

# Koç Spermasının Dondurulması ve Dölveriminde Kimi Sorunlar ile Bu Sorunların Çözümüne İlişkin Araştırma Bulguları ve Öneriler (\*)

Hazın GÖKÇEN \*\*

Spermanın dondurulması konusunda ilk çalışan İtalyan fizyolog Lazzaro Spallanzani'dir. Bu bilgin, 1776'da bir erkek köpekten onani yoluyla aldığı spermayı kar içinde sakladığında, spermatozoitlerin hareketlerinin yavaşladığını, soğutulmuş spermanın yüksek ısıda çözülmesi sonucunda ise hareketin yeniden başlayarak, spermatozoitlerin normal duruma geldiklerini bulmuştur. Spallanzani'nin bu buluşu, spermanın dondurulması sürecinin başlangıcı olarak nitelendirilebilir.

Spermanın dondurulması konusundaki diğer önemli bir buluş ta, 1949 yılında Polge ve arkadaşlarının<sup>8</sup>, spermayı, dondurmanın zararlı etkilerinden korumak amacıyla sulandırıcıya gliserol katmalarıdır. Bu önemli keşifi, 1950 yılında Emmens ve Blackshaw'ın<sup>3</sup>, boğa ve koç spermalarını gliserol içeren koruyucu medyumlar içerisinde ve düşük ısıda dondurup uzun süre saklamaları izledi.

Spermanın düşük ısıda dondurularak uzun süre saklanması gereksinimi hangi nedenlerle ortaya çıktı? Spermanın sulandırılarak hacminin artırılması ve bu sayede eskiye bakınca daha çok dişi tohumlama olanağının elde edilmesi düşüncesi, 1939 da Phillips ve Lardy'nin, yumurta sarısı, potasyum ve sodyum fosfat sulandırıcısını bulmalarıyla yeni bir boyut kazandı. Daha önceleri sperma taze olarak yani erkek hayvandan alındıktan sonra hiçbir işleme tabi tutulmaksızın tohumlamada kullanılıyordu. Ne var ki, bu şekilde kullanılan spermanın sadece birkaç saat içinde canlılığını koruyabilmesi yüzünden, sadece o sürede kızgınlığa gelen dişiler tohumlanabiliyor, spermanın büyük bölümü atılıyordu. Bu durumun üstesinden gelebilmek için bilim adamları çalışmalarını bu kez, dölleme gücünü yitirmeksizin spermanın daha uzun bir süre muhafaza edilmesi tekniklerini bulmaya yönelttiler.

\* Bu çalışma U.Ü. Vet. Fak. de konferans olarak sunulmuştur.

\*\* Doç.Dr.; U.Ü. Vet. Fakültesi Doğum ve Dölleme Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa - TÜRKİYE.

Bu çalışmalar sonunda, sulandırılmış spermanın ısısını tedricen 4-5°C ye düşürerek, bu ısıda muhafaza edilmesi ve 2-3 gün içinde tohumlamada kullanılması tekniği geliştirildi. Ancak, bu teknikle saklanan spermanın tümünden gene de yararlanılmıyor, saklanan spermanın dölleme gücü 3. günden itibaren giderek düştüğünden tohumlamada kullanılmıyor, atılıyordu. Bu kayıp, bulunacak yeni yöntem ve tekniklerle spermanın çok daha uzun süre saklanmasıyla önlenebilirdi. Böyle bir yöntemin geliştirilebilmesi için elde güvenilir verilerde vardı. Spermanın yalnız miktarı artırılmakla kalınmamış, spermatozoitleri zararlı etkilerden koruyacak yeni sulandırıcılar bulunmuştu. Bunun yanında uygun bir ortamda ve tedrici olarak ısıyı düşürülen spermatozoitlerin metabolizma faaliyetlerini en alt düzeye indirmekle, birkaç gün canlılıklarını ve dölleme güçlerini koruyabildikleri saptanmıştı.

Spermatoloji alanında elde edilen bu ve öteki kimi veriler ve gelişmeler, spermanın çok düşük ısıda dondurularak sanıldığından da uzun süre saklanabilmesi olanacağını doğurdu. Tüm bu bilimsel gelişmelerin bir sonucu olarak, öncedende belirtildiği gibi ilk kez 1950 yılında Emmens ve Blackshaw boğa ve koç spermalarını düşük ısıda dondurarak uzunca bir süre saklamayı başardılar.

Bundan sonra çalışmalar daha da hızlı bir biçimde sürdürülmeye başlandı. Yoğun bilimsel çalışmalar ve donmuş spermayla yapılan alan uygulamaları sonucunda bu konuda büyük ilerleme ve gelişmeler kaydedildi. Boğa spermasının çeşitli yöntemlerle dondurulması ve uzun yıllar muhafaza edilebilmesi rutin laboratuvar işlemleri arasına girdi. Ayrıca, donmuş boğa spermasıyla yapılan tohumlamalardan yeterli dölverimi alınabilmesi olgusu, bu tekniğin yaygınlaşarak özellikle hayvancılığın gelişmiş ülkelerde sığır sun'i tohumlamasında tümüyle bu yönteme dönülmesini sağladı. Son 20 yıl içerisinde yeni yeni tekniklerin geliştirilmesi sonucu adeta bir endüstri kolu haline dönüşen bu uygulama, ülkeler arasında ticari rekabete bile yol açtı.

Bu teknikler içerisinde ikisi uygulamada büyük bir kullanma alanı buldu. Bunlardan birincisi, Fransadaki L'Aigle Sun'i Tohumlama İstasyonunda Cassou tarafından geliştirilen Paillet (Payet) yöntemidir. Diğeri ise F. Almanya'da Landshut'taki Sun'i Tohumlama Laboratuvarında Simmet tarafından oulunan Mini-Tüp tekniğidir. Payet yöntemi Mini-Tüp'e bakınca günümüzde alan uygulamalarında daha yaygın olarak kullanılmaktadır.

Koç spermasının ilk kez 1950 yılında dondurulmasından sonra bu alanda da yoğun çalışmalar başladı. Koç sperması, boğa spermasının dondurulduğu teknikle donduruluyor, fakat tohumlamada kullanılan donmuş koç spermasından yeterli düzeyde dölverimi alınamıyordu. Koç spermasının dondurulması ve dondurulan spermanın tohumlamada kullanılması sonucu elde edilen dölveriminin artırılması konularında bugüne değin çok çeşitli araştırmalar yapılmış olmasına karşın elde edilen dölverimi yaklaşık % 50 düzeyinde kalmıştır. Bu amaçla, 1973 de Samouillidis<sup>10</sup>, çeşitli sulandırıcılarla sulandırdığı koç spermasını dondurup çeşitli ülkelerde koyunları tohumlamış, Macaristan'da % 52.7, Yunanistan'da da % 52.2 oranında dölverimi elde etmiştir. Daha sonraları Fransız Colas<sup>2</sup>, yine donmuş spermayla tohumladığı koyunlardan en çok % 57.5 gebelik oranı saptamıştır. Son olarak 1980'de Stoyanov<sup>12</sup>, aynı şekilde tohumladığı koyunlarda % 53.0 dölverimi sonucu almıştır.



## Spermanın Dondurulması:

Sperma başlıca şu yöntemlerle dondurulmaktadır:

1. Ampul Yöntemi: Kuru buz ve etil alkol kullanarak ampuller içinde dondurma,
2. Pellet Yöntemi: Kuru buz üzerinde dondurup sıvı azotta saklama,
3. Payet Yöntemi: Payetler içinde ve sıvı azot buharında dondurup sıvı azot içinde saklama,
4. Mini-Tüp Yöntemi: Mini-Tüpler içinde ve sıvı azot buharında dondurup sıvı azot içinde saklama.

Bugün Dünya'da en yaygın olarak kullanılan sperma dondurma yöntemi Payet yöntemidir. Bu yöntemle spermanın dondurulması işlemi başlıca şu evreleri içerir.

1. *İlk sulandırma evresi*: Spermanın, tohumlama dozu esas alınarak belli bir oranda sulandırıcının gliserol içermeyen bölümü ile sulandırılması,

2. *5°C ye soğutma*: İlk sulandırılması yapılan spermanın ısısının belli bir sürede ve soğutucuda 5°C ye düşürülmesi

3. *Gliserolizasyon (gliserolleme)*: İlk sulandırılması yapılmış ve ısı 5°C ye düşürülmüş spermaya sulandırıcının, tüm sulandırıcıda % 7 bulunacak biçimde gliserol taşıyan ikinci bölümünün yavaş yavaş katılması.

4. *Ekilibrasyon (alışım)*: Gliserolizasyonu tamamlanmış ve payetlere doldurulmuş spermanın gliserole alışması için 5°C deki ılık suda yaklaşık 2 saat süreyle bekletilmesi.

5. *Dondurma*: Payetler içerisindeki, ekilibrasyonu tamamlanmış spermanın sıvı azot buharında dondurularak sıvı azot içerisinde saklanması.

6. *Çözme*: Payetler içinde dondurulan spermanın kullanılacağı anda 34°C lik suda 15 saniyede eritilmesi.

Koç spermasının 1950'li yıllarda ilk kez dondurulmasından bu yana Dünya'nın koyuncululuğu gelişmiş kimi ülkelerinde dondurmanın yukarıda sayılan evreleriyle ilgili olarak çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bunlar arasında, çeşitli sulandırıcılar, sulandırma oranları, gliserol oranları, ekilibrasyon süreleri, dondurma yöntemleri ve çözme ısıları denenmiş, yapılan bu araştırmaların çoğunda sadece spermatozoit hareketi yani motilite üzerinde durulmuş ya da dondurulmuş spermaya yapılan tohumlamalardan elde edilen dölvürimi üzerinde çalışılmıştır. Nitekim, yukarıda da belirtildiği gibi, dondurma işlemi sırasında oldukça yeterli motilite sonuçları alınmasına karşın, dondurulmuş sperma ile yapılan tohumlamalardan düşük hatta çoğu kez yetersiz sonuçlar alınabilmiştir. Lalahan'da yaptığımız bir çalışmada<sup>4</sup>, koç spermasını sodyum sitrat-glikoz-yumurta sarısı sulandırıcısı ile sulandırıp payetler içinde sıvı azot buharında dondurduk ve sıvı azot içinde sakladık. Donmuş koç spermasının çeşitli özelliklerini o arada motilite ve anormal spermatozoit oranlarını saptadık. Ayrıca, donmuş spermayla servikal yolla tohumladığımız koyunlardaki dölvürimini araştırdık. Motilite ve anormal spermatozoit oranları bakımından oldukça iyi sonuçlar almış olmamıza karşın, dölvürimini hayli düşük bulduk (% 27.0). Diğer bir çalışmada<sup>11</sup> bu kez değişik sulandırıcılar ve ekilibrasyon süreleri kullanarak dondurduğumuz koç spermalarını ayrı tohumlama dozları ve teknikleriyle tohumlamada kullandık. Çeşitli deneme gruplarında en fazla % 20.0 oranında dölvürimi saptadık.



Gerek bizim yaptığımız, gerek öteki araştırmacılarca yapılan çalışmalarda donmuş koç spermasının dondurulması sürecinde ve dondurulan sperma ile yapılan tohumlamalardan yeterli düzeyde dölverimi alınamamasında ortaya çıkan sorunlar, araştırmacıları bunun nedenlerini incelemeye itmiştir.

Daha 1968 yılında Polge adlı araştırmacı<sup>9</sup>, "Koç spermasının gliserol içeren sulandırıcılarla dondurulup çözüldükten sonra genellikle yeterli motilite fakat düşük dölverimi elde edildiğini, öteki türlerde örneğin erkek domuzda da aynı sorunun yer aldığını, dondurulup çözülen spermatozoitlerin yumurtanın zona pellusida'sını delemediğini, dölverimi düşüklüğünün akrozomda oluşan membran bozuklukları sonucu fertilizasyon için gerekli enzimlerin kaybolmasına bağlı olarak döllemenin gerçekleşmemesine bağlanabileceğini, bunun da şeker içeren koruyucu medyumlarla spermanın dondurulması ve ekilibrasyonun kısa tutulmasıyla çözülebileceğini sandım" vurgulamıştır.

Ne var ki, özellikle elektron mikroskobun kullanılmaya başlamasına kadar bu konu gereği ölçüde aydınlığa kavuşturulamamıştır. Ancak, bundan sonra dahi, hayvancılığı gelişmiş fakat koyunculugu bulunmayan ülkelerde, koyunlardaki dölverimi konusu ve donmuş spermayla yapılan tohumlamalardan elde edilen dölveriminin düşüklüğü üzerinde yapılan araştırma çalışmaları çok sınırlı kalmıştır. Ancak Türkiye'de durum farklıdır. Ülkemizde son sayımlara göre yaklaşık 50 milyon koyun bulunmakta, bunun sadece % 4'ü kültür ırkı ve melezlerinden oluşmaktadır. Büyük çoğunluğu yerli ırklardan oluşan koyunlarımızın ıslah edilmesi ve verimlerinin artırılması kaçınılmaz bir zorunluluktur. Bunun içinde, çevirme melezlemesi yoluyla ve sun'i tohumlamadan yararlanarak elde edilen sınırlı sayıda koçtan azami ölçüde yararlanmak ilkesi önem taşır. Bunun da başlıca yolu, koçların spermalarını sulandırarak ya da dondurarak hacimlerini çoğaltmak, bu sayede bir koçtan tohumlanacak koyun sayısını artırmaktır. Böylece ıslah hedeflerine uygun olarak daha çok sayıda koyun tohumlanabilecektir. Bu alanda en geçerli yöntem koç spermasının dondurularak tohumlamada kullanılmasıdır. Bunun Türkiye'de uygulanabilmesi, koç spermasının dondurulmasında ve tohumlamada kullanıldıktan sonraki dölveriminde ortaya çıkan sorunların çözümlenmesine bağlıdır.

Bu konuyu biz de araştırmaya çalıştık. Özellikle baştan, dondurmanın koç spermatozoitlerini ne şekilde etkilediği konusu üzerinde durduk. Yaptığımız bir çalışmada<sup>1</sup>, koç spermasını taze olarak ve dondurulup çözüldükten sonra elektron mikroskopta inceledik. Taze spermada, spermatozoitlerde ince yapı düzeyinde herhangi bir bozukluk görülmemesine karşın, dondurulmuş örneklerde spermatozoitlerin özellikle akrozomlarında membran bozukluğu, şişme ve madde kaybıyla karakterize değişikliklerin oluştuğunu saptadık. Ancak, bu bozuklukların dondurulmuş spermadaki spermatozoitlerin tümünde görülmediğini ve hareketlerinde bir düşüklüğe neden olacak düzeyde bulunmadığını gördük. Bunu izleyen bir çalışmada<sup>5</sup>, bu kez anılan bozuklukların spermanın dondurulması işleminin hangi evresinde oluştuğunu saptamak amacıyla yine sodyum sitrat-glikoz-yumurta sarısı sulandırıcısı ile sulandırıp sıvı azotta payetler içinde dondurduğumuz spermadan, dondurma işleminin her evresinde örnekler alarak Giemsa ile boyadık ve ışık mikroskop altında inceledik. İncelediğimiz preparatlarda akrozom bozuklukları oranlarını saptadık. Sonuçta, akrozom bozukluklarında, özellikle gliserolizasyon evresinden sonra artış



görüldüğünü tesbit ettik. Daha sonra çeşitli gliserol oranlarının (% 3, % 5, % 7) donmuş koç spermatozoitlerinin motilitesi ve akrozom bozuklukları üzerindeki etkisini incelemek amacıyla yaptığımız bir çalışmada<sup>6</sup>, % 5 oranının anılan özellikler bakımından daha iyi sonuçlar verdiğini bulduk. Son olarak ta, çeşitli ekilibasyon süreleri ve çözme ısılarının koç spermatozoitlerinin motilitesi ve akrozom morfolojisi üzerindeki etkilerini araştırdık<sup>7</sup>. Bu çalışmanın sonucunda da, 2 ve 3 saatlik ekilibasyon sürelerinin anılan özellikler yönünden bir farklılığa neden olmadığını, 50°C de 10 saniyede ve 75°C ve 5 saniyede çözülmenin donmuş koç spermatozoitlerinin motilitesi ve akrozom morfolojisi üzerinde olumlu etkileri olduğunu saptadık.

Bu çalışmalar ileride de bir plan çerçevesinde sürdürülecektir. Şimdi bulunduğumuz son durumda, yöntemde yaptığımız bir takım değişiklikler sonucu motilite oranında bir artma sağladığımızda akrozom bozuklukları oranlarının da arttığını, akrozom bozuklukları oranında bir düşüş sağlandığında ise, motilitenin düştüğünü görmekteyiz. Şimdi, bu sorunun çözülmesi için çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Bunun dışında, bu konuda ileride yapılacak çalışmalarla ilgili öneriler şöylece sıralanabilir:

1. En azından, yapılacak bu spermatolojik çalışmalardan olumlu sonuçlar alınana dek, özellikle dondurulmuş spermayla koyunların tohumlanmasına ve dölvrimi araştırmalarına girilmemelidir.

2. Spermatoloji alanında elde edilecek bilimsel sonuçlar olumlu olduğunda, bu şekilde dondurulacak spermalarla gerek kurumlarda, gerek halk elinde koyunlar tohumlanmalı ve dölvrimi saptanmaya çalışılmalıdır.

3. Bunların dışında yapılacak tohumlama çalışmalarında uygun tohumlama zamanı ve bir östrusta 2-3 kez tohumlamanın dölvrimine etkisi konusu incelenmelidir.

4. Yapılacak çalışmalarda tohumlanacak koyunların kızgınlığı sinkronize edilmeli ve dölvrimi ile sinkronizasyon arasındaki ilişki mutlaka araştırılmalıdır.

## KAYNAKLAR

1. AŞTI, R.N. ve GÖKÇEN, H. (1980): Sıvı azot buharında dondurmanın koç spermatozoalarının ince yapısı üzerine etkisi. A.Ü. Vet. Fak. Derg. Cilt: 26, No: 3-4, s. 30-39.
2. COLAS, C. and BRICE, G. (1977): Seasonal variation of the fertilizing capacity of deep-frozen ram semen. A.B.A., 1977(45): 2, 803.
3. EMMENS, C.W. and BLACKSHAW, A.W. (1950): The low temperature storage of ram, bull and rabbit spermatozoa, Austr. Vet. J., 26: 226-228.
4. GÖKÇEN, H. (1976): Koç spermasının kimi özellikleri, dondurulması ve dondurulan spermanın dölvrimi üzerinde araştırmalar. Doktora tezi. L.Z.A.E. Yayınları No. 48.
5. GÖKÇEN, H. ve AŞTI, R.N.(1981): Sıvı azot buharında dondurma yönteminin çeşitli evrelerinde koç spermatozoitlerindeki akrozom bozukluklarının saptanması. A.Ü. Vet. Fak. Derg. Cilt: 27, No: 3-4, S. 502-514.

6. GÖKÇEN, H. ve AŞTI, R.N. (1982): Değişik gliserol oranlarının dondurma işleminin çeşitli evrelerinde koç spermatozoonlarının motilitesi ve akrozom bozukluklarına etkisi. Basımda.
7. GÖKÇEN, H., AŞTI, R.N. ve KOZANDAĞI, M. (1982): Farklı ekilibrasyon süreleri ve çözme ısılarının koç spermatozoonlarının motilitesi ve akrozom bozukluklarına etkisi. Basımda.
8. POLGE, C., SMITH, A.U. and PARKES, A.S. (1949): Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature. 164: 666.
9. POLGE, C. (1968): Observations on the freezing of ram semen. VI<sup>e</sup> Congr. Int. reprod. Anim. Insem. Artif. Paris, 1968.
10. SAMOULIDIS, S. (1973): Ein Beitrag zur Tiefkühlkonservierung von Schaf- und Ziegenbocksamen mit Hilfe des Pellet- bzw Pailletten Verfahrens. Vet. Med. Diss. München.
11. SEVİNÇ, A., GÖKÇEN, H., ÇETİNKAYA, K. ve YORUL, O. (1978): Çeşitli sulandırıcılar ve ekilibrasyon süreleri kullanarak sıvı azotta dondurulan koç spermasının dölverimi üzerinde araştırmalar. TBTA Kesin Rapor, Proje No: VHAG-384.
12. STOYANOV, V.K. (1980): An experiment on deep-frozen insemination of sheep with frozen semen. A.B.A., 1980 (48): 6, 3180.