

Kocatepe Vet.J (2014) 7(1): 33-37

DOI: 10.5578/kvj.7451

Submission: 13.02.2014

Accepted: 17.03.2014

ARAŞTIRMA MAKALESİ

RESEARCH ARTICLE

Farklı Sistemlerde Çözdürülen Dondurulmuş Boğa Spermasının İn Vitro Değerlendirilmesi#

Murat SELÇUK*, Eser AKAL, Muzaffer ÇELEBİ

ÖZET

Bu çalışmada dondurulmuş boğa spermasının belirli sıcaklıkta ve belirli sürede, su banyosu içerisinde ve kuru sistemde çözdürülmesinin spermatolojik parametreler üzerine etkisinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada aynı boğaya ait, aynı tarihte dondurulan ve aynı şartlarda saklanan dondurulmuş spermallerden her iki çözdürme yöntemi için 10'ar adet payet (0,25 ml) kullanılmıştır. Spermaller su sistemde 37,5 °C'lik su banyosunda 25 sn.'de, kuru sistemde ise 37,5 °C'de 25 sn.'ye ayarlanmış cihaz içinde çözdürülmüştür. Çözdürülen spermallerden, spermatolojik muayeneler için numuneler alınmış ve incelenmiştir. Spermatolojik parametrelerin incelenmesi sonucu motilite, ölü/canlı oranı, hipo-ozmotik şişme testi (HOST) değerleri ile baş, orta, kuyruk ve toplam anormal spermatozoa oranları yönünden her iki yöntem arasında önemli bir fark saptanmamıştır. Her iki yöntem arasında sadece akrozom bozuklukları yönünden önemli bir farklılık bulunmuştur. Kuru sistemde çözdürülen spermatozoonlardaki akrozom bozuklukları (%1,5±0,30) sulu sistemde çözdürülenlerden (%0,5±0,16) daha yüksek (P<0,05) bulunmasına rağmen kabul edilebilir sınırlar içerisindeydi. Sonuç olarak kuru sistem cihazının, içindeki ısıyı daha uzun süre muhafaza edebilmesi (~10 dakika), çözdürmede spermaya su karışma riskinin olmaması, ahır şartlarında su sıcaklığının ayarlanması ve soğuk havalarda bunun muhafaza zorluğunun bulunmaması gibi nedenlerden dolayı spermanın kuru sistemde çözdürülmesinin daha avantajlı olabileceği düşünülmektedir.

● ● ●

SUMMARY

In Vitro Evaluation of Frozen Bull Sperm Thawed in The Different Systems

The aim of this study was to evaluate the effect of frozen bull sperm thawed in a water bath and dry thawing system within certain time at a certain temperature on spermological parameters. Ten straws (0.25 ml) containing of the frozen bull sperm belonging to same bull, frozen at the same date and stored under same conditions were used in the study. Straws were thawed at 37.5 °C for 25 sec in a water bath and dry thawing system. Sperm samples were obtained from the each thawed sperm and evaluated for spermatological parameters. There was no difference in the percentage of motility, dead/live spermatozoa rate, hypo-osmotic swelling test (HOST) values, abnormal spermatozoa rates (head, middle, tail parts of spermatozoa and total abnormal spermatozoa) in the study. Although acrosomal disorders of spermatozoa thawed in dry thawing system (1.5%±0.30) were significantly higher (P<0.05) than those of thawing in warm water thawing system (0.5%±0.16), acrosomal disorders of the spermatozoa were acceptable. In conclusion, the dry thawing system can have some advantages due to the fact that dry thawing system device can sustain its heat longer time (~10 min), there is no risk of mixing sperm with water, lack of difficulty in adjusting the water temperature in the barn conditions or keeping the certain water temperature in cold weather conditions.

Anahtar Kelimeler

Boğa
Çözdürme
Kuru Sistem
Sperma

Key Words

Bull
Thawing
Dry System
SemenOndokuz Mayıs Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Dölerme ve Suni Tohumlama AD
Samsun / TÜRKİYE

Bu çalışmanın bazı parametreleri V. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, Ekim 01-04,2009, Elazığ'da sunulmuştur. Çalışmada kullanılan kuru sistem çözdürme cihazını sağlayan GENOVET Genetik Org. Vetr. Malz. İth. İhr. Paz. Ltd. Şti.'ne teşekkür ederiz.

*Corresponding author

Email: mselcuk@omu.edu.tr

GİRİŞ

Spermanın dondurulması ve çözdürülmesi işlemleri spermatozoon membranı üzerinde spermatozoon canlılığının ve fertilizasyon yeteneğinin azalmasına neden olan fiziksel ve kimyasal stres meydana getirmektedir. Suni tohumlama prosedüründe, spermanın çözdürülmesi sırasında ve tohumlama işlemi sonrasında spermatozoon farklı sıcaklık derecelerine ve osmotik basınçlara maruz kalmaktadır. Spermanın ani sıcaklık değişimlerine maruz kalması spermatozoa motilitesini ve morfolojisini olumsuz etkileyen soğuk şokuna neden olmaktadır (Yavasca ve ark 1999, Zeng ve Terada 2001). Osmotik şok spermatozoanın canlı kalma potansiyelini azaltır ve membran bozukluklarına neden olur (Correa ve Zavos 1995, Correa ve ark 1997). Spermanın çözdürülmesi, en az dondurulması kadar spermatozoa canlılığı üzerine etkilidir (İleri ve Ak 1993). Birçok araştırmacı (Robbins ve ark 1976, Dhama ve ark 1992, Nur ve ark 2003) dondurulmuş boğa spermasının hızlı çözdürülmesinin genellikle spermatozoa motilitesini ve akrozom bütünlüğünü olumlu yönde etkilediğini ifade etmektedir. Genel olarak, spesifik bir öneri yapılmadığında ve sulandırıcı tipi ile dondurma prosedürü dikkate alınmadığında payetlerde dondurulmuş boğa spermasının bir su banyosu içinde 33-35 °C'de 30-40 sn. içerisinde çözdürülebileceği belirtilmektedir (DeJarnette ve ark 2000, DeJarnette ve Marshall 2005). Bununla beraber, 0,25 ml'lik payette dondurulmuş boğa spermasının 37 °C'de 30 sn. içerisinde çözdürülebileceği de belirtilmektedir (Underwood ve ark 2010). Çözdürme işlemi sonrasında spermatozoanın fertilizasyon yeteneği büyük ölçüde çözdürme sıcaklığı ve süresi gibi işlemlerden etkilenmektedir (Senger 1980). Yapılan bazı çalışmalarda (Rodriguez ve ark 1975, Senger 1980, Dhama ve ark 1992, Nur ve ark 2003) 60-80 °C gibi yüksek sıcaklıklarda uygulanan çözdürme işleminin çözüm sonrası spermatozoa motilitesini olumlu yönde etkilediği belirtilmektedir. Muino ve ark (2008) tarafından yapılan bir çalışmada 0,25 ml'lik payetlerde dondurulmuş boğa spermasının 37 °C'de 40 sn., 50 °C'de 15 sn. ve 70 °C'de 5 sn. süreyle çözdürülmesinin spermatozoa motilitesi, plazma ve akrozom membran bütünlüğü üzerine herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığı ifade edilmektedir. Dondurulmuş sperma kalitesinin belirlenmesinde spermatozoa motilitesi, morfolojisi ve akrozom bütünlüğünü içeren rutin sperma analizleri, hipozmotik şişme testi (HOST) gibi değerlendirmeler kullanılabilir (Hafez 1993). HOST boğa spermatozoon membranlarındaki ufak değişikliklerin saptanmasında kullanılabilen bir testtir (Vazquez ve ark 1997). Yapılan bu çalışmanın amacı payetlerde dondurulmuş boğa spermasının su banyosunda 37,5

°C' de 25 sn. çözdürme yöntemi ile aynı sıcaklık derecesi ve süresinde kuru sistem çözdürme yöntemiyle çözdürülmesinin spermatolojik parametreler üzerine etkisinin incelenmesidir.

MATERYAL VE METOT

Çalışmada aynı boğaya ait, aynı tarihte dondurulup, aynı şartlarda saklanmış, özel bir ithalatçı firmadan temin edilen dondurulmuş spermallerden her iki çözdürme yöntemi için 10'ar adet payet (0,25 ml) kullanılmıştır. Spermalar sulu sistemde 37,5 °C'lik su banyosunda 25 sn.'de, kuru sistemde ise 37,5 °C'de 25 sn.'ye ayarlanmış kuru sistem sperma çözdürme cihazı (Şekil 1) içinde çözdürülmüştür. Çözdürülen spermallerden spermatolojik muayeneler için numuneler alınmış ve incelenmiştir.



Şekil 1. Kuru sistem sperma çözdürme cihazı

Figure 1. Dry system sperm thawer device

Spermatolojik Muayeneler

Spermatolojik muayenelerden spermatozoa motilitesi (%), ölü/canlı spermatozoa oranı (%), anormal spermatozoa oranı (%), HOST (+) oranı (%) saptandı (3).

Motilite Muayenesi

Muayene ısıtma tablalı, faz-kontrast mikroskop (Olympus CX41) kullanılarak yapıldı ve yüzde olarak belirlendi. Spermadan küçük bir damla alınarak 37 °C'ye ayarlanmış ısıtma tablalı

mikroskoba konulan lam üzerine konuldu, lamel ile kapatılıp 20X büyütmede spermatozoonların hareketlerinin incelenmesi yapıldı. Böylece bir yönde güçlü hareket eden spermatozoonların hareketsiz veya diğer hareket biçimi gösterenlere oranı en az birbirinden farklı üç mikroskop alanında ölçülmesi ile ortalaması alınarak yüzde olarak saptandı (Tekin N 1994).

Ölü/Canlı Spermatozoa Oranı (%)

Boyama yöntemiyle (%3'lük sodyum sitrat içinde %2'lik olarak hazırlanan Eosin solüsyonu) ölü/canlı spermatozoa oranları yüzde olarak belirlendi. Bu işlem 37 °C'ye ısıtılmış lam, lamel ve %2'lik Eosin boya ile yapıldı. Bir damla sperma, iki damla Eosin ile karıştırılıp bir lam üzerine froti çekildi. 15 saniye boyunca kurumaya bırakılan slaytlar mikroskopta 20X büyütme ile 400 spermatozoon sayılarak, boya alan (ölü hücrelerin) spermatozoonların sayısı yüzde olarak belirlendi (Tekin N 1994).

Anormal Spermatozoa Oranı (%)

Hancock+Eosin (0,167 gr Eosin 10 ml distile su içerisinde çözdürülerek elde edilen stok Eosin solüsyonundan iki damla, 1 ml Hancock solüsyonu ile karıştırılarak hazırlandı) solüsyonu kullanılarak belirlendi (Yıldız ve ark 2000).

Anormal spermatozoa oranı (%), 1 ml Hancock-Eosin solüsyonu, bir damla sperma numunesi ile karıştırılarak 100X büyütmede 400 spermatozoon sayılarak baş, akrozom, orta kısım, kuyruk anomalileri ve toplam spermatozoa anomalileri oranı yüzde olarak belirlendi.

HOS Testi

Spermatozoon membranının fonksiyonel bütünlüğünü değerlendirmek amacıyla hipo-ozmotik şişme testi yapıldı. Bu teste 37 °C'deki, 100 mOsm değerindeki hipo-ozmotik bir solüsyondan (distile su içerisinde hazırlanmış 75 mM fruktoz ve 25 mM sodyum sitrat) 1 ml bir ependorf tüpe aktarıldı. Bu hipo-ozmotik solüsyona çözdürülmüş spermadan 100 µl ilave edilerek karıştırıldı ve 60 dk. boyunca 37 °C'lik etüvde inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda bu karışımdan 37 °C'ye ayarlanmış faz-kontrast bir mikroskopun ısıtma tablası üzerindeki lam üzerine 15 µl alınarak lamel kapatıldı ve 40X büyütmede 200 adet spermatozoon sayılarak muayenesi yapıldı. Şişme hali spermatozoonda bir sarmal kuyruk ile karakterizedir ve plazma membranının sağlam olduğunu göstermektedir (Revell ve Mrode 1994, Martinez ve ark 2006).

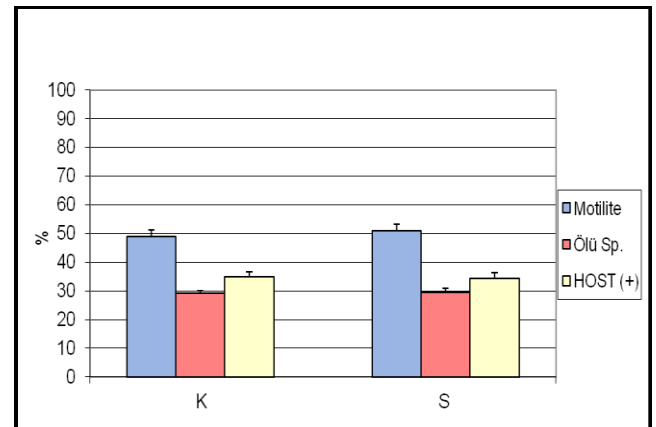
İstatistik

Motilite ve HOST için normal dağılıma uygunluk testi yapıldıktan sonra tek yönlü varyans analizi uygulandı. Ortalamalar arası farkın önemli bulunduğu durumlarda DUNCAN Çoklu Karşılaştırma Testi uygulanarak ortalamalar arası farklar belirlendi. Baş, akrozom, kuyruk ve toplam anormal spermatozoa oranı gibi sayılarak elde edilen gözlem değerleri için Poisson ve Binom dağılışına uygunluk testi yapıldıktan sonra, Genelleştirilmiş Doğrusal Modeller yöntemine göre logaritmik bağlantı fonksiyonu kullanılarak analiz edildi. Ortalamalar arası farkların önemli bulunduğu durumlarda grup ortalamaları arasındaki farklılıklar t oran testi ile belirlendi (Moore ve McCabe 1993). İstatistik analizler ve tanıtıcı istatistikler SAS (2009) istatistik paket programı kullanıldı.

BULGULAR

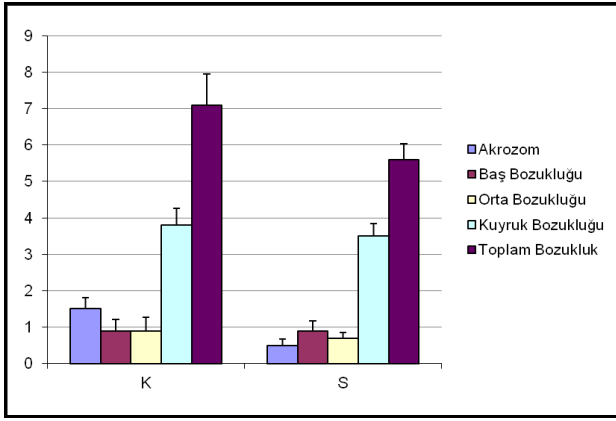
Yapılan bu çalışmada sulu sistemde 37,5 °C'lik su banyosunda 25 sn.'de ve kuru sistemde 37,5 °C'de 25 sn.'ye ayarlanmış kuru sistem sperma çözücü cihazı içinde çözdürülen boğa spermalarına ilişkin motilite, ölü/canlı oranı ve HOST değerleri Grafik 1'de sunulmuştur. Akrozom, baş, orta, kuyruk ve toplam anormal spermatozoa oranları ise Grafik 2'de verilmiştir.

Yapılan bu çalışmada spermatolojik incelemeler sonucu motilite, ölü/canlı oranı, HOST değerleri ile akrozom, baş, orta, kuyruk ve toplam anormal spermatozoa oranları yönünden her iki yöntem arasında önemli bir fark saptanmamasına rağmen, akrozom bozuklukları yönünden farklılık önemli ($P < 0,05$) bulunmuştur.



Grafik 1. Çözdürme sonrası motilite, ölü spermatozoa oranı ve HOST (+) parametreleri (K: Kuru çözdürme sistemi S: Sulu çözdürme sistemi)

Graph 1. After thawing motility, dead sperm and HOST (+) parameters (K: Dry thawing system S: Water thawing system)



Grafik 2. Çözdürme sonrası anormal spermatozoa parametreleri (K: Kuru çözdürme sistemi S: Sulu çözdürme sistemi)

Graph 2. After thawing abnormal spermatozoa parameters (K: Dry thawing system S: Water thawing system)

TARTIŞMA

Suni tohumlamada kullanılacak olan dondurulmuş boğa spermasının fertilité yeteneğinin tespit edilmesinde spermatolojik analizler önem taşımaktadır. Suni tohumlamada kullanılacak olan spermanın kalitesinin belirlenmesinde spermatozoa motilitesinin saptanması önem taşır. Bununla beraber bazı araştırmacılar (Brito ve ark 2003, Tartaglione ve Ritta 2004) dondurulmuş-çözdürülmüş spermanın HOST sonuçlarının boğa spermasının *in vitro* fertilizasyon için potansiyel fertilitésinin saptanmasında kullanılabileceğini ifade etmiştir. Padrik ve ark (2012) tarafından yapılan genç ve ergin boğa spermalarının değerlendirildiği bir araştırmada dondurulmuş boğa sperması 35 °C'lik su banyosunda 20 sn. süreyle çözdürülmüş ve çözüm sonrası motilité değeri ortalama % 63,1, uygulanan HOST (+) sonucu ortalama %34,3 bulunmuştur. Yapılan bu çalışmada spermanın iki farklı metotla (37,5 °C'lik su banyosunda 25 sn.'de ve kuru sistem sperma çözücü cihaz ile 37,5 °C'de 25 sn.) çözdürülmesi sonrası motilité değerleri sulu sistemde ortalama %51, kuru sistemde %49 olarak bulunmuştur. Söz konusu bu parametreye ilişkin sonuçlar Padrik ve ark (2012)'nin bildirdiğinden daha düşük olmasına karşın kendi içerisinde benzerlik göstermiştir. Bununla beraber yapılan bu araştırmanın motilité değerleri Gadea ve ark (2004) tarafından yapılan çalışmanın dondurulmuş-çözdürülmüş boğa spermasının ortalama motilité değeri (ortalama %50) ile benzer bulunmuştur. Dondurulmuş-çözdürülmüş boğa spermasına ilişkin motilité değerleri çalışmalarda kullanılan boğaların bireysel farklılıklarına, araştırmada kullanılan sulandırıcılara ve metotlara bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir.

Yapılan bu araştırmanın çözüm sonrası HOST (+) sonuçları sulu sistemde ve kuru sistemde sırasıyla ortalama % 34,4 ve % 34,8 olarak bulunmuştur. Çalışmadan elde edilen bu sonuç Padrik ve ark (2012)'nin HOST sonucu ile uyum göstermektedir. Yapılan bu çalışmanın sulu ve kuru sistemle çözdürülen dondurulmuş boğa spermasının baş ve orta kısım anomalilerine ilişkin değerler Tuncer ve ark (2005)'nin bildirdiğinden daha düşük, kuyruk anomalisine ilişkin değerler ise benzerdir. Sulu sistemde çözdürülen boğa spermasının akrozom anomalisi benzer değerlere sahipken, kuru sistemde çözdürme sonrası aynı parametreye ilişkin değer daha yüksek bulunmuş, ancak kabul edilebilir sınırlar içerisinde. Bununla beraber, yapılan bu çalışmada kuru sistem ile çözdürülen spermanın toplam anormal spermatozoa oranı ile Tuncer ve ark (2005)'nin aynı parametre için bildirdiği değer benzer olmasına karşın, sulu sistem ile çözdürülen spermalardaki değer daha düşük bulunmuştur. Her iki çalışmanın sonuçları arasındaki farklılıklar kullanılan sulandırıcı ve dondurma metoduna verdiği tepkiden kaynaklı olabileceğine bağlanmıştır.

SONUÇ

Sonuç olarak kuru sistem cihazının, içindeki ısıyı daha uzun süre muhafaza edebilmesi (~10 dakika), çözdürmede spermaya su karışma riskinin olmaması, payetin silinme gerekliliğinin bulunmaması, tabla üzerinde tohumlama katateri için ısıtma bölümünün bulunması ve ahır şartlarında sulu sistemde su sıcaklığının ayarlanması ve soğuk havalarda bunun muhafaza zorluğunun kuru sistemde bulunmamasından dolayı spermanın kuru sistemde çözdürülmesinin daha avantajlı olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Brito LFC, Barth AD, Bilodeau-Goeseels S, Panich PL, Kastelic JP.** Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with *in vitro* fertilization rate. *Theriogenology*. 2003; 60: 1539-1551.
- 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.
- Correa JR, Zavos PM.** Frozen-thawed bovine spermatozoa diluted by slow or rapid dilution method: measurements on occurrence of osmotic shock and sperm viability. *Theriogenology*. 1995;44: 963-971.
- DeJarnette JM, Barnes DA, Marshall CE.** Effects of pre- and post-thaw thermal insults on

- viability characteristic of cryopreserved bovine semen. *Theriogenology*. 2000; 53: 1225-1238.
- DeJarnette JM, Marshall CE.** Straw-thawing method interacts with sire and extender to influence sperm motility and conception rates of dairy cows. *J Dairy Sci*. 2005; 88: 3868-3875.
- Dhami AJ, Sahni KL, Mohan G.** Effect of various cooling rates (from 30 °C to 5°C) and thawing temperatures on the deep-freezing of *Bos Taurus* and *Bos Bubalis* semen. *Theriogenology*. 1992;38: 565–574.
- Gadea J, Selles E, Marco MA, Coy P, Matas C, Romar R, Ruiz S.** Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation . Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology*. 2004; 62: 690-701.
- Hafez ESE.** Semen evaluation, In : *Reproduction in farm animals*, Ed; Hafez ESE, 6th edition, Lea and Febiger, Philadelphia. 1993;pp: 405-423. 1993.
- İleri IK, Ak K.** Payet yöntemine göre dondurulmuş boğa spermalarının eritilmesinde eritme ısısı ve sürelerinin spermatozoitlerin motilite ve akrozom yapıları üzerine etkileri. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi ve Munich Ludwig-Maximilian Üniversitesi Veteriner Fakültesi Turk-Alman Gunleri, 29-30 Nisan-Mayıs Tebliğler, 58-62. 1993.
- Martinez CO, Mosqueda MLJ, Hernandez J, Valencia J.** Cryopreservation of bull spermatozoa alters the perinuclear theca. *Theriogenology*. 2006; 66:1969–1975
- Moore DS, McCabe GP.** Introduction to the practice of statistics. Second Ed. W.H. Freeman and Company New York. 1993; pp: 854.
- Muino R, Rivera MM, Rigau T, Rodriguez-Gil JE, Pena AI.** Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. *Anim Reprod Sci*. 2008; 109: 50-64.
- Nur Z, Dogan I, Soylu MK, Ak K.** Effect of different thawing procedures on the quality of bull semen. *Revue Med Vet*. 2003; 154: 487-490.
- Padrik P, Hallap T, Kaart T, Bulitro T, Jaakma Ü.** Relationship between the results of hypo-osmotic swelling tests, sperm motility, and fertility in Estonian Holstein dairy bulls. *Czech J Anim Sci*. 2012; 57: 490-497.
- Revell SG, Mrode RA..** An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim Reprod Sci*. 1994; 36: 77-96
- Robbins PK, Saacke RG, Chandler PT.** Influence of freeze rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in frech straws. *J Anim Sci*. 1976; 42: 145–154.
- Rodriguez OL, Berndtson WE, Ennen BD, Pickett BW.** Effect of rates of freezing, thawing and level of glycerol on the survival of bovine spermatozoa in straws. *J Anim Sci*. 1975; 41: 129-135.
- SAS** SAS Stat Software. SAS Campus Drive Cary, NC. 27513, USA. 2009.
- Senger PL.** Handling frozen bovine semen-factors which influence viability and fertility. *Theriogenology*. 1980; 13: 51-62.
- Tartaglione CM, Ritta MN.** 2004. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of *in vitro* fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 62, 1245–1252.
- Tekin N.** Spermanın muayenesi ve değerlendirilmesi. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Sun'ı Tohumlama, Doğum ve İnfertilite (Alaçam A, ed). Dizgiyevi, Konya, Turkey. 67-79. 1994.
- Tuncer PB, Çevik M, Demiral ÖO, Kinet H.** Boğa spermalarının iki farklı sulandırıcı ile dondurulması ve *in vitro* değerlendirilmesi. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*. 2005; 2 (2), 65-71.
- Underwood SL, Bathgate R, Ebsworth M, Maxwell WMC, Evans G.** Pregnancy loss in heifers after artificial insemination with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed dairy bull sperm. *Anim Reprod Scie*. 2010; 118: 7-12.
- Yavasca I, Ak K, İleri IK.** Einwirkungen verschiedener umgebungstemperaturen und besamungszeiten auf die fertilität der nach paillettenverfahren tiefgefrorenen und aufgetauten bullenspermien (in German). *J Fac Vet Med Istanbul Univ*. 1999; 25: 215-223.
- Vazquez JM, Maertinez EA, Martinez P, Garciaartiga C, Roca J.** Hypo-osmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing the sperm membrane. *Theriogenology*. 1997; 47: 913-922.
- Yıldız C, Ataman MB, Kaya A, Tepeli C, Lehimcioğlu 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
- Zeng WX, Terada T.** Protection of boar spermatozoa from cold shock damage by 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Theriogenology*. 2001; 55: 615-627.