

RESEARCH ARTICLE

J Res Vet Med. 2021; 40 (1) 25-30
DOI:10.30782/jrv.903846

Liyofilizasyon Amaçlı Kullanılan Sulandırıcıların Koç Spermalarının DNA Bütünlüğü Üzerine Etkisi

Burcu ÜSTÜNER^{1*}, **Sema BİRLER²**, **Berrin ZİK³**,
Selim ALÇAY¹, **Gül BAKIRER ÖZTÜRK⁴**, **Sabire GÜLER³**,
Hakan SAĞIRKAYA¹, **Zekariya NUR¹**, **Serhat PABUCCUOĞLU²**

¹ Bursa Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Görükle, Bursa, Türkiye

² İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Avcılar Yerleşkesi, Avcılar, İstanbul, Türkiye

³ Bursa Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Görükle, Bursa, Türkiye

⁴ İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Laboratuvar Hayvanları Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Received 26-03-2021 Accepted 27-04-2021

Özet

DNA hasarının belirlenebilmesi, sperma saklama yöntemlerinin geliştirilmesi açısından önemlidir. Biz çalışmamızda farklı liyofilizasyon medyumları kullanılarak saklanan sperm hücrelerinin DNA bütünlüğünün değerlendirilmesinde akridin oranj (AO) ve terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick and labelling (TUNEL) floresan boyama yöntemlerini kullandık. Koçlardan alınan sperma dört gruba bölündü ve her bir grup: I) %10 fetal buzağı serumu (FCS) içeren TCM 199 solüsyonu II) %10 FCS ve 0,2 mol/L trehaloz içeren TCM 199 solüsyonu III) 50 mmol/L NaCl ve EGTA [Ethylen glycol-bis (β -aminoethyl ether)-N, N, N, N,-tetraacetic acid] 10 mmol/L Tris solüsyonu ve IV) %20 yumurta sarısı ve %7 gliserol içeren Tris bazlı solüsyonlardan biri ile konsantrasyonu 10×10^6 spermatozoa/100 μ L olacak şekilde sulandırıldı.

Taze alınan spermada DNA fragmentasyon oranı AO ve TUNEL yöntemlerinde sırasıyla $2,0 \pm 1,2$ ve $3,8 \pm 3,7$ olarak tespit edildi ($P > 0,05$). AO ve TUNEL yöntemiyle değerlendirilen liyofilizasyon sonrası DNA bütünlüğüne sahip spermatozoa oranlarının, sulandırıcı farklılığına göre etkilenmediği tespit edildi ($P > 0,05$). Aynı şekilde her iki boyama yöntemi karşılaştırıldığında, liyofilizasyon sonrası elde edilen DNA bütünlüğünün değerlendirilmesinde AO ve TUNEL sonuçlarının istatistiksel olarak farklı olmadığı belirlendi ($P > 0,05$).

Çalışmamızın sonuçları; sulandırıcı gruplarından her birinin koç spermalarının liyofilizasyonu için uygun olduğunu ve her iki boyama yönteminin de tercih edilebileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: koç spermaları, liyofilizasyon, DNA bütünlüğü, tunel, akridin oranj

Abstract

Effect of Freeze-Drying Extenders on Ram Sperm DNA Integrity

The ability to detect nuclear damage is an important tool for the development of sperm preservation methods. We used the acridine orange (AO) and the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick and labelling (TUNEL) assay to evaluation of DNA status of sperm cells preserved with different lyophilization media. Collected ram semen were divided into four groups and diluted to a 10×10^6 spermatozoa/100 μ L with one of the extender: I) TCM 199 contained 10% fetal calf serum (FCS), II) TCM 199 contained 10% FCS and 0,2 mol/L trehaloz, III) 10 mmol/L Tris contained 50 mmol/L NaCl and EGTA [Ethylen glycol-bis (β -aminoethyl ether)-N, N, N, N,-tetraacetic acid] and IV) Tris based semen extender contained 20% egg yolk and 7% glycerol and then diluted semen were lyophilized.

Freshly collected semen DNA fragmentation rate was $2,0\% \pm 1,2$ and $3,8\% \pm 3,7$ obtained by AO and TUNEL assay, respectively ($P > 0,05$). The DNA integrity of rehydrated spermatozoa as determined by AO and TUNEL assays were not affected by freeze-drying extender ($P > 0,05$). Similar results were obtained by AO and TUNEL assays after rehydration ($P > 0,05$).

The results of this study showed that each of the diluent groups is suitable for lyophilization of ram semen and that both staining methods can be preferred.

Keywords: ram semen, lyophilization, DNA integrity, tunel, acridine orange

* Sorumlu Yazar: Tel: (+90 224) 294 12 45 Fax: (+90 224) 294 12 02 E-posta: bbaspinar@uludag.edu.tr Adres: Bursa U.Ü. Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Görükle Kampüsü 16059 Bursa, Türkiye.

Giriş

Liyofilizasyon işlemi biyolojik materyallerin dondurulup, düşük basınç altında buzun süblimasyonu ile su miktarının herhangi bir metabolik reaksiyonu desteklemeyecek seviyeye kadar azaltılması işlemidir.¹ Spermanın liyofilize edilerek saklama yöntemi, sıvı azot ikmalini gerektirmemesi, saklanan materyalin transportunu kolaylaştırmasının yanında depolama açısından kolaylık ve alan tasarrufu sağlar. Liyofilize edilen sperma oda sıcaklığında ve 4°C'ta saklanarak transportunun yapılması söz konusudur.

Günümüzde sığır, at, fare, domuz, tavşan ve koç gibi çok sayıda farklı memeliden liyofilize edilmiş spermanın intra stoplazmik enjeksiyonu ile embriyo elde edilmiştir.²⁻⁸ Wakayama ve Yanagimachi⁹ farede liyofilize sperma ile ilk canlı yavruyu bildirdikten sonra ilk kez çiftlik hayvanlarında liyofilize sperma ile 2011 yılında ilk tayı ve 2020 yılında da ilk canlı dişi buzağı doğumu bildirilmiştir.^{3,10}

Liyofilizasyon işlemi esnasında spermatozoa motilitesini kaybeder dolayısıyla liyofilize edilmiş spermanın in vivo ve in vitro koşullarda kendi kendine oositi fertilize etme yeteneği bulunmamaktadır. Genetik yapısı sağlam olan spermatozoonun in vitro olarak (intra stoplazmik sperm enjeksiyonu) ICSI yöntemiyle fertilizasyon amaçlı kullanılması gerekir.⁶ Bu yüzden liyofilize spermadan canlı yavru elde edebilmek için mutlaka spermanın genetik yapısının korunmuş olması gerekir.^{9,11}

Liyofilizasyon prosedüründe sperm DNA hasarına neden olan ana problemlerden biri yıkımlanan sperm plazma membranından salınan endojen endonükleazların rolü ve reaktif oksijen radikalleridir (ROS).^{11,12} Bu anlamda liyofilizasyon işlemi için kullanılan sulandırıcının spermayı koruyucu özellikte olması gerekmektedir. Özellikle liyofilizasyon sulandırıcısına katılan EDTA ve glycol tetraacetic acid (EGTA) gibi şelatör ajanların sperm DNase'ı inaktive ederek sperm DNA bütünlüğü üzerinde etkisi olduğu bilinmektedir.^{11,13} Ayrıca antioksidan özelliği bulunan bazı katkı maddelerinin liyofilize sperm DNA bütünlüğüne olan etkileri araştırma konusu olmaktadır.¹²

Yardımcı üreme tekniklerinde liyofilize edilmiş spermanın kullanım etkinliği için sperm DNA yapısının doğru şekilde belirlenmesi önemlidir. Sperm kromatin yapısı ve DNA yapısının belirlenmesinde kullanılan birçok yöntem bulunmaktadır.¹⁴

Bu yöntemlerden acridine orange (AO) ve TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick-end labeling) en çok kullanılan tekniklerdir. AO boyama yönteminde; sperm nüklear DNA'sının akrinin oranın metakromatik özelliği aracılığıyla asitle oluşturulan denatürasyona dayanıklılığı ölçülür. Bu boya DNA'ya monomermiş gibi eklenerek çift zincir DNA ile yeşil renk verir ve tek zincir-

li DNA'ya veya RNA'ya eksitasyon sonrası kırmızı-turuncu ışık yayarak bağlanır.¹⁵ TUNEL yönteminin özelliği ise işaretlenmiş terminal deosinükleotit transferaz (TdT) kullanılarak, enzimatik olarak katalizlenmiş reaksiyon aracılığı ile tek ve çift zincir DNA kırıklarındaki DNA prekürsörlerinin (dUTP: deosüridin trifosfat) gösterilmesidir. Bu zincir kırık sayısını arttırarak floresan edilmiş dUTP ile DNA'nın 3'-OH ucunu birleştirir.¹⁶

Bu çalışmanın amacı farklı sulandırıcıların liyofilize edilen koç sperm genetik yapısı üzerine etkisinin değerlendirilmesi ve aynı zamanda DNA bütünlüğünün değerlendirilmesinde kullanılan AO ve TUNEL boyama yöntemlerinin karşılaştırılmasıdır.

Materyal ve Metot

Çalışmada, Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde aynı bakım ve besleme koşullarında barındırılan 3-5 yaş aralığında toplam 5 baş Kıvrıcık ırkı koç kullanıldı (Etik Kurul No: No.2008-5/8).

Spermanın alınması

Aşım sezonu içinde, her koçtan sperma gün aşırı olmak üzere elektro- ejakülatör (Ruakura Ram Probe Plastic Products, Hamilton, New Zealand) yöntemiyle toplam 5 kez alındı.¹⁷ Alınan spermalar 30°C'ta su banyosuna aktarıldıktan sonra kısa bir süre içerisinde mass aktivite (0-5 skala), motilite (%0-100) ve konsantrasyon (spermatozoa/mL) yönünden değerlendirildi. Ejakülatlardan en az 3-5 mass aktivite, %70 motilite ve 2×10^9 spermatozoa/mL özelliğe sahip olanlar birleştirildi (pooling).¹⁷

Liyofilizasyon solüsyonları

Liyofilizasyon amaçlı sulandırıcıların hazırlanmasında Sigma-Aldrich (St.Louis, USA) marka kimyasallar kullanıldı. Pooling yapılan sperma 4 eşit hacime bölünerek her bir grup: I) %10 fetal buzağı serumu (FCS) içeren TCM 199 solüsyonu (TCM+FCS) II) %10 FCS ve 0,2 mol/L trehaloz içeren TCM 199 solüsyonu (TCM+FCS+trehaloz) III) 50 mmol/L NaCl ve EGTA [Ethylen glycol-bis (β -aminoethyl ether)-N, N, N, N,-tetraacetic acid] 10 mmol/L Tris solüsyonu (Tris+NaCl+EGTA)18 ve IV) %20 yumurta sarısı ve %7 gliserol içeren Tris bazlı (Tris+YS+G)17 solüsyonlardan biri ile konsantrasyonu 10×10^6 spermatozoa/100 μ L olacak şekilde sulandırıldı.

Spermanın liyofilize edilmesi ve liyofilizasyon sonrası sulandırılması

Sulandırılan sperma gruplarının, oda ısısında 30 dakika bekletilerek sulandırıcıya uyumu sağlandı. Liyofilizasyon amaçlı kullanılan kapaklı cam kriyojenik tüplere 100 μ L sperma konularak sıvı azot içine daldırıldı. Daha sonra dondurulan sperma ön soğutulmuş (-40°C) ve 350×10^{-3} bar basınca ayarlanmış liyofilizatöre (Labconco, Tri-

ad, U.S.) aktarılarak 12-16 saat boyunca liyofilize edildi. Liyofilize edilmiş sperma alüminyum folyo ile sarılarak buzdolabında (+4 °C'de) kullanılabilecek kadar saklandı.^{7,8} Liyofilize edilmiş sperma örnekleri spermatolojik değerlendirmede kullanılacağı zaman oda sıcaklığında 100 µL ultra saf su eklenerek sulandırıldı. Spermatolojik değerlendirmeler için 20 µL sulandırılmış sperma örneğine 1000 µL PBS ilave edildi ve 2000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatant ayrıldı. Spermatozoa içeren pellet ise 1000 µL PBS ile tekrar sulandırıldı.

Spermatolojik muayeneler:

Liyofilizasyon sonrası spermatozoonlar ölü olduğu için motilite değerlendirmesi yapılmadı.

Spermanın taze ve liyofilizasyon sonrası DNA bütünlüğü, acridine orange (AO) ve terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick and labelling (TUNEL) floresan boyama yöntemleri ile belirlendi. Liyofilizasyon sonrası her iki boyama yöntemiyle, her sulandırıcı grubuna ait en az on yedi numunenin değerlendirilmesi yapıldı.

Acridine-orange (AO) boyama yöntemi

Çalışmamızda sperm DNA bütünlüğünün belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden birisi AO floresan boyama yöntemidir.¹⁷ Santrifüj sonrası PBS ile tekrar sulandırılan pelletten bir damla alınarak lama froti çekildi ve kurutuldu. Kuruyan frotiler taze olarak hazırlanan Carney'in solüsyonunda (3/4'ü metanol ve 1/4'ü glacial asetik asitten oluşmaktadır) bir gece tespit edildi. Tespit sonrası lamlar bir-iki dakika oda ısısında kurutulduktan sonra 3 dakika AO ile boyandı. Boyanan preparatlar zaman geçirilmeksizin floresan mikroskopta değerlendirildi. DNA bütünlüğü olan hücreler baş bölgesinde yeşil renk yansıma yaparken, anormaliteye sahip olan hücrelerde yeşilden kırmızıya göre değişken yansımalar gözlemlendi. En az 100 adet spermatozoa değerlendirilerek her preparatta kromatin hasarı değerlendirildi.¹⁷

Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick and labelling (TUNEL) yöntemi

Spermada DNA kırıklarının tespit edilmesi histokimyasal TUNEL metodu ile saptandı. TUNEL boyama prosedüründe in Situ Cell Death Detection Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) kullanılarak, Benchaib ve ark.'nın¹⁹ prosedürü temel alındı. Bu amaçla 5-10 µL yıkanmış sperm örneği PAP-pen ile sınırlandırılmış poly-lizin kaplı lamlara damlatılarak, 4°C ısıda buzdolabında 1 gece bırakıldı. Daha sonra üzerindeki fazla sıvı alınarak frotiler %10 formaldehit içerisinde 20 dakika tespit edilip 3 defa PBS'de yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan frotiler boyama zamanına kadar 4°C ısıda saklandı. Boyama zamanında frotiler PBS ile 3 defa 15 dakika yıkanıp oda ısısında 10 dakika Proteinaz K ile muamele edilerek tekrar PBS ile 2 defa 5 dakika süreyle yıkandı. Daha sonra en-

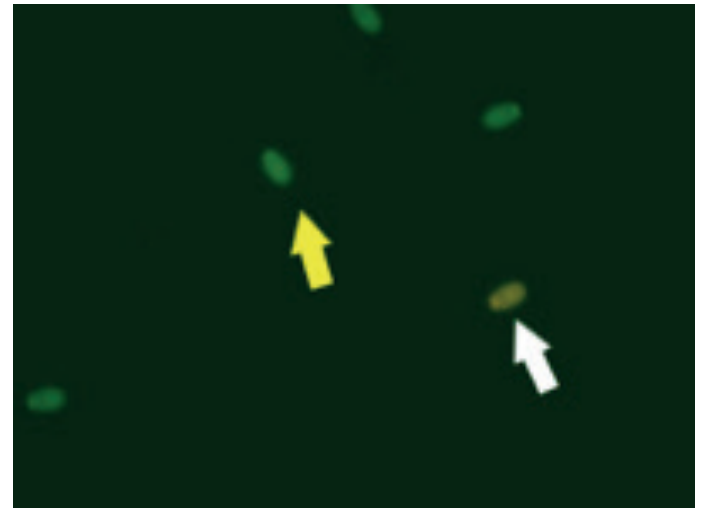
dojen peroksidaz aktivitesini önlemek amacıyla %3 H₂O₂ (hidrojen peroksit) ile oda ısısında 10 dakika bekletilerek tekrar PBS ile 2 defa yıkandı. Permiabilizasyonu artırmak amacıyla preparatlara Triton X-100 (%0.1) ilave edilerek 5 dakika buz aküler üzerinde inkübe edildi. Pozitif kontrol amacıyla bazı preparatlara 37°C ısıda 10 dakika DNase uygulandı. TUNEL uygulanacak preparatlara; enzim 1/3 oranında dilüsyon buffer ile sulandırılarak her 5 µL dilüe edilen enzime 45 µL label ilave edilerek karanlıkta 37°C ısıdaki etüvde 1 saat inkübe edildi. Boyanan preparatlar PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra, üzerlerine mounting medium damlatılarak lamel kapatıldı ve karanlıkta floresan mikroskopta 100 spermatozoa incelenerek DNA fragmentasyonuna sahip spermatozoa oranı (%) belirlendi.¹⁹

İstatistiksel Analiz

Sonuçlar SPSS (Windows için SPSS 23.0; SPSS, Chicago, IL, ABD) kullanılarak analiz edildi. Liyofilizasyon amaçlı kullanılan dört farklı sulandırıcının, iki farklı yöntemle tespit edilen sperm DNA bütünlüğü üzerine etkisi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile tespit edildi. P <0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Spermanın taze ve liyofilizasyon sonrası DNA hasarı, acridine orange (AO) ve terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick and labelling (TUNEL) floresan boyama yöntemleri ile belirlendi (Şekil 1 ve 2).



Şekil 1. Koç spermalarının acridine orange ile boyama sonrası görüntüsü

Sarı okla gösterilen spermatozoonun DNA bütünlüğü söz konusu iken, beyaz okla gösterilen sarı ve kırmızı renk aralığında gözlemlenen spermatozoon DNA hasarına sahiptir.

Taze spermada AO ve TUNEL yöntemleri ile tespit edilen DNA hasarı oranları sırasıyla; %2,0±1,2 ve %3,8±3,7'dir. Boyama yöntemleri karşılaştırıldığında, taze spermada AO ve TUNEL yöntemleri arasında DNA hasarı yönünden



Şekil 2. Koç spermasının Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick and labelling (TUNEL) ile boyama sonrası görüntüsü

Bakılan mikroskop sahasında yeşil renk floresan veren tüm spermatozoonlarda DNA hasarı bulunmaktadır.

istatistiksel bir fark tespit edilmedi ($P>0.05$). Çalışmada liyofilizasyon sonrası AO ve TUNEL yöntemi ile tespit edilen sperm DNA bütünlüğünün taze spermaya göre olumsuz yönde etkilendiği gözlemlendi.

Farklı sulandırıcılarla liyofilize edilen koç spermasının AO ve TUNEL floresan boyama yöntemleri ile tespit edilen DNA fragmentasyonuna sahip spermatozoa oranı Tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo 1. Farklı sulandırıcılarla liyofilize edilen koç spermasında DNA hasarının acridine orange (AO) ve terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick and labelling (TUNEL) yöntemleri ile karşılaştırılması.

Boyama	Grup	n	DNA fragmentasyon oranı (%)
AO	TCM+FCS	22	5,2±0,5 ^a
	TCM+FCS+trehaloz	24	5,0±0,5 ^a
	Tris+NaCl+EGTA	21	6,1±0,6 ^a
	Tris+YS+G	23	6,5±0,7 ^a
TUNEL	TCM+FCS	17	8,8±1,4 ^a
	TCM+FCS+trehaloz	18	9,0±1,2 ^a
	Tris+NaCl+EGTA	18	8,1±1,4 ^a
	Tris+YS+G	19	10,7±2,4 ^a

a Ortak karakter taşıyan gruplar arası istatistiksel fark bulunmamaktadır ($P>0.05$).

AO ve TUNEL yöntemiyle değerlendirilen liyofilizasyon sonrası DNA bütünlüğüne sahip spermatozoa oranlarının, sulandırıcı farklılığına göre etkilenmediği tespit edildi ($P>0.05$). Aynı şekilde her iki boyama yöntemi karşılaştırıldığında, liyofilizasyon sonrası elde edilen DNA bütünlüğünün değerlendirilmesinde AO ve TUNEL

sonuçlarının istatistiksel olarak farklı olmadığı belirlendi ($P>0.05$).

Tartışma ve Sonuç

Dondurarak ya da liyofilize ederek spermanın saklama prosedürlerinin her ikisinde spermatozoa üzerinde farklı olumsuz etkileri bulunmaktadır. Spermanın liyofilize edilmesi esnasında membran yapısı zarar görerek spermatozoon motilitesini kaybetmekte ve dolayısıyla yalnızca in vitro olarak ICSI yöntemiyle embriyonik gelişim elde edilebilmektedir. Dondurarak saklama yönteminde ise, dondurma prosedürünün sperm plazma membranı üzerindeki mekanik stresi ve aşırı ROS üretimine bağlı olarak spermanın genetik materyali negatif yönde etkilenerek sperm DNA fragmentasyon oranı artmaktadır.^{20,21} Liyofilizasyon prosedürü spermanın saklanmasında alternatif bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, farklı sulandırıcılarla liyofilize edilen koç spermasında DNA hasarını belirlemek amacıyla AO ve TUNEL boyama yöntemlerinin karşılaştırılması yapıldı.

Taze alınan koç spermasında AO ($2,0 \pm 1,2$) ve TUNEL ($3,8 \pm 3,7$) yöntemleri ile tespit edilen DNA hasar oranlarının düşük olduğu belirlendi. Çalışmamızda taze spermada elde edilen sperm DNA hasarının, Nur ve ark.¹⁷ ve Üstüner ve ark.⁸ ile uyum sağladığı fakat Alçay ve ark.'nın²² sonuçlarından daha düşük olduğu gözlemlendi. TUNEL metodu ile belirlenen DNA hasar oranlarının çalışmalar arasında farklı çıkmasının sebebi; sperma alınan bireyin taze sperm DNA fragmentasyon oranının bireysel farklılığının olması bazen de aynı bireyin farklı ejakülatları arasında bu oranların değişkenlik göstermesidir.²³

Her iki boyama yönteminde sperm DNA bütünlüğünü koruyucu özellikleri bakımından liyofilizasyonda kullanılan farklı sulandırıcıların karşılaştırılmasında istatistiksel bir farkın olmadığı gözlemlendi ($P>0.05$). Martins ve ark.¹⁸ boğa spermasını farklı sulandırıcılarla liyofilize ettikleri çalışmada, EGTA sulandırıcısının spermayı DNA bütünlüğü bakımından diğer sulandırıcılara göre daha üstün koruduğunu fakat sulandırıcı grupları arasında istatistiksel farkın olmadığını bildirmiştir. Çalışmamızda da EGTA sulandırıcısı istatistiksel olarak farklı olmasa da özellikle TUNEL boyama prosedüründe diğer sulandırıcılara göre sperm DNA bütünlüğünü daha iyi koruduğu belirlendi ($P>0.05$). Kaneko ve Nakagata¹³ liyofilizasyon solüsyonuna küçük miktarlarda şelatör ajanların ilavesinin (EDTA ve EGTA) liyofilizasyon prosesi boyunca fare spermasının DNA hasarını azalttığını, özellikle EGTA'nın daha etkin olduğunu bildirmiştir. Buna karşılık, Nakai ve ark.²⁴ domuz spermasının liyofilizasyonunda EDTA ve EGTA'nın endonükleaz aktiviteyi önlemede aynı oranda etkili olduğunu belirtmiştir. Aygır ve köpek spermasında yapılan

çalışmalarda ise liyofilizasyon solüsyonuna eklenen EG-TA'nın DNA'yı koruyucu etkisinin EDTA'dan daha yüksek olduğu bildirilmiştir.^{12,25}

Olaciregui ve Gil¹² köpek spermasının liyofilizasyonunda, trehaloz ilave edilmiş olan sulandırıcının sperm genetik yapısını trehalozsuz sulandırıcıya göre daha iyi koruduğunu tespit etmiştir. Trehalozun, uzun süreli saklama boyunca liyofilize edilmiş lipid/DNA kompleksini koruyamadığı²⁶ ve trehalozun tek başına liyofilizasyon prosedüründe yeterli olmadığı tespit edilmiştir.²⁷ Çalışmamızda liyofilizasyon sulandırıcıları arasında sperm DNA bütünlüğünü koruma yönünden istatistiksel olarak fark tespit edilmemesi ($P>0.05$), belirtilen çalışmalarda ki tür farklılığından kaynaklanabilir.

Aynı şekilde her iki boyama yöntemi karşılaştırıldığında, liyofilizasyon sonrası elde edilen DNA bütünlüğünün değerlendirilmesinde AO ve TUNEL sonuçlarının istatistiksel olarak farklı olmadığı belirlendi ($P>0.05$). Martins ve ark.¹⁸ farklı sulandırıcılarla liyofilize ettikleri boğa spermasında TUNEL yöntemi ile tespit edilen DNA bütünlük oranının in vitro fertilizasyon sonuçları ile pozitif ilişkili olduğunu fakat aynı korelasyonu AO boyama yönteminde saptayamadıklarını bildirmiştir. Duran ve ark.²⁸ ve Evenson ve ark.²⁹ AO boyama yönteminde floresanın hızlı bir şekilde solması ve preparatın heterojen olarak boyanmasının, sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanmasında problem teşkil ettiğini bildirmiştir. Çalışmamızda AO ve TUNEL boyama grupları arasında istatistiksel bir fark tespit edilmemesine rağmen TUNEL yönteminde liyofilizasyon sonrası farklı sulandırıcı gruplarında elde edilen DNA fragmentasyon oranının daha yüksek olması; TUNEL boyama yönteminin belirtilen nedenlere bağlı olarak daha hassas olabileceğini düşündürmektedir.

Liyofilizasyon spermanın saklanması hususunda önemli modern biyoteknolojik bir yöntemdir. Liyofilizasyon prosedüründe kullanılan sulandırıcının kompozisyonu, spermanın saklanması ve bu spermalarla elde edilen fertilizasyon sonuçların başarılı olması için gerekli olan temel faktörlerden biridir. Sonuç olarak; çalışmamızın farklı sulandırıcı gruplarıyla liyofilize edilen koç spermasının AO ve TUNEL boyama yöntemleriyle belirlenen DNA fragmentasyon oranlarında istatistiksel bir fark tespit edilmemesi, sulandırıcı gruplarından her birinin koç spermasının liyofilizasyonu için uygun olduğunu ve her iki boyama yönteminin de tercih edilebileceğini göstermektedir.

Teşekkür

Bu çalışma, TÜBİTAK 108R018 No'lu proje tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Hara H, Tagiri M, Hwang IS, et al. Adverse effect of cake collapse on the functional integrity of freeze-dried bull spermatozoa. *Cryobiology* 2014; 68: 354–360.
2. Keskinetepe L, Pacholczyk G, Machnicka A, et al. Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Biol Reprod.* 2002; 67: 409-415.
3. Choi YH, Varner D, Love CC, et al. Production of live foals via intracytoplasmic injection of lyophilized sperm and sperm extract in the horse. *Reproduction* 2011; 142 (4): 529-538.
4. Kaneko T, Whittingham DG, Yanagimachi R. Effect of pH value of freeze-drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa. *Biol Reprod.* 2003; 68: 136-139.
5. Nanassy L, Leeb K, Javora A, et al. Changes in MPF and MAPK activities in porcine oocytes activated by different methods. *Theriogenology* 2007; 68: 146 – 152.
6. Liu, JL, Kusakabe H, Chang CC, et al. Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biol Reprod.* 2004; 70: 1776-1781.
7. Nur Z, Birler S, Üstüner B, et al. Koç spermasının liyofilizasyonu ve intra-stoplazmik sperm enjeksiyonu yöntemi ile embriyo üretimi, 2009; TEBAG- 108R018.
8. Üstüner B, Pabuccuoglu S, Demir K, et al. Liyofilize koç sperm plazma membranının embriyonik gelişim üzerine etkileri, 2013; TOVAG-113O593.
9. Wakayama T, Yanagimachi R. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat Biotechnol.* 1998; 16: 639-641.
10. Matsukawa, K., Wagyu calf born after conception with freeze-dried semen in Japan. <https://english.kyodonews.net/news/2020/04/61b68b6dbd2a-wagyu-calf-born-after-conception-with-freeze-dried-semen-in-japan.html?phrase=postwords=&words=>, Accessed Apr 18, 2020.
11. Kusakabe H, Szczygiel MA, Whittingham DG, et al. Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13501–13506.
12. Olaciregui, M, Gil L. Freeze-dried spermatozoa: a future tool? *Reprod Dom Anim.* 2017; 52 (2): 248–254.
13. Kaneko T, Nakagata N. Improvement in the long-term stability of freeze-dried mouse spermatozoa by adding of a chelating agent. *Cryobiology* 2006; 53: 279–282.
14. Erenpreiss J, Jepson K, Giwercman A, et al. Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation:

- comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *Hum Reprod.* 2004; 19 (10): 2277-2282.
15. Rigler R. Microfluorometric characterization of intracellular nucleic acids and nucleoproteins by acridine orange. *Acta Physiol Scand.* 1966; 67 (267): 1-122.
 16. Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2000; 15 (6): 1338-1344.
 17. Nur Z, Zik B, Ustuner B, et al. Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. *Theriogenology* 2010; 73 (9):1267-1275.
 18. Martins CF, Dode MN, Báo, SN, et al. The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of; freeze-dried bovine spermatozoa DNA. *Genet Mol Res.* 2007; 6: 94-104.
 19. Benchaib M, Braun V, Lornage J, et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod.* 2003; 18: 1023-1028.
 20. Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl.* 2000; 21: 1-7.
 21. Koppers AJ, De Iuliis GN, Finnie JM, et al. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93: 3199-3207.
 22. Alcay S, Toker B, Ustuner B, et al. Investigation of relationships between DNA integrity and fresh semen parameters in rams. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2014; 20 (5): 793-798.
 23. Takeda K, Uchiyama K, Kinukawa M, et al. Evaluation of sperm DNA damage in bulls by TUNEL assay as a parameter of semen quality. *J Reprod Dev.* 2015; 61 (3): 185-190.
 24. Nakai M, Kashiwazaki N, Takizawa A, et al. Effects of chelating agents during freeze-drying of boar spermatozoa on DNA fragmentation and on developmental ability in vitro and in vivo after intracytoplasmic sperm head injection. *Zygote* 2007; 15 (1): 15-24.
 25. Olaciregui M, Luño V, Marti JI, et al. Freeze-dried stallion spermatozoa: evaluation of two chelating agents and comparative analysis of three sperm DNA damage assays. *Andrologia* 2016; 48: 988-994.
 26. Molina MC, Armstrong TK, Zhang Y, et al. The stability of lyophilized lipid/DNA complexes during prolonged storage. *J Pharm Sci.* 2004; 93, 2259-2273.
 27. Garcia de Castro A, Lapinski J, Tunnacliffe A. Anhydrotic engineering. *Nat Biotechnol.* 2000; 18: 473.
 28. Duran EH, Gurgan T, Gunalp S, et al. A logistic regression model including DNA status and morphology of spermatozoa for prediction of fertilization in vitro. *Hum Reprod.* 1998; 13: 1235-1239.
 29. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod.* 1999; 14 (4): 1039-1049.