

**BOĞA SPERMATOZOONLARININ *İN-VİTRO* KAPASİTASYONU ÜZERİNE
GLUKOZUN ETKİSİ
(Effect of Glucose on *In-vitro* Capacitation of Bull Spermatozoa)**

İlker SERİN¹ Necmettin TEKİN² Ergun AKÇAY² Ahmet CEYLAN¹

¹ Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Reprodüksiyon Hastahkları AD. -AYDIN

² Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama AD. -ANKARA

ÖZET

Bu araştırmada, glukozun dondurulmuş boğa spermatozoonlarının *in-vitro* kapasitasyonu üzerine etkisi araştırıldı. Bu amaçla sperma, 5 mM glukoz içeren (HG) ve glukoz içermeyen (H) mediumlarda 100 µg/ml heparin ile 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Heparin ile kapasitasyonun sağlanmasıdan sonra her iki gruba da 100 µg/ml lizofosfatidilkolin (LC) ilave edilerek akrozom reaksiyonunu indüklendi. Meydana gelen reaksiyon, Giemsa ile yapılan boyamayla tespit edildi. Boyama sonucunda reaksiyon geçirmeyen spermatozoonların akrozomu koyu pembe boyanırken reaksiyon geçirenler boya almadan kaldı. HG grubu için reaksiyon geçirmiş spermatozoon ortalamaları %20.8 olurken, H grubu için bu oran %43.4 olarak tespit edildi. Sonuç olarak; sperma heparin ile kapasitasyon koşullarında inkübe edildiğinde ortamda bulunan glukoz, kapasitasyona uğramış spermatozoon oranlarında azalmaya ($p<0.001$) neden oldu.

Anahtar sözcükler: Boğa spermatozoonu, spermatozoon kapasitasyonu, heparin, glukoz.

SUMMARY

In this study, the effect of glucose on *in-vitro* capacitation of frozen-thawed bull semen was investigated. For this purpose, sperm were incubated with a dose of 100 µg/ml heparin in the presence (HG) or absence of 5 mM glucose (H) for a 60 min. Heparin induced capacitation was determined by the undergo an acrosome reaction upon exposure to 100 µg/ml lysophosphatidylcholine (LC). To be able to determine the reaction, spermatozoa were stained by Giemsa. The acrosome stained dark pink for the non-reacted sperm and remain unstained for the reacted sperm. Mean proportions of acrosome reacted spermatozoa for the HG and H groups were 20.8% and 43.4% respectively. Consequently, when sperm were incubated under capacitating conditions with heparin plus glucose reduced the LC induced acrosome reactions ($p<0.001$).

Key words: Bull spermatozoa, spermatozoa capacitation, heparin, glucose.

GİRİŞ

Spermatozoa kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonu (AR), fertilizasyon olayının başlangıcında, spermatozoonun ovumun katmanlarını geçebilmesi için gerekli olan fizyolojik olaylardır. Kapasitasyonun başlangıç aşamalarını spermatozoon plazma membranında absorbe edilmiş olan ve seminal plazmadan köken alan bazı komponentlerin uzaklaştırılması ya da yerlerinin değiştirilmesi oluşturur. Kapasitasyon olgusunun en önemli bölümü bu koruyucu tabakanın spermatozoon yüzeyinden ve özellikle akrozom üzerinden uzaklaştırılması olmaktadır (9,28). Akrozom reaksiyonu ise spermatozoonun plazma membranı ile dış akrozomal membranları arasındaki birleşmeler ve bu membranlar arasında enzimlerin dışa salınmalarına neden olan membran yıkımlanmalarını kapsar (3).

Dişi genital kanalında meydana gelen kapasitasyona yüksek konsantrasyonlarda bulunan glikoaminoglikanlar neden olur. Kapasitasyon yerindeki heparin ve heparin benzeri glikoaminoglikanlar (heparin sülfat, kondriotin sülfat, hiyaluronik asit gibi) boğa spermatozoonlarının kapasitasyonu için fizyolojik stimülatörlerdir (20). Tekin ve ark. (28) kapasitör ajan olarak hipotaurin ve folliküler sıvı kullandıkları araştırmalarında fertilizasyon oranlarını sırasıyla %34.21 ve %29.23 olarak bildirmişlerdir.

Kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu olgusunda değişik faktörlerin rol oynadığı bir çok araştırıcı tarafından bildirilmektedir.

Spermatozoonlarda prematüre reaksiyon hücre içinde yüksek olan K^+ ile düşük olan Na^+ ve Ca^{2+} iyonları aracılığı ile engellenir. Bu iyonların konsantrasyonları membrandaki Na^+ - K^+ ATP_{ase} ve Ca^{2+} ATP_{ase} tarafından sağlanır (5,29). Bazı türlerde kapasitasyon kalsiyum bağımsız olarak meydana gelirken boğa spermatozoonları Ca^{2+} iyonlarına ihtiyaç duyarlar. Kapasitasyon esnasında membran yapısında meydana gelen değişiklikler hücre dışı kalsiyum iyonlarının hücre içine girmesine olanak sağlayarak akrozomal reaksiyonun başlamasına öncülük eder (10). Fertilizasyon sırasında Na^+ iyonlarının da hücre içine girmesi ile artan hücre içi pH kalsiyum kanallarının açılmasına neden olarak akrozomal reaksiyonu başlatmaktadır (6).

Kapasitasyonda etkili olan faktörlerden birisi de kullanılan kapasitör ajanın dozu ve inkübasyon süresi olarak görülmektedir. Bir glikoaminoglikan olan heparinin AR nu indükleyici etkisinden çok kapasitasyon üzerine etkisi vardır (22). Fukui ve ark. (8) heparin için optimum dozun 25-100 $\mu\text{g/ml}$ ve optimal sürenin 5-60 dakika arasında olduğunu belirtmektedirler. Serin ve Tekin (24) 10, 25 ve 100 $\mu\text{g/ml}$ heparin ile 5, 15 ve 60 dakika süre inkübasyona bıraktıkları boğa spermasında en yüksek kapasitasyon oranlarının 100 $\mu\text{g/ml}$ heparin ile 60 dakika inkübasyonundan elde ettiklerini bildirmektedirler.

Spermatozoonların fertilizasyon yeteneklerini etkileyen değişik kimyasal maddeler vardır. Bu bunlardan en önemlilerinden birisi hücre metabolizma ve özellikle glukolizis

için gerekli olan glukozdur. Glukoz; bazı türlerde kapasitasyon, AR ve fertilizasyonu stimüle ederken (4) boğalarda inhibisyona neden olur (19). Mediumda glukoz bulunmadığında heparin daha etkili olmaktadır. Çünkü glukoz ve diğer glukolize edilebilen substratlar kapasitasyona etki ederek boğa spermatozoonlarının fertilize yeteneklerini inhibe etmektedirler (11,19).

İnkübasyon ısısı adenilat siklaz aktivitesini ve motiliteyi de modüle eder. Heparinin adenilat siklaz enzimi üzerine etkisi nedeniyle kapasitasyon esnasında cAMP seviyeleri düşük kalırken, ortamda glukoz bulunduğu bu seviyenin yükseldiği görülür (12). Azalan ısı ile birlikte AR hızı da azalır ve reaksiyon 27 °C nin altında çok yavaş devam eder (15). Boğa sperması heparinle inkübe edildiğinde protein fosforilasyonunun meydana geldiği, ortamda glukoz bulunduğu ise bu fosforilasyonun inhibe edildiği bildirilmektedir (11).

Glukozun metabolize olamayan analoglarının (sorbitol ve sukroz) kapasitasyonda olumsuz etkileri görülmezken, metabolize olabilen analogları (fruktoz, mannoz) glukozda olduğu gibi reaksiyona uğramış hücre sayısında azalmaya neden olmaktadır. Glukozun inhibe edici etkisi glikolizis yoluyla metabolize olmasından kaynaklanmakta, glikolitik bloker ajanlar (19), fosfodiesteraz inhibitörleri ya da 8-bromo-cAMP glukozun bu etkisini ortadan kaldırmaktadır. (11,21).

Kapasitasyon mediumunun pH sı oldukça önemlidir. Kalsiyum içermeyen Tyrode's solüsyonunda boğa spermatozoonları için en uygun pH 7.6 olarak görülmüştür (13). Glukoz metabolizması sonucu ortam pH sının asidik hal alması kapasitasyonu engellemekte ya da kapasitasyon için gerekli sürenin uzamasına neden olmaktadır (19).

İn-vitro kapasitasyon prosedürüne tabi tutulmuş spermatozoonlarda lizofosfatidilkolin (LC) kapasite olmuş spermatozoonlarda AR'yi indüklerken, kapasite olmamış spermatozoonlarda herhangi bir etki göstermemektedir. Boğa spermatozoonlarında LC ile reaksiyonun indüklenmesi, kapasitasyon esnasında meydana gelen değişikliklere bağlı olup oositleri fertilize edebilme yeteneği ile de yakından ilgilidir (10,19,22). *İn-vitro* akrozom reaksiyonunun belirlenmesinde boyama teknikleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla trypan blue-Giemsa ile ikili boyama, Giemsa (2,26), Bryan boyası (17), nigrosin-eosin-Giemsa (27), trypan blue-Bismarck brown-rose Bengal boyaları ile üçlü boyama (30) teknikleri kullanılabilir.

Günümüzde hayvan ıslahını hızlandırmak amacı ile kullanılan ve son yıllarda büyük gelişmeler gösteren *in-vitro* fertilizasyon (IVF) tekniğinden en yüksek yararın sağlanması uygun ve güvenilir *in-vitro* kapasitasyon tekniklerinin geliştirilmesi yada mevcut yöntemler arasından en iyi sonuçları verenlerin bulunmasıyla gerçekleşecektir.

Bu araştırmada, kapasitasyon ortamına ilave edilen glukozun boğa spermatozoa kapasitasyonu üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmada kapasitör ajan olarak heparin, akrozom reaksiyonunun indüklenmesi için ise lizofosfatidilkolin kullanıldı. İndüklenen bu reaksiyonun belirlenmesi için spermatozoonlar Giemsa ile boyandı. Deneyler 39°C deki su banyosunda yapıldı.

Medium

Araştırmada medium olarak sp-TALP kullanıldı.

Sp-TALP mediumunun kompozisyonu (22).

NaCl	100,0 mM
KCl	3,1 mM
NaHCO ₃	25,0 mM
NaH ₂ PO ₄	0,3 mM
Laktat (Sodyum Tuzu) ^a	21,6 mM
CaCl ₂	2,0 mM
MgCl ₂	0,4 mM
HEPES ^b	10,0 mM
Pürüvat	1,0 mM
BSA ^c	6,0 Mg/ml

^a: % 60 sirop

^b:N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid.

^c:Fraksiyon V.

Spermanın Deneye Hazırlanması

0,25 ml lik payetlerdeki dondurulmuş boğa sperması, 39°C deki su banyosunda 20 saniye tutularak çözüldü. Çözülen spermaya 2 ml medium ilave edilerek 500 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı. Dipte kalan sediment kısmı aynı koşullarda bir kez daha santrifüj edildi. Sperma böylece sulandırıcı ve kryoprotektan maddelerden ayrıldı.

Ortama ilave edilen glukozun kapasitasyona olan etkisinin belirlenmesi için iki grup oluşturuldu. Bu gruplar heparin-glukoz (HG) ve heparin (H) olarak adlandırıldılar. Spermanın son santrifüjünden sonra elde edilen sediment kısmı HG grubunda 5mM glukoz içeren, H grubunda ise glukoz içermeyen mediumla ml'de yaklaşık 10x10⁶ hücre olacak şekilde dilüe edildi. Bundan sonra kapasitasyonun indüklenmesi aşamasına geçildi.

Kapasitasyonun İndüklenmesi

Bu amaçla her iki gruba da 100 µg/ml heparin (Sodyum tuzu) ilave edilerek 60 dakika süre için inkübasyona bırakıldı.

Akrozom Reaksiyonun İndüklenmesi

Kapasite olmuş spermatozoonlarda reaksiyonu indüklemek için her iki gruba da 100 µg/ml lizofosfatidilkolin ilave edilerek 15 dakika inkübasyona bırakıldı (19).

Akrozom Reaksiyonunun Belirlenmesi

İnkübasyon sonunda lam üzerine froti çekilerek hazırlanan preparatlar akrozomal yapının belirlenmesi için giemsa'nın %10 luk

solüsyonu ile 40 dakika süre ile boyandı. Süre sonunda preparatlar distile su ile yıkandı, oda sıcaklığında kurutuldu (2).

Değerlendirme

Akrozom reaksiyonu, Giemsa ile yapılan boyama sonucunda reaksiyon geçirmeyen spermatozoonların akrozomal bölgeleri kırmızı-pembe renkte boya alırken, reaksiyona uğrayanların boya almadan kalması esasına göre değerlendirildi (25). Buna göre her bir

preparattan ışık mikroskobu altında 200 adet spermatozoon sayıldı ve reaksiyon geçiren ve geçirmeyen spermatozoon oranları % olarak belirlendi.

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi Ki-Kare yöntemi ile yapıldı.

BULGULAR

Deneyle elde edilen sonuçlar tablolar (Tablo 1-3) halinde sunulmuştur.

Tablo 1. Glukoz içermeyen grupta (H) elde edilen kapasitasyon sonuçları (%).

Deney No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Reaksiyon geçirmeyen spermatozoon	54.36	55.69	55.00	49.10	55.04	60.45	57.34	59.12	56.37	61.50
Reaksiyon geçiren spermatozoon	45.64	44.31	45.00	50.90	44.96	39.55	42.66	40.88	43.63	38.50

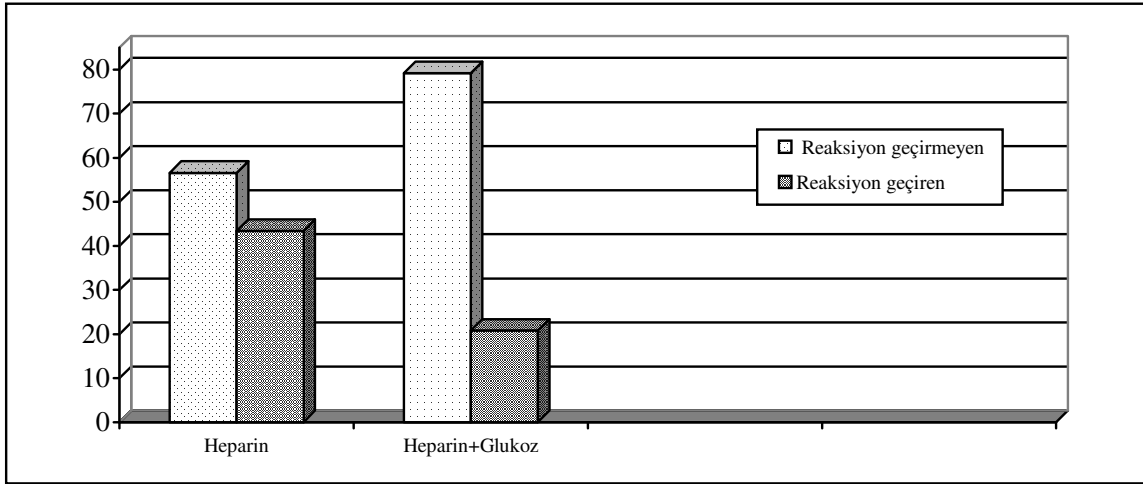
Tablo 2. Glukoz içeren grupta (HG) elde edilen kapasitasyon sonuçları (%).

Deney No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Reaksiyon Geçirmeyen spermatozoon	76.92	80.89	77.27	75.00	75.27	80.36	81.09	83.42	84.43	77.21
Reaksiyon Geçiren spermatozoon	23.08	19.11	22.73	25.00	24.73	19.64	18.91	16.58	15.57	22.79

Tablo 3. Glukoz içeren (HG) ve içermeyen (H) gruplarda kapasitasyon sonuçlarının genel değerlendirmesi (%).

Grup	Deney (n)	Reaksiyon Geçirmeyen $\bar{X} \pm s_x$	Reaksiyon Geçiren $\bar{X} \pm s_x$
H	10	56.6 \pm 3.5	43.4 \pm 3.5
HG	10	79.2 \pm 3.3	20.8 \pm 3.3
$X^2 = 191.316^{***}$			

***: p<0.001



Şekil 1. Spermatozoon kapasitasyonunun gruplara göre değerlendirilmesi.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Heparin günümüzde *in-vitro* kapasitasyon amacı ile en çok kullanılan ajanlardan birisidir. Genellikle yalnız başına kullanılmasına rağmen fertilizasyon mediumunda epinefrin, hipotaurin (23) ve kafein (14) gibi diğer bazı kapasitör ajanlarla da kombine edilebilmektedir.

Bir glikoaminoglikan olan heparinin *in-vitro* ortamda boğa spermatozoonlarında kapasitasyona neden olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmesine rağmen bu çalışmaların çoğunda kullanılan heparin dozları ve inkübasyon süreleri farklılıklar göstermektedir. Örneğin bu amaçla heparini Parrish ve ark. (22), Handrow ve ark. (10) 10 µg/ml kullanırken, O'Flaherty ve ark. (16) 60 µg/ml, Choi ve ark. (1) ile Fukui (7) 100 µg/ml kullanmışlardır. Aynı şekilde heparin ile kapasitasyonun sağlanması için kullanılan inkübasyon sürelerinde de bazı farklılıklar

görülmektedir. Örneğin spermayı Parrish ve ark. (18) 5 saat inkübasyonda bırakırken Handrow ve ark. (10) 4 saat, O'Flaherty ve ark. (16) 45 dakika, Choi ve ark. (1) ile Fukui (7) 15 dakika süre ile inkübasyonda bırakmışlardır.

Mediuma ilave edilen glukozun heparin tarafından indüklenen kapasitasyonu engellediği bildirilmektedir (10,19,21). Parrish ve ark (19) 10 µg/ml heparin ile 4 saatlik bir inkübasyon sonunda %75 oranında akrozom reaksiyonuna uğramış spermatozoon tesbit ederlerken, mediuma 5 mM glukoz ilave edildiğinde motilitenin artmasına rağmen reaksiyona uğramış spermatozoon oranlarının belirgin şekilde gerilediğini bildirmektedirler. Aynı araştırmada glukozun etkisinin ilk 4 saatte ve doza bağımlı olarak meydana geldiği bu süreden sonra glukozun etkisinin zayıfladığı bildirilmektedir. Parrish ve ark. (18) 10 mg/ml heparinle 9.5 saatlik bir inkübasyonda glukoz bulunan ve bulunmayan mediumlarda sırasıyla

%45±6 ve %70±4 oranında reaksiyon geçiren spermatozoon tesbit ettiklerini bildirmektedirler.

Parrish ve ark. (19) 6 saatlik bir inkübasyon periyodundan sonra 10 µg/ml heparinle %68±6 reaksiyona uğramış hücre belirlerken ortama ilave edilen 5 mM glukoz bu oranı %11±3 e düşürmüştür (p<0.05).

Fukui (7) yaptığı çalışmada spermayı 100 µg/ml heparin içeren mediumda 15 dakika inkübe ettikten sonra %13-18 oranında akrozom reaksiyonu elde etmiştir. Çalışmasında heparinin yüksek dozunu kullanmasına rağmen düşük oranlar elde etmesinin ise glukozdan kaynaklanabileceğini bildirmiştir.

Serin ve Tekin (24) kapasitasyon için 100 µg/ml heparin kullandıkları araştırmalarında 60 dakikalık inkübasyon süresi sonunda spermatozoonları trypan blue ve Giemsa ile ikili boyama yapmışlardır. Bu boyama sonucunda hem akrozom reaksiyonunu hem de hücrelerin canlı olup olmadıklarını belirlemişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmalarında canlı ve reaksiyon geçirmiş hücre oranını %25.4±0.8, ölü ve reaksiyon geçirmiş hücre oranını ise %5.2±0.3 olarak belirlemişlerdir. Elde ettikleri toplam reaksiyon geçirmiş hücre oranının bu çalışmadaki HG grubuna göre daha yüksek olması glukozun heparinle yapılan kapasitasyon çalışmalarında inhibitör etki yaptığını desteklemektedir.

Sunulan bu çalışmada ortama ilave edilen 5 mM glukozun reaksiyona uğramış spermatozoon sayısını belirgin

oranlarda (p<0.001) geriletmesi yukarıda söz edilen (4,7,10,18,19,21) çalışmalardaki bulgularla paralellik göstermektedir. Mediumda glukoz bulunmadığında heparinin daha etkili olduğu, glukozun kapasitasyona etki ederek boğa spermatozoonlarının fertilizasyon yeteneklerini inhibe edebileceği anlaşılmıştır. Değişik araştırmalar arasında farklı oranların elde edilmesi inkübasyon süreleri, heparin konsantrasyonları ve sperması kullanılan boğalar arasındaki bireysel farklılıklara bağlanabilir.

Son yıllarda önemli gelişmelere sahne olan *in-vitro* fertilizasyon olgusunun çok önemli bir aşaması olan *in-vitro* kapasitasyonun uygun teknik ve yöntemlerle yapılmasının elde edilen başarıyı direkt olarak etkileyeceği bilinmelidir. Oositi ancak kapasitasyon geçirmiş spermatozoonun fertilize edebileceği düşünülürse kapasite edilebilmiş tek bir hücrenin bile oldukça önemli olduğu görülecektir. Dolayısı ile bu tür çalışmalarda en iyi sonuçları veren yöntemlerin bulunması ya da mevcutların etkinliğinin artırılması için daha fazla çalışmalar yapılması yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Choi YH, Fukui Y, Ono H (1991). Effects of media and the presence of bovine oviduct epithelial cells during *in-vitro* fertilization on fertilizability and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*, **36** (5):863-873.
2. Didion BA, Dobrinsky JR, Graves CN (1989). *Staining procedure to detect viability and true acrosome reaction in spermatozoa of various species*. *Gamete Research*, **22**: 51-57.

3. **Fléchon JE, Harrison RAP, Fléchon B, Escaig J** (1986). *Membrane fusion events in the Ca^{2+} / ionophore-induced acrosome reaction of ram spermatozoa*. Journal of Cell Science, 81: 43-63.
4. **Fraser LR, Herod JE** (1990) *Expression of capacitation-dependent changes in chlortetracycline- fluorescence patterns in mouse spermatozoa requires a suitable glycolysable substrate*. Journal of Reproduction and Fertility, 88: 611-621.
5. **Fraser LR, McDermott CA** (1992). *Ca^{2+} -related changes in the mouse sperm capacitation state: a possible role for Ca^{2+} -ATP_{ase}*. Journal of Reproduction and Fertility, 96: 363-377.
6. **Fraser LR, Umar G, Sayed S** (1993). *Na^{+} -requiring mechanisms modulate capacitation and acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa*. Journal of Reproduction and Fertility, 97: 539-549.
7. **Fukui Y** (1990). *Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization and developmental competence of bovine oocytes matured in-vitro*. Molecular Reproduction and Development, 26: 40-46.
8. **Fukui Y, Sonoyama T, Mochizuki H, Ono H** (1990). *Effects of heparin dosage and sperm capacitation time on in-vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in-vitro*. Theriogenology, 34 (3): 579-591.
9. **Gordon I.** (1994). *Laboratory Production of Cattle Embryos*, Cab International, Wallingford, p. 143-168.
10. **Handrow RR, First NL, Parrish JJ** (1989). *Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin*. The Journal of Experimental Zoology, 252: 174-182.
11. **Homer GHL, Visconti PE, Koph GS** (1997). *Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent pathway*. Biology of Reproduction, 56: 707-719.
12. **Ijaz A, Fortier MA, Sirard MA** (1996). *Adenylate cyclase activity increases concomitantly with the onset of capacitation in heparin-treated bovine spermatozoa*. Reproduction Nutrition Development, 36: 221-232.
13. **Ijaz A, Hunter AG** (1989). *Evaluation of calcium-free Tyrode's sperm capacitation medium for use in bovine in-vitro fertilization*. Journal of Dairy Science, 72: 3280-3285.
14. **Niwa K, Ohgoda O** (1988). *Synergistic effect of caffeine and heparin on in-vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture*. Theriogenology, 30 (4): 733-741.
15. **Nolan JP, Graham JK, Hammerstedt RH** (1992). *Artificial induction of exocytosis in bull sperm*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 292 (1): 311-322.
16. **O'Flaherty C, Beconi M, Beorlegui N** (1997). *Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa*. Andrologia, 29: 269-275.
17. **Palermo G, Steirteghem AV** (1991). *Enhancement of acrosome reaction and subzonal insemination of a single spermatozoon in mouse eggs*. Molecular Reproduction and Development, 30: 339-345.
18. **Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL** (1985). *Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in-vitro*. Theriogenology, 24 (5): 537-549.
19. **Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL** (1989a). *Capacitation of bovine sperm by heparin: Inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH*. Biology of Reproduction, 41: 683-699.
20. **Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Handrow RR, Sims MM, First NL** (1989b). *Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid*. Biology of Reproduction, 40: 1020-1025.
21. **Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Uguz C, First NL** (1994) *Differences in the role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid*. Biology of Reproduction, 51 (6):1099-2008.
22. **Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, First NL** (1988). *Capacitation of bovine sperm by heparin*. Biology of Reproduction, 38: 1171-1180.
23. **Schellander K, Fuhrer F, Brackett BG, Korb H, Schleger W** (1990). *In-vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in meium supplemented*

- with estrous cow serum*. Theriogenology, 33 (2): 477-485.
24. **Serin İ, Tekin N** (2003) *Dondurulmuş boğa spermasının değişik kapasitör ajanlarla in-vitro kapasitasyonu*. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 50 (1): Baskıda.
 25. **Sidhu KS, Dhindsa JS, Guraya SS** (1992). *A simple staining procedure for detecting the true acrosome reaction in buffalo (Bubalus bubalis) spermatozoa*. Biotechnic and Histochemistry, 67 (1): 35-39.
 26. **Sidhu KS, Guraya SS** (1989). *Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in mammalian spermatozoa*. International Review of Cytology, 118: 231-280.
 27. **Tamuli MK, Watson PF** (1994). *Use of a simple staining technique to distinguish acrozomal changes in the live sperm sub-population*. Animal Reproduction Science, 35: 247-254.
 28. **Tekin N, Daşkın A, Akçay E** (2001) *Boğa spermatozoonlarında in-vitro kapasitasyon ve fertilizasyon*. Turkish Journal of Veterinary Animal Science, 25: 349-358
 29. **Trounson A** (1992) *The production of ruminant embryos in-vitro*. Animal Reproduction Science, 28: 125-137.
 30. **Vázquez JM, Martinez E, Roca J, Coy P, Pastor LM** (1993). *Acrosome reaction of boar spermatozoa in homologous in-vitro fertilization*. Molecular Reproduction and Development, 36: 84-88.