

Sulandırıcıya Değişik Oranlarda Katılan Gliserolün Dondurma İşleminin Çeşitli Evrelerinde Koç Spermatozoon'larının Motilitesi ve Akrozom Morfolojisi Üzerine Etkisi

Hazım GÖKÇEN*
Reşat Nuri AŞTI**
Mehmet KOZANDAĞI***

Die Wirkung des mit Verschiedener Verhältnissen in Verdünner
Eingesetzten Glycerins auf die Motilität und die Akrosommorphologie
des Schafbockspermien bei Verschiedenen Stadien von
Tiefgefrierungstechnik

Zusammenfassung: Der Merino-Schafbocksamen wurde mit verschiedenen Verhältnisse Glycerin enthaltene Citrate-Glycose-Eidotter Verdünner verdünnt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Beim Prozess der Tiefgefrierung wurde die Prozentsätze an die Motilität und Akrosomschädigung der Samenzellen festgestellt. Es wurde bestimmt, dass die Motilität nach der Einfrierung fällt und die Akrosomschädigungen nach der Glycerolization ansteig. Zwischen der verschiedenen Glycerinkonzentrationen im Verdünner konnte kein Unterschied sowohl bei der Motilität als auch Akrosommorphologie gefunden werden. Nach Zugabe von % 5 Glycerine im Verdünner zeigte bessere Ergebnisse an beiden Untersuchungsparameter als anderen.

Özet: Merinos koçlarının sperması değişik oranlarda gliserol içeren Sodyum Sitrat-Glikoz-Yumurta sarısı sulandırıcısı ile sulandırılıp sıvı azotta donduruldu. Dondurulan ejakülatlarda dondurma işleminin değişik evrelerinde spermatozoon motilitesi ve akrozom bozuklukları oranları saptandı. Spermatozoon motilitesinin

* Doç. Dr.; U.Ü. Vet. Fak. Dölerme ve Sun'i Tohumlama Bilim Dalı Bursa / TURKEY

** Doç. Dr.; S.Ü. Vet. Fak. Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı Konya / TURKEY

*** Dr., Tarım ve Orman Bakanlığı Vet. İş. Genel Müdürlüğü Ankara / TURKEY

özellikle dondurma evresinden sonra önemli ölçüde düştüğü, akrozom bozukluklarında ise gliserolizasyon evresinden sonra önemli artışlar olduğu gözlemlendi. Sulandırıcıya katılan değişik gliserol oranları arasında gerek motilite gerek akrozom morfolojisi bakımından önemli bir fark bulunmamakla birlikte, sulandırıcıya % 5 oranında gliserol katmanın daha iyi sonuç verdiği saptandı.

GİRİŞ

Koç spermasının düşük ısıda dondurulması sürecinde ve dondurulan koç spermasıyla yapılan tohumlamalardan elde edilen dölvöriminde kimi sorunların bulunduğu gerek Türkiye'de gerek dışarıda yapılan araştırmalarda ortaya konmuştur ^{1, 5, 6, 7, 11}. Yapılan tüm çalışmalardan elde edilen ortak sonuçların başlıcaları, spermatozoon motilitesinde düşüklük, spermatozoonların akrozomlarında ve hücre membranlarında çeşitli derecelerdeki bozukluklar, dölvörimi düşüklüğü olarak özetlenebilir. Örneğin yaptığımız bir çalışmada donmuş koç spermatozoonlarının akrozomunda şişme, madde yitimi ve dış membranlarında bozulma oluştuğunu elektron mikroskopik düzeyde bildirmiştik ¹. Bunu izleyen çalışmamızda ise, anılan bu bozuklukların, dondurma işleminin gliserolizasyon evresinde yani spermanın gliserol içeren sulandırıcı bölümü ile sulandırılmasından sonra çoğaldığını saptadık ⁶. Tasseron ve arkadaşları ¹¹, donmuş koç spermatozoonlarındaki akrozom bozuklukları üzerinde ışık ve elektron mikroskopik düzeyde yaptıkları bir çalışmada bu bozuklukların özellikle spermanın gliserol içeren sulandırıcı bölümü ile sulandırılmasından sonra arttığını; Haeley ⁷, koç spermasını % 15-20 gliserol içeren Sodyum Sitrat-yumurta sarısı sulandırıcısı ile sulandırıp dondurduğunda, özellikle gliserollü sulandırıcı kattıktan sonra spermatozoonların akrozom kompleksi ve membranlarında ince yapı düzeyinde bozuklukların oluştuğunu bildirmektedirler.

Bu literatür verileri, koç spermasının dondurulması konusunda ortaya çıkan sorunların genellikle dondurmanın gliserolizasyon evresinden kaynaklandığı izlenimini vermektedir. Biz de bu çalışmamızda, çeşitli oranlarda gliserol içeren sulandırıcıyla sulandırılıp dondurulan koç spermatozoonlarının motilitelerinde ve akrozomlarında, dondurma işleminin değişik evrelerine bağımlı olarak oluşan düşüklük ya da bozuklukları oransal olarak saptamayı amaçladık. Boğa ve koç spermalarının düşük ısıda dondurulmasında genellikle sulandırıcıya % 7 oranında gliserol katılmaktadır ^{4, 8, 12}. Ancak Salamon ¹⁰, % 5'lik gliserol oranının koç spermatozoonlarının dondurulmasında en iyi sonucu verdiğini; Bauer ², % 1.5, % 3.0 ve % 6.0 oranlarında gliserol içeren sulandırıcılarla sulandırıp dondurduğu koç spermasında, çözülmeden sonraki motilite oranlarının sırasıyla % 31.9, % 34.2 ve % 34.7 olduğunu; Besulin ³, 10 koçun spermasını % 2.4, % 2.5, % 4.5, % 5.0, % 6.5 ve % 7.0 gliserol içeren sitrat-glikoz-yumurta sarısı sulandırıcısıyla sulandırıldığında, bu spermalardaki motilite indeksinin sırasıyla 0.44; 0.60; 1.03; 1.35; 0.63 ve 0.45 olduğunu bildirmektedirler.

Gliserolün koç spermasının dondurulmasındaki etkisini araştıran Polge ⁹, spermanın gliserol içeren sulandırıcılarla sulandırılıp dondurulmasından sonra genellikle yeterli motilite, fakat düşük dölvörimi sağlandığını vurgulamakta ve koçta ve öteki kimi türlerde, örneğin erkek domuzda, dondurulmuş spermatozoonların

fertilizasyonda zona pellucidayı yeterince delemediğini, bunun da akrozom ve membran bozukluklarıyla, fertilizasyon için gerekli enzimlerin bulunmayışından kaynaklandığını ileri sürmektedir. Araştırmacı dölvemini ile spermatozoon motilitesi arasında bir ilişkinin bulunmadığı görüşündedir.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışma Lalahan Veteriner Zootečni Araştırma Enstitüsünde iki merinos koçundan alınan toplam 10 ejakülat üzerinde yapıldı.

Sperma koçlardan suni vajenle alındı. Alınan ejakülatlar gerekli makroskopik ve mikroskopik muayeneleri yapıldıktan sonra üç eşit bölüme ayrıldı. Ejakülatın ilk bölümü birinci sulandırıcı bölümünde % 3, ikinci sulandırıcı bölümünde % 4, ikinci bölümü ikinci sulandırıcı bölümünde % 5, üçüncü bölümü ise ikinci sulandırıcı bölümünde % 7 gliserol içeren sodyum sitrat-glikoz-yumurta sarısı sulandırıcısıyla sulandırıldı. Sulandırma işlemi iki aşamada yapıldı. Birinci aşamada sperma, sulandırıcının gliserolsüz bölümüyle 1: 5 oranında sulandırılarak buzdolabına konuldu ve ısı 45 dakika içinde 5°C'ye düşürüldü. Isısı 5°C'ye düşürülen bu spermaya dondurma kabini içerisinde daha önceden ısı 5°C'ye düşürülmüş gliserollü sulandırıcı bölümü 30 dakikada azar azar ve eşit zaman aralıklarında katıldı (Gliserolizasyon). Gliserolizasyonu tamamlanan sperma payetlere çekilerek 5°C'deki su banyosunda 2 saat bırakıldı (Ekilibrasyon). Ekilibrasyondan sonra sperma sıvı azot buharında dondurularak, -196°C'deki sıvı azot içinde saklandı. Örnek alma esnasında sıvı azottan alınan payetler 34°C'lik ılık su banyosunda 15 saniye bırakılarak spermanın çözülmesi sağlandı.

Üç ayrı gliserol oranı içeren sulandırıcı ile sulandırılıp dondurulan sperma bölümlerinden, dondurma işleminin her aşamasında örnekler alınarak motilite kontrolleri yapıldı ve Giemsa ile boyanarak akrozom bozukluk oranları saptandı. Alınan 10 ejakülatın ilk beşinde sadece motilite oranları, son beşinde ise hem motilite oranları, hem de akrozom bozuklukları oranları saptandı.

BULGULAR

Araştırmada kullanılan koçların ejakülatlarında dondurma işleminin değişik evrelerinde saptanan spermatozoon motilitesi ve akrozom bozuklukları oranları Tablo 1'de topluca verilmiştir.

Tablodan da izlenebileceği gibi değerlendirilen toplam 10 ejakülatla saptanan ortalama spermatozoon motilitesi oranlarını % 7 gliserol içeren sulandırıcı ile sulandırılıp dondurulan ejakülatlarda ilk sulandırma, 5°C ısıda, gliserolizasyondan sonra ekilibrasyondan sonra ve dondurulup çözdükten sonra sırasıyla % 82.5, % 74.5, % 70.0, % 66.0 ve % 32.0; sulandırıcının birinci bölümünde % 3, ikinci bölümünde % 4 gliserol bulunacak biçimde sulandırılıp dondurulan ejakülatlarda spermatozoon motilitesi oranları dondurma işleminin değişik evrelerinde sırasıyla % 82.0, % 72.5, % 66.0, % 61.0 ve % 30.5; % 5 gliserol içeren sulandırıcıyla sulandırılıp dondurulan ejakülatlarda ise spermatozoon motilitesi oranlarını sırasıyla % 82.5, % 76.0, % 68.0, % 65.0 ve % 33.5 olarak saptadık.

Tablo 1
Değişik Gliserol Oranları İçeren Sulandırıcılarla Sulandırılıp Dondurulan Koç Spermında Motilite ve Akrozom Bozuklukları Oranları

Ejekülât No.	Gliserol Oranı %	İlk Sulandırma		+ 5° C de		Gliserilizasyondan Sonra		Ekilibrazyondan Sonra		Dondurulu Çözüldükten Sonra	
		Mot. %	Akrz. %	Mot. %	Akrz. %	Mot. %	Akrz. %	Mot. %	Akrz. %	Mot. %	Akrz. %
1	7	85		85		80		70		20	
	3+4	85	—	85	—	70	—	70	—	20	—
	5	80		80		70		70		30	
2	7	75		65		65		60		25	
	3+4	75	—	50	—	50	—	40	—	20	—
	5	75		60		60		50		35	
3	7	75		70		70		65		25	
	3+4	70	—	60	—	55	—	45	—	20	—
	5	80		80		70		65		35	
4	7	80		70		70		65		25	
	3+4	80	—	70	—	70	—	55	—	45	—
	5	80		75		70		60		50	
5	7	85		75		65		60		35	
	3+4	85	—	75	—	60	—	60	—	25	—
	5	85		75		65		65		30	
6	7	85	3.8	70	15.0	60	18.5	60	24.0	40	27.0
	3+4	85	6.8	70	14.2	60	18.0	65	22.0	40	21.0
	5	85	3.9	70	3.9	60	13.6	60	13.0	30	21.0
7	7	85	3.3	80	7.0	75	8.4	70	19.0	20	25.0
	3+4	85	2.7	80	6.3	75	9.9	70	10.2	35	18.0
	5	85	1.5	80	5.6	70	11.0	65	11.5	20	13.0
8	7	85	4.8	80	15.0	75	10.0	70	10.0	35	29.0
	3+4	85	6.0	80	15.0	70	15.0	65	23.0	20	26.0
	5	85	4.0	80	11.0	70	23.0	70	18.0	35	29.0
9	7	85	3.0	75	4.2	70	12.0	70	20.0	45	31.0
	3+4	85	5.0	75	6.0	75	12.0	65	17.0	40	20.0
	5	85	4.0	80	7.0	75	12.0	75	15.0	30	18.0
10	7	85	4.0	75	6.0	70	19.0	70	17.0	40	18.0
	3+4	85	3.0	80	10.0	75	32.0	75	24.0	40	25.0
	5	85	3.0	80	9.0	75	12.0	70	18.0	30	21.0
11	7	82.5	3.8	74.5	9.4	70.0	13.6	66.0	18.0	32.0	26.0
	3+4	82.0	4.7	72.5	10.3	66.0	17.2	61.0	19.2	30.5	24.0
	5	82.5	3.1	76.0	7.3	68.5	14.3	65.0	15.5	33.5	22.8

Toplam 5 ejakülatta saptadığımız ortalama akrozom bozuklukları oranları da % 7 gliserol içeren sulandırıcı ile sulandırılıp dondurulan ejakülatlarda dondurma işleminin ilk sulandırma, % 5°C ısıda, gliserolizasyondan sonra, ekilibrazyondan sonra ve dondurulup çözdükten sonraki evrelerinde sırasıyla % 3.8, % 9.4, % 13.6, % 18.0 ve % 26.0 olarak bulundu. Bu oranlar ilk sulandırıcı bölümünde % 3, ikinci sulandırıcı bölümünde % 4 gliserol içeren sulandırıcıyla sulandırıp dondurulan ejakülatlarda sırasıyla % 4,7, % 10.3, % 17.2, % 19.2 ve % 24.0; tüm sulandırıcıda % 5 gliserol bulunacak biçimde sulandırılıp dondurulan ejakülatlarda ise sırasıyla % 3.1, % 7.3, % 14.3, % 15.5 ve % 22.8 olarak saptandı.

TARTIŞMA VE SONUÇ

İncelediğimiz ejakülatlarda ortalama spermatozoon motilitesi oranlarını, dondurma işleminin ilk sulandırma, 5°C'lik ısıda, gliserolizasyondan sonra, ekilibrazyondan sonra ve dondurup çözdükten sonraki evrelerinde % 7 gliserol içeren grupta sırasıyla % 82.5, % 74.5, % 70.0, % 66.0 ve % 32.0; % 3+4 gliserol içeren grupta sırasıyla % 82.0, % 72.5, % 66.0, % 61.0 ve % 30.5; % 5 gliserol içeren grupta da sırasıyla % 82.5, % 76.0, % 68.5, % 65.0 ve % 33.5 olarak saptadık.

Dondurulan ejakülatlarda, dondurma işleminin değişik evrelerinde saptanan spermatozoon motilitesi oranlarının incelenmesinden anlaşılacağı üzere her üç gliserol oranı grubunda da motilite oranları dondurma işleminin ekilibrazyondan sonraki evresine kadar oldukça yavaş bir azalma göstermekte, fakat dondurulup çözüldükten sonra ani bir düşüş göstererek hemen hemen ekilibrazyondan sonra saptanan motilite oranlarının yarısına kadar düşmektedir. Bu sonuç, diğer araştırmacıların sonuçlarına benzerlik göstermektedir^{2,4,5,6}. Bu bulgulara göre koç spermasının dondurulması sırasında spermatozoon motilitesi en çok dondurulup çözme evresinde etkilenmekte ve önemli ölçüde bir motilite düşüklüğü gözlenmektedir. Yine spermatozoon motilitesine ilişkin bulgulardan anlaşıldığına göre her üç gliserol oranı grubunda dondurma işleminin hemen her evresinde saptanan motilite oranları birbirine benzer bulunmakla birlikte, % 5 gliserol içeren grupta, diğerlerine nazaran düşükte olsa bir artış görülmektedir. Salamon'un¹⁰, % 5'lik gliserol oranının koç spermatozoonlarının dondurulmasında en iyi sonuç vermesi ve Besulin'in³, değişik gliserol oranları içeren sulandırıcı ile sulandırıp dondurduğu koç spermasında en iyi motilite sonucunu % 5'lik gliserol içeren grupta elde etmesi de bizim bulgumuzu desteklemektedir.

Toplam 5 ejakülatta dondurma işleminin değişik evrelerinde saptadığımız akrozom bozuklukları oranlarını, tüm sulandırıcıda % 7 gliserol bulunacak biçimde sulandırılıp dondurulan ejakülatlarda sırasıyla % 3.8, % 9.4, % 13.6, % 18.0 ve % 32; birinci sulandırıcı bölümünde % 3, ikinci sulandırıcı bölümünde % 4 gliserol bulunan sulandırıcı ile sulandırılıp dondurulan ejakülatlarda sırasıyla % 4.7, % 10.3, % 17.2, % 19.2 ve % 24.0; tüm sulandırıcıda % 5 gliserol bulunan sulandırıcıyla sulandırılıp dondurulan ejakülatlarda da sırasıyla % 3.1, % 7.3, % 14.3, % 15.5 ve % 22.8 olarak saptadık.

Bu verilerden de görüleceği gibi, her üç gliserol grubunda da, dondurma işleminin değişik evrelerinde saptanan akrozom bozuklukları oranları birbirine oldukça yakın bulunmakla birlikte % 5 gliserol içeren grupta bu oranlar, öteki gruptaki-

lere göre biraz daha düşük olmaktadır. Yine her üç gliserol grubunda da, dondurma işleminin ilk sulandırma ve +5°C'deki evrelerinde normal düzeylerde bulunan akrozom bozuklukları oranları, gliserolizasyondan sonra önemli derecede bir artış göstermekte, daha sonraki evrede ise bu artışlar normal düzeye inmektedir.

Araştırmada elde edilen spermatozoon motilitesi ve akrozom bozuklukları değerleri birlikte incelendiğinde her iki değer arasında belirli bir ilişkinin bulunmadığı anlaşılmaktadır. Akrozom bozukluklarındaki önemli artışın dondurmanın gliserolizasyon evresinden sonra görülmesine karşın spermatozoon motilitesindeki düşüklük önemli ölçüde dondurup çözme evresinden sonra şekillenmektedir. Nitekim bu görüşümüzü Polge'nin⁹, görüşleri de desteklemektedir. Polge spermanın gliserol içeren sulandırıcılarla sulandırılıp dondurulmasından sonra yeterli motilite fakat düşük dölverimi elde edildiğini elde edilen bu düşük dölveriminin büyük ölçüde akrozom bozukluklarına bağlı olarak şekillendiğini ileri sürmektedir.

LİTERATÜR

1. AŞTI, N.R., H. GÖKÇEN (1976): Sıvı azot buharında dondurmanın koç spermatozoonlarının ince yapısı üzerine etkisi, Vet. Fak. Derg., 26 (3-4), 30-39.
2. BAUER HANS - JOACHIM und O. LIEBENBERG (1976): Untersuchungen Zum Einfluß der Verdünnung, Aquilibrierung und Auftauens von Schafbock-sperma bei dessen Tiefgefrierkonservierung nach dem Pelletverfahren, Arch. Tierzucht, Berlin, 4, 283-293.
3. BESULIN, V.I. (1973): Deep freezing of semen from Askanian rams. Anim. Breed. Abstr., 42, 3.
4. FIRST, N.L., H.A. HENNEMAN, W.T. MAGEE and J.A. WILLIAMS (1961): The frozen storage of ram spermatozoa. J. Anim. Sci. 20, 74.
5. GÖKÇEN, H., (1977): Koç spermasının kimi özellikleri, dondurulması ve dondurulan spermanın dölverimi üzerinde araştırmalar. Doktora tezi. Lalahan Zoot. Araşt. Enst. Yayınları No: 48.
6. GÖKÇEN, H., N.R. AŞTI (1980): Sıvı azot buharında dondurma yönteminin çeşitli evrelerinde koç spermatozoitlerindeki akrozom bozukluklarının saptanması. Vet. Fak. Derg., 27 (3-4), 501-514.
7. HEALEY, P. (1969): Effects of freezing on the ultrastructure of the spermatozoa of some domestic animals. J. Reprod. Fert. 18, 21.
8. LOPYRIN, A.I. and N.V. LOGINOVA (1958): The method of freezing ram semen. Ovcevodstvo, Moskva, 4, 31 (As quoted) in Anim. Breed. Abstr. 27, 72, 1959.
9. POLGE, C. (1968): Observations on the freezing of ram semen. VI^e Congr. int. Reprod. Anim. Insem. artif, Paris, 1968.
10. SALAMON, S. (1968): Freezing of ram semen. Recovery of spermatozoa after pelleting and comparison with other methods of freezing. Austr. J. biol. Sci. 21-351.
11. TASSERON, F., D. AMİR and H. SCHINDLER (1977): Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. J. Reprod. Fert. 51, 461.
12. WHITE, I.G., A.W. BLACKSHAW and C.W. EMMENS (1954): Metabolic and motility studies relating to the low temperature storage of ram and bull spermatozoa. Aust. Vet. J. 30, 85.