

A.Ü. Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji ve Dölerme ve
Sun'î Tohumlama Kürsüleri
Prof. Dr. Osman Hassa-Prof. Dr. Afif Sevinç

SIVI AZOT BUHARINDA DONDURMANIN KOÇ SPERMATOOZOA'LARININ İNCE YAPISI ÜZERİNE ETKİSİ

Reşat Nuri Aştı

Hazım Gökçen

The effect of freezing in liquid nitrogen fumes on the ram sperm ultrastructure.

Summary: *This preliminary and investigatory study has been carried out under the electron-microscope to find out the effect on freezing of ram sperm with liquid nitrogen fumes.*

Marked swelling of acrosome, material loss and degeneration of sperm membrane were noted. Examination of thin sections revealed that there were unaffected spermes as well as of those affected.

Özet: *Bu önçalışmada sıvı azot buharında dondurulmuş koç spermatozoa'larına, dondurmanın etkisi araştırıldı.*

Donmuş koç spermatozoa'larının acrosom'unda şişme, madde yitimi ve dış membranlarında bozulma saptandı. Donmuş spermatozoa'ya ait aynı kesitlerde hem zarara uğromuş, hem uğramamış spermatozoa'lar görüldü.

Giriş

Dünya'da son yirmi yıldır koç spermasının düşük ısı derecelerinde dondurulması konusunda oldukça yoğun çalışmalar yapılagelmektedir. Bu çalışmalar sonunda koç spermasının ampuller, payetler (straw) içinde ve pelet biçiminde; katı CO₂-etilalkol ile-79°C'de veya sıvı azot buharında dondurulması olanak içerisine girmiştir.

Dr. A.Ü. Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Kürsüsü, Ankara. Türkiye.
Dr. A.Ü. Veteriner Fakültesi Uzmanlık Yüksek Okulu Dölerme ve Sun'î Tohumlama Bilim Dalı, Ankara, Türkiye.

Ancak bu çalışmalardan bugüne değin gerek motilite (spermatozoa hareketi), gerekse dölverimi yönünden yeterli sonuç alınamamıştır.

Salamon (20), taze koç sperması ile tohumladığı iki sürüde % 73,9 ve % 78,3; dondurulup çözülmüş koç sperması ile tohumladığı iki sürüde de % 51,3 ve % 54,9 doğum oranı elde etmiştir.

Kalev ve arkadaşları (9), ampuller içinde ve kuru buz üzerinde dondurdukları koç sperması ile tohumladıkları iki sürüde % 45,4 ve % 32,2 oranında gebelik sağlayabilmişlerdir.

Samouilidis (21)'in, payetler içinde ve pellet biçiminde dondurduğu koç sperması ile çeşitli ülkelerde yaptığı tohumlamalardan elde ettiği dölverimi % 36,3-52,7 olmuştur.

Türkiye'de de koç spermasının düşük ısı derecelerinde dondurulması konusunda son yıllarda çalışmalar yapılmıştır.

Gökçen (6), koç spermasını payetler içerisinde ve sıvı azot buharında dondurup sıvı azot içinde saklamış, tohumladığı 96 koyunda % 22,9 oranında doğum elde etmiştir.

Sevinç ve arkadaşları (22), çeşitli sulandırıcılar ve ekilibasyon süreleri kullanarak sıvı azot buharında dondurdukları koç sperması ile tohumladıkları koyunlarda elde ettikleri doğum oranını % 20,0 olarak bulmuşlardır.

Tüm bu literatür sonuçlarından da anlaşılacağı gibi çeşitli tekniklerle dondurulan koç spermasıyla yapılan sun'i tohumlamalardan dölverimi yönünden yeterince başarılı sonuç alınamamıştır.

Bu olgu, çeşitli araştırmacıları bunun nedenlerini araştırmaya yöneltmiştir. Lasley ve arkadaşları (10) koç spermasının ısını, aniden 0°C'ye düşürdüklerinde hücre membranının permeabilitesinin arttığını; bazı araştırmacılar (2, 12, 13), bu permeabilite artışının, motilite ve metabolik aktivite azalması yanında, protein ve fosfolipidlerin kaybı ile beraber seyrettiğini bildirmişlerdir. Bir kısım araştırmacılar da (16, 18, 23), koç spermatozoa'larının ancak -79°C'de dondurulduğunda, metabolizma ve motilitelerinin azaldığını, fosfolipidlerin kaybolduğunu bildirmektedirler.

Normal mikroskop kullanarak yapılan çalışmalarda taze ve donmuş koç spermatozoa'ları arasında morfolojik yönden önemli bir değişiklik saptanmamıştır. Son yıllarda insan ve çeşitli tür hayvanların spermatozoa'ları üzerinde elektron mikroskopik çalışmalar (3, 5, 15) yapıldığı halde, donmuş koç spermatozoa'ları üzerinde yapılan çalış-

malar sınırlıdır (8, 17). Healey (8), taze ve donmuş boğa spermatozoa'ları üzerinde yaptığı çalışmada, ince yapı düzeyinde farklılık bulunmadığını bildirmektedir. Buna karşılık Quinn ve arkadaşları (17), taze ve donmuş koç spermatozoa'larının acrosomlarında madde yitimi saptadıklarını bildirmişlerdir.

Bu çalışmanın amacı, düşük ısıda dondurmanın koç spermatozoa'larının ince yapıları üzerindeki etkilerini araştırmaktır.

Materyal ve Metot

Bu çalışma Lalahan Veteriner Zootečni Araştırma Enstitüsü'ndeki Karacabey ve Konya Merinos Irklarından 4 koçtan alınan toplam 12 ejakülat üzerinde yapıldı.

Sperma, koçlardan sun'i vajenle alındı. Ejekülatlar alınır alınmaz bunların yarısı spermatozoa'ların normal yapılarını elektron mikroskopta incelemek amacıyla glutaraldehide-para-formaldehide tesbitine kondu. Öteki yarısı ise gerekli normal mikroskopik muayeneleri yapıldıktan sonra sulandırıldı. Sulandırıcı olarak Milovanov'un sodyum sitrat-glikoz-yumurta sarısı sulandırıcısı kullanıldı (14). Bu sulandırıcıya % 7 oranında gliserol katıldı. Sulandırma işlemi iki aşamada yapıldı. Birinci aşamada sperma, sulandırıcının gliserolsüz bölümü ile 1/2 oranında sulandırılarak buzdolabına konuldu ve ısısı 45 dakika içinde 5°C'ye düşürüldü. Isısı 5°C'ye düşürülen bu sperma'ya, dondurma kabini içinde daha önceden ısısı 5°C'ye düşürülmüş bulunan gliserollü sulandırıcı 30 dakikada ve eşit aralıklarla katıldı (Gliserolizasyon). Gliserolizasyonu tamamlanan sperma, payetlere çekilerek 5°C'deki su banyosunda iki saat bırakıldı (Ekilibrasyon). Ekilibrasyondan sonra sperma sıvı azot buharında dondurularak, -196°C'deki sıvı azot içinde saklandı.

Sıvı azottan çeşitli zamanlarda alınan payetler ılık su banyosunda çözüldü ve dondurmanın spermatozoa'ların ince yapısındaki etkisini saptamak amacıyla bir miktar ejakülat glutaraldehideparaformaldehide'le tesbit edildi.

Gerek taze, gerekse dondurulduktan sonra glutaraldehide paraformaldehide tesbit sıvısına alınan spermatozoa'lar, 50 mg/ml sakkaroz içeren bu tesbit sıvısında 1 saat + 4°C'de bırakıldı. Bu süre sonunda, dakikada 800 devir yapan santrifüjde 10 dakika santrifüje edildi. Çökelti, 50 mg/ml sakkarozlu 0,1 fosfat buffer'da 1 saat yıkandı. Bu süre sonunda yine 800 devirde 10 dakika santrifüje edil-

di. Fosfat buffer'da 1 saat yıkandıktan sonra, 800 devirde tekrar 10 dakika santrifüje edildi. Tüp, süpernatant atılmaksızın 50°C'deki su banyosuna alındı. Tüp içeriği aynı ısıya ulaştıktan sonra süpernatant atıldı. Çökelti üzerine 50°C'de erimiş % 2 lik agar'dan 1-2 damla damlatılarak tüp içeriği temiz bir lam üzerine döküldü. Agar donduktan sonra küçük parçacıklar halinde kesilerek % 1 lik ozmik asitte bir saat süreyle tesbit edildi. Parçalar dereceli alkollerden geçirilerek Araldit M'de bloklandı. LKM Ultratome III ile bu bloklardan alınan ince kesitler Reynolds (19) yöntemiyle boyanarak Carl Zeiss EM 9 S-2 model elektron mikroskopta incelendi.

Bulgular

Dondurulmuş koç spermatozoa'larının ince yapısında, özellikle acrosom'un bulunduğu baş bölgesinde değişiklikler görüldü.

Dondurulmamış sperma örneklerinden alınan uzunlamasına kesitlerde çekirdek, kama biçiminde idi; benekli görünüşte olup dens madde taşıyordu (Şek. 1N). Acrosom'un, başın 2/3 ünü kapladığı, lateralde dar olduğu, anteriorda ise genişleme yaptığı gözlemlendi (Şek. 1A). Bu genişleme bölgesinin torbalanma yaptığı yerde koyu acrosomal bir maddenin bulunduğu saptandı (Şek 1B). Subacrosomal bölgenin, başın apex'ine rastlayan ön kısmı içinde de Subacrosomal dens maddenin bulunduğu görüldü (Şek. 1C).

Dondurulmuş örneklerden alınan kesitlerde, dondurmanın spermatozoa üzerindeki zararlı etkisinin çeşitli biçimlerine rastlandı (Şek. 1, 2). Etkinin acrosomal bölgede olduğu görüldü.

Zararlı etkinin çokaz olduğu durumlarda, spermatozoa'ların acrosom'unda şişme, membranlarında bozulma görülmediği halde, acrosom'un genişleme bölgesinde madde yitimi gözlemlendi (Şek. 2 ok'lar). İleri derecede etkilenmiş spermatozoa'larda ise, acrosom'da şişme, ileri derecede madde yitimi ve membranlarda bozulma saptandı (Şek. 3 ok'lar); ancak, acrosomal ve subacrosomal dens maddenin bütünlüğünü koruduğu görüldü (Şek. 2, 3). Bir bölüm spermatozoa'larda ise acrosomlarını tamamen yitirdikleri saptandı. Aynı kesitlerde çeşitli ölçülerde etkilenmiş spermatozoa'ların yanında, hiçbir etkiye uğramamış normal yapıdaki spermatozoa'lara da rastlandı.

Dondurulmamış ve dondurulmuş spermatozoa'ların boyun ve kuyruk bölgelerinin ince yapılarında bir değişim görülmedi.

Tartışma

Elektron mikroskop tekniğinin gelişmesi ile değişik hayvan türlerinin spermatozoa'ları üzerinde araştırmalar (3, 5, 15), yapıldığı halde, donmuş koç spermatozoa'larında yapılan çalışmalar sınırlıdır. Healey (8), -79°C 'de dondurmanın boğa ve aygır spermatozoa'larında zararlı etki yapmadığını, domuz ve tavşanların acrosom'unda zararlı etkiye neden olduğunu; Quinn ve arkadaşları (17), donmuş koç spermatozoa'larında yaptıkları çalışmada acrosom'da madde yitiminin görüldüğünü bildirmektedirler. Biz de donmuş koç spermatozoa'larında yaptığımız bu çalışmada, sıvı azot buharında dondurmanın spermatozoa'ların özellikle acrosom'unu etkilediğini saptadık. Acrosom'da şişme, madde yitimi ve dış zarlarda bozulma gördük. Aynı örneklerdeki kimi spermatozoa'ların acrosom'larını tümüyle yitirdiklerini, bir bölümünün ise normal yapıya sahip olduklarını saptadık. Acrosomal ve subacrosomal maddede yitim görmediğimiz gibi, taze ve donmuş spermatozoa'ların boyun ve kuyruk bölgelerinin ince yapılarında da bir değişim gözlemedik.

Burada bir soru akla gelmektedir: Nasıl oluyor da aynı etkiye uğrayan spermatozoa'ların bazıları zarara uğradıkları halde diğerleri normal kalabiliyor? Görüşümüze göre bu durum, spermatozoa'ların dış membranlarının permeabilitesi ile ozmotik basınçlara karşı tekil dirençlerinin değişik olması ile ilgilidir. Nitekim, Lovelock (II) ve Farrant (4) da yaptıkları çalışmalarda, spermatozoa'ların dış membranlarının değişik permeabiliteye ve ozmotik basınçlara karşı tekil dirence sahip olduklarını bildirmişlerdir.

Hartree ve arkadaşları (7), protein, fosfolipid ve polisakkaritlerin spermatozoa'nın özellikle acrosom'unda yerleştiğini, Austin ve arkadaşları (1) yumurtanın delinmesine hizmet eden enzimlerin acrosom'da bulunduğunu bildirmişlerdir. Düşük ısı derecelerinde dondurulmuş spermatozoa'ların acrosom'unda görülen madde yitimi, spermatozoa'nın dölleme gücünü azaltmaktadır. Donmuş koç spermatozoa'sının dölleme gücünün, spermatozoa'larda görülen zararın ölçüsünden çok, zarara uğramış ve uğramamış spermatozoa'ların sayısı ile ilgili olabileceği görüşündeyiz.

Teşekkür

Bu çalışmanın Lalahan Veteriner Zootekni Araştırma Enstitüsü'nde yürütülmesi sırasında her türlü yardımlarını gördüğümüz başta Enstitü Müdürü Sayın Uzman Veteriner Hekim Zeki Benlioğ-

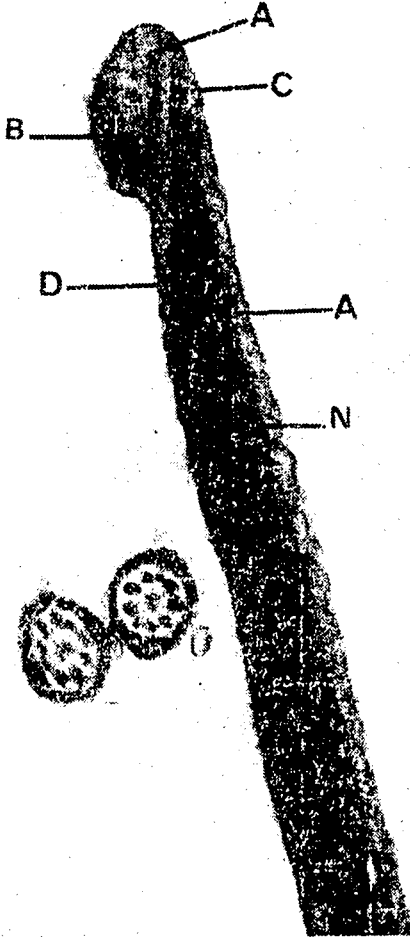
lu olmak üzere, Sun'î Tohumlama Laboratuvarı Şefi Sayın Uzman Veteriner Hekim Dr. Mehmet Kozandağı'ya ve çalışma arkadaşlarına teşekkürü bir borç biliriz.

Koçlardan alınan sperma numunelerinin elektron-mikroskoba hazırlanmasında ve kesitlerinin alınmasında yardımlarını gördüğümüz Teknisyen Elvan Solmaz ve Hüseyin Yılband'a da teşekkürlerimizi sunarız.

Literatür

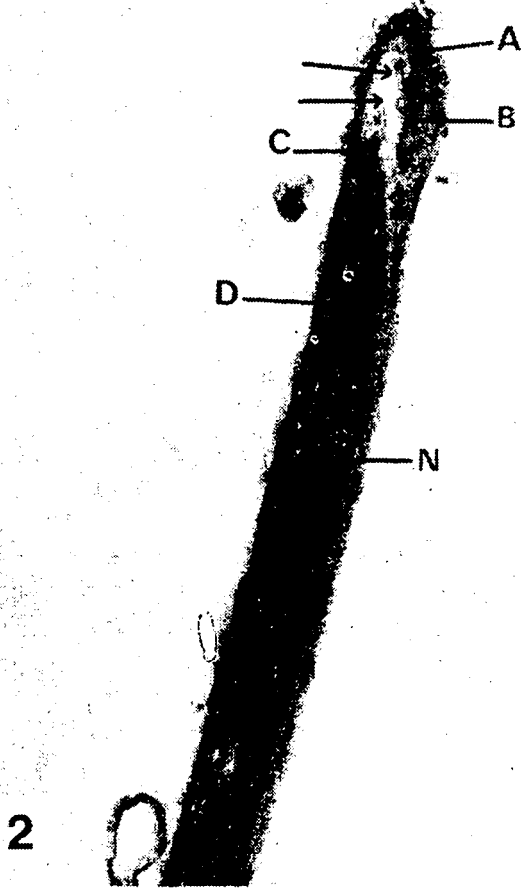
- 1- **Austin, C. R., Bishop, M. W. H.** (1958): *Role of the rodent acrosome and perforatorium in fertilisation.* Proc. R. Soc., 149, 241.
- 2- **Blackshaw, A. W.** (1958): *The effects of incubation temperature and cold shock on the metabolism of ram spermatozoa.* Aust. J. Biol. Sci., 11, 581.
- 3- **Blom, E., Birch-Anderson, A.** (1956): *The ultrastructure of the bull sperm. II. The sperm head.* Nord. Vet. Med., 17, 193.
- 4- **Farrant, J.** (1965): *Mechanisms of cell damage during freezing and thawing and its prevention.* Nature. Lond., 205, 1284.
- 5- **Fawcett, D. W.** (1965): *The anatomy of the mammalian spermatozoon with particular reference to the guinea-pig.* Z. Zellforsch. Mik. Anat., 67, 279.
- 6- **Gökçen, H.** (1976): *Koç spermasının kimi özellikleri, dondurulması ve dondurulan spermanın dölvürümü üzerinde araştırmalar.* Doktora tezi. Lalahan Veteriner Zootečni Araştırma Enstitüsü yayınları, No 48.
- 7- **Hartree, E. F., Srivastova, P. N.** (1956): *Chemical composition of the acrosomes of ram spermatozoa.* J. Reprod. Fert., 9, 47.
- 8- **Healey, P.** (1969): *Effect of freezing of the ultrastructure of the spermatozoon of some domestic animals.* J. Reprod. Fert., 18, 21-27.
- 9- **Kalev, G., Zagorski, D., Zakhariiev, Z.** (1973): *Deepfreezing of ram semen.* Anim. Breed. Abstr., Vol. 41, No, 9.
- 10- **Lasley, J. F., Easley, G. T., Mc Kenzie, F. F.** (1942): *A staining method for the differentiation of live and dead spermatozoa. I. Applicability to the staining of ram spermatozoa.* Anat. Rec. 82, 167.
- 11- **Lovelock, J. E.** (1953): *The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing.* Biochem. Biophys. Acta., 11, 28.

- 12- **Mann, T., Lutwak-Mann, C.** (1955): *Biochemical changes underlying the phenomenon of cold shock in spermatozoa.* Archs. Sci. Biol. St. Petersburg., 39, 578.
- 13- **Mayer, D. T.** (1955): *The chemistry and certain aspects of the metabolic activities of mammalian spermatozoa.* Mich. Univ. Cent-Symp. on Reprod. infertil., P. 45. Michigan state Universty., East Lansing.
- 14- **Milovanov, V. K.** (1962): *Biology and reproduction and artificial insemination of animals.* Izd. Selk. hoz. Lit. Moscow (Alınmıştır) in **Paufler, S. K. und Mitautoren.** (1974): *Künstliche Besamung und Eitransplantation bei Tier und Mensch.* Verlag M.-H, Schaper, Hannover.
- 15- **Nicander, L., Bane, A.** (1962): *Fine structure of boar spermatozoa.* Z. Zellforsch. Mik. Anat., 57, 390.
- 16- **Quinn, P. J., White, I. G.** (1966): *The effect of cold shock and deep-freezing on the concentration of major cations in spermatozoa.* J. Reprod. Fert., 12, 263.
- 17- **Quinn, P. J., White, I. G. and Cleland, K. W.** (1969): *Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing cold shock and freezing.* J. Reprod. Fert., 18, 209.
- 18- **Pickett, B. W., Komarek, R. J.** (1964): *Evidence for Loss of Lipid from bovine spermatozoa due to freezing.* J. Dairy. Sci., 47, 905.
- 19- **Reynolds, E. S.** (1963): *The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy.* J. Cell. Biol., 17, 208-212.
- 20- **Salomon, S.** (1971): *Fertility of ram spermatozoa Following Pellet freezing on dry ice at -79 and -140°C.* Austr. J. Biol. Sci., 24, 183.
- 21- **Samouilidis, S.** (1970): *Ein Beitrag zur Tiefkühlkonservierung von Schaf-und Ziegenbocksamen mit Hilfe des Pellet-bzw. Pailletten Verfahrens.* Vet. Med. Diss. München.
- 22- **Sevinç, A., Gökçen, H. Çetinkaya, K., Yorul, O.** (1978): *Çeşitli sulandırıcılar ve ekilibrasyon süreleri kullanılarak sıvı azotta dondurulan koç spermalarının dölvürimi üzerinde araştırmalar.* T.B.T.A.K. Veteriner ve Hayvancılık Grubu, Proje No, VHAG-384.
- 23- **White, I. G., Blackshaw, A. W. Emmens, C. W.** (1954): *Metabolic and motility studies relating to the low temperature storage of ram and bull spermatozoa.* Aust. Vet. J., 30. 84.



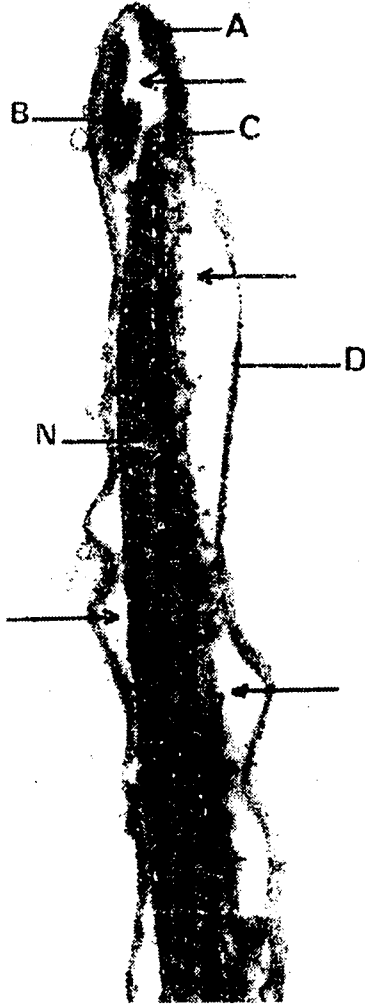
Şekil 1. Taze koç spermatazoa'sının baş kısmından uzamına kesit, A) acrosom. B) akrosomal dence madde, C) subakrosomal dence madde, D) dış membran, N) Nucleus., X 41800.

Fig 1. Sagittal section through the head of freshly fixed ram sperm. A) acrosome, B) acrosomal dence substance, C) subacrosomal dence substance, D) plasma membrane, N) nucleus., X 41800.



Şekil 2. Dondurulmuş koç spermatozoa'sının baş kısmından uzamına kesit. A) akrosom, B) akrosomal dens madde, C) subakrosomal dens madde, D) dış membran, N) nucleus, akrosom'da madde yitimi (ok'lar), X 38950.

Fig 2. Sagittal section through the head of frozen ram sperm. A) acrosome, B) acrosomal dence substance, C) subacrosomal dence substance, D) plasma membrane, N) nucleus, arrows) loss in the acrosomal substance., X 38950.



Şekil 3. Dondurulmuş koç spermatozoa'sının baş kısmından uzamına kesit. A) akrosom, B) akrosomal dens madde, C) subakrosomal dens madde, D) dış membran, N) nucleus, akrosomda ileri derecede madde yitimi ve dış membranlarda bozulma (ok'lar), X 40850

Fig 3. Sagittal section through the head of frozen ram sperm. A) acrosome, B) acrosomal dence substance, C) subacrosomal dence substance, D) plasma membrane, N) nucleus, arrows; severe damage in the acrosome and plasma membrane., X 40850.