

Teke Spermasının Morfolojik Değerlendirilmesinde Farklı Boyama Metotlarının Kullanılması

Zekariya NUR* Ülgen GÜNAY** İbrahim DOĞAN***
Burcu BAŞPINAR**** M.Kemal SOYLU*****

Geliş Tarihi: 21.07.2003

Kabul Tarihi: 29.09.2003

Özet: Bu çalışmada Saanen ırkı teke spermasının değerlendirilmesinde Eozin-nigrozin (EN), Gimza ve ikili boyama yöntemi olan Eozin-nigrozin sonrası Gimza (EN-G) boyama metotlarının kullanılabilirliği araştırıldı. EN, Gimza ve EN-G boyama yöntemlerinde akrozomal bozukluk (AB) oranları sırasıyla; %3.5±0.4, %7.2±0.4 ve %9.1±0.4; Diğer Morfolojik Bozukluk (DMB) oranı 2.8±0.2, 2.4±0.2 ve 2.8±0.2, Toplam Morfolojik Bozukluk (TMB) oranı ise sırasıyla 6.3±0.4, 9.6±0.4 ve 11.9±0.4 olarak saptandı. En yüksek AB ve TMB oranı EN-G boyama metodunda elde edildi (P<0.05). EN ve EN-G boyama metotları arasında ölü spermatozoon oranları arasında istatistiksel bakımdan fark bulunmadı. Sonuç olarak EN-G metodu kullanılarak yapılan boyama sonucunda ölü spermatozoon oranı, AB, DMB ve TMB morfolojik bozukluk oranlarının tek bir preparattan daha ayrıntılı olarak değerlendirilebileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Teke sperması, boyama metotları, morfoloji.

Evaluation of Goat Semen Morphology After Different Staining Methods

Summary: This study was designed to assess effectiveness of different staining methods, Eosin-nigrosin (EN), Giemsa and double staining method Eosin-nigrosin combined with Giemsa (EN-G), to detect dead spermatozoa, defected acrosome rates (AB), Other Morphological Defect (DMB) and Total Morphological Defect (TMB) in fresh Saanen semen. The percentages of spermatozoa with AB, DMB and TMB were 3.5%, 7.2% and 9.1%; 2.8%, 2.4% and 2.8%; and 6.3%, 9.6% and 11.9% in EN, Giemsa and EN-G, respectively.

The highest AB was observed in EN-G staining method (P<0.05). There were no significant differences in percentage of dead spermatozoa between EN and EN-G staining methods.

In conclusion, EN-G staining method could be used to distinguish the percentage of dead spermatozoa, AB, DMB and TMB in the same slide.

Key Words: Goat semen, staining methods, morphology.

* Araş.Gör.Dr.; U.Ü. Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Bursa-TÜRKİYE.

** Yard.Doç.Dr.; U.Ü. Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Bursa-TÜRKİYE.

*** Doç.Dr.; U.Ü. Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Bursa-TÜRKİYE.

**** Dokt.Öğr.; U.Ü. Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Bursa-TÜRKİYE.

***** Prof.Dr.; U.Ü. Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Bursa-TÜRKİYE.

Giriş

Evcil hayvanlarda erkek bireyin potansiyel fertilitésinin belirlenmesi ve genital organlarının sağlık durumunun değerlendirilmesinde bireyden elde edilen ejakulatin spermatolojik muayenesi önemlidir. Ejakulattaki anormal yapı ve morfolojik bozuklukların infertilite ile doğrudan ilgili olduğu çok sayıda araştırmacı^{1,14,20,25,35} tarafından bildirilmiştir.

Canlı ve ölü spermatozoonların ayırt edilmesinde Eozin-nigrozin^{9,11}, Propidium iodide, Carboxyfluorescein diacetate^{8,10,24} gibi yöntemler kullanılmaktadır. Evcil hayvanların spermasındaki morfolojik bozuklukların saptanması amacıyla Eozin-nigrozin^{7,18,32}, Nigrozin-eozin^{6,23,28,33}, opal blue¹⁸, fast green^{17,32}, Gimza^{7,9,11,18} gibi boyama yöntemleri dışında sıvı fizyasyon yöntemlerinin de kullanılabilieceği bildirilmiştir^{9,11}.

Morfolojik değerlendirmenin başlıca amacı normal ve anormal spermatozoonların ayırt edilmesidir^{9,11,26}. Ayrıca morfolojik bozukluğun lokalizasyonu, çeşidi ve miktarının fertilité ile sıkı bir ilişkisi olup anormal yapıdaki spermatozoonların fertilité yetenekleri yoktur. Fertilizasyonda önemli rol oynadığından morfolojik incelemelerde akrozomun ayrı bir önemi vardır. Pek çok araştırmada, akrozom reaksiyonun post-mortem bir değişiklik olarak ölü hücrelerde oluştuğu, plazma ve akrozom mebranlarının hasarı veya kaybıyla karakterize olduğunu bildirilmektedir^{2,3,5}.

Triple stain, Bismark Brown, Rose Bengal gibi aynı preparatta ölü, canlı ve akrozom bütünlüğünün incelenmesine olanak sağlayan teknikler geliştirilmiştir^{21,30}. Mortimer ve ark.¹⁶, bu tekniklerin ölü hücrelerin ayırt edilmesinde kullanışsız olduğunu ve bu teknikleri kullanan laboratuvarlar arasında yüksek oranda farklılıklar olduğunu bildirmişlerdir. EN-G metodu Tamuli ve Watson³¹ tarafından alternatif bir boyama metodu olarak geliştirmiştir.

Bu çalışmada taze teke spermasının değerlendirilmesinde üç farklı boyama metodunun karşılaştırılması ve bunun yanı sıra tek bir preparat üzerinde ölü spermatozoon, akrozomal bozukluk, diğer ve toplam morfolojik bozukluk oranlarının EN-G metodu ile belirlenebilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışmada materyal olarak aynı bakım ve besleme koşullarına sahip 6 adet Saanen ırkı teke kullanıldı. Sperma sıfat sezonuna geçiş döneminde suni vajen yöntemiyle ve günde iki kez olmak üzere beş gün boyunca her tekeden 10'ar defa toplandı. Alınan toplam 60 ejakulat spermatolojik muayene için 35°C su banyosuna aktarıldı.

Morfolojik Muayene:

Her bir sperma örneğinin morfolojik muayenesi için Eozin-nigrozin (EN), Gimza ve ikili boyama yöntemi olan Eozin-nigrozin sonrası Gimza (EN-G) boyama yönteminden oluşan üç farklı yöntem kullanıldı.

Eozin-nigrozin ve Gimza Boyasının Hazırlanması:

Eozin-nigrozin ana solüsyonu %1 Eozin ve %8 Nigrozin olacak şekilde hazırlandı. On damla Gimza ana solüsyonu 5 ml distile su ile karıştırılarak Gimza boyası elde edildi¹¹.

Boyama İşlemi:

Bir damla serum fizyolojik üzerine bir damla sperma damlatılarak, 1/1 oranında EN boyası ile karıştırılarak sürme froti hazırlandı. Gimza yönteminde ise 1 damla sperma 1/1 oranında serum fizyolojik ile karıştırılarak sürme froti hazırlandı. Hazırlanan preparatlar kurutulurak 10 dk süreyle metil alkolde tespit edildi. Metil alkol dökülerek lam üzerine hazırlanan Gimza boyası aktarıldı ve 45 dk boyandı. Boyama işleminin sonrasın preparatlar distile su ile yıkanarak kurumaya bırakıldı. Her iki yöntemde de her ejakulattan iki adet froti hazırlandı.

EN-G boyama yönteminde yukarıda tanımlanan EN yönteminde belirtilen şekilde her ejakulattan hazırlanıp kurutulan frotilerden bir tanesi Tamuli ve Watson tarafından belirtilen Tartarat Fosfat Buffer (TFB) solüsyonda 10 dk süreyle tespit edildi^{22,31}.

TFB Tespit Solüsyonunun Hazırlanması²²:

Na ₂ HPO ₄	50 mMol
KH ₂ PO ₄	25 mMol
Potasyum sodyum tartarat	77 mMol
Bidistile su	q. s. p.100 ml

Hazırlanan solüsyona %4 (v/v) olacak şekilde formalin solüsyonu eklendi. Tespit edilen preparatlar Gimza boyama yönteminde belirtildiği şekilde 90 dk boyandı.

Ölü Spermatozoon Oranının Saptanması:

EN ve EN-G yöntemleri ile boyanan her bir preparattan 200 spermatozoon sayılarak boya alan ölü spermatozoonların oranı % olarak belirlendi. Sadece EN ile boyanan preparatlarda pembe renk alanlar, EN-G yönteminde ise koyu mor renkte gözlenen spermatozoonlar ölü olarak kabul edildi³¹.

Her üç boyama yönteminde saptanan morfolojik bozukluk oranları Akrozoma bağlı (AB), Diğer Morfolojik Bozukluklar (DMB) ve Toplam Morfolojik Bozukluklar (TMB) olmak üzere üç kısımda incelendi. Morfolojik muayenelerde de her preparattan toplam 200 spermatozoon sayıldı. Bütün muayeneler X100 immersiyon objektif altında ışık mikroskobu kullanılarak gerçekleştirildi.

Her üç boyama yönteminden elde edilen spermatolojik bulguların istatistiksel olarak karşılaştırılmasında "Duncan testi" kullanıldı. Ayrıca EN ve EN-G yönteminde saptanan ölü spermatozoonların karşılaştırılmasında "Independent Samples testi" kullanıldı.

Bulgular

Farklı yöntemlerle boyama sonrası saptanan morfolojik bozukluk oranları Tablo I'de sunulmuştur.

Tablo I. Farklı Yöntemlerle Boyama Sonrası Saptanan Morfolojik Bozukluk Oranları

Table I. Detected Rates of Morphological Defects After Different Staining Methods

Boyama metodu	n	AB	DMB	TMB
EN	60	3.5±0.4 ^c	2.8±0.2 ^a	6.3±0.4 ^c
EN-G	60	9.1±0.4 ^a	2.8±0.2 ^a	11.9±0.4 ^a
Gimza	60	7.2±0.4 ^b	2.4±0.2 ^a	9.6±0.4 ^b
Genel ortalama	60	6.6±0.2	2.7±0.1	9.2±0.2

^{a,b,c} Aynı sütunda ortak harf taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0.05)

EN: Eozin-nigrozin

EN-G: Eozin-nigrozin sonrası Gimza

AB: Akrozomal Bozukluk

DMB: Diğer morfolojik bozukluk oranı

TMB: Toplam morfolojik bozukluk oranı

Tartışma ve Sonuç

Sunulan araştırmada, AB, DMB ve TMB'nin genel ortalama değerleri sırasıyla %6.6±0.2, %2.7±0.1 ve %9.2±0.2 olarak saptandı. Elde edilen TMB'lara ait değerler bazı araştırmacıların saptadığı değerlerden biraz yüksek^{4,15,27}, bazı araştırmacıların saptadığı değerlerle ise uyumlu bulunmuştur^{12,27}. DMB oranları dikkate alındığında her üç boyama metodu arasında istatistiksel olarak fark saptanmamıştır (P>0.05). EN boyama metodu ile EN-G metodunda ölü spermatozoon oranları sırasıyla %12.7±0.7 ve %11.9±0.5 olarak saptandı. Her iki metot arasında ölü spermatozoon oranları dikkate alındığında istatistiksel açıdan herhangi bir fark bulunmamıştır (P>0.05). EN ve EN-G boyama yöntemleri sonrası elde edilen ölü spermatozoon oranları farklı araştırmacıların bildirdiği değerlerle benzer^{4,19}, bazı araştırmacıların belirttiği değerlerden ise düşük bulunmuştur^{29,34}.

Palamo ve ark.²¹, tekelerde taze spermada yaptıkları çalışmada akrozomal bozukluk oranını Triple stain tekniği ile %11.4 olarak saptamışlardır. Sunulan çalışmada EN-G metodundan elde edilen AB oranı Palamo ve ark.'nın²¹ belirttiği değerden biraz düşük, EN ve Gimza'dan elde edilen değer ise oldukça düşük bulunmuştur. Singh ve ark.²⁹ ise tekelerde taze spermada AB oranını Giemsa boyama yönteminde %3.2'den düşük saptadıklarını ifade etmişlerdir. Bu çalışmada EN'de bulunan akrozom değeri Singh ve ark.'nın²⁹ bulduğu değerle benzer, diğer boyama metotlarından elde edilen değerler ise yüksek bulunmuştur.

Yapılan bu çalışmada morfolojik muayeneler sırasında EN ile hazırlanan preparatlarda AB oranı diğer boyama metotlarına göre daha düşük bulunmuştur (P<0.05). Bu durum araştırmacıların belirttiği gibi^{9,11} söz konusu boyama metodunun AB oranının belirlenmesinde yetersiz olmasından kaynaklanmış olabilir. En yüksek AB oranı EN-G metodunda saptanmış olup diğer iki metotla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark saptanmıştır. Pintado ve ark.'nın da²² belirttiği şekilde EN-G ile boyanan preparatlarda akrozomal bölgenin diğer metotlara oranla daha ayrıntılı olarak görülmesi, muayenenin daha net ve kolay yapılmasına olanak sağlamıştır. Bu durumun EN-G metodunda elde edilen yüksek AB oranının nedeni olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak; teke spermasında EN-G metodu kullanılarak yapılan incelemelerde ölü, akrozomal ve diğer morfolojik bozuklukların tek bir preparat üzerinde rahatlıkla yapılabildiği gözlemlenmiştir. Fakat rutin sperma muayenelerinde ölü/canlı ve anormal akrozoma sahip spermatozoon oranlarının belirlenmesi için farklı frotiler hazırlanarak incelenmektedir. EN-G metodu ile boyanan preparatlarda saptanan morfolojik bozuklukların ölü veya canlı spermatozoonlara ait olduğu rahat bir şekilde görülebilmektedir. Bu metodun gerek laboratuvar gerekse saha şartlarında maliyet ve zaman bakımından kazanç, preparatların değerlendirilmesinde ise araştırmacıya kolaylık sağlaması açısından diğer metotlara oranla daha üstün olduğu kanısına varılmıştır.

Kaynaklar

1. AMOAH EA, GELAYE S. Biotechnological advances in goat reproduction. *J. Anim. Sci.* 1997; 75: 578-585.
2. CARDULO RA, FLORMAN HM. Strategies and methods for evaluating acrosome reaction. *Methods in Enzymol.* 1993; 225: 137-153.
3. CASEY PJ, HILMAN RB, ROBERTSON KR, YUDIN AI, LIU IKM, DROBNIS EZ. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. *J. Androl.* 1993; 14 (4): 289-297.
4. DAŞKIN A. Teke spermasının dondurulması ve değişik yöntemlerle östrusları senkronize edilen Ankara keçilerinin tohumlanmalarından elde edilen dölverimi. (Doktora Tezi). A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1991.
5. DIDION BA, DOBRINSKY JR, GILES JR, GRANES CN. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in the spermatozoa of various species. *Gamete. Res.* 1989; 22 (1): 51-57.
6. ENGLAND GCW, PONZIO P. Comparison of the a quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology.* 1996; 46: 165-171.
7. FELDMAN EC, NELSON RN. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction.* W.B. Saunders Company, Philadelphia, 481-525, 1987.
8. GAMER DL, PINKEL D, JOHNSTON LA, PACE MM. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol. Reprod.* 1986; 34: 127-138.
9. HAFEZ ESE. Semen evaluation. In: HAFEZ ESE, ed. *Reproduction in Farm Animals*, 5th edit. Lea and Febiger, Philadelphia. 405-481, 1987
10. HARRISON RAP, VICKERS SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 1990; 88: 343-352.
11. İLERİ K, AK K, PABUÇÇUOĞLU S, BİRLER S. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. İstanbul Üniv. Vet. Fak. Yayını. Ders Notu No:23, 2000.
12. KARAGIANNIDIS A, VARSAKELI S, KARATZAS G. Characteristics and seasonal variations in the semen of alpine, saanen and damascus goat bucks born and raised in Greece. *Theriogenology* 1999; 53: 1285-1293.
13. KARATZAS G, KARAGIANNIDIS A, VARSAKELI S, BRIKAS P. Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. *Theriogenology*; 48: 1049- 1058.
14. LEBOEUF B, RESTALL B, SALAMON S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Scien.* 2000; 62: 113-141.
15. MEMON MA, BRETZLAFF KN, OTT RS. Effect of washing on motility and acrosome morphology of frozen thawed goat spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.* 1985; 46(2): 473-475.
16. MORTIMER D, CURTIS EF, CAMEZIND AR. Combined use of fluorescent peanut agglutinin lectin and Hoechst 33258 to monitor the acrosomal status and vitality of human spermatozoa. *Human reprod.* 1990; 5: 99-103.
17. OETTLE, EE. Sperm morphology and fertility and fertility in the dog. *J. Reprod. Fertil.* 1993; 47: 257-260.
18. OLIVIA SF. Cryopreservation of canine semen: Technique and performance. *Dissertation Abstracts International.* 1985; 45: 3441.
19. ÖZSAR S, GÜVEN B, EKİCİ A, ARİF S. Controlled breeding and artificial insemination of Angora goats in turkey. *Int. Atom Energ. Agency, Vienna*, 1988.
20. ÖZTÜRKLER Y, BARAN A, EVECEN M, AK K, İLERİ K. Comparison of ovine spermatozoal morphological features after staining and assessment of morphological abnormalities in dead/live spermatozoa. *Turk. J. Anim. Sci.* 2001; 25: 675-680.
21. PALAMO MJ, IZQUIERDO T, MOGAS T, PARAMIO MT. Effect of semen preparation on IVF prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*; 51: 927-940.
22. PINTADO B, FUENTA DE LA J, ROLDAN ERS. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. *J. Reprod. Fert.* 2000; 118: 145-152.

23. PLUMMER JM, WATSON PF, ALLEN WE. A spermatozoal midpiece abnormality associated with infertility in a Lhasa Apso dog. *J. Small Anim. Pract.* 1987; 28: 743-751.
24. RHO GJ, HAHNEL AC, BETTERIDGE KJ. Comparisons of oocyte maturation times and of three methods of sperm preparation for their effects on the production of goat embryos in vitro. *Theriogenology*; 58: 503-516.
25. RITAR AJ, BALL PD. The effect of freeze-thawing of goat and sheep semen at a high density of spermatozoa on cell viability and fertility after insemination. *Anim. Reprod. Scien.* 1993; 31: 249-262.
26. RODRIGUEZ-MARTINEZ H, EKWALL H, LINDE-FORSBERG C. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1993;47: 279-285.
27. SHAMSUDDIN M, AMIRI Y, BHUIAN MMU. Characteristics of buck semen with regard to ejaculate numbers, collection intervals, diluents and preservation periods. *Reprod. Dom. Anim.* 2000; 35: 53-57.
28. SILVA LDM, VERSTEGEN JP. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology.* 1995; 44: 571-579.
29. SINGH MP, SINHA AK, SINGH BK. Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology*; 43: 1047-1053.
30. TALBOT P, CHACON R. A triple stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J. Exp. Zool.* 1981; 215: 201-208.
31. TAMULI MK, WATSON PF. Use of a simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-population. *Anim. Reprod. Scien.* 1994; 35: 247-254.
32. TEKİN N. Spermanın Muayenesi ve Değerlendirilmesi. In: ALAÇAM E, ed. *Reproduksiyon ve Sun'i Tohumlama Doğum ve İnfertilite*, 1. baskı. Düzgüvü, Ankara. 69-81, 1994.
33. THOMAS PGA, LARSEN RE, BURNS JM, HAHN CN. A comparison of three packaging techniques using two extenders for the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology.* 1993; 40:1199-1205.
34. TULI RK, HOLTZ W. Effects of season on the freezability of boer goat semen in the northern temperate zone. *Theriogenology*; 43: 1359-1363.
35. YILDIZ C, ATAMAN MB, KAYA A, TEPELİ C, LEHİMCİOĞLU N. Köpek ve koçlarda akrozom bozukluklarının belirlenmesi amacıyla farklı tespit ve boyama yöntemlerinin karşılaştırılması. *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg.* 2000; 11 (2): 7-11.