**Epididimal Boğa Spermatozoonlarında Dondurulma Öncesi ve Sonrası Apoptotik Aktivitenin Araştırılması**

Numan Akyol1 Ahmet Kürşat Azkur2

1 Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı

2 Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı

**Özet**

Bu çalışmada, epididimal kaynaklı spermatozoonların taze ve dondurulup çözdürüldükten sonra Akım sitometri (Flow Cytometri) yöntemiyle analiz edilmesi ve nekroz/apoptoz düzeylerinin incelenmesi ve klasik boyama yöntemi olan eozin-nigrozin boyama metoduyla kıyaslanması amaçlanmıştır. Bu amaçla yerel mezbahada kesilen 14 boğanın testislerinden elde edilen spermatozoonlar, AnnexinV/PI floresan boyaları kullanılarak akım sitometri yöntemiyle incelenmiştir. Epididimisten alındıktan sonra motilite kontrolü yapılan spermatozoonlar, PBS içerisinde 2x105spermatozoa/ml olacak şekilde sulandırılmış ardından AnnexinV+PI (Propidium İyodür) floresan boyaları ile boyandıktan sonra bir saat içerisinde Akım sitometri cihazında (BD Facs Aria II, Biosciencess, CA, USA) analiz edilmiştir. Eozin nigrozin yöntemiyle benzer şekilde taze ve donmuş çözdürülmüş spermaların ölü miktarı, protoplazmik damlacık durumları tespit edilmiştir.

Taze spermada, akım sitometri ile ölü spermatozoon sayısı eozin-nigrozin boyamada bulunana göre daha az olduğu görülmüştür (P < 0.05). Protoplazmik damlacık gibi bazı morfolojik parametrelerin mikroskopilerle tespit edilebildiği ancak ölüm sürecine giren spermatozoonların alt kategorilerinin akım sitometri ile net olarak tespit edilebildiği görülmüştür. Bu bakımdan klasik yöntemlere göre spermatozoa canlılığı tespitinde akım sitometri yönteminin klasik boyama yöntemlerine destek olarak ve daha etkin bir şekilde kullanılabileceği düşünülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Boğa, epididimal spermatozoa, akım sitometri, apoptoz

**Abstract**

The aim of this study is investigation of necrosis and apoptosis in epididymal bull spermatozoa before freezing and after thawing by flow cytometric method and comparison with eosin-nigrosin dying that is conventional method in frame of the relationship for bull fertility.

Testicles from fourteen bulls in local slaughterhouse were used for this study. All the same experimental implementation will be applied for control group consist of native sperm which is obtain as soon as possible from epididymidis. Proportion of alive spermatozoa, total apoptotic, necrotic and early necrotic spermatozoa level was observed via flow cytometry. Annexin V/PI fluoruscence dying was used for investigation proprotion of apoptotic, necrotic, early necrotic and live spermatozoa for flow cytometry. Epididymal sperm was diluted by PBS as 2x105 spermartozoa per mililiter after motility control. Spermatozoa were dyed by FITC Annexin V and Propidium Iodide such as describe in their technical data sheet and analized in one hour. Proportion of dead spermatozoa and protoplasmic droplet was determined by eosin-nigrosin conventional dying method in fresh and frozen-thawed spermatozoa.

Average of dead spermatozoa by flow cytometry was les than eosin-nigrosin method (P < 0.05). Some morphological charachters such as protoplasmic droplets can be determined however subpopulations of entering of death process such as apoptotic, necrotic and early necrotic sperm can defined clearly only by flow cytometric method.

As a result, combination of eosin-nigrosin dying method and flow cytometric analysis of sperm morpholgical evaluation can be given better results of bull epididymal semen in comparison to eosin-nigrosin dying method alone.

**Key Words:** Bull, epidydimal spermatozoa, flow cytometry, apoptosis

**1. Giriş ve amaç**

Spermatozoonların morfoljik açıdan incelenerek morfolojik bütünlük, motilite ve fertilizasyon yetenekleri arasında ilişkiyi araştırmak üzere çok sayıda yöntem mevcuttur. Spermatozoonların canlılık tespitinde eozin-nigrozin, papanicolaou, mygrünwald-giemza, hematoksilen-eozin gibi pek çok boyama yöntemleri kullanılmaktadır. Bu boyama yöntemleri ile elde edilen ölü/canlı spermatozoa oranları arasında etkinlik açısından önemli bir fark yoktur (Seyalıoğlu 2007).

İki farklı boyadan oluşan bu karışımda, Eosin’in kullanılma amacı, ölü veya hücre membranı hasar görmüş spermatozoaları işaretlemektir. Nigrosin ise, arka planı boyar, böylece soluk boyanmış hücreler ile kontrast yaratılarak hücreler, kolaylıkla seçilebilir (Björndahl ve ark 2003).

Akım sitometri yöntemi ile ölü-canlı spermatozoa tayini daha ileri düzeyde ele alınabilmekte ve ölüm sürecine giren spermatozoonların alt katogorileri de (nekrotik-erken nekrotik-apoptotik) güvenilir bir şekilde belirlenebilmektedir. Günümüzde spermatolojik parametrelerin incelenmesi amacıyla floresan boyalar yoğun olarak kullanılmaktadır. Akım sitometri kısa sürede çok sayıda hücrenin incelenebildiği, kantitatif sonuç veren ve kolay uygulanabilen ve istatistiki hataların minimum olduğu bir yöntemdir (Brugnon ve ark 2007, Güleş Ö ve Eren Ü 2008).

Bazı spermatolojik parametrelerle apoptoz arasında bir ilişki olup olmadığına dair çelişkili görüşler mevcut olup, kimi çalışmalarda (Marchetti C ve ark 2002, Shen HM ve ark 2002, Weng LS ve ark 2002, Pena FJ ve ark 2003, Liu CH ve ark 2004, Taylor SL ve ark 2004) sperm konsatrasyonu, motilite ve normal formdaki spermatozoa oranının apoptozla negatif korelasyon gösterdiğini bildirmesine rağmen, Said TM ve ark (2005) ise apoptoz ile spermatozoa morfolojisi arasında bir ilişki olmadığını bildirmişlerdir. Diğer taraftan sperm morfolojisi ile apoptoz arasındaki ilişki henüz net olarak ortaya konmadığına dair bilgiler de mevcuttur (Aziz N ve ark 2007).

Canlı ve ölü hücre ayrımı yapabilmek için tüm hücreleri boyayan bir floresan boya ve sadece ölü hücreleri boyayan Propidium İyodür (PI) ile birlikte kullanılır. Annexin-V ile boyama ve akım sitometrisi, apoptotik hücreleri tanımlamak için kullanılan güvenilir, basit ve hızlı bir yöntem olduğu ifade edilmektedir (Engeland ve ark 1998). Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik kısımlarında yerleşmiş olan Fosfatidil Serin (PS) apoptozun erken dönemlerinde yer değiştirmek suretiyle hücre zarının dış yüzeyine transloke olurlar. Annexin-V PS’ye bağlanabilen bir protein olduğundan floresan bir madde ile (örn. FITC/Fluoroscein İsothiocyonate) işaretlenmesi durumunda apoptotik hücreler görülebilir hale getirilebilmekte ve akım sitometri yoluyla ölçülebilmektedir (Overbeeke R ve ark 1998, Zhang G ve ark 1997). Annexin-V ve PI kombinasyonu ile boyanan hücrelerde canlı, nekrotik ve apoptotik spermatozoa popülasyonlarını aynı anda gözlemek mümkündür. Ayrıca bu yöntem enzim aktivasyonu ve hücre fiksasyonu gibi hazırlık aşamalarına gerek duyulmamakta ve canlı spermatozoonları kısa sürede değerlendirme imkânı vermektedir (Ok E ve Öz ZS, 2007). Floresan bir boya ile birlikte PI kullanılarak ya da Annexin-V kullanılarak yapılabilir. Floresan mikroskobuyla uzun zaman alan sayma işlemi akım sitometri yöntemiyle saniyeler içinde sonuç alınır.

Epididimal spermada ölü sperm oranlarını etkin bir şekilde belirlenmesi, spermatozoa morfolojik karakterleri ve ölüm sürecine girmiş olan spermatozoonların morfolojik özellikleri ve motiliteleri arasında ilişkinin incelendiği bu çalışmada; ölü spermatozoon miktarının ve bazı sperma parametrelerinin, akım sitometrisi ve konvansiyonel boyama yöntemiyle tespitinin karşılaştırılmalı olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

**2. Materyal ve yöntem**

Bu çalışmada yerel mezbahada kesilen, herhangi morfolojik bozukluk taşımayan 14 melez boğadan alınan testisler kullanılmıştır. Testisler, boğaların kesimini takip eden iki saat içerisinde stryroform kap içerisinde ve oda sıcaklığında laboratuvara ulaştırılmış ve toplam 3 saat içerisinde spermalar elde edilmiştir. Epididimal sperm elde edilmesi amacıyla Turri ve ark (2012) ’nın tarif ettikleri geriye yıkama (Retrograde flushing-RF) yöntemi kullanılmıştır. Ductus deferens kanalından bir kanül vasıtasıyla girilmiş ve enjektör yardımıyla geriye basınç uygulanmış ve spermanın cauda epididimise toplanması sağlanmıştır. Ancak epididimal spermanın saf olarak elde edilmesi amaçlandığından sperma sulandırıcısı kullanılmamış bunun yerine hava verilmiştir. Ardından cauda epididimise uygulanan küçük bir insizyon yardımıyla epididimal sperma elde edilmiştir. Elde edilen spermalarda, ısıtma tablalı mikroskopta total motilite (%), eozin-nigrozin boyama ile ölü canlı (%), proximal ve distal droplet taşıyan spermatozoa (%) oranları tespit edilmiştir. Akım sitometri yöntemiyle inceleme amacıyla BD FACS ARIA II akım sitometri cihazı kullanılmıştır. Epididimal spermatozoonlar, PBS içerisinde sulandırıldıktan sonra 2 kez 500G devirde 10dk santrifüj edilmiş, süpernatantın uzaklaştırılmasının ardından üzerine binding solüsyonu ilave edilmiş ve konsantrasyonun 2x107 spermatozoa/ml olması sağlanmıştır. Bu karışımdan 100µl alınarak akım sitometri tüpüne konmuş ve üzerine 5µl floresein izotiosiyanat (FITC/Annexin V®) ve 5µl propidium iyodüd (PI) ilave edildikten sonra narin bir şekilde vortekslenmiş ve oda sıcaklığındaki karanlık ortamda 15 dk inkube edilmiştir. Boyama işleminin ardından sperma üzerine 900µl binding solüsyonu eklenerek son konsantrasyonun 2x105 spermatozoa/ml olması sağlanmıştır. Elde edilen bu karışım 1 saat içerisinde akım sitometri cihazında incelenmiştir. Akım sitometri cihazında öncelikle her bir numune için floresan boyama yapılmaksızın spermatozoonlar tespit edilmiş, ardından floresan boyama ile total hücre popülasyonu görülerek (Şekil 1) kalibrasyon gerçekleştirilmiştir.

 

Şekil 1. Akım sitometri yöntemiyle total spermatozoa

Daha sonra nekrotik (Q1), erken nekrotik (Q2), canlı spermatozoa (Q3) ve apoptotik (Q4) hücre populasyonları niçin ayrı gradyanlar oluşturularak inceleme tamamlanmıştır (Şekil 2).



Şekil 2. Gradyanlarda nekrotik, erken nekrotik, apoptotik canlı sperm hücreleri

İstatistiki analiz için SPSS (13.0 Windows versiyonu- SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanılmıştır. Veriler aritmetik ortalama ve standart hata olarak gösterilmiştir. Veri analizi için bağımsız örnekleme ile t-testinden yararlanılmıştır. İstatistiki önem derecesi (P), 0.05 olarak belirlenmiştir.

**3. Sonuç**

Elde edilen 14 adet taze sperma numunesinde ortalama %75.36±2.37 oranında motilite tespit edilmiştir. Dondurma çözdürme sonrası ise elde edilen total motilite ortalaması %41.07±2.73 olarak bulunmuş olup ikisi arasında farkın istatistiki olarak önemli düzeyde olduğu tespit edilmiştir (P < 0.05). Taze spermada, eozin-nigrozin boyama yöntemiyle %16.71±1.18 oranında ölü spermatozoa bulunurken, akım sitometri yöntemiyle ise spermatozoonların %11.18±1.17 oranında ölü, %3.01±0.70 oranında apoptotik, %27.36±4.31 oranında ise erken nekrotik aşamada oldukları görülmüştür.

Dondurma çözdürme sonrası eozin-nigrozin boyama ile %14.00±0.91 ölü spermatozoon bulunmuştur. Aynı spermatozoonların akım sitometri ile %13.62±1.79 ölü, %29.14±2.72 erken nekrotik ve %4.89±0.76 oranında apoptotik spermatozoon olduğu tespit edilmiştir ve eozin-nigrozinle ve akım sitometri yöntemiyle bulunan ölü spermatozoon oranları istatistiki olarak birbirinden farklı çıkmıştır (P < 0.05) (Tablo).

Taze ve dondurulup çözdürülen spermatozoonların akım sitometrik incelenmesinde bulgular beklendiği gibi belirlenmiş dondurma çözdürme sonrası nekrotik, erken nekrotik ve apoptotik spermatozoon sayısında artış olduğu görülmüştür (Şekil 3).

Tablo. Taze epididimal spermatozoa parametreleri

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Parametre (%) | Mean | S.E.M. | S.D. |
| Yöntem | Total motilite | 75,36 | 2,37 | 8,87 |
| Eozin-nigrozin | Ölü spermatozoa | 16,71a | 1,18 | 4,43 |
| Proksimal damlacık | 3,89 | 0,45 | 1,67 |
| Distal damlacık  | 19,54 | 0,67 | 2,52 |
| Akım sitometri | Canlı spermatozoa  | 58.24 | 5,18 | 19,37 |
| Nekrotik sperm. | 11,18b | 1,17 | 4,38 |
| Apoptotik sperm. | 3,01 | 0,70 | 2,62 |
| Erken nekrotik sperm. | 27,36 | 4,31 | 16,13 |

ab Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark önemlidir (P < 0.05)

****

Şekil 3. Boğaların taze ve dondurulmuş- çözdürülmüş epididimal spermalarında farklı alt popülasyon ortalamaları (mean ± SEM).

**4. Tartışma**

Sunulan çalışmada spermatozoa incelenmesinde yaygın olarak kullanılan eozin-nigrozin boyama ve akım sitometri yöntemleri ile elde edilen bulgular kıyaslanmıştır. Eozin-nigrozin yöntemiyle tespit edilen ölü spermatozoa miktarı akım sitometri ile ölçülen miktardan istatistiki olarak yüksek bulunmuştur (P < 0.05). Akım sitometri yöntemi ile erken nekrotik, apoptotik ve canlı spermatozoa oranları net olarak tespit edilebilirken, eozin nigrozin boyama ile ölü spermatozoonlar subjektif olarak tespit edilebildiği ancak akım sitometri ile tespiti yapılamayan distal ve proksimal damlacık gibi morfolojik bazı parametrelerin incelenebildiği görülmüştür.

Spermatozoonlarda boyama yöntemleri arasında önemli düzeyde bir fark bulunmamaktadır (Ataman ve ark 1998). Eosin-nigrosin boyama yöntemi basit ve hızlı olmasından dolayı yaygın olarak sperm değerlendirilmesi için kullanılmasına rağmen sınırlı sayıda spermatozoonu değerlendirme imkânı vermesinden dolayı oldukça sübjektif bir yöntemdir (Johanson ve ark 2008). Froti hazırlanırken canlı spermatozaonların başlarının boya almamaları ve nigrosin boyasının koyu bir zemin oluşturması muayeneleri kolaylaştırmaktadır. Ölü spermatozoonların başlarının kırmızıya boyanmaları ise özellikle akrozom yapısının değerlendirilmesini güçleştirmektedir (Ataman ve ark 1998). Boyama zamanı, sperm konsantrasyonu, ve sulandırıcısının karakteristiği ortamdaki eosini veya sperm membranının stabilitesini etkileyen bazı faktörler nedeniyle intakt sperm mambranına sahip sperm oranı değişebilmektedir (Björndhal ve ark 2003 - Björndhal ve ark 2004). Chalah ve Brillard (1998) sperm membran bütünlüğü açısından akım sitometrik incelemenin eosin-nigrosin boyamaya kıyasla önemli derecede etkin bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Foster ve ark (2011) eosin-nigrosin boyama ile canlı spermatozoon sayısının akım sitometrik ölçümlere göre %12.5 daha fazla olduğu tespit etmişlerdir. Johansson ve ark (2008) de benzer bulgular elde etmişleridir. Sunulan çalışmada ise eosin nigrosin boyamada ölü sperm sayısı akım sitometri ile elde edilen verilerinden yüksek gözükmektedir. Bunun nedeni veriler değerlendirilirken erken nekrotik sperm hücreleri ölü olarak kabul edilmemiştir. Erken nekrotik spermatozoonlar ölü kabul edilmesi durumunda Johanson ve ark (2008) ve Foster ve ark (2011)’nın bildirimleriyle uyumlu olarak eosin-nigrosin boyamada %21.83 oranında daha fazla canlı (membran intakt) spermatozoon olduğu anlaşılmaktadır.

Normal spermatogenez sırasında hücre gelişimi ve farklılaşmasına ek olarak germ hücrelerinin ölümü de söz konusu olur ve bu durum spermatozoa oluşum sürecinde kritik öneme sahiptir. Bu ölümler neticesinde spermatozoa potansiyeli büyük oranda azalır ve bu durum yaşam boyu devam eder. Spermatogenez sürecinde gözlenen apoptozun, germ hücre potansiyelinin sertoli hücrelerince desteklenebilecek sayıda tutulabilmesi ve anormal spermatozoonların ortadan kaldırılarak normal spermatozoonların önünün açılması gibi önemli işlevleri vardır (Seli E ve Sakkas D 2005, Weng LS ve ark 2002, Sakkas D ve Moffat O 2002, Print CG ve Loveland KL 2000). Konvansiyonel boyama yöntemleriyle tespit edilemeyen bu durum akım sitometri yöntemiyle hem apoptotik yolla ölüm sürecine girmiş olan spermatozoonlar hem de erken nekrotik ve nekrotik hücre popülasyonları net olarak tespit edilebilmektedir. Buna karşılık eozin nigrozin yöntemi ile de anormal spermatozoonlar ayırt edilebilmekte bu da akım sitometri yöntemine bir üstünlük olarak karşımıza çıkmaktadır.

Spermatozoonların anormal morfolojik karakterleri ile düşük fertilizasyon yetenekleri arasındaki ilişki çok yönlü görünmektedir. Bu açıdan spermatozoonların morfolojik değerlendirmeleri ile fertilite yetenekleri arasındaki ilişkiyi tanımlamak oldukça zordur (Walters ve ark 2005). Sperm analizlerinde asıl amaç sperm numunesini fertilite açısından, gerçekçi, ucuz, objektif ve hızlı bir şekilde değerlendirmektir ancak pek çok laboratuvarda bu kriterler karşılanamaz ve ölçülen değerlerin fertilite ile ilişkisi net olarak ortaya konamaz (Lindsay ve ark 2005). Akım sitometri yöntemi ile hücrelerin şekli, yapısal özellikleri gibi morfolojik karakterleri floresan boyalarla işaretlenerek belirlenebilmekte ve spermatozoonlar için çok sayıda parametre aynı anda değerlendirilmekte ve fertilite özellikleri objektif olarak ortaya konabilmektedir (Larsson ve ark 2000, Amman ve ark 1993). Ayrıca on binlerce spermatozoonun birkaç dakikada değerlendirmesine imkân sağlaması ve floresan boyamalarla mikroskopta değerlendirmeye kıyasla akım sitometri yöntemi yüksek düzeyde güvenli bilgiler sunmaktadır (Graham 2001). Spermatozoa değerlendirmesinde kullanılan sübjektif yöntemlerle birlikte akım sitometrinin kullanımı halinde fertilitenin daha iyi tahmin edilebilmekte ayrıca spermatozoonlarda fertilite belirlenmesinde konvansiyonel laboratuvar testleriyle birlikte akım sitometri kullanımının daha iyi sonuçlar vermektedir (Padrik ve ark 2012).

Eosin-nigrosin boyama, otomatik hücre sayım cihazı ve akım sitometri yöntemleriyle sperm membranı incelendiği bir çalışmada, sperm membran bütünlüğü yüksek düzeyde olan örneklerde bu üç yönteminde birbiriyle uyumlu sonuçlar verdiği ancak sperm membranında hasarın fazla olduğu durumlarda eosin-nigrosin boyama ve otomatik hücre sayım cihazının verdiği sonuçların akım sitometri yöntemine göre daha değişken olduğu bildirilmiştir (Foster ve ark 2011). Sunulan çalışmada eosin-nigrosin boyama ile elde edilen ölü sperm miktarı akım sitometri ile bulunana kıyasla daha yüksektir (P<0.05). Bu durum Foster ve ark (2011) bildirimleriyle uyumlu olarak gerçekleşmiş olup eosin-nigrosin yöntemiyle sperm membran bütünlüğüne bağlı olarak değişken sonuçlar alınması söz konusu olabilmektedir.

Eozin-nigrozin boyama yöntemi kullanılarak yapılan ölü/canlı spermatozoa tespitinin subjektif bir değerlendirme olduğu, bu bakımdan yanılgılar olabileceği bunun da spermatozoonların farklı düzeylerde boya alma durumuna göre değişebildiği görülmüştür. Buna rağmen akım sitometrik yöntemde, apoptotik veya nekrotik safhaya girmiş olan spermatozoonların net olarak tespit edilebildiği ve bu yöntemle daha ayrınıtılı sonuçlar alınabildiği görülmüştür. Bu bakımdan klasik yöntemlere göre spermatozoa canlılığı tespitinde akım sitometri yönteminin klasik boyama yöntemlerine destek olarak ve daha etkin bir şekilde kullanılabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak epididimal spermatozoonların eosin nigrosin boyama yöntemine ilave olarak akım sitometri yöntemiyle morfolojik değerlendirme yapmanın spermatozoonların objektif olarak morfolojik değerlendirmesi için avantajlı bir durum olacağı görülmüştür.

**5. Literatür**

1. Ataman MB, Yıldız C, Kaya A, Aksoy M, Lehimcioğlu N. Köpeklerde taze ve donmuş-çözünmüş spermada anormal spermatozoon tiplerinin ve oranlarının tespit edilmesinde farklı yöntemlerin kullanılması. Vet Bil Derg 1998; 14: 121-129.
2. Amman RP, Hammerstedt RH. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. J Androl 1993; 14: 397–406.
3. Aziz N, Said T, Paasch U, Agarwal A. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. Hum Reprod 2007; 22: 1413-1419.
4. Björndahl L, Söderlund I, Kvist U. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. Human Reprod 2003; 18: 813–16.
5. Björndahl L, Söderlund I, Johansson S, Mohammadieh M, Reza Pourian M., Kvist U. Why the SHO recommendations for eosinnigrosin staining techniques for human sperm vitality assessment must change. Andrology Lab Corner. J Androl 2004; 25: 671–8.
6. Brugnon F, Ouchchane L, Verheyen G, Communal Y, Van der Elst J, Tournaye H. Flourescence microscopy and flow cytometry in measuring activated caspase in human spermatozoa. Int J of Androl 2007; 32: 265-273.
7. Chalah T, Brillard JP. Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosin-nigrosin and dual fluorescence (SYBR14/PI). Theriogenology 1998; 50: 487-493.
8. Engeland Mvan, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. Annexine V-Affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. Cytometry 1998; 31: 1-9.
9. Foster ML, Love CC, Varner DD, Brinsko SP, Hinrichs K, Teague S, LaCaze K, Blanchard TL. Comparison of methods for assessing integrity of equine sperm membranes. Theriogeneology 2011; 76: 334-341.
10. Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. YYÜ Vet Fak Derg 2008; 2: 73-78.
11. Graham JK. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. Anim Reprod Sci 2001; 68: 239-247.
12. Johansson CS, Matsson FC, Lehn-Jensen H, Nielson JM, Petersen MM. Equine spermatozoa viability comparing the NucleoCounter SP-100 and the eosin-nigrosin stain. Anim Reprod Sci 2008; 23: 24 –5.
13. Larsson B, Rodriguez-Martinez H. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? Anim Reprod Sci 2000; 60–61: 327–36.
14. Lindsay G, Evans G, Maxwell WMC. Flow cytometric evaluation of sperm parameteres in relation to fertility potential. Theriogenology 2005; 63: 445-457.
15. Liu CH, Tsao HM, Cheng TC, Wu HM, Huang CC, Chen CI, Lin DP, Lee MS. DNA fragmentation, mitochondrial dysfunction and chromosomal aneuploidy in the spermatozoa of oligoasthenoteratozoospermic males. J Assist Reprod Genet 2004; 21: 119-126.
16. Marchetti C, Obert G, Deffosez A, Formstecher P, Marchetti P. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygene species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. Hum Reprod 2002; 17: 1257-1265.
17. Ok E, Öz ZS. Sperm hücrelerinde apoptoz. Androloji bülteni 2007; 30: 215-218.
18. Overbeeke R, Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperger C, Hanen C. Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. Apoptosis 1998; 3: 115-121.
19. Padrick P, Hallap T, Januškauskas A, Kaart T, Bulitko T, Jaakma Ü. Conventional laboratory test and flow cytometry in the prognostic testing of bull semen fertility. Vet Med Zoot 2012; 60: 52-58.
20. Pena FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez-Martinez H. Asseement of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. Theriogenology 2003; 60: 677-689.
21. Print CG, Loveland KL. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. Bioessay 2000; 22: 423-430.
22. Said TM, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A. Role of caspases in male infertility. Hum Reprod 2004; 10: 39-51.
23. Said TM, Paasch U, Grunewald S, Baumann T, Li L, Glander HJ, Agarwal A. Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. Reprod Biomed 2005; 10: 740-746.
24. Sakkas D, Moffat O. Nature of DNA damage in ejeculated human spermatozoa and possible involvement of apoptosis. Biol Reprod 2002; 66: 1061-1067.
25. Seli E, Sakkas D. Spermatozoal Nuclear Determinants of Reproductive Outcome: Implications for ART. Hum Reprod 2005; 11: 337-349.
26. Seyalıoğlu Hİ. Semen tespitinde farklı yöntemlerin karşılaştırılması. Fen Bilimleri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniv Adli Tıp Enst 2007.
27. Shen HM, Dai J, China SE, Lim A, Ong CN. Detection of apoptotic alteration in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. Hum Reprod 2002; 17: 1266-1273.
28. Taylor SL, Weng SL, Fox P, Duran EH, Morshedi MS, Oehninger S, Beebe SJ. Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: potentially utility as indicators of sperm quality. Mol Hum Reprod 2004; 10: 825-834.
29. Turri F, Madeddu M, Gliozzi TM, Gandini G, Pizzi F. Influence of recovery methods and extenders on bull epididymal spermatozoa quality. Reprod in Dom Anim 2012; 47: 712-717.
30. Walters, AH, Eyestone WE, Saacke RG, Pearson RE, Gwaszdauskas FC. Bovine embryo development after IVF with spermatozoa having abnormal morphology. Theriogenology 2005; 63: 1925–1937.
31. Weng LS, Taylor LS, Morshedi M, Schuffner A, Duran HE, Beebe S, Oehninger S. Caspase activity and apoptotic markers in ejeculated human sperm. Mol Hum Reprod 2002; 8: 984-991.
32. Zhang G, Gurtu V, Kain SR, Yan G. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of Annexin-V. Biotechniques 1997; 23: 525-531.

**EKLER:**

1. Proje kapsamında alınan ısıtma tablalı mikroskop hali hazırda Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı’nın en temel ihtiyaçlarından birini karşılamakta olup ilgili laboratuvarda bulunmaktadır. Laboratuvar rutini için kullanılmakta olan cihaz benzer proje ve çalışmalar için de kullanılacaktır.
2. İlgili projenin sonuç raporunun kabulü durumunda indeksli bir yayın hale getirilerek yayımlanması planlanmaktadır.