

Dondurulmuş Embrio Nakli Yapılan Düvelerde Kan Progesteron Hormonu Düzeyleri ile Gebe Kalma Oranları Arasındaki İlişki *

Erol ALAÇAM**

Tevfik TEKELİ**

Ramazan KADAK***

Mehmet GÜLER**

A. Nuri SEZER****

ÖZET

Bu çalışmada, dondurulmuş embrio nakli yapılan düvelerde kan serumu progesteron hormonu düzeyleri, embrioların gelişme aşamaları, kaliteleri ve gebe kalma oranları arasındaki ilişkiler araştırıldı.

Materyal olarak 7 günlük, dondurulmuş Brangus embrioları ile 64 adet 2-4 yaşlı İsviçre Esmeri dişe kullanıldı. Taşıyıcı olarak kullanılan düveler onbir gün ara ile iki defa 25 mg. Dinoprost tromethamine enjeksiyonu ile senkronize edildiler. İkinci enjeksiyondan sonra nakil günlerine kadar, 24 saat aralarla kan örnekleri toplandı. Ayrıca düveler enjeksiyon sonrasında östrüs belirtileri yönünden, hergün

* Bu çalışma Tarım, Orman ve Köyişleri Bakanlığı tarafından desteklenmiştir.

** Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Konya.

*** Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü, Konya.

**** Özel Nükleer Tıp Merkezi, Konya.

09.00 ve 16.00 saatlerinde gözlemlendiler. Nakilleri izleyen 13-15. günlerde östrüs belirtileri ve 45. günlerde ise rektal muayene ile gebelik bulguları araştırıldı. Kan serumu progesteron hormonu düzeyleri radioimmunoassay yöntemi ile ölçüldü.

Rektal yolla corpus luteumların sınıflandırılmasıyla kan progesteron değerleri arasında bir ilişki kurulamadı. Nakil günü progesteron hormonu düzeyleri 62 düvede 1 ng/ml. nin üzerinde iken, corpus luteum formasyonu geciken iki düvede 0.34 ve 0.54 ng/ml. olarak belirlendi ve bu iki hayvan gebe kalmadılar. Diğer düvelerde kan progesteron hormonu düzeyleri ile gebelik oranları arasında bir bağlantı görülmedi. Keza embrioların gelişme aşaması ve kaliteleri, progesteron hormonu düzeyleri ve gebelik oranları arasında da bir ilişki belirlenemedi.

Çalışma bulgularına göre, erken gelişme aşamasında ve iyi kaliteli embriolar ve kan progesteron düzeyleri 1 ng/ml. den yüksek düveler kullanılarak gebelik oranlarının yükseltilebileceği kanısına varıldı.

SUMMARY

Relationship Between Blood Progesterone Concentrations and Pregnancy Rate in Heifers Receiving Frozen-Thawed Embryos.

Relationship among blood progesterone concentrations, embryonic development stage, quality of embryos and pregnancy rates was investigated in heifers receiving frozen-thawed embryos.

Seven days old frozen Brahman embryos were non-surgically transferred to the 64 Brown-Swiss heifers. Recipients were synchronized by two Dinoprost trometamine injection 11 days apart. Estrous symptoms were detected by close observation two times in a day, Jugular blood samples were collected, with 24 hours intervals until transfer days, following 2 nd prostaglandin injections. Blood serum progesterone concentrations were detected by radioimmunoassay. Estrous and pregnancy symptoms were detected 13-15 and 45 days after the embryo transfers respectively.

No relation was found between rectal classification of corpora lutea and blood progesterone levels. Progesterone levels were higher than 1 ng/ml. in 62 out of 64 heifers. But no relation was found between pregnancy rates and progesterone levels. On the other hand, in two heifers progesterone concentrations were 0.34 and 0.54 ng/ml on transfer days due to delayed formation of corpora lutea and they weren't pregnant later. Also no relation was found among the quality and transfer stage of embryos, blood progesterone levels and pregnancy rates.

As a conclusion, looking the results of this study better embryo survival rates could be obtained by using best quality and early stage embryos and heifers having blood progesterone levels higher than 1 ng/ml. on transfer days.

Key words: Heifer, Frozen-Thawed Embryo, Blood Progesterone Concentration, Pregnancy Rate.

GİRİŞ

Embriyo nakli özette, fertilize olmuş ve normal gelişmesine devam eden zigot (ların) ana hayvanın uterus ya da ovidukt'undan alınarak hemen veya dondurularak kısa-uzun süre korunduktan sonra, aynı türden taşıyıcı bir hayvana nakli ve nakil-doğum süresini burada tamamlaması olarak tanımlanabilir.

Ülkemizde çeşitli hayvan türlerinde yapılan çalışmalarda, fare¹, tavşan², koyun³ ve inekte^{4,5} taze-dondurulmuş embriyo nakilleri ile başarılı sonuçlar alındığı bildirilmektedir.

İnek embriolarının ilk defa Wilmut ve Rowson⁶ tarafından dondurulduktan sonra başarıyla kullanılmasıyla, bu türde de kıymetli genetik materyalin kısa-uzun süreler fertil olarak saklanabileceği ortaya konulmuştur.

Hubbert ve Hopkins⁷, ana hayvandan elde edilen embrioların dondurulmasıyla uzun süreler saklanabileceğini, eldeki fazla embrioların uygun taşıyıcılar bulunana kadar korunabileceğini, etçi sürülerde aşım sezonu dışında toplanan embrioların aşım sezonunda hazır olarak kullanılabilceğini bildirmekte ancak yöntemin taze nakillerden daha masraflı olması ve donma-çözülme işlemleri sırasında embrioların ölmesi gibi olumsuz yönlerinin de bulunduğunu eklemektedirler.

Yapılan çeşitli çalışmaların sonuçlarına göre, taze embriyo nakilleri ile gebelik oranları % 60-80 iken, dondurulmuş embriyo nakilleri ile alınan sonuçlar % 30-50 arasında değişmektedir^{8,9,10}.

Dondurulmuş embriyo ile yapılan nakillerde başarıyı etkileyen faktörler arasında embrionun kalitesi, taşıyıcı hayvanların fertilitesi, seksüel siklusların senkronizasyonunun uygunluğu, dondurma-çözme işlemleri sırasında embrioda şekillenebilecek ultrastruktural değişimler ve uygulayıcının deneyimi önemli ölçüde rol oynamaktadır^{11,12,13,14}.

Araştırmacılar^{13,15}, embriyo nakillerinde yüksek bir gebelik şansı için verici taşıyıcı arasında iyi bir seksüel senkronizasyon sağlanması gerektiğini bildirmektedirler.

Wright¹⁶, yaptığı taze nakillerde, vericilerden 36, 24, 12 saat önce östrüs gösteren taşıyıcı dâvelerde gebelik oranlarını sırasıyla % 59, 61, 68 ve 0, 12, 24, 36 saat sonra gösterenlerde ise % 59, 61, 58, 41 olarak belirlemiştir.

Schneider ve ark.¹⁷, dondurulmuş embriyo nakillerinde taşıyıcılardaki senkronizasyon farklılığının + 12 saati geçmemesini önermektedirler.

McDonald¹⁸, pratik olarak nakiller sırasında taşıyıcıların bir ovaryumunda mutlaka genç corpus luteum'un palpe edilmesini önerirken, Remsen ve ark.¹⁹ ile Stubbings ve Walton²⁰, corpus luteum'u palpasyonla değerlendirmenin kan

progesteron hormonu yoğunluğunu tayin etmede bir ölçü olamayacağını ileri sürmektedirler.

Bazı araştırmacılar, embrio nakilleri sırasında kan progesteron hormonu yoğunluğunun embrionun yaşam şansı bakımından önemli bir faktör olduğunu bildirirken bazıları bu konuda progesteronun düşük ya da yüksek olmasının fazla önemi bulunmadığını iddia etmektedirler^{20,21,22}.

Stubbings ve Walton²⁰, taze ve dondurulmuş embriolarla yaptıkları çalışmalarda, taşıyıcı düvelerde nakil günü kan progesteron düzeylerinin 1-4 ng/ml arasında dağıldığını, yoğunluğun daha düşük belirlendiği düvelerde embrioların yaşama ve ölme oranlarının hemen hemen eşit olduğunu, ancak taze nakillerde 1 ng/ml nin altında gebelik oranlarında düşme olduğunu, dondurulmuşlarda ise 3 ng/ml nin altında düşmelerin başladığını eklemektedirler.

Maurer ve Echterkamp²², progesteron hormonu düşüklüğünün hormonal imbalansa bağlı olabileceğini ve bu durumda uterusu erkek-dişi gametler ya da embrio için uygun olmayan bir ortam şekillenerek fertilizasyon düşüklüğü ve erken embrionik ölümler görüleceğini ileri sürmektedirler.

Remsen ve ark.¹⁹, plazma progesteron yoğunluğu ile nakil sonucu gebelik oranları arasında önemli bir ilişki bulunduğunu, yoğunluk 2 ng/ml den az ise gebelik şansının azalacağını bildirmekte ve yaptıkları çalışmada nakil günü progesteron düzeyi <2, 2-5 ve > 5 ng/ml olan düvelerde sırasıyla % 20,75 ve 60 oranında bir gebelik sağladıklarını eklemektedirler.

Sunulan çalışmada ise, dondurulmuş embrio nakilleri yapılan düvelerde kan serumu progesteron hormonu düzeyleri, embrioların gelişme aşaması, kalitesi ve gebe kalma oranları arasındaki ilişkiler araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOT

I. Materyal:

Sunulan çalışmada, Tarım, Orman ve Köyişleri Bakanlığı tarafından ABD'nin Granada firmasından sağlanan Brangus (BrahmanXAngus) ırkı, 7 günlük, dondurulmuş embriolar ile taşıyıcı olarak Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsüne ait 64 adet, 2-4 yaşlı İsviçre Esmeri ırkından düve kullanıldı.

Deneme hayvanlarına yetiştirmenin olağan bakım ve besleme şartları dışında ayrı bir özen gösterilmedi.

II. Metot:

Taşıyıcı olarak seçilen düvelere öncelikle rektal muayene uygulanarak tubuler genital kanalın durumu ve ovaryumların siklik işlevleri kontrol edildi. Nor-

mal gelişmiş, ovaryum fonksiyonları sağlıklı ve devamlı olan hayvanlar embrio nakilleri için hazırlandılar.

Taşıyıcıların seksüel sikluslarını senkronize etmek amacıyla onbir gün ara ile iki defa Dinoprost tromethamine* i.m. enjekte edildi. İkinci Dinoprost enjeksiyonundan nakil gününe kadar 24 saat aralarla jugular kan örnekleri toplandı, serumları çıkartılarak laboratuvar analizlerine kadar - 20°C de saklandı. Ayrıca, ikinci enjeksiyon sonrasında düveler, 24 saatten başlanarak günde iki defa 09.00 ve 16.00 saatlerinde yarımşar saat gözlemlendiler. Östrüs belirtileri gösterenler rektal muayene ile doğrulandıktan sonra kaydedildiler.

Östrüsleri izleyen 7. günlerde, embrio nakillerinden önce taşıyıcılara yeniden rektal muayene uygulanarak, ovulasyon sonucu corpus luteum'un şekillendiği ovaryumlar belirlendi. Corpus luteum'lar büyüklüklerine ve derinliklerine göre, belirgin olanlar CL1, küçük olanlar ise CL2 olarak değerlendirildiler.

Daha sonra dondurulmuş embriolar çözülerek, stereo mikroskopta değerlendirilip, nakil için hazırlandılar. Değerlendirme embrioların gelişme aşamalarına ve kalitelerine göre yapıldı. Embrioların çözülmesi, değerlendirilmesi ve nakil işlemleri Sungur ve ark.⁵'nin bildirdiği şekilde uygulandı.

Taşıyıcı düvelerden toplanan kan örneklerinde serum progesteron hormonu düzeyleri, Konya Özel Nükleer Tıp Merkezinde, radioimmunoassay (RIA) yöntemiyle ve IAEA²³'ün tarif ettiği şekilde ölçüldü. Ölçümlerde Gamma Sayıcı (Mini assay tip, 6-20) ve direkt hormon analiz kiti (125 I Progesteron Analiz Kiti, IMM 1024)** kullanıldı.

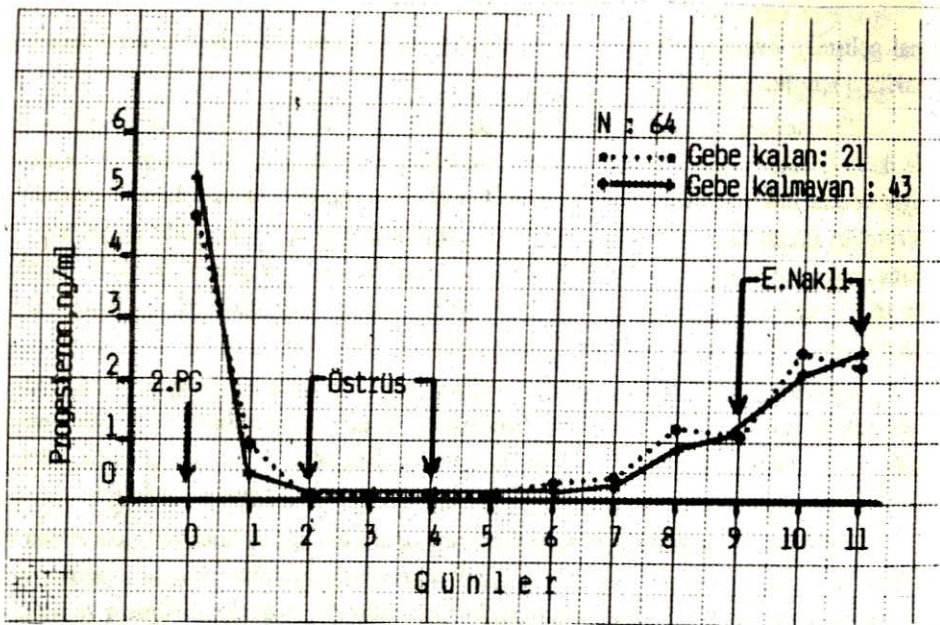
Embrio nakli yapılan düvelerde nakilleri izleyen 13-15 inci günlerde östrüs belirtileri ve 45. günlerde ise rektal muayene ile gebelik bulguları araştırıldı.

BULGULAR

Dondurulmuş embrio nakli yapılan düvelerde, seksüel siklusların denetlenmesi için uygulanan ikinci Dinoprost enjeksiyonundan başlanarak nakil gününe kadar toplanan kan serumu örneklerinin progesteron hormonu değerleri Grafik 1 ve 2'de, rektal yolla corpus luteum'ların sınıflandırılmasıyla progesteron düzeylerinin karşılaştırılması Tablo I'de, nakledilen embrioların gelişme aşamaları, progesteron değerleri ve gebelik oranları arasındaki ilişki Tablo II'de, embrioların kalitesi, kan progesteron düzeyleri ve gebelik oranları arasındaki ilişki de Tablo III'de sunulmuştur.

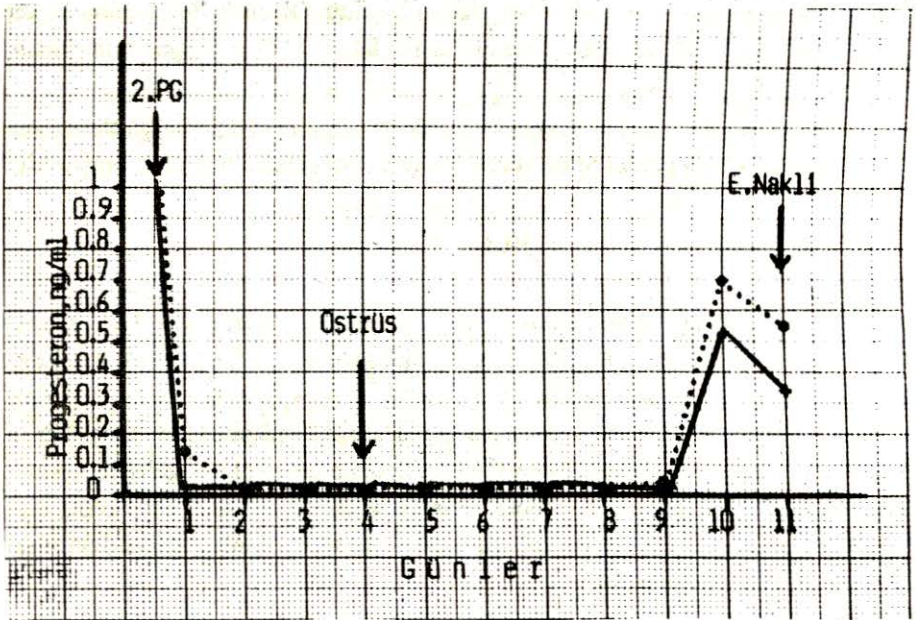
* Dinolytic, Enj. Sol., Eczacıbaşı.

** Immuchem Corp., A.B.D.



Grafik: 1

İkinci Dinoprost enjeksiyonundan nakillere kadar kan serumu progesteron hormonu yoğunlukları



Grafik: 2

İkinci Dinoprost enjeksiyonundan sonra corpus luteum formasyonu geciken iki düvede progesteron hormonu yoğunlukları

Tablo: I
Nakil Günü Rektal Yolla Corpus Luteum'ların Sınıflandırılması ve Serum Progesteron Düzeyleri

Corpus Luteum'un Kalitesi	N	Progesteron Hormonu Düzeyi (ng/ml)	Ortalama (ng/ml)
CL 1	25	1.40 — 2.80	2.10 $\bar{\pm}$ 0.25
CL 2	39	1.23 — 4.20	2.20 $\bar{\pm}$ 0.15

Tablo: II
Embrioların Gelişme Aşaması, Serum Progesteron Hormonu Düzeyleri ve Gebelik Oranları

Embriyonun Gelişme Aşaması	N	Nakil Günü Progesteron Düzeyleri (ng/ml)	Gebelik Oranı (%)
Morula	43	1.40 — 4.20 (2.27 $\bar{\pm}$ 0.19)	29.30
E. Blastosit	9	1.23 — 2.40 (1.71 $\bar{\pm}$ 0.35)	46.42
Blastosit	11	1.20 — 2.20 (1.58 $\bar{\pm}$ 0.15)	47.91
Ex. Blastosit	1	3.30	—

Tablo: III
Embrioların Kalitesi, Kan Progesteron Hormonu Düzeyleri ve Gebelik Oranları

Embriyonun Kalitesi	N	Nakil Günü Progesteron Düzeyleri (ng/ml)	Gebelik Oranı (%)
G 1	27	1.23 — 3.30 (2.10 $\bar{\pm}$ 0.27)	39.28
G 2	32	1.66 — 4.20 (2.34 $\bar{\pm}$ 0.27)	25.80

TARTIŞMA VE SONUÇ

Dondurulmuş embrio nakillerinde gebelik oranlarının taze nakillere göre daha düşük olması, nakledilen embrioların gelişme aşaması ve kalitesinin yanı sıra donma-çözme işlemleri sırasında şekillenebilecek ultrastruktural değişimler,

taşıyıcı hayvanların infertil olması ya da seksüel siklusların yeterince denetim altına alınamaması gibi olumsuz faktörlerle de yakından ilgilidir^{11.14.24}.

Uygulama sonuçlarına göre, dondurulmuş embrio ile yapılan nakillerde % 30-50 oranında gebelik bildirilirken^{8.9.10}, sunulan bu çalışmada % 32,81 lik bir gebelik oranı elde edilmiştir.

Nakiller sırasında senkronize taşıyıcı hayvanın ovaryumundaki corpus luteum'un niteliği ve kan progesteron hormonu değerlerinin yüksek olmasının gebelik şansı yönünden önemi hakkında değişik görüşler ileri sürülmektedir^{20.21.22}. Sunulan çalışmada, nakil günlerinde ovaryumlarda belirlenen corpus luteum'ların büyüklüklerine göre yapılan değerlendirmeler ile aynı hayvanların kan progesteron hormonu yoğunlukları arasında bir ilişki belirlenememiştir. Gerek CL1, gerekse CL2 olarak nitelendirilen düvelerde ortalama 2 ng/ml nin biraz üzerinde bir progesteron yoğunluğu ölçülmüştür (Tablo I). Bu konuda değişik araştırmacılar tarafından benzer sonuçlar elde edilmiştir^{10.19.22}. Remsen ve ark.¹⁹, gebelik şansındaki düşmelerin 2 ng/ml nin altında başladığını ve en yüksek gebelik oranına kan progesteron değerleri 2-5 ng/ml olan taşıyıcılarda ulaştıklarını bildirmektedirler. Stubbing ve Walton²⁰, nakil günü progesteron yoğunluğunun 1-4 ng/ml arasında dağıldığını, 1 ng/ml nin altında gebelik şansının azalacağını ve özellikle dondurulmuş embrio nakillerinde 3 ng/ml nin altında gebelik oranlarının olumsuz etkilenebileceğini ileri sürmektedirler. Sunulan çalışmada nakil günü progesteron değerleri, iki düve dışında, 1.23-4.20 ng/ml arasında belirlenmiştir. Bu değerlerle birlikte seksüel senkronizasyon amacıyla uygulanan ikinci Dinoprost tromethamine enjeksiyonundan başlayarak nakil gününe kadar belirlenen progesteron değerleri incelendiğinde (Grafik 1) gebe kalan ve kalmayan hayvanlar arasında önemli bir fark olmadığı görülmektedir. Ancak, 62 hayvanda nakil günü bu değerler 1 ng/ml nin üzerinde görülmektedir. Diğer taraftan iki düvede ikinci prostaglandin enjeksiyonundan sonra luteolizis'in şekillendiği ancak ovulasyonu izleyen corpus luteum formasyonunun geciktiği belirlenmiştir (Grafik 2). Bu hayvanlarda enjeksiyondan 24 saat sonra progesteron düzeyleri düşmüş ve nakil günleri de dahil olmak üzere, 0.34 ve 0.54 ng/ml olarak, 1 ng/ml nin altında kalmıştır. Düvelerin her ikisinde de gebelik şekillenmemiştir. Bu olgularda morula aşamasında ve G1 kalite embriolar kullanılmasına rağmen, progesteron hormonu düşüklüğünün embrioların yaşamını olumsuz etkilediği kanısına varılmıştır.

Çalışma sırasında 7. günde erken gelişme aşamasındaki iyi kaliteli embriolar ile en iyi sonuçlar alınmış ise de, embrionun kalitesi ve gelişme aşaması ile kan progesteron değerleri arasında, gebe kalma oranını etkileyecek bir ilişki belirlenememiştir.

Sonuç olarak, çalışma bulgularının yorumu yapıldığında, ovaryumlardaki corpus luteum'ların büyüklüğü ile periferik kandaki progesteron düzeyi arasında

bir ilişki kurulamayacağı, dondurulmuş embrio nakillerinde progesteron değerlerinin 1 ng/ml den yüksek olması gerektiği, ancak daha yüksek değerlerin gebe kalamayan hayvanlar yönünden farklılık göstermediği, nakledilen embrioların kalite ve 7. günde gelişme aşamalarının gebe kalma oranını etkilediği ancak bunlarla kan progesteron yoğunlukları arasında bir bağlantı kurulamayacağı kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. ÜNAL, E.F.: Farelerde embrio transferi, Doktora Tezi, A.Ü. Veteriner Fakültesi, Ankara (1983).
2. KILIÇOĞLU, Ç. ve TEKELİ, T.: Tavşanlarda embrio transferi. A.Ü. Vet. Fak. Derg., 28, 1-4, 23-25, (1981).
3. KILIÇOĞLU, Ç., ALAÇAM, E., İZGÜR, H. ve TEKELİ, T.: Koyunlarda embrio nakli üzerinde çalışmalar, Doğa Bilim Dergisi, 8, 3, 257-270, (1984).
4. İLERİ, K.: İneklerde embriyo transferi çalışması ve elde edilen sonuçlar, Veteriner Hekimliği Biyoteknoloji ve Embrio Transferi Paneli, 2 Ekim 1987, İzmir, (1987).
5. SUNGUR, H., ALAÇAM, E., TEKELİ, T., KADAK, R., PAKDİL, N. ve WHITAKER, R.O.: İsviçre esmeri düvelerde dondurulmuş embrio nakli uygulamaları. Lalahan Hay. Arş. Enst. Derg., 29, 1-4, 1-10, (1989).
6. WILMUT, I. and ROWSON, L.E.A.: Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos, Vet. Re., 92, 686-690, (1973).
7. HUBBERT, K.G. and HOPKINS, S.M.: Bovine embryo transfer-Present and future, Iowa State Veterinarian, 46, 2, 113-116, (1984).
8. GARCIA, M.A., FAHNING, M.L. and GRAHAM, E.F.: Invitro culture, freezing, thawing and transfer of bovine embryos versus transfer of fresh embryos from the same collection: Preliminary results, Theriogenology, 26, 6, 803-812, (1986).
9. GREVE, T. and JENSEN, H.L.: The effect of HCG administration on pregnancy rate following non-surgical transfer of viable embryos, Theriogenology, 17, 1, 91, (1982).
10. RENARD, J.P., OZIL, J.P. and HEYMAN, Y.: Cervical transfer of deep frozen cattle embryos, Theriogenology, 15, 3, 311-320, (1981).
11. BONDURANT, R.H., ANDERSON, G.B., BOLAND, M.P., CUPPS, P.T. and HUGHES, M.A.: Preliminary studies on bovine embryo survival following short-term storage at 4C, Theriogenology, 17, 2, 223-230, (1982).
12. KENNEDY, L.G., BOLAND, M.P. and GORDON, I.: The effect of embryo quality at freezing on subsequent development of thawed cow embryos, Theriogenology, 19, 6, 823-831, (1983).

13. SEIDEL, G.E. Jr., ELSDEN, R.P., TAKEDA, T. and FARRAND, G.D.: Field trials with cryopreserved bovine embryos, "As quoted" H, M. Beier and H.R. Linder (Editors), "Fertilization of The Human Egg In Vitro", Springer-Verlag Berlin, 343-352, (1983).
14. STRINGFELLOW, D.A., THOMPSON, M.S. and RIDDELL, K.P.: Morphological and quality assesment of transfer-stage bovine embryos, *Auburn Veterinarian*, 42, 2, 6-10, (1987).
15. ROWSON, I.E.A., LOWSON, R.A.S., MOOR, R.M. and BERKER, A.A.: Egg transfer in the cow: Synchronization requirements, *J. Reprod. Fert.*, 28, 427-431, (1972).
16. WRIGHT, J.M.: Non-surgical embryo transfer in cattle, embryo-recipient interactions, *Theriogenology*, 15, 1, 43-56, (1981).
17. SCHNEIDER, H.J. Jr., CASTLEBERRY, R.S. and GRIFFIN, J.L.: Commercial aspects of bovine embryo transfers, *Theriogenology*, 13, 73-85, (1980).
18. MCDONALD, G.K.: Current embryo transfer technology: *Canadian Vet. J.*, 42, 3, 49-50, (1986).
19. REMSEN, L.G., ROUSSEL, J.D. and KARIHALOO, A.K.: Pregnancy rates relating to plasma progesterone levels in recipient heifers at day of transfer, *Theriogenology*, 17, 1, 105, (1982).
20. STUBBINGS, R.B. and WALTON, J.S.: Relationship between progesterone concentrations and pregnancy rate in cattle receiving either fresh or previously frozen embryos. *Theriogenology*, 26, 2, 145-155, (1986).
21. HASLER, J.F., BOWEN, R.A., NELSON, R.D. and SEIDEL, G.E.: Serum progesterone concentrations in cows receiving embryo transfers. *J. Reprod. Fert.*, 58, 3, 71-77, (1980).
22. MAURER, R.R. and ECHTERNKAMP, S.E.: Hormonal asynchrony and embriyonic development, *Theriogenology*, 17, 1, 11-19, (1982).
23. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY: Laboratory Training Manual on Radioimmunoassay in Animal Reproduction, Technical Report Series, No: 233, Vienna, (1984).
24. SHEA, B.F., JANSEN, R.E., MCALLISTER, R.J. and MCDERMAND, D.P.: Freezing of bovine embryos: Effect of embryo quality, time from thawing to transfer and number frozen per vial, *Theriogenology*, 20, 2, 205-212, (1983).