



MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ DERGİSİ
“MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg.”
<http://edergi.mehmetakif.edu.tr/index.php/sabed/index>



Epididimal ve Dondurulmuş Çözölmüş Holstain Boğa Spermasında Farklı Boyama Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Comparison of Different Staining Methods on Epididymal and Frozen Thawed Sperm from Holstein Bulls

Ayhan Ata¹, Muhammed Enes İnanç¹, Orhan Kankavi², Özlem Yıldız Gülay³, Mehmet Şükrü Gülay³

¹ Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama AD, 15030, BURDUR

² Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 15030, BURDUR

³ Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, 15030, BURDUR

Abstract: The aim of the current study was to compare effectiveness of various semen staining methods in frozen-thawed and epididymal cattle semen. Frozen semen were placed in a water bath first at 37 °C for 30 seconds and thawed. Epididymal semen from cauda epididymis was obtained from slaughter house and diluted with phosphate buffer solution (PBS). After preliminary examination under the microscope, frozen-thawed and epididymal semen samples were smeared on glass microscope slides using another glass slide and air dried. Sperm on the slides were stained with Coomassie Blue, Silver Nitrate, May-Grünwald+Giemsa, Naphthol Yellow-S+Eritrosin-B, Trypan Blue+Giemsa and Eosin+Coomassie Blue stain, Naphthol Yellow-S+Eritrosin-B, Trypan Blue+Giemsa and Eosin+Coomassie Blue. Stained froty samples were examined under bright field microscopy (Nikon E-600). From all froties at least 100 spermatozoa were investigated. Equatorial region of intact spermatozoa was well defined and acrosomal region was stained differently than other regions by some staining methods (Coomassie Blue, May-Grünwald+Giemsa, Naphthol yellow-S+Eritrosin-B, Eosin+Coomassie Blue). Equatorial regions of spermatozoa with corrupted acrosomes were not stained well. Epididymal spermatozoa were stained better than frozen-thawed spermatozoa in all staining methods investigated in the present study. This could be because of the substances used in frozen semen as cryoprotectants (proteins of animal origin, etc.). In conclusion, our results demonstrated that Eosin+Coomassie Blue staining method is simple, inexpensive, and reliable method for staining semen from Holstein bulls. The method works quickly, needs fewer methodological steps, and does not require complex laboratory conditions for assessment of establishing live-dead spermatozoa and acrosomal/morphological status in frozen-thawed and epididymal semen obtained from Holstein bulls.

Key words: Cattle, spermatozoa, staining.

Yazışma Adresi: Prof. Dr. Ayhan ATA Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, 15030, BURDUR.

E-posta: ayhana@mehmetakif.edu.tr **Tel:** 0248 213 2115

Öz: Bu çalışmanın amacı, epididimal ve dondurulmuş çözölmüş boğa spermalarında farklı sperma boyama yöntemlerinin etkinliğinin karşılaştırılmasıdır. Dondurulmuş sperma 37°C'de 30 saniyede çözöldü. Epididimal sperma mezbahadan cauda epididimisten elde edildi ve PBS ile sulandırıldı. Mikroskop altındaki ön değerlendirilmeden sonra dondurulmuş çözölmüş ve epididimal spermalardan froty hazırlandı ve hazırlanan frotiler kurutuldu. Spermatozoa Coomassie Blue, Gümüş Nitrat, May-Grünwald+Giemsa, Naphthol Yellow-S+Eritrosin-B, Trypan Blue+Giemsa ve Eosin+Coomassie Blue, Panceao-S, Ponceau-S+ Naphthol Yellow-S+ Eritrosin B ve modifiye wright ile boyandı. Boyanan frotiler parlak ışık mikroskopunda değerlendirildi (Nikon E-600). Bütün frotilerden en az 100 spermatozoa incelendi. Sağlam spermatozodaki egüteryal bölge çok iyi fark edildi ve akrozomal bölge bazı sperma boyama yöntemlerinde diğer bölgelere göre farklı renkte boyandı (Coomassie Blue, May-Grünwald+ Giemsa, Naphthol yellow-S+Eritrosin-B, Eosin+Coomassie Blue). Bozuk akrozomlu spermatozodaki egüteryal bölgeler iyi boyanmadı. Çalışmamızdaki tüm boyama yöntemlerinde epididimal sperma dondurulmuş çözölmüş spermaya göre daha iyi boyandı. Bu ise cryoprotektan olarak kullanılan maddelerden kaynaklanabileceği tahmin edildi (hayvansal protein kaynakları gibi). Sonuç olarak çalışmamız Eosin+Coomassie boyamasının Holstein boğalarda basit, ucuz, güvenilir bir boyama yöntemi olduğunu gösterdi. Bu metot Holstein boğalarda epididimal ve dondurulmuş çözölmüş spermalarda hızlı çalışan, ölü-canlı ve akrozomal/ morfolojik bozuklukların hesaplanmasında kullanılabilir bir metot olduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar sözcükler: Sığır, spermatozoa, boyama.

Geliş Tarihi: 16.06.2014

Kabul Tarihi: 30.06.2014

Kaynak göstermek için: Ata A, İnanç ME, Kankavi O, Gülay ÖY, Gülay MŞ. 2014. Epididimal ve dondurulmuş çözölmüş Holstain boğa spermasında farklı boyama yöntemlerinin karşılaştırılması. MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg. 2(1): 1-12.

Giriş

Suni tohumlama ya da doğal aşımında kullanılan erkek damızlık hayvanlara bağı olarak şekillenen infertilite veya sterilite büyük ölçüde ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Yıldız ve ark., 2000). Bu nedenle fertilitiyi yakından ilgilendiren çalışmalarda erkek hayvanların potansiyel fertilitelerinin de bilinmesi önem taşımaktadır (Yıldız ve ark., 2000). Spermatozoonun fertilizasyon yeteneğı ise birçok faktöre bağı olarak değışkenlik göstermektedir. Bu faktörlerden biri de spermanın kalitesidir. Erkek hayvanlarda infertilitenin en önemli sebebinin spermatozooya ait akrozomal ve morfolojik bozuklukların ejakulattaki miktarına bağı olduğu ortaya konmuştur (Blom, 1981). Ejakulatta bulunan spermatozoonların morfolojik olarak incelenmesinde mikroskopik morfolojik muayene en önemli testlerden biridir.

Epididimal spermada ya da dondurulmuş çözdürölmüş spermada morfolojik olarak spermatozoa değılendirilmesi için çeşitli boyama yöntemleri kullanılmaktadır. Son zamanlarda birçok yöntem sperma örneklerinde, bozuk spermatozoon ve akrozom yüzdesini belirlemede ortaya çıkmıştır; fakat bunların birçoğı pahalı araç gereç ve tekrarlama gerektirmektedir (Larson ve Miller, 1999). Tekniklerden örneğın immunofloresan tekniğı akrozomal proteinlerin belirlenmesinde monoklonal antikoru geliştirmiştir (Rajamahendran ve ark.,1994). Alternatif olarak histokimyasal boyalar kullanılırken; (Bryan ve Akruk 1977; Lenz ve ark.,1983) bazı türlerde lectine dayalı florasın boyamalar yapılmıştır (Carver ve ark.,1977). Ne yazık ki bu prosedürlerin birçoğının sakıncaları bulunmaktadır (Larson ve Miller, 1999). Örneğın bunların antikorları ya zor bulunmaktadır ya da çok pahalıdır. Ayrıca florasın mikroskop ve elektron mikroskop ekipmanları sadece birkaç türün akrozom durumlarını belirlemek için kullanılmaktadır (Larson ve Miller, 1999). Buna ilave olarak histokimyasal ve antikorlarına dayanan boyamalarda uzun bir zamana ihtiyaç vardır (Larson ve Miller, 1999). Bu sayılan bir dizi zorluklardan dolayı boğaların akrozomal/morfolojik durumlarını belirlemek için güvenilir ve ucuz olan bu boyama metotları kullanılmıştır.

Bu çalışmanın amacı; spermatozoayı basit, kolay, ucuz yöntemlerle boyayarak spermanın morfolojik kalitesi hakkında güvenilir bir bilgi sahibi olmaktır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada Holstein ırkı boğalardan alınan epididimal ve dondurulmuş-çözdürölmüş spermalar (American Breeder Service (ABS) ve EgeVet) kullanıldı. Mezbaha materyalinden

(cauda epididymisden) elde edilen epididimal spermalar, phosphate buffer solution (PBS) ile sulandırıldı. Dondurulmuş spermalar ise öncelikle 37 °C'de su banyosunda 30 saniye 'de çözdürüldü. Spermaların mikroskop altında ön incelenmesinden sonra lamda sürme frotileri hazırlandı ve havada kurutuldu. Sürme frotileri hazırlanan boğa spermaları (spermatozoa) farklı boyama metotları kullanılarak karşılaştırıldı:

1. Coomassie Blue G-250

Froti çekilmiş kurutulmuş preparatlar %0,22 Coomassie Blue G-250 (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ), %50 Metanol (Merck-1.06008.2500) %10 asetik asit %40 distile su olacak şekilde hazırlanan boya ile 2 dakika boyandı. Preparatlar distile su kullanılarak istenmeyen boyalar yıkandı ve kurutuldu. Kurutulduktan sonra ksilenden geçirildi ve tekrar kurutuldu ve ışık mikroskobu altında incelendi (Larson ve Miller, 1999).

2. Gümüş Nitrat

Hazırlanan preparatların her biri eşit miktarda karıştırılan gümüş nitrat (Merck-1.01510.0050) ve distile su ile hazırlanan solüsyon ile kaplandı ve lamel kapatıldı. Daha sonra preparatlar bir cam kap içerisinde rutubetli bir hava sağlanacak şekilde 65 °C'de 2 saat tutularak uygun boya miktarını alması için izlendi. Bu süreden sonra lameller çıkarıldı ve preparatlar distile su ile yıkandı (Bongso, 1983).

3. May-Grünwald+Giemsa

Frotisi çekilmiş preparatlar kurutulduktan sonra dik jale içinde 2-5 dakika May-Grünwald boyası (Merck-HX941807) ile fiksasyon işlemine tabi tutuldu. Bunun ardından ise hızlı bir şekilde distile sudan geçirildi. Daha sonra 40 °C %7,5'lik giemsa (Merck-HX895661) ile 2-4 saat boyandı, hızlı bir şekilde distile sudan geçirildi.

4. Ponceau-S

Daha önceden hazırlanmış preparatlar üzerine pancoua-s (sigma- aldrich, P3504-10G) lamın üzerini kaplayacak şekilde döküldü, kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar daha sonra hızlı bir şekilde önce distile su ile yıkandı, daha sonra ksilenden geçirilerek tekrar distile su ile yıkandı, kurutuldu. Mikroskopta incelendi.

5. Naphthol yellow-S+Eritrosin-B

Öncelikle preparatlar %1'lik asetik asitte bulunan %0,1'lik Naphthol Yellow S (Sigma-Aldrich-19,962-1)'le 30 dakika boyandı. Boyanan preparatlar kurumaya bırakıldı,

kurutulduktan sonra %1'lik asetik asitle 10 saniye durulandı. Durulanan preparatlar eşit miktarda %0,2'lik Naphtol Yellow S ve %0,2'lik Eritrosin B (Sigma- Aldrich-19.826.9) (pH 4,8 olacak şekilde) 13 dakika boyandı. Preparatlar ya iyonize olmayan ya da distile su ile (pH 4,8) yıkandı, kurutularak mikroskop altında inceleme yapıldı (9).

6. Ponceau-S+Naphthol Yellow-S+Eritrosin-B

Hazırlanmış preparatlara Pancua S (sigma- aldrich, P3504-10G) boyası dökülerek boyandı, kurutuldu ve distile su ile yıkandı. Daha sonra ise yukarıda anlattığımız gibi naphthol yellow s- eritrosin B boyama prosedürü uygulanarak boyama işlemi tamamlandı.

7. Trypan Blue+Giemsa

İlk önce izotonik (290 m osmol) ve pH'ları nötr (6.9-7.2) olacak şekilde %0,81 NaCl'da %0,25 trypan blue (Sigma Cell Culture, T-6146) (ağırlık/hacim) boyama solüsyonu hazırlandı. Boyalar Fiksasyon için 1N'luk HCl'den 86 ml ve 14 ml formaldehit solüsyonu %37'lik ağırlık/hacim; (Merck-1.06008.2500) ve 0,2g nötral red (Sigma-Aldrich-N2880) hazırlandı. Akrozom boyası ise %2,5-7,5'lik Giemsa stok solüsyonundan (J.T. Baker-3856) distile su ile (pH 6,9) hazırlandı. Daha sonra boyamaya geçildi (10).

Bu boyamada öncelikle trypan blue ve sperma lamın bir kenarında otomatik pipetle karıştırıldı ve lamel ile froti çekildi. Daha sonra preparatlar kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar formaldehit-nötral red solüsyonunda dik jale içinde 2-5 dakika fiksasyon işlemine tabi tutuldu. Bunun ardından ise hızlı bir şekilde distile sudan geçirildi. Boyama işlemine 40 °C %7,5'lik giemsa (JT. Baker-3856) ile 2-4 saat boyandı, hızlı bir şekilde distile sudan geçirildi. Bu ikinci distile sudan geçirmede preparatlar 2 dakika distile suda bırakıldı.

8. Eozin+Coomassie Blue

Frotiller eozin %20 (Riedel-De Haen-32617)'le boyandı, kurutuldu. Daha sonra Commassie blue G-250 (Thermo Scientific 6104-58-1) ile 2 dakika boyandı, distile su ile yıkandı kurutuldu ve mikroskop altında incelendi.

9. Wright's

Frotiller doğrudan Wright's boyası (Sigma WG-32) ile 40 °C'de 2-4 saat boyandı, distile su ile yıkanarak kurutuldu.

Boyanan tüm frotiller ışık mikroskobunda değerlendirildi (Nikon E-600). Bütün frotillerde en az 100 spermatozoa incelendi.

Bulgular

1. Coomassie Blue G-250

Yapılan boyamalarda akrozomları sağlam olan spermatozoa baş kısımları spermatozoonun diğere bölümlerine göre daha fazla boyanarak koyu renkli görölmüş ve eguteryal bölgeler tespit edilmiştir. Mikroskopta sayılan akrozomları bozuk olan spermatozoa ise akrozomları parçalı olarak görölmüş, eguteryal bölgeleri tespit edilememiş ve spermatozoanın apikal kısımlarında koyu renk görölmemiştir. Sayılan 100 tane spermatozoondan 85 tanesi sağlam ve iyi boyandığı, 15 tanesinin ise hasarlı olduğı ve kötü boyandığı tespit edilmiştir. Fakat bu bulgular dondurulmuş çözölmüş spermalarda net olarak gözlenememesine rağmen %25 oranında iyi, %75 oranında ise kötü boyanmış spermatozoon tespit edilmiştir.

2. Gümüş Nitrat

Bu boyamada spermatozoaların akrozomal ve post akrozomal bölgeleri farklı renkte boyandığı, akrozomun postakrozom bölgesine göre daha açık renkte olduğı göröldü. Eguteryal bölgeler hem epididimal spermatozoada hem de dondurulmuş çözölmüş spermatozoada ayırt edilebilirken epididimal spermatozoonun kuyruk bölümlerinin postakrozom gibi daha koyu görölmesi dondurulmuş çözölmüş spermalarda gözlemlenememiştir. Yapılan muayene sonucunda epididimal spermalarda sayılan 100 spermatozoondan 75 tanesinin kötü boyandığı 25 tanesinin ise güzel boyandığı tespit edilmiştir. Dondurulmuş çözölmüş spermatozoonlarda ise %25 oranında iyi, %75 oranında ise kötü boyanmış spermatozoonlar tespit edilmiştir.

3. NaphthoL Yellow S ve Eritrosin B

Boyama sonucunda epididimal spermatozoa baş kısımlarının kuyruk kısımlarına göre daha az boya aldığı, kuyruk kısımlarının özellikle midpiece bölgesi kolayca seçildiğı fakat baş bölgesinde bulunan eguteryal bölge ve akrozomun seçilemediğı göröldü. Epididimal spermatozoonların incelenmesinde görüntülerin tam olarak ayırt edilememesine rağmen incelenen 100 spermatozoondan 70 tanesinin kötü boyandığı 30 tanesinin iyi boya alarak spermatozoonu oluşturan bölümlerin çok rahat ayırt edildiğı göröldü. Dondurulmuş çözölmüş spermatozoon preparatlarında ise %22 oranında iyi boyanmış spermatozoon tespit edilmiştir.

4. Trypan Blue-Giemsa

Boyanan preparatlar incelendiğinde spermatozoonların çok fazla boya almadığı buna rağmen akrozomal bölgenin spermatozoonun baş kısmının diğer bölümlerine göre daha az boya aldığı gözlemlendi. Spermatozoonun kuyruk kısmı postakrozomal bölgeye göre daha az boya aldığı görüldü. Ayrıca, kuyruk kısmının baş kısmı ile bağlantı bölgesi fark edilebilir durumdaydı. Bunun yanı sıra epididimal spermalar dondurulmuş çözölmüş spermaya göre daha iyi boyanmıştır. Epididimal spermaların incelenmesi sonucu %38 morfolojik olarak düzgün boyanmış ve ayırt edilebilen spermatozoon görölmüştür. Dondurulmuş çözölmüş spermalarda bu oran %15'dir.

5. May- Grunwald –Giemsa

Boyama sonucunda epididimal sperma preparatları incelendiğinde spermatozoonların çok iyi boyandığı özellikle akrozom bölümünün postakrozom bölümüne göre daha fazla boya alması sonucu spermatozoonun incelenmesinin daha kolay olduğu gözlemlendi. Bazı spermatozoonun baş kısımlarının diğer spermalara göre çok açık olarak boyandığı, bunun ise bu spermaların bozuk olmasından kaynaklanabileceği düşünöldü. Akrozomların dikkatlice incelenmesi sonucu bazı akrozomların parçalı olduğu, bazılarının ise daha az boya alarak açık renkli görünümde oldukları göröldü. Dondurulmuş-çözölmüş sperma preparatlarına bakıldığında ise epididimal sperma ile yapılan boyama ile karşılaştırıldığında boyama kalitesinin düşük olmasına rağmen diğer boyama yöntemlerinin donmuş sperma ile yaptığımız preparatlara göre daha iyi boyandığı göröldü. Yapılan incelemeler sonucunda %7 oranında kötü boyanmış, %93 oranında ise çok iyi boyanmış, morfolojik olarak incelemenin kolay yapılabildiği tespit edilmiştir. Dondurulmuş çözölmüş spermalarda iyi boyanma yüzdesi ise %22 bulunmuştur.

6. Eozin- Comassie Blue

Boyama sonrası inceleme yapıldığında bazı spermatozoonun baş kısımlarının tamamen eozin ile boyandığı ve bu boyanan spermatozoa sayısının ise preparatın tamamına bakıldığında çok az olduğu göröldü. Bu incelemeler dondurulmuş çözölmüş sperma ile yapıldığında ise yine bazı spermatozoonun eozin ile boyandığı fakat epididimal spermlar gibi kolayca ayırt etmenin zor olduğu göröldü. Bu yöntemin diğerlerinden en önemli farkı boyamanın çok iyi olmasının yanı sıra bozuk ve hasarlı spermatozoonların baş kısımlarının eozini alarak kırmızı boyanması olmuştur. İncelemeler sonucu epididimal frotilerde %3

oranında iyi boyanmayan spermatozoon tespit edilmiştir. Dondurulmuş çözdürölmüş sperma frotilerinde ise %65 oranında iyi boyanmış spermatozoon tespit edilmiştir.

7. Wright Boyaması

Boyamalar sonucunda spermatozoonların iyi boyanmadığı ve spermaların birbirinden ayırt edilemediği, sadece epididimal spermada kuyruk bölgesinin baş bölgesine göre daha az boyandığı, bu farklılığın dondurulmuş- çözdürölmüş spermada ayırt edilemediği görölmüştür.

Epididimal spermalarda %90 oranında iyi boyanmamış, %10 oranında ise iyi boyanmış, spermatozoonların bölümlerinin ayırt edilebildiği görölmüştür. Dondurulmuş çözdürölmüş spermalarda ise preparatların neredeyse tamamında net bir görüntü elde edilememesine rağmen %10 oranında iyi görüntü elde edilmiştir.

8. Pancua- s

Boyama sonrası spermatozoonların baş kısımlarının kuyruk bölümüne göre daha iyi boyandığı ancak baş kısmının eguteryal ve akrozom bölümlerinin ayırt edilemediği ve bozuk akrozomlu spermaların sağlam spermatozoonlardan ayırt edilemediği göröldü. Yapılan incelemeler sonrasında dondurulmuş çözdürölmüş spermaların neredeyse tamamında kötü bir görüntü elde edilirken epididimal ve dondurulmuş çözdürölmüş spermaların incelenmesinde yaklaşık %5 oranında iyi boyanmış spermatozoon tespit edildi.

9. Pancua s Naphthol Yellow- Eritrosin B

Bu boyama yönteminin yapılmasındaki amaç farklı bölgelerin farklı renkte boyanmasını sağlayarak spermatozoonların morfolojik olarak daha kolay ayırt edilmesini sağlamak olmasına rağmen burada bu yöntem başarılı olmamıştır. Spermatozoonlar ağırlıklı olarak pancua s ile boyandığı; spermatozoayı oluşturan farklı bölümlerin ayırt edilemediği görölmüştür. Mikroskopta incelemeler neticesinde dondurulmuş çözdürölmüş spermalardan net bir sonuç alınamazken, epididimal ve dondurulmuş çözdürölmüş spermatozoonların incelenmesinde %10 oranında iyi boyanmış spermatozoon tespit edilmiştir.

Yukarıda incelenen 9 boyama yönteminin sonuçlarını bir tablo halinde iyi boyanan ya da boyanmayan olarak şöyle sıralayabiliriz;

Tablo 1. Boyama yöntemlerinin sonuçları

	Epididimal sperma	Dondurulmuş-çözdürölmüş sperma
1.Coomassie Blue	++++	++
2.Silver Nitrate	+++	++
3.May-Grünwald+Giemsa	++++	+++
4.Pancoeau S	+	+
5.Naphthol Yellow-S+Eritrosin-B	+++	++
6.Ponceau-S+Naphthol yellow-S+Eritrosin-B	++	++
7.Trypan Blue+Giemsa	+++	+
8.Eosin+Coomassie Blue	+++++	++++
9.Wright's	+	+
0-20 arası spermatozoon: + (Bir Artı)		
20-40 arası spermatozoon: ++ (İki Artı)		
40- 60 arası spermatozoon: +++ (Üç artı)		
60-80 arası spermatozoon: ++++ (Dört artı)		
80-100 arası spermatozoon: +++++ (Beş artı)		

Tartışma

Comassie Blue, Gümüş Nitrat, Naphthol Yellow S- Eritrosin B, Tripan Blue- Giemsa, May- Grunwald Giemsa, Eozin-Commassie Blue ile yapılan boyamalar sonucunda, bazı boyama yöntemlerinde morfolojik olarak çok güzel boyandığı, spermatozoonu oluşturan baş, orta, kuyruk, akrozom bölümlerinin çok kolay olarak ayırt edildiği; bazı boyama yöntemlerinde ise bu başarının sağlanamadığı görölmüştür. Commassie Blue boyaması ile Moller ve ark. (1990) daha önce fare ve hamsterlarda, Larson ve Miller (1999) farklı tür memelilerde yaptığı çalışmalardaki sonuçlarla benzer sonuçlar elde ettik. Yapılan çalışmalarda akrozomları sağlam olan spermatozoanın apikal kısımlarının koyu renkle boyandığı, akrozomları sağlam olmayan spermatozoanın ise çok az boyandığı veya boya almadığı görölmüştür. Epididimal spermalarla elde ettiğimiz sonuçlar Commassie Blue boyamasının spermatozoanın akrozom durumlarını ve morfolojik olarak spermaların kalitesini belirlemek için hızlı ve güvenilir bir metot olduğunu ortaya çıkarmıştır. Brum ve ark. (2006) belirttiği gibi, spermatozoanın akrozom durumlarını belirlemek için bunun gibi birçok yöntem olmasına rağmen; bu boyama tekniğinin pahalı laboratuvar şartlarını gerektirmemesi ve frofi hazırlandıktan sonra yaklaşık 5-10 dakika gibi çok kısa bir zaman sonra boyama işleminin tamamlanması, pratik ve iyi sonuç veren bir yöntem olması nedeni ile birçok kişi tarafından tercih edilmesini sağlamıştır. Bununla birlikte bu boyama yöntemi ile dondurulmuş çözdürölmüş spermalarda benzer sonuçlara ulaşılamadı. Bunun sebebi olarak ise,

dondurulmuş spermallerdeki sulandırıcılarda bulunan hayvansal proteinlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Gümüş nitrat boyamasında en dikkat çekici boyama farklılığı baş bölgesindeki akrozom ve postakrozomal bölgedeki boyanma farklılığıdır. Bulgular incelendiğinde postakrozomal bölgenin akrozomal bölgeye göre daha koyu renkte boyandığı ve diğer bölgelerden kolayca ayrıldığı görüldü. T. A. Bongso'nun (1983) yaptığı çalışmada bozuk akrozomlu olanların daha az boya aldığı görülürken sağlam akrozomlu olanların ise daha fazla boya aldığını tespit etmiştir. Elder ve ark. (1981) köpek, kedi ve diğer laboratuvar hayvanlarında yaptığı çalışmalarda benzer sonuçlarla karşılaşmıştır. Fakat bizim yaptığımız çalışmada ise sadece birkaç spermatozoonda bu ayrıma gidebildik ve bunu sperma örneğinin tamamında gözlemleyemedik. Morfolojik olarak ise Katarzyna ve Elzibeta (2011) gibi postakrozomal ve akrozomal bölgelerin ayrımını çok kolay bir şekilde yaptık. T. A. Bongso (1983) gümüş nitrat boyamasının yine pahalı laboratuvar şartları gerektirmeyen, ucuz, güvenilir bir yöntem olduğunu belirtmiştir. Bunun yanı sıra boyama prosedürü boyama sırasında rutubetli ve 65 °C'lik bir etüv ortamında yaklaşık 2 saatlik bir zaman dilimine ihtiyaç duyması sebebi ile diğer boyama yöntemlerine göre daha dezavantajlı görülmektedir.

Naphthol Yellow-S Eritrosin-B boyamasında beyaz ışık altında akrozomal cap, kiraz kırmızısı (apikal bölüm)'ndan pembe renge kadar (dorsal ve ventral bölüm) değişen renkte görülmüştür. Nükleus ya hiç boya almamış ya da çok az oranda sarımsı pembe ile boyanmıştır (Bryan ve Akruk,1977). Postnuclear cap açık pembe görünürken midpiece ve flagellum pembe rengin farklı çeşitleri ile boyanmıştır. Bu bulgular daha önceki çalışmalarla benzerlik göstermektedir (Bryan ve Akruk,1977). Bununla birlikte dondurulmuş çözölmüş spermada yaptığımız denemelerde benzer sonuçlarla karşılaşmadık. Bunun sebebi olarak ise sperma sulandırıcılarının içinde bulunan çeşitli kimyasal maddelerin heterojen alanlar oluşturması sonucunda net bir görüntü oluşturmaması ve boyamaya engel olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Naphthol Yellow-S Eritrosin-B boyama yöntemi diğer yöntemlere göre nispeten kolay olmasına rağmen, yaptığımız karşılaştırmada, Comassie Blue boyama yöntemi kadar net bir görüntü vermemiştir. Comassie Blue boyamasında akrozom bölgesi net olarak koyu renkle görülmesinden dolayı ayırt edilebilirken, Naphthol Yellow-S Eritrosin-B boyama yönteminde akrozomu ayırt etmek daha zordur. Bununla birlikte Naphthol Yellow-S Eritrosin-B boyama yönteminin avantajı gümüş nitrat gibi yaklaşık 2 saatlik bir zamana ihtiyaç duymaması ve boyama işleminin yaklaşık 40 dakika da tamamlanmasıdır.

Tripan Blue-Giemsa boyama yöntemi diğer yöntemlerle ile karşılaştırıldığında, Giemsa boyamasının 2-6 saat gibi uzun bir süre gerektirmesi ve boyamada sonucunda güzel bir görüntü vermemesi sebebi ile diğer boyamama yöntemlerine göre pek avantajlı bir yöntem olmadığı sonucuna varılmıştır.

Epididimal spermalarda yapılan boyamalarda, ucuz ve kolay olan May Grünwald-Giemsa boyasıyla spermatozoanın çok güzel olarak boyandığı görölmüştür. İncelemelerimiz sırasında akrozomların çok kolay ve net şekilde görüldüğü, bozuk akrozomların seçilebildiği, farklı spermatozoon bölgelerinin boyama tonlarına bakılarak ayrılabilirdiği görölmüştür. Boyama prosedürünün uygulanabilirliğine bakıldığında ise Commassie Blue boyaması ile karşılaştırıldığında bu prosedürün uygulamasının uzun olmasına rağmen Tripan Blue- Giemsa boyaması ile karşılaştırıldığında ise sürelerin hemen hemen aynı olmasına rağmen May-Grünwald- Giemsa boyamasından net ve spermatozoon bölümlerinin net olarak ayırt edilmesi sebebi ile kullanışlı bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır. Eozin-Comassie Blue boyamasına bakıldığında ise her ikisinde de net olarak görüntü elde edilmesine rağmen Eozin-Comassie Blue boyamasında morfolojik incelemeler yanında Eozin alan spermatozoada ölü canlı muayenesi de yapılabileceğinden dolayı Eozin-Comassie Blue boyaması May-Grunwald-Giemsa ya göre daha avantajlı görölmektedir.

Çalışmanın sonucunda Eosin+Comassie Blue boyamasının Holstein boğa spermalarında basit, ucuz, güvenilir bir boyama yöntemi olduğunu gösterdi. Bu yöntemle tek frotide hem morfolojik muayene hem de ölü-canlı muayenesi yapılarak hızlı bir şekilde spermatozoonun değerlendirilmesi sağlanmıştır. Bu boyama yönteminin çok kolay olması ve saha şartlarında kolay uygulanabilir ve çok hızlı bir şekilde spermatozoonun morfolojik özellikleri açısından bilgi sahibi olunabilme özellikleri göz önüne alındığında bu yöntemin çok avantajlı bir yöntem olduğu söylenebilmektedir. Yaptığımız boyamada epididimal spermatozoada boyama sonrası spermatozoon çok net olarak seçilebilirken dondurulmuş-çözdürölmüş spermatozoada sperma sulandırıcılarına bağılı olarak daha fazla boya alması sonucu gözlem güçleşmiştir. Sonuç olarak bu metot Holstein boğalarda Epididimal ve dondurulmuş-çözdürölmüş spermalarda hızlı çalışan, ölü canlı ve akrozomal/morfolojik bozuklukların hesaplanmasında kompleks laboratuvar şartları gerektirmeyen bir metot olduğunu ortaya konmuştur.

Kaynaklar

1. Amer M, Elnasser Taha ABD, Shawky El Haggag, Taymour M, Geirgis AM and Wael Z.2001. May- Grünwald- Giemsa stain for detection of spermatogenic cells in the ejaculate: a simple predictive parameter for successful testicular sperm retrieval. Human Reproduction. 7 : 1427-1432.
2. Anonim 2011. Stain for Sperm Acrosomes. <http://www.animal.ufl.edu/hansen/protocols/acrstain.htm>. (Erişim Tarihi:15.01.2011).
3. Blom E.1981. Ocena morfologiczna wad plemnikow buhaja II. Ppropozycja nowej klasyfikacji wad plemnikow. (Morfological evaluation of sperm abnormalities in bulls. 2. Aproposal for a new classification of sperm abnormalities) Medycyna Waternaryjna, 37: 239-241.
4. Bongso TA.1983. Comparative Silver Staining Patterns of Water Buffalo, Goat, and Pig Spermatozoa. Archives of Andrology. 11:13-17.
5. Brum AM, BS Alysia DT, PhD Khalida Sabeur, PhD Barry AB.2006. Evaluation of Coomassie blue staining of the acrosome of equine and canine spermatozoa. American Journal of Veterinary Research, 67 (2): 358-362.
6. Bryan J and Akruk S. 1977. A Naphthol Yellow S and Eritrosin B Staining Prosedure For Use In Studies of the Acrosome Reaction Of Rabbit permatozoa. Stain Technology Copright © by The Williams & Wilkins Co.
7. Carver-Ward J, Moranverbeek I, Hollanders J. Bryan J, Akruk S. 1977. A naphthol yellow S and erythrosin B staining procedure for use in studies of the acrosome reaction of rabbit spermatozoa. Stain Technol., 52: 47-50.
8. Christensen P, Whitfield' CH and Parkinson TJ.1996. In vitro induction of acrosome reactions in stallion spermatozoa by heparin and A23187. Theriogenology 45:1201-1210.
9. Elder FFB, Hsu TC.1981. Silver Staining Patterns of Mamalian Epididymal Spermatozoa. Cytogen Cell Genet 30: 157-167.
10. Foresta C, Ferlin A, Bettella A, Rossato M, Varotto A.1995. Diagnostic and clinical features in azoospermia. Clinical Endocrinology, 43(5): 537-543.
11. Hansen C, Srikandakumar A, Downey DR.1991. Presence of follicular fluid in the porcine oviduct and its contribution to the acrosome reaction. Molecular Reproduction and Development, 30 (2): 148-153..
12. İleri İK., AK K, Papuccuoğlu S, Birler S.2008. Evcil hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'ı tohumlama. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, Ders notu no :142, 2008.
13. Katarzyna A and Elzibieta S.2011. The use of silver nitrate for the identification of spermatozoon structure in selected mammals. Can. J. Anim. Sci. 91: 239-246.
14. Kovakcs A and Foote RH.1992. Viability and Acrosomes Staining of Bull, Boar and Rabbit Spermatozoa. Biotechnic & Histochemistry, 1052-0295/92/6703-0119.
15. Larson JL and Miller DJ. 1999. Simple Histochemical Stain for Acrosomes on Sperm From Several Species. Molecular Reproduction and Development, 52: 445-449.

16. Lenz RV, Ball GD, Lohse JK, First NL and Ax RL. 1983. Chondroitin Sulfate Facilitates an Acrosome Reaction in Bovine Spermatozoa as Evidenced by Light Microscopy, Electron Microscopy and In Vitro Fertilization. *Biology of Reproduction*, 28: 683-690.

17. Moller CC, Bleil JD, Kinloch RA, Wassarman PM.1990. Structural and functional relationships between mouse and hamster zona pellucida glycoproteins. *Dev Biol* 137: 276-286.

18. Rajamahendran R, Anbrose J, Lee C. 1994. Anti-human sperm monoclonal antibody HS-11: a potential marker to detect bovine sperm acrosome reaction in vitro. *J Reprod Fertil*, 101: 539-545.

19. Uçar Ö. 2004. Akrozom reaksiyonunun sperma kalitesi, muhafazası ve suni tohumlama başarısındaki rolü. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 10(1):117-124.

20. Yıldız C, Ataman MB, Kaya A, Tepeli C, Lehimcioğlu N. 2000. Köpek ve koçlarda akrozom bozukluklarının belirlenmesi amacıyla farklı tespit ve boyama yöntemlerinin karşılaştırılması. *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 11 (2): 7-11,.