evaluation of fresh and cold-shocked dog semen. *Vet. Argen*, 4: 433-439.
2. ALIFANOV, İ. (1935): The influence of feeding on spermatogenesis in dogs *Skuzebn Sobohovod*. 1: 25-32.
3. ANDERSEN, K. (1969): Kunslig saedoverforing pa hund. (Artificial insemination in the dog). *Medlemsbl norske Vet. Foren* 21: 482.
4. ANDERSEN, K. (1975): İnsemination with frozen semen based on a new insemination technique. *Zuchthyg*, 10: 1-4.
5. ANDERSEN, K. (1980): Artificial insemination and storage of canine semen İn: *Current Theraphy in Theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in animals*. Ed. DA. Morrow. Philadelphia, W. B. Saunders, 661-665.
6. BARTLETT, D. J. (1962): Studies on dog semen. 1. Morphological characteristics. *J. Reprod. Fertil*, 3: 173-189.
7. BOUCHER, J.H., FOOTE, R.H., KİRK, R. W. (1958): The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequency of ejaculation upon semen quality, libido and depletion of sperm reserves. *Cornell Vet*, 48: 67-86.
8. BLOM, E. (1972): The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Atti del VII. Symp. İnt. Zootec, Mihano*, 125 -139.
9. CHATTERJEE, S.N., MEENAKSHİ-SHARMA, R.N., KAR, A.B.(1976): Semen characters of normal and asectomied dogs. *İnd. J. Ex. Biol*, 14: 411-414.
10. CONCANNON, P. W. (1991) : *Reproduction in the Dog and Cat*. İn: *Reproduction in Dornestic Animals*. Ed: Perry T. Cupps, Fourth edition, 545-546, Academic Press İnc., California, USA.
11. DUBİEL, A. (1976): Evaluation of semen properties and ejaculation reflex in dogs with reference to fertility. İn VIII th *İnt. Congr. Anim. Reprod. Artif. İnsem*. Krakow, July 12-16.
12. ENGLAND, G. C. W., ALLEN, W. E. (1990): An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculate. *Res. Vet. Sci.*, 49: 66-70.
13. FELDMAN, E. C., NELSON, R. W. (1987): Disorders of the canine male reproductive tract. İn : *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. Ed: E. C. Feldman, R. W., Nelson, Philadelphia, W. B. Saunders, 481-524.

14. FOOTE, R. H. (1964) : Extenders for freezing dog semen. *Am. J. Vet. Res.* 25: 37-39.
15. GOODMAN, M.F., CAİN, J.L. (1993): Retrospective evaluation of artificial insemination with chilled extended semen in the dog. *J. Reprod Fertil. Suppl.* 47: 554.
16. GÖKÇEN, H., SOYLU. M. K., TÜMEN, H. (1991) : Erkek köpeklerin kimi spermatolojik özellikleri üzerinde arařtırmalar. *U.Ü.Vet. Fak. Derg.* 10: 67-73.
17. GUNN, R. M. C. (1934): Artificial production of ejaculation and the character of the sperm of the resultant. *Vet. rec.* 14: 1379.
18. HANCOCK. J. L., ROWLANDS. İ. W. (1957): The physiologie of reproduction in the dog. *Vet. Rec.* 61: 771.
19. HARROP, A.E. (1960): *Reproduction in the Dog.* p 94 Bailliere. Tindall and Cox. London.
20. HENDRIKSE, J., ANTONİSSE. H. W. (1984) Evaluation of canine semen. *Tijd voor Diergenee.* 109: 171-178.
21. LİNDE-FORSBERG. C. (1991): Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Veterinary Clinics of North America: Sm. Anim. Prac.* 21: 467-484.
22. LİNDE-FORSBERG, C. (1994): Artificial insemination in the dog. *W.S.A.V A. XIX World Congress.* 606-611. Durban.
23. LİNDE-FORSBERG, C., FORSBERG, M. (1989): Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 39: 299-310.
24. MORTON, D. B., BURUCE, S. G. (1989): Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 39: 311-316.
25. OETTLE, E. E. (1982) : Preliminary report: A pregnancy from frozen centrifuged dog semen. *J. South Afr. Vet. Assec.*, 4: 269-270.
26. OETTLE, E. E. (1986): Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 12: 145-150.
27. OETTLE, E. E., SOLEY, J. T. (1988): Sperm abnormalities in the dog: A light and electron microscopic study. *Vet. Med. Rev.* pp. 59: 28-70.
28. OLAR, T. T., BOWEN, R.A., PİCKETT, B. W. (1989): Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology.* 31: 451-461.

29. POOLE, C. M., HOLMES, C. L., KENNAN, W. G., TOLLE, D. V. (1967): Estimation of semen quality in outbred and partially inbred Beagles. Rep. Argonne natn Lab. Bio/ Med. Res. div., ANL-7409: 281-283.
30. SCHEFELS, W. (1969): Obtaining semen from the dog by means of a vibrator. Dt. Tierarztl. Wschr 76: 289-290.
31. SEAGER, S. W. J. (1969): Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. Artif. İnsem. Digest. 17: 6.
32. SEAGER, S. W.J., PLATZ, C. C., FLETCHER, W. S. (1975): Conception rates and related data using frozen dog semen. 45: 189-192.
33. SMİTH. F. O. (1985): Cryopreservation of canine semen: Technique and performance. Diss. Abstr. İnt. B-Sci. Engineering 45: 3441.
34. SMİTH, F. O. (1986): Update on freezing canine semen. İn: Current Veterinary Therapy IX pp. 1243 -1248. Ed : R. W., Kirk, W. B. Saunders Co. Philadelphia.
35. SOUZA, J. A. T. (1987): A study of some semen traits in German Shepherd Dogs. rev. Facul. Med. Vet. Zoot. Univ. sao Paulo. 24: 104 -105.
36. VAH GEMERT, W. (1970); Pups from deep-frozen semen. Tijdschr Diergenee 95; 697-699.
37. VESTERLUND-CARLSSON, C. (1990): Semen quality in dogs. Svensk Veterinartidning, 42: 215 -219.
38. WİLSON, M. (1993): Non - surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. J. Reprod. Fertil. Suppl. 47: 307- 311.
39. YURDAYDIN, N., KOTZAB, E. (1987) : Köpek spermasının dondurulması üzerinde araştırmalar. A. Ü. Vet. Fak. derg., 34: 534 -540.