

## Değişik Düzeylerde $\alpha$ -Chimotrypsin Katılan Sulandırılmış Koç Spermasının Bazı Spermatolojik Özellikleri ve Dölverimi Üzerinde Araştırmalar

M. Kemal SOYLU\*

Hazım GÖKÇEN\*\*  
İbrahim DOĞAN\*\*\*\*

Hüseyin TÜMEN\*\*\*

### ÖZET

*Bu araştırmada sulandırılarak tohumlamada kullanılan koç spermasına değişik düzeylerde katılan  $\alpha$ -chymotrypsin'in spermatolojik özellikler ve dölverimine etkisi araştırıldı.*

*Karacabey Tarım İşletmesinde yetiştirilen 40 baş merinos koyunu araştırmanın materyalini oluşturdu. Kontrol grubunu oluşturan 20 baş koyun, glikoz-fosfat sulandırıcısı ile sulandırılan enzim katılmamış sperma ile, deneme grubunu oluşturan 20 baş koyundan 10'u 0.2 mg/ml, 10'u da 0.4 mg/ml enzim içeren sulandırılmış sperma ile tohumlandı. Tohum-*

\* Yard. Doç. Dr.; U.Ü. Vet. Fak., Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa-Türkiye.

\*\* Prof. Dr.; U.Ü. Vet. Fak., Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa-Türkiye.

\*\*\* Dr.; U.Ü. Vet. Fak.; Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa-Türkiye.

\*\*\*\* Araş. Gör.; U.Ü. Vet. Fak., Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa-Türkiye.

lamalar  $0.2 \text{ cm}^3$ lük bir tohumlama dozunda  $150 \times 10^6$  motil spermatozoon bulunacak biçimde servikal yolla yapıldı.

Sulandırılmamış sperma (kontrol), 0.2 ve 0.4 mg/ml. tripsin katılmış sperma ile elde edilen gebelik oranları sırası ile % 55, 70 ve 80 bulundu.

## SUMMARY

### Investigations of Spermatological Characteristics and Fertility of Ram Semen Diluted By Adding Various Levels of $\alpha$ -chymotrypsin

*In this research, effects of  $\alpha$ -chymotrypsin, added to diluted semen at various levels, on spermatological characteristics and fertility of ram semen diluted and used for insemination.*

*Fourty Merino ewes, bred in Karacabey Agricultural Administration, were used as the material. Twenty ewes (control) inseminated with pure glucose-phosphate diluent. In the experiment groups ten of twenty ewes were inseminated with 0.2 mg/ml, and the other ten ewes were inseminated 0.4 mg/ml. enzym added glucose-phosphate diluent. Inseminations were performed cervically with  $0.2 \text{ cm}^3$  doses include  $150 \times 10^6$  motil spermatozoa.*

*Pregnancy rates for ewes inseminated with pure (control) and 0.2 and 0.4 mg/ml. trypsin added semen were 55, 70 and 80 % respectively.*

*Key words: Enzyme, addition, ram semen.*

## GİRİŞ

Türkiye'de halen uygulanmakta olan koyun sun'i tohumlama tekniğinin daha verimli, pratik ve ekonomik olabilmesi en başta koç spermasının dondurularak kullanılmasına bağlıdır. Ne var ki, bu alanda henüz çözümlenmemiş kimi sorunların bulunduğu da bir gerçektir. Bir yandan bu sorunların çözümlenmesine çalışılırken bir yandan da koyun sun'i tohumlamasında verim artırıcı girişimleri sürdürmek gerekir. Bu amaçla sulandırılmış koç spermasına değişik düzeylerde katılan  $\alpha$ -chymotrypsin'in spermatolojik özellikler ve dölverimine etkisi araştırıldı.

Bu araştırma ile benzerlik gösteren çalışmalar kimi yabancı bilim adamları tarafından domuzlar üzerinde yapılmıştır. Nitekim Bezlyudnikov ve Ambrosova<sup>1</sup> domuz spermasına katılan hyaluronidaz ve trypsin enzimlerinin gebelik oranını % 13,3 düzeyinde artırdığını bildirmektedirler. Yazarlar fosfodiesteraz katıkları spermalar ile yaptıkları tohumlamalardan % 83,3, enzim katılmamış sper-

ma bölümü ile yapılan tohumlamalardan ise % 71.3 gebelik oranı elde etmişlerdir.

Yapılan bir araştırmada<sup>2</sup>, domuz sperması, yüz mililitresinde 10, 20, 50 ve 100 mg. olmak üzere dört ayrı düzeyde hyaluronidaz ilave edilmiş glikoz-şelat-yumurta sarısı-sitrat sulandırıcısı ile sulandırılmıştır. Anılan düzeylerde hyaluronidaz katılan sperma bölümleri arasında motilite oranı ve spermatozoonların canlı kalma süresi bakımından önemli derecede fark saptanamamıştır. 10, 20, 50 ve 100 mg/ml. düzeyinde enzim katılan sperma bölümleri ile yapılan tohumlamalardan sırasıyla % 90.0; 90.0; 95.5 ve 91.0; kontrol olarak ayrılan sperma bölümü ile de % 80.0 doğum oranı elde edilmiştir.

Antonyuk et al.<sup>3</sup> ise, Hyaluronidaz enzimini tohumlama işleminden 1 saat önce domuzların uterusuna infuzyon tarzında vermişler, daha sonra 110 mililitrelik bir tohumlama dozunda  $1 \times 10^9$  motil spermatozoon bulunacak biçimde sulandırdıkları sperma ile domuzları tohumlamışlardır. Elde ettikleri doğum oranları deneme grubunda % 83.3, kontrol grubunda ise % 75.0 olmuştur. Yazarlar başka bir deneme grubunda bulunan domuzların bir bölümüne, 100 ml. sinde 50 mg. Trypsin + Hyaluronidaz içeren sulandırıcıdan 25 cc, bir bölümüne de 150 mg. Trypsin + Hyaluronidaz bulunan sulandırıcıdan 25 cc. uterus içine tatbik etmişler ve 1 saat sonra bunları tohumlamışlardır. Anılan gruplarda sırasıyla % 90 ve 95, kontrol grubunda ise % 85 doğum oranı elde etmişlerdir.

## MATERYAL VE METOD

Araştırmada hayvan materyali olarak 40 merinos koyunu ile bir merinos koçu kullanıldı. Koyunlar Karacabey Tarım İşletmesinde yetiştirilen anaç koyunlar arasından tesadüfi örnekleme yöntemiyle seçildi ve araştırma süresince işletmenin normal bakım-besleme koşullarında bulunduruldu.

Kontrol grubu olarak 20, deneme grubu olarak da 20 koyun ayrıldıktan sonra deneme grubu 10'ar başlık iki alt gruba bölündü ve ayrı ayrı numaralar ile işaretlendi.

Koçtan, sun'i vajen yardımı ile ardarda alınan iki ejakulat, spermatoojik muayeneleri yapıldıktan sonra üç bölüme ayrıldı. Spermanın birinci bölümü kontrol olarak enzim içermeyen sulandırıcı ile, kalan iki ve üçüncü bölümleri ise bir mililitresinde 0.2 ve 0.4 cc. Trypsin ilave edilmiş glikoz fosfat sulandırıcısı ile sulandırıldı. Sulandırma işlemi  $0.2 \text{ cm}^3$ 'lük bir tohumlama dozunda  $150 \times 10^6$  motil spermatozoon bulunacak biçimde yapıldı. Sulandırılan spermaların spermatoojik muayeneleri yapıldıktan sonra ısıları  $5^\circ\text{C}$ 'ye düşürüldü ve spermatoojik muayeneleri tekrarlandı.

Kızgın olduğu saptanan koyunlar, bu şekilde hazırlanan sperma bölümleri ile bir kızgınlıkta bir kez olmak üzere servikal yolla tohumlandı. Tohumlanan



koyunlar, iki östrus siklusu boyunca izlendi ve geri dönmeyenler gebe olarak kabul edildi.

## BULGULAR

Spermanın sulandırılmasından önce, sulandırılmasından ve ısısının 5°C'ye düşürülmesinden sonra yapılan muayenelerde saptanan spermatolojik özelliklere ilişkin değerler ile yapılan tohumlamalardan elde edilen dölverimi sonuçları Tablo I'de topluca sunulmuştur.

Tablo I'den de izlenebileceği gibi spermanın koçtan alınmasından hemen sonra yapılan muayenesinde spermatozoon motilitesi, ölü spermatozoon, anormal spermatozoon ve akrozom bozuklukları oranları sırasıyla % 90, 16.2, 0.2 ve 0 olarak saptanmıştır. Spermanın sulandırılmasından sonra anılan spermatolojik özelliklerin 0.2 mg/ml. trypsin katılmış sperma bölümünde sırasıyla % 85, 16.2, 2.1, 0.9, 0.4 mg/ml. trypsin katılmış sperma bölümünde % 85, 20.1, 2.1 ve 0.9 olduğu saptanmıştır.

Spermaların ısı 5°C'ye düşürüldüğünde anılan spermatolojik özelliklere ilişkin değerler 0.2 mg/ml. trypsin katılan bölümde sırasıyla % 85, 22.2, 1.8, 1.5, 0.4 mg/ml. katılan sperma bölümünde ise yine sırasıyla % 85, 19.2, 3.3 ve 1.2 olarak bulunmuştur.

Kontrol olarak ayrılan spermanın sulandırılmasından ve ısısının 5°C'ye düşürülmesinden sonra motilite oranı % 90 ve 85, ölü spermatozoon oranı % 15.0 ve 21.0 anormal spermatozoon oranı % 1.5 ve 1.2, akrozom bozukluk oranı da % 1 ve 2 olarak saptanmıştır.

0.2 ve 0.4 mg/ml. düzeyinde trypsin katılan deneme grubu sperma bölümleri ile % 70 ve 80, kontrol grubu sperma bölümü ile ise % 55 gebelik oranı elde edilmiştir.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Spermanın biyokimyasal özelliklerinin araştırılması amacıyla yapılan çalışmalar sonucu, gerek seminal plazmada gerekse spermatozoonların yapısında bulunan enzimler ve miktarları ile bu enzimlerin fonksiyonlarının ne olduğu büyük ölçüde açıklık kazanmıştır.

Seminal plazmada bulunan enzimlerin başlıcaları laktik dehidrogenaz (LDH), Glutamik oksalasetik transaminaz (GOT), Glutamik piruvik transaminaz (GPT), asit fosfataz ve alkalin fosfataz, spermatozoonun yapısında bulunanlar ise Akrosin, hyaluronidaz, koronapenetrating enzim ve asit hidrolaz'dır<sup>4,5</sup>. Moule<sup>6</sup>'nin bildirdiğine göre amilaz, kolinesteraz, sitokrom, glukoronidaz ve 5-nükleotidaz da seminal plazmada bulunan enzimler arasındadır.

**Tablo: I**  
**Değişik Düzeylerde Trypsin Katılan Koç Spermasında Saptanan Spermatolojik**  
**Özelliklere İlişkin Değerler İle, Yapılan Tohumlamalardan Alınan Dölverimi Sonuçları**

| Spermatolojik Muayene Bulguları |                   |                             |                            |                                |  | Dölverimi Bulguları     |                         |                   |
|---------------------------------|-------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------------|--|-------------------------|-------------------------|-------------------|
| YÖNTEM                          |                   | Spermatozoon Motilitesi (%) | Ölü Spermatozoon Oranı (%) | Anormal Spermatozoon Oranı (%) | Akrozomu Defektli Spermatozoon Oranı (%) | Tohumlanan Koyun Sayısı | Gebe Kalan Koyun Sayısı | Gebelik Oranı (%) |
| Sulandırmadan Önce              |                   | 90                          | 16.2                       | 0.2                            | —  |                         |                         |                   |
| Sulandırdıktan Sonra            | 0.2 mg/ml Trypsin | 85                          | 16.2                       | 2.1                            | 0.9                                      |                         |                         |                   |
|                                 | 0.4 mg/ml Trypsin | 85                          | 20.1                       | 2.1                            | 0.9                                      |                         |                         |                   |
|                                 | Kontrol           | 90                          | 15.0                       | 1.5                            | 1.0                                      |                         |                         |                   |
| 5°C'de                          | 0.2 mg/ml Trypsin | 85                          | 22.2                       | 1.8                            | 1.5                                      | 10                      | 7                       | 70                |
|                                 | 0.4 mg/ml Trypsin | 85                          | 19.2                       | 3.3                            | 1.2                                      | 10                      | 8                       | 80                |
|                                 | Kontrol           | 85                          | 21.0                       | 1.2                            | 2.0                                      | 20                      | 11                      | 55                |



Bilhassa spermatozoonun yapısında bulunan ve hidrolitik etkili olarak nitelendirilen enzimlerin fertilizasyonun gerçekleşmesinde önemli rol oynadıkları ancak bunların spesifik etkilerinin henüz tam olarak açıklık kazanmadığı bildirilmektedir<sup>5</sup>.

Enzim biyokimyası üzerinde yoğunlaşan araştırmalar sonucunda akrozomal enzimlerin fertilizasyonda önemli rol onadığı, ancak spermaya uygulanan işlemler (dondurma, saklama) sırasında bu enzimlerin aktivitesinde olumsuz değişimlerin meydana geldiği ve bunun sonucunda da spermatozoonların dölleme gücünün azaldığı hatta tümüyle kaybolduğu açıklanmıştır<sup>7</sup>.

Yapılan bu araştırmada spermanın koçtan alınmasından hemen sonra yapılan muayenelerde saptanan spermatojik özelliklere ilişkin değerler ile, iki ayrı düzeyde enzim katılarak sulandırılan ve ısısı 5°C'ye düşürülen sperma bölümlerinde saptanan spermatojik bulgular çok farklı değildir. Domuzlar üzerinde yapılan benzer araştırmalarda da kontrol ve deneme grupları arasında olduğu gibi, farklı düzeylerde enzim katılan sperma bölümleri arasında da spermatojik özellikler bakımından fark bulunmadığı bildirilmiştir<sup>2</sup>. Alınan bu sonuçlara ve literatür verilerine dayanarak, anılan düzeylerde spermaya katılan trypsin'in spermatojik özellikler üzerine olumsuz yönde etkisinin olmadığını düşünmek olasıdır. Alınan dölverimi sonuçları da bu savı destekler nitelikte görünmektedir. Nitekim kontrol, 0.2 ve 0.4 mg/ml. trypsin katılan sperma bölümleri ile yapılan tohumlamalar sırasıyla % 55, 70, 80 gebelik oranı sağlamıştır. Kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olan dölverimi sonuçlarının tatminkâr ve bu konuda yapılacak çalışmaların umut verici olduğu söylenebilir. Ne var ki izlenebilen literatürde bu araştırmaya benzer bir çalışmanın koçlar üzerinde yapıldığı saptanamadı. Ancak tür farkı olmakla birlikte domuzlar üzerinde yapılmış olan çok sınırlı sayıda ki araştırmalardan alınan sonuçların elde edilen bulgular ile büyük bir benzerlik gösterdiği ileri sürülebilir.

Nitekim Bezlyudninkov ve Ambrosova<sup>1</sup> domuz spermasına katılan hyaluronidaz ve trypsin enzimlerinin gebelik oranını % 13.3 oranında arttırdığını, ayrıca kontrol ve fosfodiesteraz katılan deneme grubu spermalar ile yaptıkları tohumlamalardan % 71.3 ve 83.3 gebelik oranı elde ettiklerini bildirmekte dirler. Yine domuzlar üzerinde yapılan bir araştırmada spermaya 10, 20, 50 ve 100 mg/ml. düzeyinde hyaluronidaz katıldığı, kontrol ve deneme grupları arasında spermatojik özellikler bakımından fark bulunmadığı bildirilmiş, buna karşın anılan düzeylerde hyaluronidaz katılan sperma bölümleri ile yapılan tohumlamalardan sırasıyla % 90.0; 90.0; 95.5; 91.0; kontrol grubu sperma ile de % 80.0 gebelik oranı elde edilmiştir<sup>2</sup>.

Benzer bir çalışmada da tohumlamadan bir saat önce uterus içi enfüzyon şeklinde hyaluronidaz enzimi verilen deneme grubunda % 83.3, kontrol grubunda ise % 75.0 gebelik oranı sağlanmıştır<sup>3</sup>.

Bu konuda yapılan çalışmaların sınırlı sayıda olması nedeniyle spermaya katılan enzimin dölverimi üzerine olan etkisinin mekanizmasını kesin olarak ifade etmek henüz güçtür. Zira seminal plazmanın tohumlamadan sonra genital kanalda kalıp rezorbe olduğu, fertilizasyon bölgesine ise sadece spermatozoonların ulaştığı bilinmektedir<sup>5,8</sup>. Bu durumda spermaya katılan enzimlerin fertilizasyonda nasıl bir rol oynadığı ve dölverimini ne şekilde arttırdığı sorusu hemen akla gelmektedir. Çünkü fertilizasyonda etkili olan enzimler de seminal plazmada var olanlar değil, spermatozoonun akrozomunda bulunan enzimlerdir<sup>4,5</sup>. Fakat bu soruya cevap olabilecek bilgiler de mevcuttur. Nitekim, bir tohumlama dozunda bulunan motil spermatozoonların bir kısmının fertilizasyon bölgesine ulaşmadan öldüğü ve bunların taşıdıkları enzimleri genital kanala bıraktıkları, salınan bu enzimlerin de genital kanalda bulunan mukusun eritilmesinde rol oynadığı, bunun sonucu olarak da canlı kalan spermatozoonların fertilizasyon bölgesine ulaşmasının kolaylaştığı ve daha çok sayıda spermatozoonun bu bölgeye ulaşabildiği bildirilmektedir. Bu verilere dayanarak, spermaya katılan enzimlerin aynı mekanizma ile etkiyerek ovidukt'a ulaşabilen hareketli ve ovumu dölleme yeteneğine sahip spermatozoon sayısının daha fazla olmasını sağlayabileceğini ve bu şekilde dölverimi düzeyinde bir artış meydana getirebildiğini düşünmek olasıdır. Bunun yanısıra sperma ile birlikte genital kanala verilen enzimler, spermatozoonların burada geçirdiği kapasitasyonu olumlu yönde etkiyerek de yüksek gebelik sonuçları alınmasını sağlamış olabilir.

Özkoca<sup>9</sup>'nın bildirdiğine göre ölü spermatozoon ve hatta çini mürekkebi gibi hareketsiz cisimler reproduktif sistemin yukarı kısımlarına taşınabilir. Ancak yapılan bu araştırmada 0.2 cm<sup>3</sup>'lük bir tohumlama dozunun kitle olarak uterus'u geçip ovidukt'a ulaşması ve tohumlama dozu içerisinde bulunan enzimlerin ovum'u etkilemesi çok zayıf bir olasılıktır. Bu durumda enzim-ovum etkileşiminden ziyade, enzim-spermatozoon ve enzim-uterus etkileşimlerinin varlığı ve buna açıklık kazandırılması şeklindeki görüş ve düşüncelerin daha haklı çıkabileceği de söylenebilir.

Sonuç olarak, enzim biyokimyası üzerine eğilmenin ve benzer çalışmaların daha çok sayıda materyal üzerinde değişik yöntemlerle denenmesinin yararlı olacağı, bunun yanısıra spermaya enzim katılması yönteminin, günümüze kadar yapılan çalışmalarda dölverimini arttırdığı saptanan tekniklerle birleştirilme olanaklarının da araştırılmasının, sun'i tohumlama çalışmalarına çok olumlu katkıları sağlayacağı kanısındayız.

## KAYNAKLAR

1. BEZLYUDNIKOV, L.G., AMBROSOVA, T.I.: New methods of increasing the fertilizing ability of boar semen. Anim. Breed. Abstr. 58: 806,



- (1990).
2. ANTONYUK, V.S. and BEZLYUDNIKOV, L.G.: Using hyaluronidase for increasing conception rate of sows. Anim. Breed. Abstr. 52: 5369, (1984).
  3. ANTONYUK, V.S., BEZLYUDNIKOV, L.G., AMBROSOVA, T.I.: Increasing the effectiveness of the use of boar ejaculates. Anim. Breed. Abstr. 57: 3422, (1989).
  4. ÖZKOCA, A.: Çiftlik hayvanlarında reproduksiyon ve sun'i tohumlama. İ.Ü. Vet. Fak. Yayınları No: 3209, İstanbul, (1984).
  5. HAFEZ, E.S.E.: Reproduction in farm animals. Lea Febiger, Philadelphia, (1980).
  6. MOULE, G.R.: Basic physiological and managerial considerations in artificial insemination of sheep. C.S.L.R.O. Div. of Animal Physiology, Ian Clunies Ross Animal Research Lab., REPORT, (1965).
  7. AŞTI, R.N., GÖKÇEN, H.: Sıvı azot buharında dondurma yönteminin spermatozoonların ince yapısı üzerine etkisi. A.Ü. Vet. Fak. Derg., Cilt: 26, No: 3-4, s. 30-39, (1980).
  8. MORROW, D.A.: Current Therapy in Theriogenology. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, (1980).
  9. ÖZKOCA, A.: Sığırlarda reproduksiyon ve infertilite. İ.Ü. Vet. Fak. Yayınları No: 3433, İstanbul, (1986).