

Prostaglandin F₂α ve Vit. E Katılarak Dondurulan Koç Spermalarında Akrozom Morfolojisi ve Dölverimi Üzerinde Araştırmalar

Hazım GÖKÇEN*
Reşat AŞTI**
Erol ÇEKĞÜL***
Erdoğan ŞENER***

ÖZET

Çeşitli hormonların ve antioksidanların dondurulan koç spermatozoon'larında, akrozom bozukluğu oranı ve dölverimine etkisini araştırmak amacıyla tertiple- nen bu çalışma, Karacabey Merinosu ırkından 4 koç ve 34 koyun üzerinde yapıldı. Koçlardan alınan sperma gerekli muayeneleri yapıldıktan sonra üçe ayrıldı. Birinci bölüm olduğu gibi bırakıldı. İkinci bölüme Prostaglandin, üçüncü bölüme de Vit. E katıldıktan sonra sıvı azot buharında dondurulup sıvı azotta saklandı. Daha sonra koçlardan birinin dondurulmuş sperması ile koyunlar tohumlandı. Sonuçta akrozom bozuklukları oranının donmadan sonra değil de gliserolizasyondan sonra oluştuğu saptandı. Ayrıca Vit.E katılarak dondurulan spermada saptanan akrozom bozuklukları oranının öteki gruplara göre tüm koçlarda önemli derecede düşük bulunduğu da tesbit edildi. Dölveriminin ise, Vit. E katılarak dondurulan koç spermalarıyla tohumlanan grupta ötekilere nazaran önemli derecede yüksek bulunduğu göz- lendi.

ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen über die Akrosomen Morphologie des mit Prostaglandin und Vitamin E angereichertem und tiefgefrorenem Schafbockspervas und über die Befruchtungsquote

Diese Untersuchungen, die den Zweck haben den Einfluss verschiedener Hor- mone und Antioxidans auf das Verhaeltnis der fehlerhaften Akrosomen von gefro-

* Doç. Dr.; Uludağ Üniv. Veteriner Fakültesi, Bursa — TÜRKİYE

** Doç. Dr.; Selçuk Üniv. Veteriner Fakültesi, Konya — TÜRKİYE

*** Uzm. Vet. Hek.; Karacabey Harası, Bursa — TÜRKİYE

renen Spermatozoen und auf die Befruchtung herauszufinden, wurden mit 4 Schafböcken und 34 Mutterschafen der Rasse Karacabey Merino durchgeführt. Das von den Schafböcken entnommene sperma wurde nach den nötigen Untersuchungen in drei Teile geteilt.

Der erste Teil blieb unverändert. Nachdem man dem Zweiten Teil Prostaglandin und dem dritten Teil Vitamin E hiuzufügte, wurden alle Teile im flüssigen Stickstoff dampf eingefroren und im flüssigen Stickstoff aufbewahrt. Später wurden die Mutterschafe mit dem gefrorenen Sperma eines der schafböcke befruchtet.

Daraufin ergab sich, das die Quote der fehlerhaften Akrosome nicht nach dem Gefrieren, sondern nach der Zugabe von Glycerol stieg. Ausserdem stellte man fest, dass das Verhaeltnis fehlerhafter Akrosome bei dem mit Vitamin E zusammen gefrorenem Sperma, den anderen Gruppen gegenüber, bei allen Schafböcken erheblich niedriger war.

Die Befruchtungs erfolge hingegen, stiegen bei dem Vitamin E hinzugefügtem Schafbock sperma, im Vergleich zu den anderen Gruppen, in grossem Masse.

GİRİŞ

Geleneksel bir hayvancılık dalı olan koyunculugumuz, 50 milyona yaklaşan sayısıyla orantılı bir verim düzeyine bugüne kadar maalesef ulaşamamıştır. Bunun nedenlerinin başında kuşkusuz birim başına verimin düşük olması gelmektedir. Birim başına verimin artırılmasının hayvan ıslahı ile, hayvan ıslahının da sun'i tohumlama ile en etkin biçimde gerçekleştirilebileğİne kuşku yoktur.

Elli yılı aşkın bir süredenberi Türkiye'de uygulanagelmekte olan koyun sun'i tohumlaması çalışmalarını çeşitli nedenlerle bir türlü arzu edilen düzeye ulaşamamıştır. Alan çalışmalarının sonuçlarına göre³, halen ülkemizde koyunlarda uygulanmakta olan sun'i tohumlama tekniğı ekonomik olmadığı gibi verimsizdir de. Bu teknik spermanın koçtan alınarak, hiçbir muameleye tabi tutulmaksızın birkaç porsiyona ayrılıp koyunlara verilmesini içerir. Aslında, ülkemizin koşulları da gözönüne alındığında bu alandaki en ekonomik yöntem, koç spermasının sulandırılarak, ya da dondurularak yani hacmini ve yaşama süresini arttırmak suretiyle tohumlamada kullanılmasıdır. Koç spermasının sulandırılarak tohumlamada kullanılması konusunda Dünya'da ve Türkiye'de yapılan çalışmalardan kimi başarılı sonuçlar alınmasına karşılık, donmuş koç spermasıyla yapılan tohumlamalardan şimdide değin maalesef olumlu dölvrimi sonuçları elde edilememiştir.

Gökçen², sodyum sitrat-glikoz-yumurta sarısı sulandırıcısı ile sulandırıp payetlerde ve sıvı azot buharında dondurduğu koç spermalarıyla yaptığı tohumlamalardan % 27.0 doğum elde etmiştir. Değışik sulandırıcılar ve ekilibrasyon süreleri kullanarak dondurdukları koç spermalarını ayrı tohumlama dozları ve teknikleri ile tohumlamada kullanan Sevinç ve arkadaşları⁶, ortalama % 20.0 oranında dölvrimi saptamışlardır.

Donmuş koç sperması ile tohumlanan koyunlardan yeterli düzeyde dölvrimi alınamaması, araştırıcıları bunun nedenlerini incelemeye yöneltmiş, nitekim Aşı ve Gökçen¹, koç spermasını taze olarak ve dondurulup çözüldükten sonra elektron mikroskopta incelemişlerdir. Araştırıcılar, taze spermada, spermatozoonlarda ince yapı düzeyinde herhangi bir bozukluk görülmemesine karşın, dondurulmuş örneklerde spermatozoit'lerin özellikle akrozomlarında membran bozukluğu, şişme ve madde kaybıyla karakterize değışikliklerin oluştuğunu saptamışlardır.

Donmuş koç spermasından yeterli dölverimi alabilmek amacıyla araştırmacılar özellikle dondurma evresinde spermaya kimi antioksidan, vitamin ve hormonları katmayı denemişlerdir. Nitekim, Gustafsson ve arkadaşları⁵, koç spermasını içerisine 300 µg/ml hesabıyla PGF₂α katarak dondurmuşlar ve donmuş spermayla yaptıkları tohumlamalardan hormon katılmamış gruba nazaran daha iyi dölverimi sonuçları elde etmişlerdir. Aynı şekilde Varnavskii⁷, çeşitli oranlarda Prostaglandin deriveleri katarak dondurduğu koç spermasıyla yapılan tohumlamalardan benzer sonuçlar aldığını bildirmektedir. Değişik antioksidanların, o arada Vitamin E'nin koç spermatozoonlarının morfolojisine ve dölverimine etkisini araştırmak üzere yapılan bir çalışmada⁴, doğum oranları arasında herhangi bir farklılık tesbit edilememiştir. Vit. E'nin özellikle alyuvarlarda membran dayanıklılığını arttırdığı klasik bilgiler arasındadır.

Bu çalışmamızda dondurma esnasında koç spermasına katılan PGF₂α ve Vit. E'nin spermatozoon'ların akrozom morfolojisine, spermatolojik özelliklerine ve dölverimine etkisini incelemeyi amaçladık.

MATERYAL VE METOD

Araştırmada Karacabey Merinosu Irkından 4 koç ve 34 koyun kullanıldı. Koçlar ve koyunlar Karacabey Harasının normal bakım ve beslenme koşullarında tutuldular.

Sperma koçlardan sıfat sezonunda sun'i vajen ile alındı. Gerekli makroskopik ve mikroskopik muayeneleri yapılan ejakülatlardan kullanılmaya elverişli bulunanları her biri 0.3 cm³ lük üç eşit bölüme ayrıldı. Ejakülatların bir bölümüne 0.25 cc Prostaglandin F₂α, bir bölümüne 0.25 cc Vit. E katıldı, bir bölümü ise kontrol olarak olduğu gibi bırakıldı. Sperma numunelerinde miktar, spermatozoon yoğunluğu, massaktivite gibi spermatolojik özellikler de saptandı.

Her bir ejakülat bölümü, önce 30°C de sütozu sulandırıcısının (10 g sütozu, 20 ml yumurta sarısı, 100 ml bidistile su) gliserolsüz bölümü ile bir tohumlama dozunda (0.2 ml) 100x10⁶ motil spermatozoon bulunacak biçimde sulandırılıp ısı 5°C ye düşürüldükten sonra bu kez sulandırıcının gliserollü bölümü ile aynı derecede sulandırıldı. Sulandırılmış sperma 1.5 saat ekilibrazyonda tutulduktan sonra payetlere çekildi ve raflara dizilip sıvı azot buharında 7 dakikada dondurulup muhafaza için sıvı azot içine daldırıldı. Donmuş spermalar numune alınacağı ya da tohumlamada kullanılacağı zaman 34°C lik ılık suda 15 saniye tutulmak suretiyle çözüldü. Spermanın dondurulması sürecinin her evresinde spermatozoon motilitesi saptandı.

Akrozom morfolojisini incelemek amacıyla dondurma sürecinin gliserolizasyondan sonra ve dondurulup çözüldükten sonraki evrelerinde alınan sperma numunelerinden frotiler yapılarak Giemsa tekniğiyle boyandı. Frotiler ışık mikroskobu ile muayene edilerek akrozom bozuklukları oranı yüzde olarak saptandı.

Tohumlamalar 8/1 numaralı koçtan alınan ejakülatların herhangi bir madde katılmadan, prostaglandin ve Vit. E katılarak dondurulmuş örnekleriyle spekülüm ve payet pistolesi kullanarak gerçekleştirildi. Dölverimi sonuçları aynı kızgınlıkta bir kez tohumlanan koyunlardan iki siklus sonunda koça dönmeyenlerin oranına göre saptandı. Elde olunan sonuçların istatistik değerlendirmesi ($\lambda^2 = \text{Ki-Kare}$) yöntemiyle yapıldı.

BULGULAR

Araştırmada kullanılan 4 adet Karacabey Merinosu koçunun dondurulmadan önce ve dondurma sürecinin kimi evrelerindeki spermatojistik bulguları ve akrozom bozuklukları oranları Tablo I'de verilmiştir.

Tablo: I
Araştırmada Kullanılan Koçların Dondurulmadan Önce ve Dondurma Sürecinin Kimi Evrelerindeki Spermatojistik Bulguları Ortalamaları

Koç No.	Sperma miktarı (cc)	Spermatozoon yoğunluğu ($\times 10^9$ / cc)	Massaktivite	İlk Sulandırma	Motilite (%)								
					5 °C de			Gliserolizasyondan sonra			Dondurulup çözüldükten sonra		
					N	P	E	N	P	E	N	P	E
147/1	1.05	3.1	++++	90	90	86	90	90	88	88	61	27	56
			Akrozom Bozuklukları Oranı (%)		—	—	—	17	16.5	12	17	15	11.5
230/1	0.6	2.5	++++	88	89	85	89	86	84	86	71	28	65
			Akrozom Bozuklukları Oranı (%)		—	—	—	18	12.5	11	18	13	10.5
8/1	1.3	2.6	++++	88	89	88	88	89	87	87	61	10	55
			Akrozom Bozuklukları Oranı (%)		—	—	—	29	17.5	17	28	18	15
54/1	1.2	3.0	++++	82	88	86	90	85	88	87	70	36	70
			Akrozom Bozuklukları Oranı (%)		—	—	—	27	21	14	18	14	13

Tablo II'de 8/1 nolu Karacabey Merinosu koçunun herhangi bir madde katılmadan ve Prostaglandin ve Vit. E katıldıktan sonra dondurulan ejakülatları ile tohumlanan koyunlardaki dölverimi durumu görülmektedir.

Tablo: II
8/1 Nolu Karacabey Merinosu Koçunun Donmuş Spermaları İle Tohumlanan Koyunlardan Elde Edilen Dölverimi Bulguları

Koç No:	Yöntem	Tohumlanan koyun sayısı	Gebe kalan koyun sayısı	Gebelik oranı %
8/1	Normal	10	3	33.0
	+ Prostaglandin	12	5	42.0
	+ Vit.E	12	6	50.0

TARTIŞMA VE SONUÇ

Araştırmanın birinci bölümünde, sperması kullanılan koçların kimi ön spermatojistik özellikleri ile dondurmadan önce, dondurma sırasında ve dondurmadan sonraki motilite oranları ve akrozom morfolojisi oranları her üç araştırma yöntemine

göre de saptanmış ve Tablo I'de sunulmuştur.

Tablodan da izlenebileceği gibi 4 koçun spermalarının da miktar, spermatozoon yoğunluğu, massaktivite bakımından yeterli olduğu anlaşılmıştır.

Spermatolojik verilerin incelenmesinden anlaşılabileceği gibi Akrozom bozukluğu oranları her koç grubunda da gliserolizasyondan sonra ve dondurup çözüldükten sonra değişmemiş, bu durum daha önce akrozom bozukluğunun dondurma sırasında değil de gliserolizasyondan sonra oluştuğu şeklindeki değerlendirmeleri haklı çıkaracak düzeydedir¹.

Tüm koçların dondurulan spermalarında motilite oranları dondurmanın çeşitli evrelerinde her üç deneme yönteminde de incelendiğinde, özellikle dondurup çözüldükten sonraki evrede, önceki evrelere nazaran önemli ölçüde düştüğü gözlenmektedir ki, bu da motilitenin dondurma sırasında kayba uğradığı şeklindeki literatür verileriyle tutarlı bir durum göstermektedir^{2.6}.

Spermayı dondurma sürecinin özellikle çözmeden sonraki evresinde normal ve Vit. E katılmış ejakülat bölümlerinde saptanan motilitenin her koç grubunda da prostaglandin katılmış ejakülat bölümüne göre önemli derecede yüksek bulunması, denemede prostaglandin kullanımının motiliteye özellikle sperma dondurulup çözüldükten sonra olumsuz etki yaptığı şeklinde yorumlanabilir. Buna karşın akrozom bozukluğu oranları bakımından ise, hem gliserolizasyondan sonra hem de dondurulup çözüldükten sonraki evrelerde Vit. E katılmış sperma bölümlerinin öteki iki deneme yöntemine göre tüm koç gruplarında önemli sayılabilecek düzeyde düşük akrozom içerdiği ve bunun da özellikle dölverimi yönünden iyi sayılabileceği sonucunu vermiştir. Nitekim dölverimi sonuçları Tablo II'den incelendiğinde, bu görüş kanıtlanmaktadır.

Tablodan da görüleceği üzere aynı koçun hiçbir madde katılmamış, prostaglandin katılmış, Vit. E katılmış ejakülat bölümleri ile tohumlanan koyunlarda en iyi dölverimi sonucu Vit. E katılan spermayla tohumlanan grupta alınmıştır. Vit. E katılarak dondurulmuş sperma bölümü ile yapılan tohumlamalardan alınan dölverimi sonucunun, hele 1. tohumlamaya dayalı oluşu da gözönüne alınırsa, literatür verileriyle tutarlı ve hatta oranlardan daha da üstün olduğu hemen anlaşılacaktır^{2.6}. Aynı zamanda Vit. E ile alınan bu sonuç özellikle hiçbir madde katılmadan dondurulan spermadan alınan sonuca bakınca istatistiki yönden önemli de bulunmuştur. Böylesine bir sonucun alınmasında kuşkusuz daha önce belirttiğimiz gibi Vit. E katılan sperma bölümünde akrozom bozukluğu oranının düşük olmasının önemli payı vardır. Bu da Vit. E'nin antioksidan bir vitamin olması nedeniyle A vitamininin oksidasyonunu önlemesi yanında, lipoprotein yapıdaki hücre membranını düşük ısıya karşı koruduğu ve bütünlüğünü muhafaza etmesini sağladığı şeklinde değerlendirilebilir.

Çeşitli antioksidanların, o arada Vit. E'nin koç spermatozoon'larının membranının dayanıklılığını ve bütünlüğünü koruyarak, akrozom bozukluklarının oluşmasını önlediği ve bu nedenle de Vit. E katılarak dondurulmuş koç spermalarıyla daha iyi dölverimi sonuçlarının alınmasını sağladığı bu araştırmanın sonuçlarına göre söylenebilir. Ancak, bu konuda ilk çalışma olması nedeniyle, ileride yapılarak bu türden araştırmaların daha çok sayıda materyal üzerinde uygulanmasının gereğini de vurgulamakta fayda vardır.

KAYNAKLAR

1. AŞTI, R. ve GÖKÇEN, H.: Sıvı azot buharında dondurmanın koç spermatozoa'larının ince yapısı üzerine etkisi. A.Ü. Vet. Fak. Derg. Cit: XXVII, No: 3-4 S. 30-39, (1979)
2. GÖKÇEN, H.: Koç spermasının kimi özellikleri, dondurulması ve dondurulan spermanın dölverimi üzerinde araştırmalar. Doktora Tezi, L.Z.A.E. Yayınları, No: 48, (1976).
3. GÖKÇEN, H.: Türkiye'de Koyun Sun'i Tohumlaması Uygulaması, II.Bölüm, Vet. Hek. Dern. Derg., Cilt: 50, Sayı: 3-4, S. 26-37, (1980).
4. GRIGORYAN, S. and NAZARYAN, V.: The effect of antioxidant on frozen ram semen. Anim. Breed. Abstr. 50(2): 756, (1982).
5. GUSTAFSSON, B. et al.: The fertility of deep-frozen ram semen supplemented with $PGF_2\alpha$ Anim. Breed. Abstr. 44(2): 684, (1976).
6. SEVİNÇ, A. et al.: Çeşitli sulandırıcılar ve ekilibrasyon süreleri kullanarak sıvı azotta dondurulan koç spermasının dölverimi üzerinde araştırmalar. TUBİTAK, Proje No: VHAG-384, Kesin Rapor, (1978).
7. VARNAVSKII, A.: The effect of synthetic prostaglandins in frozen ram semen on conception rate of ewes. Anim. Breed. Abstr. 50(2): 779, (1982).