



Kısa Süreli Saklanan Koç Spermasına İlave Edilen Sığır Serum Albumininin (BSA) Farklı Dozlarının Sperma Kalitesi ve DNA Hasarı Üzerine Etkisi*

Deniz YENİ^{1a}, Fatih AVDATEK^{1b}, Mustafa GÜNDOĞAN^{1c}

1. Afyonkocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, TÜRKİYE.
ORCID: 0000-0002-9105-5677^a, 0000-0003-2345-8826^b, 0000-0002-3292-4625^c

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
19.07.2019	08.10.2019	25.12.2019

Bu makaleye atıfta bulunmak için/Tocitethisarticle:

Yeni D, Avdatek F, Gündoğan M: Kısa Süreli Saklanan Koç Spermasına İlave Edilen Sığır Serum Albumininin (BSA) Farklı Dozlarının Sperma Kalitesi ve DNA Hasarı Üzerine Etkisi. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.,14(3): 299-306, 2019. DOI: 10.17094/ataunivbd.594130.

Öz: Bu çalışmanın amacı kısa süreli (5 °C)'de saklanan Merinos koç spermasında 0, 24, 48 ve 72. saatlerde sığır serum albumininin (BSA) sperma kalitesi ve DNA hasarı üzerindeki etkilerini belirlemektir. Ejekülatlar beş baş Merinos ırkı koçtan suni vajen ile toplandı ve değerlendirmeler 37 °C'de yapıldı. Tüm çalışma altı kez tekrar edildi. Toplanan koç sperması örnekleri dörde bölündü ve Tris temelli sulandırıcı ile sulandırılan spermaya (0, 2, 4 ve 6 mg/ml) dozlarında BSA eklendi ve motilite, anormal spermatozoon oranı, plazma membran bütünlüğü ve canlılık, akrozom bütünlüğü ve DNA hasarı (COMET testi) belirlendi. Çalışma gruplarından 4 mg/ml BSA içeren grup, 72 saatlik depolamaya kadar, kontrol ile karşılaştırıldığında daha yüksek motilite yüzdeleri, plazma membran bütünlüğü ve canlılık gösterdi (P<0.05). Araştırmamızın 24 ve 48. saatlerinde DNA hasarı BSA'nın tüm dozlarında kontrol grubuna göre daha düşük bulundu. Bununla beraber anormal spermatozoon oranları yönünden BSA'nın tüm dozlarında 24, 48 ve 72 saatler sonunda kontrol grubuna göre daha düşük değerler olduğu görüldü (P<0.05). Sonuç olarak, kısa süreli saklamada koç sperma parametreleri için özellikle 4 mg/ml BSA eklemenin yararlı olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: BSA, DNA hasarı, Kısa süreli saklama, Koç sperması.

The Effect of Different Concentrations of Bovine Serum Albumin on Sperm Quality and DNA Damage in Short Term Stored Ram Semen

Abstract: In the present research the aim was emphasized to find out the effects of bovine serum albumin (BSA) on quality of sperm and DNA damage at 0, 24 th, 48 th and 72 th hours in Merino ram semen at short term preservation (5°C). Ejaculates were obtained from five Merino Rams which were collected by artificial vagina and all the samples were pooled at 37°C for detection. All the procedures were applied six times concurrently. Different concentrations (0, 2, 4 and 6 mg/ml) of BSA with Tris-based extender was used for dilution on semen samples. Sperm motility, abnormality, plasma membrane integrity, acrosome integrity and % DNA in tail (COMET assay) content were measured and analyzed. The extender with 4 mg/ml of BSA had both higher motility percentages and plasma membrane integrity, when compare with the control, up to 72 hours (P<0.05). At the 24th and 48th hours of the study, DNA damage was lower in all doses of BSA than in the control group. In addition, in terms of abnormal spermatozoon rates, all doses of BSA were lower than the control group at 24, 48 and 72 hours (P<0.05). In conclusion, it was found to be especially useful to add 4 mg / ml BSA for the ram semen parameters in short term storage.

Keywords: BSA, DNA integrity, Liquid storage, Ram semen.

✉DenizYeni

Afyonkocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, TÜRKİYE.
e-posta: dyeni@aku.edu.tr

*Bu çalışma 17.KARIYER. 68 numaralı proje ile AKÜ BAPK tarafından desteklenmiş ve II. International Congress on Advances in VeterinarySciences&Technics (ICAVST, 2017, Skopje, Macedonia) kongresinde sunulmuştur.

GİRİŞ

Küçük ruminantlarda infertilite veya sterilite dışı hayvanlarda bireysel olarak çok fazla önem taşımazken erkek damızlıklarda sürünün fertilitesi açısından oldukça önemlidir. Küçük ruminantların mevsimsel poliöstrik hayvanlar olmaları ve aşım sezonu esnasında tohumlandıkları halde gebe kalmayan dişilerin genellikle kasaplık olarak değerlendirilmeleri, dölveriminin azalmasına neden olmaktadır.

Spermanın soğutulması veya dondurularak saklama metodlarının amacı, spermatozoanın metabolizmasını yavaşlatmak ve enerjisini azaltarak fertil yaşam süresini uzatmaktır. Bu durum araştırmacıları spermayı saklama yöntemi olarak iki yöntem geliştirmeye sevk etmiştir. Bunlardan ilki likit durumda olan spermanın sıcaklığının istenilen derecelere kadar düşürülmesi (0-5°C veya 10-15°C) ve bu derecelerde spermatozoanın dönüşümlü olarak inaktif duruma getirilmesi, bir diğeri ise, 0°C'den daha düşük sıcaklıklarda dondurularak yapılan saklama yöntemidir. Kısa süreli saklama için en uygun olan sıcaklık dereceleri ile ilgili olarak şimdiye kadar çeşitli görüşler ortaya atılmıştır. Kimi araştırmacılar kısa süreli saklama açısından en ideal sıcaklıkların 10-15°C olduğunu, bazıları da boğa ve koç spermalarının fertilizasyon kabiliyetlerinin devamı açısından 0-5°C'lerin daha uygun olduğunu iddia etmişlerdir (1-3).

Geniş antioksidan türleri arasında BSA, spermatozoonlara karşı çok fonksiyonlu etkisi nedeniyle dikkat çekmektedir. Antioksidan kapasitesine ek olarak, BSA'nın motiliteyi hızlandırdığı, membran ve DNA bütünlüğünü koruduğu, spermatozoa'nın canlılığını arttırdığı ve kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunu indüklediği bildirilmiştir. Bunların bir sonucu olarak, BSA eklenmiş sulandırıcılar, çeşitli memeli sperma türlerinin dondurulması ve kısa süreli saklanmasında kullanılmaktadır (4-7). Sığır serum albumini (BSA) geniş bir protein molekülüdür ve reproduktif sistem sekresyonlarında bulunur. Koç spermasında

çözdürme sonrası spermatozoa motilitesini artırmaktadır. Kolesterol ve BSA en iyi membran koruyucular olarak spermanın kryopreservasyonunda sperma sulandırıcılarına yoğun olarak katılmaktadır (8).

Spermatozoonlardaki genetik hasar ile infertilite arasında önemli bir ilişki vardır. Spermatozoon DNA hasarının infertilite açısından önemi in vitro ve in vivo olarak pek çok kez ortaya konmuştur. Sonuç olarak da DNA hasarlı spermatozoonun fertilizasyon kabiliyetini azaldığı ve artan DNA hasarlı spermatozoon oranının doğal yolla gebe kalma oranını da azaltabileceği bildirilmektedir (9).

Bu çalışmanın amacı kısa süreli (5 °C)'de saklanan Merinos koç spermasında 0, 24, 48 ve 72. saatlerde BSA'nın farklı dozlarının bazı spermatolojik özellikler ve DNA hasarı üzerindeki etkilerini belirlemektir.

MATERYAL ve METOT

Çalışmamızda hayvan materyali olarak Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim Araştırma ve Uygulama Çiftliği şartlarında bakım ve beslenmesi yapılan 3-5 yaşlarında 5 baş Merinos ırkı koç kullanıldı. Çalışma boyunca koçlara yapılan bütün müdahaleler Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından araştırmacılara bildirilen kurallar çerçevesinde 03.05.2017 tarihli, (AKÜHADYEK 202-17) referans no'lu ve 73 sayılı etik kurul onayı ile gerçekleştirildi. Üreme mevsimi dışında, her bir koçtan haftada iki kez olmak üzere toplam 6 ejakulat toplandı. Sperma sulandırıcı olarak Tris (Trisma base 3.63 g, sitrik asit 1.99 g, fruktoz 0.50 g) kullanıldı. Daha sonra farklı yoğunluklarda BSA (2, 4 ve 6 mg/ml) ve herhangi bir antioksidan içermeyen (kontrol) grubu ile birlikte 4 farklı içerikte grup oluşturuldu. Koçlardan elde edilen sperma örnekleri birleştirilerek (pooling) spermatolojik muayeneleri yapıldı ve 4 eşit hacme bölündü. Sulandırılmış olan gruplar 2-2.5 saatte 5°C'ye soğutulduktan sonra

çalışma süresince aynı sıcaklıkta muhafaza edildi. Soğutulma sonrası 0., 24., 48. ve 72. saatlerde spermatojolojik parametreler ve DNA hasarı sonuçları belirlendi. Çalışma süresince sperma örnekleri +5 C° sıcaklıkta saklandı ve yapılan işlemler 6 kez tekrarlandı.

Spermatojolojik Muayeneler

Sperma motilitesi 37°C'de ısıtma tablası kullanılan faz kontrast ataçmanlı mikroskopta (Olympus CX31, Olympus Optical Co., Ltd., Japan) 20x objektifte ve en az 3 farklı alanın ortalaması alınarak yüzde değer olarak kaydedildi (10). Anormal spermatozoon oranları Giemsa boyama yöntemiyle ve mikroskopta immersiyon objektif (100x) kullanmak suretiyle belirlenerek bozukluklar % olarak kaydedildi (11). Membran bütünlüğü ve canlılığının birlikte değerlendirildiği bir test olan HE testi Gündoğan ve ark. (12)'nin metodu kullanılarak yapıldı. Örnekler, 100 mOsm/l'te ayarlanmış HOS (sodyum sitrat-fruktoz) test solüsyonu içerisine %1'lik eozin-Y ilave edilerek ve 35°C'de 30 dakika süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası frotiler hızlıca kurutularak hazır hale getirildi. Hazırlanan preparatlarda toplam 200 hücre sayıldı ve spermatozoon baş kısmının boya alma ve kuyruğunun kıvrılma durumlarına göre;

I.Tip: Kuyruğu şişmiş ve başı boya almamış, HOS+/E-

II.Tip : Kuyruğu şişmemiş ve başı boya almamış, HOS-/E-

III.Tip: Kuyruğu şişmiş ve başı boya almış, HOS+/E+

IV.Tip: Kuyruğu şişmemiş ve başı boya almış, HOS-/E+ şeklinde değerlendirildi.

Spermatozoon DNA hasarı COMET Assay (13) metoduna göre yapıldı floresan ataçmanlı mikroskop (Olympus CX-31) ile her slayttan 100 adet DNA görüntüsü Comet Skor 1.5 (TriTekCorporation) görüntü analiz sistemi ile değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Önemlilik testlerinden önce, tüm değişkenler parametrik normallik varsayımları açısından ShapiroWilks testi ile varyansların homojenliği ise Levene's testi ile incelendi. Normal dağılım gösteren değişkenler arası farklılığın istatistiksel olarak kontrolü tek varyans analizi (One-Way ANOVA) ile belirlendi. Gruplar arası farklılığın anlamlı çıktığı değişkenler için ileri aşama (post-hoc) testi olarak Duncan testi uygulandı. Elde edilen sonuçlar ise ortalama ± standart hata olarak verildi. Bütün istatistiksel analizler en az %5 hata payı ile incelendi. SPSS (Windows; SPSS, 13.0, Chicago, IL, USA) paket programından yararlanıldı ve P<0.05 düzeyi önemli kabul edildi.

BULGULAR

Kısa süreli saklama işlemi boyunca farklı dozlarda BSA'nın sperma özellikleri üzerindeki etkisinin değerlendirildiği çalışmamızda Tablo 1, 0. saat (sulandırıcı sıcaklığı 5°C'ye ulaştığında), Tablo 2, 24. saat, Tablo 3, 48. saat ve Tablo 4, 72. saatler de çalışma gruplarının motilite, anormal spermatozoon ve akrozom oranı, plazma membrane fonksiyonel bütünlüğü ve canlılığı ile DNA hasarını göstermektedir.

Tablo 1. Çalışmada 0. saatte elde edilen ortalama spermatojolojik parametreler ve DNA hasarı oranları (± SEM, n:30).

Table 1. Mean spermatological parameters and DNA damage rates obtained at 0 h in the study (± SEM, n:30).

0 h					
Gruplar (n=30)	Motilite (%)	Anormal Spermatozoon Oranı (%)	Anormal Akrozom Oranı (%)	H+E- (%)	DNA Hasarı (%)
Kontrol	82.0±2.00 ^b	9.1±0.30 ^a	9.7±0.40 ^b	58.4±0.51 ^b	3.6±0.36 ^{bc}
2 mg/ml BSA	83.0±1.70 ^b	5.2±0.70 ^b	12.0±0.63 ^a	57.0±0.83 ^b	3.3±0.12 ^b
4 mg/ml BSA	90.0±0.02 ^b	5.4±0.27 ^b	8.2±0.37 ^c	67.0±0.70 ^a	3.5±0.44 ^b
6 mg/ml BSA	82.0±2.00 ^b	5.7±0.63 ^b	6.4±0.51 ^d	58.0±0.89 ^b	4.2±0.10 ^a

a-c: Herbir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemlidir (P<0.05).H+E-:Kuyruğu şişmiş ve başı boya almamış spermatozoonlar. BSA: Sığır Serum Albumini.

Tablo 2. Çalışmada 24. saatte elde edilen ortalama spermatolojik parametreler ve DNA hasarı oranları ($\bar{X} \pm SEM$, n:30).

Table 2. Mean spermatological parameters and DNA damage rates obtained at 24 h in the study ($\bar{X} \pm SEM$, n:30).

24 h					
Gruplar (n=30)	Motilite (%)	Anormal Spermatozoon Oranı (%)	Anormal Akrozom Oranı (%)	H+E- (%)	DNA Hasarı (%)
Kontrol	78.0±2.00 ^{bc}	10.9±0.70 ^a	11.0±0.71 ^c	60.0±0.54	10.4±0.63 ^a
2 mg/ml BSA	80.0±3.16 ^b	6.6±0.17 ^b	14.6±1.31 ^b	56.4±0.88	8.50±0.48 ^b
4 mg/ml BSA	88.0±2.00 ^a	5.5±0.55 ^b	15.8±0.20 ^b	64.0±1.41	5.40±0.36 ^c
6 mg/ml BSA	80.0±3.13 ^b	5.6±0.43 ^b	20.1±2.94 ^a	60.5±3.22	8.60±0.65 ^b

a-c: Herbir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistikî açıdan önemlidir (P<0.05). H+E-:Kuyruğu şişmiş ve başı boya almamış spermatozoonlar. BSA: Siğir Serum Albumini.

Tablo 3. Çalışmada 48. saatte elde edilen ortalama spermatolojik parametreler ve DNA hasarı oranları ($\bar{X} \pm SEM$, n:30).

Table 3. Mean spermatological parameters and DNA damage rates obtained at 48 h in the study ($\bar{X} \pm SEM$, n:30).

48 h					
Gruplar (n=30)	Motilite (%)	Anormal Spermatozoon Oranı (%)	Anormal Akrozom Oranı (%)	H+E- (%)	DNA Hasarı (%)
Kontrol	70.0±4.47 ^b	12.1±0.87 ^a	19.5±0.13 ^a	50.2±0.66 ^b	17.1±1.41 ^a
2 mg/ml BSA	78.0±2.16 ^a	7.2±0.56 ^b	14.0±0.11 ^b	56.0±0.31 ^a	10.6±0.87 ^b
4 mg/ml BSA	86.6±1.66 ^a	6.6±0.85 ^b	19.1±0.75 ^a	56.4±0.50 ^a	6.9±0.87 ^c
6 mg/ml BSA	82.0±2.00 ^a	6.4±1.00 ^b	20.3±0.44 ^a	52.2±0.63 ^b	12.6±0.93 ^b

a-c: Herbir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistikî açıdan önemlidir (P < 0.05). H+E-:Kuyruğu şişmiş ve başı boya almamış spermatozoonlar. BSA: Siğir Serum Albumini.

Tablo 4. Çalışmada 72. saatte elde edilen ortalama spermatolojik parametreler ve DNA hasarı oranları ($\bar{X} \pm SEM$, n:30).

Table 4. Mean spermatological parameters and DNA damage rates obtained at 72 h in the study ($\bar{X} \pm SEM$, n:30).

72 h					
Gruplar (n=30)	Motilite (%)	Anormal Spermatozoon Oranı (%)	Anormal Akrozom Oranı (%)	H+E- (%)	DNA Hasarı (%)
Kontrol	58.0±2.00 ^c	14.1±0.55 ^a	20.2±0.53 ^b	35.2±1.95 ^c	22.2±1.41
2mg/ml BSA	56.0±1.85 ^c	8.5±0.41 ^b	18.8±0.48 ^b	52.1±0.35 ^b	19.6±3.71
4mg/ml BSA	76.0±2.00 ^a	6.9±0.88 ^c	19.5±0.40 ^b	60.8±1.15 ^a	16.2±3.28
6 mg/ml BSA	65.0±2.11 ^b	9.5±1.26 ^b	22.4±1.75 ^a	47.2±0.37 ^b	26.4±3.74

a-c: Herbir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistikî açıdan önemlidir (P < 0.05). H+E-:Kuyruğu şişmiş ve başı boya almamış spermatozoonlar. BSA: Siğir Serum Albumini.

Motilite değerleri kısa süreli saklama boyunca sürekli bir azalma gösterdi, 4 mg/ml BSA grubunun motilite değerleri 0. saat da dahil olmak üzere, çalışma boyunca kontrol grubuna göre yüksekti

(P<0.05). 72 saatlik saklama sonunda, 4 mg/ml grubu diğer gruplara göre daha yüksek motilite oranına sahipti (P<0.05).

BSA'nın tüm dozlarında kontrol grubuna göre anormal spermatozoon oranları önemli düzeyde düşük bulundu ($P<0.05$). Anormal spermatozoon oranı 72. saat sonunda 4 mg/ml BSA içeren grupta en düşük düzeyde gözlemlendi ve bu değer tüm gruplara göre istatistiki olarak önemli bulundu ($P<0.05$). Anormal akrozom oranı ise 6 mg/ml BSA grubunda 72. saatte kontrol grubuna göre yüksek bulundu ($P<0.05$).

Membran fonksiyonel bütünlüğü ve canlılık açısından 24. saat dışındaki tüm analizlerde kontrol grubuna göre daha yüksek değerler elde edildi ($P<0.05$). Yetmiş iki saatlik saklama sonunda 4 mg/ml BSA grubunda H+E- değeri diğer gruplara göre daha yüksekti ve sonuçlar istatistiki olarak önemli ($P<0.05$) bulundu.

Comet analiz sonuçlarına göre ise % tail DNA değerleri 24 ve 48. saatlerde 4 mg/ml BSA grubundaki DNA hasarı kontrol grubuna göre önemli derecede düşük bulundu ($P<0.05$).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Kısa süreli saklama, kriyoprezervasyonun spermaya verdiği zararlı etkiler nedeniyle koç spermalarının saklanmasında bir alternatifi olarak kullanılmaktadır (14). Ancak spermayı kısa süreli saklamanın da olumsuz etkileri vardır. Kısa süreli saklamada devam eden spermatozoon metabolizması ve soğuk şoku, spermatozoon membranı üzerinde oksidatif stres oluşturur. Oksidatif stres membran akışkanlığını ve enzimatik aktiviteyi değiştirdiğinden spermatozoon yapısına geri dönüşsüz biçimde zarar verir. Bu değişiklikler, spermatozoonun hareketliliğini, canlılığını ve fertilizasyon kabiliyetini düşürür ve MDA düzeylerini de artırır (15). BSA, kararlılığı iyi amino asit profili ve koruyucu fonksiyonundan dolayı, araştırmacılar tarafından pek çok kez sperma sulandırıcısına ilave edilmiştir (7,17,18).

Spermatozoonların motilitesi, sperma değerlendirmesi için vazgeçilmez faktördür. Serviks yoluyla geçiş kabiliyeti ve zona pellucida'nın penetrasyonu için bir göstergedir (16). Birçok

araştırmacı, BSA'nın bilinmeyen bir mekanizma ile spermatozoon motilitesini uyardığını bildirmişlerdir (7,17,18). Çalışmamızda gruplar arasında 0., 24., 48. ve 72. saatlerde motiliteyi kontrol grubuna göre önemli derecede artırdı. 48. saatte tüm BSA gruplarında motilite kontrol grubuna göre önemli düzeyde yüksekti. 2 mg/ml BSA grubu, 72. saatte sperma motilitesini 4 mg/ml BSA grubuna kıyasla önemli ölçüde azalttı; ancak aynı zaman noktasındaki kontrol ve 2 mg/ml BSA motilite değerleri arasında fark yoktu. Sonuçlarımız daha önce yapılan bazı araştırma sonuçlarıyla paralellik arz etmemektedir (17,19). Bu durumun farklı hayvan türlerinin kullanılması ve saklama yönteminden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Çalışmamız da 72 saat sonunda, 4 mg/ml BSA grubunun motilite değeri diğer gruplardan anlamlı derecede yüksekti ve bu motilite düzeyi (%76) suni tohumlama için kabul edilebilirliği yüksek bir değerdir. Kısa süreli saklanan koç spermalarının motilite değerleri, daha önceki çalışmalarda %50-56, %70-84, %60-80, %40-78, %30-77 (sırasıyla 0, 24, 48 ve 72 saat) arasında değişmektedir (20,21,22,23). Çalışmamız sezon dışında yapılmasına rağmen, elde ettiğimiz sonuçlar bu değerlerle uyum içindedir.

Spermatozoonların membran hasarı, soğuk şoku, lipid peroksidasyon ve spermatozoa yaşlanmasından kaynaklanır. Soğuk şoku muhtemelen membran lipidlerinin faz geçişine bağlı spermatozoonun faz ayrımı ve seçici geçirgenliğinin kaybı ile ilgilidir (14). BSA, spermatozoon membranına yapışır ve spermatozoonun lipid kompozisyonunu, plazma membranının lipid değişimi veya hidrolizi, protein hidrolizi ve plazma membranının kolesterol ve fosfolipid yoğunluğunun azalması gibi çeşitli şekillerde değiştirir (24). Plazma membranında artan akışkanlığın spermatozoonun soğuk şokuna karşı duyarlılığını azalttığı bilinmektedir (19). Dolayısıyla BSA'nın soğuk şoka karşı koruyucu etkisi membran akışkanlığını arttırmaya bağlıdır. Spermatozoon parametrelerinin arasında, plazma membranının fonksiyonel bütünlüğü, sperma kalitesinin değerlendirilmesi için çok önemlidir,

çünkü spermatozoonun hayatta kalması için gerekli sınır çizgisini gösterir (16). Plazma zarları spermatozoon sinyalizasyonunu sürdürür ve çevreleyen ortam ile etkileşim sağlarlar, böylece spermatozoon metabolizmasında temel roller oynarlar (4). Plazma zarları ayrıca kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve son olarak spermatozoon oosit füzyonunda da önemli rol oynamaktadır (16). HOS testin, spermatozoon membranlarının fonksiyonel bütünlüğünde meydana gelen küçük değişiklikleri bile tespit etmede etkili bir yöntem olduğu bildirilmektedir (22). Akrozom bütünlüğü fertilizasyon sürecindeki diğer bir önemli faktördür çünkü spermatozoon penetrasyonu ve zona pellusidaya füzyon ile ilişkilendirilmiştir (25). Sarıözkan ve ark. (15), BSA'nın akrozomal bütünlüğü koruduğunu bildirmişler, sonuçlarımız bu fikri doğrulamıştır. Beklendiği gibi plazma zarı ve akrozom bütünlüğü spermatozoanın kısa süreli saklanması sürecinde düzenli olarak azaldı. Bununla birlikte, BSA'nın (2 mg/ml) plazma membranının fonksiyonel bütünlüğü ve akrozom bütünlüğü üzerine koruyucu etkisini gözlemledik. Çalışmamızdaki 2 mg/ml BSA grubunun HOST/E ve akrozom bütünlüğü değerlerini daha önce yapılan çalışmalarla uyum içinde olduğunu belirledik (22).

Düşük sıcaklıklar spermatozoonun membran lipitlerinde faz değişiklikleri ve ozmotik basınç değişimi nedeniyle soğuk şokuna ve membran değişikliklerine sebep olur (23). Fertilité potansiyelinin korunmasında spermatozoon DNA bütünlüğü çok önemlidir. Çeşitli mekanizmalar spermatozoon DNA'sına zarar verebilir. Spermatozoonlar soğuk şoku kaynaklı hasarlara özellikle duyarlı oldukları için, plazma membranları büyük miktarlarda çoklu doymamış yağ asitleri içerdiğinden sitoplazma düşük yoğunluklarda temizleyici enzimler içerir (7,18).

Çalışmamızda özellikle 24. ve 48. saatlerde 4 mg/ml BSA grubunda en düşük DNA hasarı elde edilmiş bu değerler istatistiki olarak önemli bulunmuş ve 72. saatte de nispi olarak en düşük DNA hasarı düzeyi elde edilmiştir. Oksidan üretimi ve antioksidan

koruma dengesinin sağlıklı biyolojik sistemlerin korunması için kritik olduğuna inanılmaktadır. Bu nedenle, yüksek dozdaki antioksidanlar, pro-oksidanlar gibi davranmalarına rağmen en iyi hücresel işlevleri için gerekli olan fizyolojik konsantrasyonlarda mevcut olan ROS ile etkileşme potansiyellerini takiben, hücre işlev bozukluğuna yol açarak redoks dengesini de bozabilirler. Yüksek ROS oranları, lipid peroksidasyonunun yanı sıra proteinler ve DNA gibi diğer hassas biyomoleküllerin oksidasyonuna yol açan zehirli bileşiklerdir (26,27,28).

Sonuç olarak bu çalışma, sezon dışında alınan ve kısa süreli saklama esnasında farklı dozlarda BSA eklenen koç spermasında, tris temelli sulandırıcı içine eklenen 4 mg / mL BSA kullanmanın açık bir avantaj oluşturduğunu gösterdi.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

1. Salamon S., Maxwell WMC., 2000. Storage of ram semen. Anim Reprod Sci, 62, 77-111.
2. Johnson LA., Weitze KF., Fiser P., Maxwell WMC., 2000. Storage of boar semen. Anim Reprod Sci, 62, 143-172.
3. Huo LJ., Yue KZ., Yang ZM., 2002. Characterization of viability, mitochondrial activity, acrosomal integrity and capacitation status in boar sperm during in vitro storage at different ambient temperatures. Reprod Fert Develop, 14, 509-514.
4. Akhter S., Rakha BA., Iqbal R., Ansari MS., 2014. Effect of bovine serum albumin on motility, plasmalemma, viability and chromatin integrity of buffalo bull spermatozoa and chromatin integrity of buffalo bull spermatozoa. Pakistan J Zool, 46, 115-120.
5. Fu J., Li Y., Wang L., Zhen L., Yang Q., Li P., Li X., 2017. Bovine serum albumin and skim-milk improve boar sperm motility by enhancing energy metabolism and protein modifications

- during liquid storage at 17 °C. *Theriogenology*, 102, 87-97.
6. Sarıözkan S., Türk G., Cantürk F., Yay A., Eken A., Akçay A., 2013. The effect of bovine serum albumin and fetal calf serum on sperm quality, DNA fragmentation and lipid peroxidation of the liquid stored rabbit semen. *Cryobiology*, 67, 1-6.
 7. Uysal O., Bucak MN., 2007. Effect of oxidized serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen thawed ram semen. *Acta Vet Brno*, 76, 383-390.
 8. Fardin A., Abbas F., Abbas K., 2010. Effects of cholesterol-loaded cyclodextrin during freezing step of cryopreservation with TCGY extender containing bovine serum albumin on quality of goat spermatozoa. *Cryobiology*, 61, 94-99.
 9. Hughes CM., Lewis SEM., Mckelvey-Martin VJ., Thompson W., 1997. Reproducibility of human sperm DNA measurements using the alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res*, 374, 261-268.
 10. Yeni D., Avdatek F., 2017. Kısa süreli saklanan epididimal Anadolu Mandası spermasına ilave edilen karnosik asitin etkisi. *Kocatepe Vet J*, 10, 187-195.
 11. Tamuli MK., Watson PF., 1994. Use of a simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-population. *Anim Reprod Sci*, 35, 247-254.
 12. Avdatek F., Yeni D., Gündoğan M., 2018. Merinos koçlarda spermaya katılan antioksidanların kısa süreli saklama sırasında spermatolojik parametreler ve DNA hasarı üzerine etkileri. *Kocatepe Vet J*, 11, 126-133.
 13. Yeni D., İnanç ME., Avdatek F., Tuncer PB., Çil B., Türkmen R., Taşdemir U., 2018. Supplementation of rosmarinic acid has reduced oxidative stress on bull spermatozoa following the freeze thawing process. *CryoLetters*, 39, 156-165.
 14. Maxwell WMC., Salamon S., 1993. Liquid storage of ram semen. *Reprod Fertil Dev*, 5, 613-638.
 15. Sarıözkan S., Tuncer PB., Bucak MN., Ulutaş PA., 2009. Influence of various antioxidants on microscopic oxidative stress indicators and fertilizing ability of frozen-thawed bull semen. *Acta Vet Brno*, 78, 463-469.
 16. Alçay S., Gökçe E., Toker MB., Onder NT., Ustuner B., Uzabacı E., Gul Z., Cavus S., 2016. Freeze-dried egg yolk based extenders containing various antioxidants improve post-thawing quality and incubation resilience of goat spermatozoa. *Cryobiology*, 72, 269-273.
 17. Alçay S., Toker MB., Gökçe E., Önder NT., Üstüner B., Nur Z., 2019. Long term incubation resilience of post-thaw ram semen diluted with lecithin based extender supplemented with bovine serum albumin. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 25, 291-297.
 18. Uysal O., Bucak MN., Yavaş İ., Varışlı Ö., 2007. Effect of various antioxidants on the quality of frozen-thawed bull semen. *J Anim Vet Adv*, 6, 1362-1366.
 19. El-Kon I., 2011. Testing usability of bovine serum albumin (BSA) for preservation of Egyptian buffalo semen. *American-Eurasian J Agric Environ Sci*, 11, 495-502.
 20. Gökçe E., Alçay S., Gül Z., 2017. Positive effect of BSA supplemented soybean lecithin based extender on liquid storage of ram semen at 5 °C. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 64, 313-320.
 21. Çoyan K., Başpınar N., Bucak MN., Akalın PP., Ataman MB., Ömür AD., Güngör S., Küçükğünay S., Özkalp B., Sarıözkan S., 2010. Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. *Res Vet Sci*, 89, 426-431.
 22. Gündoğan M., Yeni D., Avdatek F., Fidan AF., 2010. Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. *Anim Reprod Sci*, 122, 200-207.
 23. Sarıözkan S., Türk G., Cantürk F., Yay A., Eken A., Akçay A., 2013. The effect of bovine serum

- albümin and fetal calf serum on sperm quality, DNA fragmentation and lipid peroxidation of the liquid stored rabbit semen. *Cryobiology*, 67, 1-6.
24. Davis BK., Byrne R., Hun B., 1979. Studies on the mechanism of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albümin during capacitation in vitro. *Biochim Biophys Acta*, 558, 257-266.
25. Alçay S., Toker MB., Gökçe E., Üstüner B., Tekin Önder N., Sağırkaya H., Nur Z., Soylu M., 2015. Successful ram semen cryopreservation with lyophilized egg yolk-based extender. *Cryobiology*, 71, 329-333.
26. Bouayed J., Bohn T., 2010. Exogenous antioxidants--Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev*, 3, 228-237.
27. İnanç ME., Çil B., Yeni D., Avdatek F., Orakçı D., Tuncer PB., Türkmen R., Taşdemir U., 2019. The effect of green tea extract supplementation in bull bemen cryopreservation. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 25, 703-708.
28. Avdatek F., Yeni D., İnanç ME., Çil B., Tuncer PB., Türkmen R., Taşdemir U., 2018. Supplementation of quercetin for advanced DNA integrity in bull semen cryopreservation. *Andrologia*, 50, 1-7.