

KÖPEKLERDE TAZE ve DONMUŞ-ÇÖZÜNMÜŞ SPERMADA ANORMAL SPERMATOZOON TİPLERİNİN ve ORANLARININ TESPİT EDİLMESİNDE FARKLI YÖNTEMLERİN KULLANILMASI

M. Bozkurt Ataman¹ Cengiz Yıldız² Abdullah Kaya¹
Melih Aksoy¹ Necdet Lehimcioğlu³

Effectiveness of the Various Staining Methods to Detect Abnormal Sperm Types and Rates in Fresh and Frozen-thawed Dog Semen

Summary: Effectiveness of the various staining methods to detect abnormal sperm types and rates in fresh and frozen-thawed dog semen were studied. Semen samples were collected by digital manipulation. Abnormal sperm rates of fresh semen samples were determined following the fixation in Hancock solution or in the smears stained by eosin-nigrosin, hematoksilen-eosin and Caserette stains. Morphological examination of the semen samples were also conducted following freezing and thawing in Tris-fructose extender in 0.25 ml of French straw. Analyses of the data showed that there is no statistic difference ($p>0.05$) among the fixation and stain groups to determine abnormal sperm types and rates of fresh or frozen-thawed dog semen. As a conclusion; in addition to Hancock solution, different staining methods can be used to detect morphologically abnormal sperm in fresh and frozen-thawed dog semen.

Key words: Dog, abnormal spermatozoon, staining method, fresh and thawed semen.

Özet: Bu çalışmada, köpeklerde taze ve donmuş-çözünmüş spermada anormal spermatozoon oranı ve tiplerinin tespit edilmesinde farklı

Hancock solusyonu, Eosin-nigrosin, Hematoksilen-eosin ve Caserett boyaları kullanılarak anormal spermatozoon oranları belirlendi. Ejakülatın geri kalan kısmı Tris-Fruktoz sulandırıcısı kullanılarak 0.25 ml'lik payetler içerisinde donduruldu. Payetler çözödüldükten sonra taze spermada anormal spermatozoon oranını tespit etmek amacı ile yapılan tüm muayeneler aynı yöntemler kullanılarak tekrar edildi. Anormal spermatozoon oranlarının tespiti için kullanılan yöntemler arasında istatistiki fark gözlenmedi ($p>0.05$). Sonuç olarak; taze ve donmuş-çözünmüş spermada anormal spermatozoon oranlarının belirlenebilmesi için Hancock solusyonu yanında farklı boyama yöntemlerinin de başarıyla kullanılabileceği kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: Köpek, anormal spermatozoon, boyama yöntemleri, taze ve çözünmüş sperma

Giriş

Spermatozoonlar üremenin gerçekleşmesinde rol oynayan hareket ve penetrasyon yeteneğine sahip hücrelerdir. Bu fonksiyonlardan birinin aksaması halinde ovumun döllenmesi mümkün olmamaktadır. İnsan ve hayvan spermalarında normalden farklı yapı ve morfolojide spermatozoonlar bulunmakta ve normalden ayrılan bu spermatozoonlar anormal ya da patolojik olarak isim-

lendirilmektedir. (Roberts,1986). Erkek hayvanlarda infertilitenin spermatozoonlardaki anormal yapı ve morfolojik bozukluklarla ilgili olduğu belirtilmiştir (Blom, 1981).

Spermanın morfolojik anomalileri; primer, sekonder ve tersiyer kökenli olabilmektedir. Primer kökenli olanlar spermatogenezis, sekonder kökenli olanlar epididimal taşınma ve tersiyer kökenliler ise ejakülasyon esnasında ya da ejakülasyondan sonra spermanın-işlenmesi sırasında şekillenmektedir. Pri-

Geliş Tarihi : 03.10.1998

1 S.Ü.Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, KONYA.

2 Y.Y.Ü.Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, VAN.

3 Y.Y.Ü.Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, KARS.

mer ve sekonder kökenli anomalilerin oranının yükselmesi fertilitiyi düşürebilmektedir (Hafez, 1987). Ancak ejakülattaki toplam anormal spermatozoon oranlarının %20'den düşük olması fertilitiyi önemli oranda etkilememektedir. Hatta bazı anormal spermatozoon tiplerinin infertilite ile ilişkili olmadığı bildirilmiştir (Hafez, 1987). Sperma muayenesinin amaçlarından birisi de, fertilité üzerine önemli etkileri olduğu bilinen anormal spermatozoon tipleri ve oranlarının belirlenmesidir (Roberts, 1986). Taze ejakülattan hazırlanan boyanmış preparatlar, spermatozoonların yapısal anomalilerinin tespiti amacıyla incelenmektedirler. Bu amaçla Wright's, Giemsa, Eosin-nigrosin boyaları ve hatta Çini mürekkebi de kullanılabilir (Feldman ve Richard, 1987).

Androlojik yönden sağlıklı köpeklerde morfolojik olarak normal spermatozoon oranı %70'tir. Köpeklerde primer kökenli anormal spermatozoon oranı %10, sekonder kökenli anormal spermatozoon oranı ise %20'den az olmalıdır (Feldman ve Richard, 1987).

Tekin (1994), ejakülatta veya spermada bulunan anormal yapıları spermatozoonların saptanmasının amaca ve çalışma koşullarına bağlı olarak değişik tekniklerle yapılabileceğini, bu tekniklerin boyama (Eosin-nigrosin, Methylen blue, Opal blue, Fast green, Çini mürekkebi) ve Sıvı fikzasyon yöntemi olduğunu bildirmektedir. Ayrıca anormal spermatozoon oranlarının tespitinde yine Çini mürekkebi, Eosin-nigrosin, Wright's boyası, Caserett's boyası gibi boyama yöntemleri ile sıvı fikzasyon yönteminin başarıyla kullanılabilceği değişik araştırmacılar tarafından da belirtilmektedir (Howard ve Pace, 1988; Roberts, 1986).

Boğalarda morfolojik muayene için çeşitli boyama tekniklerini (Methylviolet, Rosa Bengal, Vital boyama) denediğini belirten Özkoca (1963), ölücanlı spermatozoon oranının tespiti için hazırlanan preparatların morfolojik muayene açısından kullanıma uygun olmadığını ifade etmektedir.

Anormal spermatozoon oranlarının tespitinde Giemsa ve Wells-Awa boyalarının saha şartlarında çok rahat bir şekilde kullanılabilceğini belirten Wells ve Awa (1970), her iki boya ile yapılan morfolojik muayenelerde pozitif yönlü bir korelasyon ($r=0.56$) bulunduğunu vurgulamaktadırlar.

Dott ve Foster (1972) ise ölü-canlı spermatozoon muayenesi için hazırlanan nigrosin-eosin ve eosin-nigrosin boyama yöntemlerinin anormal spermatozoon oranlarının tespiti amacıyla da kullanılabilceğini bildirmektedirler.

Oettle (1986) ise sperma alımını takiben, sulandırma ve çözünme sonrası akrozom yapısında şekillenen membran değişikliklerinin Spermac boyası çok rahat ve hızlı bir şekilde incelenebileceğini ifade etmektedir.

Köpek spermasında anormal spermatozoon oranının belirlenmesi için en basit boyama yönteminin Çini mürekkebi ile boyama olduğu Renzel (1968) tarafından bildirilmektedir.

Günzel ve ark. (1987), köpeklerden elde ettikleri spermada Karras ve Rose-Bengal boyama yöntemlerini kullanarak anormal spermatozoon oranını belirlediklerini, iki metot arasında bazı önemli farklılıklar tespit ettiklerini ve Rose-Bengal boyama yönteminin daha basit ve kolay olması, akrozom yapısı hakkında ayrıntılı sonuçlar vermesi sebebiyle bu amaçla kullanılabilceğini belirtmektedirler.

Bu çalışmada taze ve donmuş spermada anormal spermatozoon tiplerinin ve oranlarının belirlenmesi amacıyla çeşitli boyama ve sıvı-fikzasyon yöntemlerinin etkinliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada sperma vericisi olarak Kangal ve Kangal melezi, toplam iki adet köpek kullanıldı. Sperma, köpeklerden kızgın bir dişi bulunmaksızın penis masajı yöntemiyle ve beşer gün aralıklarla olmak üzere toplam beş kez alındı. Penis masajı yardımıyla alınan ejakülattın spermadan zengin ikinci fraksiyonu derhal 32 °C'deki su banyosuna nakledildi. Ejakülattların dondurulmaya elverişli olup olmadıklarının tespiti amacıyla spermatolojik muayeneleri gerçekleştirildi. Elverişli ejakülatlardan frotiler hazırlanarak kurutuldu. Kurutulan frotiler Hematoksilin eosin (Hafez, 1987) ve Caserett's (Roberts, 1986) boyaları ile boyandı. Ayrıca bir damla sperma ve üç damla eosin-nigrosin (Evans ve Maxwell, 1987) boyası homojen olarak karıştırılarak frotiler hazırlandı. Yine taze ejakülattan

Hancock solusyonu içeren tüpler içerisine örnekler alındı. Ejakülata geri kalan kısmı Andersen'in (1975) bildirdiği yöntemle Tris-Fruktoz-Sitrik asit-Yumurta sarısı-Gliserol'den oluşan dondurma solusyonu ile 1/3 oranında sulandırılarak 0.25 ml'lik payetler içerisinde donduruldu. Dondurma işlemini takiben payetler sabit olarak 35°C'lik su banyosunda 30 saniye süreyle çözdürüldü. Taze spermada spermatozoonların morfolojik muayenesi için gerçekleştirilen tüm uygulamalar, çözdürülen payetlerden elde edilen sperma ile tekrarlandı. Mor-

folojik muayenelerin tamamı mikroskopta 100 x objektif kullanılarak gerçekleştirildi. Taze ve donmuş-çözünmüş spermada eşit sayıda olmak üzere toplam 24.000 adet spermatozoon incelendi.

İstatistiksel hesaplamalarda ANOVA testi ve korelasyon analizi yöntemleri kullanıldı.

Bulgular

Çalışmada elde edilen bulgular tablolar halinde özetlenmiştir.

Tablo 1. Taze ve donmuş-çözünmüş spermada tespit edilen toplam anormal spermatozoon oranları.

	Hancock (%)	Eosin-Nigrosin (%)	Hematoksilen Eosin (%)	Caserett's (%)
Taze Sperma	18.7±2.48a	17.6±2.63a	17.3±2.46a	17.3±2.53a
Donmuş-çözünmüş Sperma	40.9±2.66b	39.3±2.66b	38.4±2.37b	36.5±2.59b

X±SEM (a, b : P<0.01)

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark önemlidir.

Tablo 2. Taze ve donmuş-çözünmüş spermada belirlenen anomalilerin spermatozoonlardaki lokalizasyonu ve oranları.

Bölge	Hancock		Eosin-Nigrosin		Hematoksilen-eosin		Caseretts	
	Taze	Donmuş	Taze	Donmuş	Taze	Donmuş	Taze	Donmuş
Akrozom	0.8±0.17a	14.1±0.61b	0.6±0.09a	13.4±0.50bc	0.7±0.09a	11.4±0.42cd	0.6±0.05a	9.5±1.16de
Baş	2.3±0.13a	4.9±0.48b	2.3±0.32a	4.1±0.32b	2.6±0.17a	4.3±0.27b	2.3±0.22a	4.3±0.21b
Orta	8.1±1.77a	10.6±1.29b	7.1±1.23a	10.7±1.23b	5.9±0.89a	10.2±1.10b	5.9±0.76a	10.2±0.94b
Kuyruk	7.6±1.15a	11.4±1.16b	7.6±1.69a	11.2±1.10b	8.0±1.69a	12.3±1.10b	8.5±1.69a	12.4±1.02b

X±SEM (a, b : P<0.01)

Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark önemlidir.

Tablo 3. Taze spermada morfolojik muayene amacıyla kullanılan farklı yöntemlerden elde edilen sonuçlara ilişkin korelasyon bulguları.

	Hancock	Eosin-Nigrosin	Hematoksilen-eosin
Eosin-Nigrosin	.975*		
Hematoksilen-eosin	.973*	.991*	
Caseretts	.967*	.997*	.994*

*p<0.01

Tablo 4: Donmuş-çözünmüş spermada kullanılan farklı morfolojik muayene yöntemlerinden elde edilen sonuçlara ilişkin korelasyon bulguları.

	Hancock	Eosin-Nigrosin	Hematoksilen-eosin
Eosin-Nigrosin	.950*		
Hematoksilen-eosin	.912*	.975*	
Caseretts	.884*	.920*	.950*

*p<0.01

Sunulan çalışmada taze ve donmuş çözünmüş spermada Hancock solusyonu ile yapılan morfolojik muayelerde %18.7±2.48 ve %40.9±2.66; Eosin-nigrosin, Hematoksilen-eosin ve Caserett boyaları kullanılarak yapılan muayenelerde anormal spermatozoon oranları sırasıyla taze sperma için, %17.6±2.63, %17.3±2.48, %17.3±2.53 ve donmuş çözünmüş sperma için ise %39.3±2.66, %38.4±2.37 ve %36.5±2.59 olarak tespit edilmiştir.

Çalışmadan elde edilen verilerin istatistiksel analizi sonucunda taze ve donmuş-çözünmüş spermada toplam morfolojik bozukluk oranı açısından boyama yöntemleri arasında herhangi bir farklılık gözlenmedi (p<0.01).

Donmuş-çözünmüş spermada belirlenen anomalilerin spermatozoonlardaki lokalizasyonuna göre istatistiksel analizi sonucunda ise, akrozom bozukluklarının Hancock solusyonu ve Eosin-nigrosin boyası ile daha başarılı bir şekilde tespit edildiği ve aradaki farkın önemli olduğu belirlendi (p<0.01).

Taze ve donmuş-çözünmüş spermada tespit edilen anormal spermatozoon tipleri Resim 1 ve 2'de sunulmuştur.

Tartışma ve Sonuç

Gerek doğal aşım gerekse suni tohumlamada kullanılan erkek hayvanın potansiyel fertilitésinin tespiti için spermatozoon muayenelerinin önemi büyüktür (Salisbury ve ark., 1978).

Morfolojik olarak anormal yapı gösteren spermatozoonların hareket morfolojilerinin farklı olması ve fonksiyonel eksiklikleri nedeniyle dölleme yetenekleri düşüktür (Larsson, 1988). Anormal spermatozoon oranlarının kabul edilebilecek sınırlar içinde olması halinde bile, fertilité oranlarında düşüklere neden olabileceği bildirilmektedir. Bu da anormal spermatozoonların ortamda bulunan mor-

folojik yönden normal spermatozoonlar üzerine olumsuz etkisinden kaynaklanmaktadır (Larsson, 1988).

Sunulan çalışmada taze ve donmuş çözünmüş spermada Hancock solusyonu ile yapılan morfolojik muayelerde %18.7±2.48 ve %40.9±2.66; Eosin-nigrosin, Hematoksilen-eosin ve Caserett boyaları kullanılarak yapılan muayenelerde anormal spermatozoon oranları sırasıyla taze sperma için, %17.6±2.63, %17.3±2.48, %17.3±2.53 ve donmuş çözünmüş sperma için ise %39.3±2.66, %38.4±2.37 ve %36.5±2.59 olarak tespit edilmiştir. Çalışmada taze ve donmuş çözünmüş spermadan elde edilen anormal spermatozoon oranlarına ilişkin tüm değerler literatürlerde belirtilen sınırlar içerisinde bulunmuştur (Barlett, 1962; Wong ve Dhaliwall, 1985). Kullanılan farklı boyama yöntemleri arasında toplam anormal spermatozoon oranlarının belirlenmesi açısından herhangi bir farklılık tespit edilememiştir.

Çalışmada karşılaşılan anormal spermatozoon tipleri ise, kopuk baş, armut baş, küçük baş, çevresi anormal baş, proksimal ve distal sitoplazmik damlacık, çift kuyruk ve orta kısım, abaxial implantasyon, dag defekt, orta kısım kalınlaşması, pseudo sitoplazmik damlacık, orta kısım kıvrımları ve basit kuyruk ucu kıvrımları gibi anormalite çeşitleridir.

Feldman ve Nelson (1987) androlojik yönden sağlıklı bir köpekte morfolojik olarak normal spermatozoon oranının %70, primer kökenli anormal spermatozoon oranının %1 kökenli anormal spermatozoon oranının da %20'den düşük olması gerektiğini belirtmektedirler. Bazı araştırmacılar (Harrop, 1955; Nooder, 1950) ise taze spermada anormal spermatozoon oranının %20 düzeyinde bulunmasının normal olarak kabul edilebileceğini vurgulamaktadırlar. Çalışmada taze spermada tespit edilen anormal spermatozoon oranı yukarıda bildirilen sınırlar içerisinde bulunmuştur.

Tekin ve ark. (1987), Kangal ve Alman Çoban ırkı köpeklerde Sıvı fizkasyon yöntemi ile anormal spermatozoon oranlarını sırasıyla %7.9 ve %6.2 olarak tespit ettiklerini bildirmektedirler. Araştırmada taze spermadan elde edilen %18.7'lik oran, araştırmacıların bildirdikleri orandan oldukça yüksek bulunmuştur. Köpekler arasındaki bireysel farklılıkların oranları değiştirdiği düşünülebilir.

Yurdaydın ve Kotzab (1987), farklı ırk köpekler üzerinde gerçekleştirdikleri bir araştırmada taze ve donmuş-çözünmüş spermadaki anormal spermatozoon oranlarını sırasıyla %14.7 ve %27.9 olarak belirtmektedirler. Çalışmada toplam olarak taze spermada %18.7 ve donmuş çözünmüş spermada ise %40.9 oranında tespit edilen anormal spermatozoon oranları araştırmacıların bildirdikleri değerlerden yüksek bulunmuştur. Çalışmalarda farklı köpek ırklarının kullanılmasının oranları etkilediği düşünülmektedir.

Hancock solusyonu ile gerçekleştirilen muayenelerde prepatın hazırlanmasının kolay olmasına karşın spermatozoonların çökmesi için yaklaşık 10-15 dakikalık bir bekleme zamanının geçmesi bu yöntemin dezavantajı olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca akrozom muayenesi amacıyla başın boya almaması nedeniyle detaylı muayenelerde yorucu olmakla birlikte güvenilir sonuçlar vermesinden dolayı morfolojik muayene için başarıyla kullanılabilmesi kanısına varılmıştır.

Barlett (1962) üç adet melez ırk köpek üzerinde yürüttüğü araştırmada Eosin-nigrosin boyası kullanarak ortalama anormal spermatozoon oranını %15±1.6, başa ait bozuklukları %11±1.4, boyun kısmına ait bozuklukları %5±1.5, orta kısma ait bozuklukları %21±5 ve kuyruğa ait bozuklukları ise %7±0.8 oranlarında tespit ettiğini bildirmektedir. Çalışmada ortalama olarak elde edilen %17.6'lık oran araştırmacının bildirdiği orana yakın olarak bulunmuştur.

Wong ve Daliwal (1985) ise melez ve safkan ırk köpeklerde Eosin-nigrosin boyası kullanarak tespit ettikleri anormal spermatozoon oranlarını sırasıyla %9±4.3 ve %18±17.12 olarak bildirmektedirler. Çalışmada aynı boya ile safkan ırk köpeklerden elde edilen %17.6'lık oran araştırmacıların bildirdikleri orana yakın bulunmuştur.

Mickelsen ve ark. (1993), Eosin-nigrosin boyası kullanarak anormal spermatozoon oranı ve tiplerini belirledikleri bir araştırmada toplam anormal spermatozoon oranlarının %28-48 arasında değiştiğini, en fazla karşılaştıkları anormal spermatozoon tiplerinin ise proksimal sitoplazmik damlacık, iri baş, orta kısımda şişme ve kıvrılma, kopuk baş, kıvrık kuyruk ve distal protoplazmik damlacık olduğunu vurgulamaktadırlar. Çalışmada elde edilen %17.6'lık oran araştırmacıların bildirdikleri orandan düşük bulunmuştur. Ayrıca sunulan çalışmada da araştırmacıların en fazla karşılaştıkları anormal spermatozoon tipleri sıklıkla gözlenmiştir.

Calderon ve ark. (1987), Beagle ırkı köpekler üzerinde yürüttükleri araştırmada Nigrosin-eosin boyası ile taze ve donmuş-çözünmüş spermada anormal spermatozoon oranlarını sırasıyla %21.4±18.2 ve %34.4±17.4 bildirmektedirler. Sunulan çalışmada Eosin-nigrosin boyası ile taze spermada elde edilen değer düşük, donmuş çözünmüş spermadan elde edilen %39.3'lük oran ise oldukça yakın bulunmuştur.

Ferguson ve ark. (1989), Nigrosin-eosin ve Spermac boyalarını kullanarak anormal spermatozoon oranlarını tespit ettiklerini ve bu oranların %12-31 arasında değiştiğini, en fazla karşılaşılan anormal spermatozoon tiplerinin ise kıvrık kuyruk, kopuk baş ve kuyruk, kırık boyun, proksimal ve distal damlacık, büyük baş ve orta kısım anomalileri olduğunu ifade etmektedirler. Çalışmada sunulan %17.6'lık değer araştırmacıların bildirdiği oranlar arasında tespit edilmiş olup, karşılaşılan anormal spermatozoon tipleri yönünden de araştırmacıların verileriyle uyum arz etmektedir.

Eosin-nigrosin boyası kullanılarak yapılan muayenelerde, prepatın hazırlanması kolay olmasına karşın froinin kurumması için 10-15 dakikalık bir süre gerekmektedir. Froti hazırlanırken canlı spermatozoonların başlarının boya almamaları ve nigrosin boyasının koyu bir zemin oluşturması muayeneleri kolaylaştırmaktadır. Ölü spermatozoonların başlarının kırmızıya boyanmaları ise özellikle akrozom yapısının değerlendirilmesini güçleştirmektedir. Ama yinede ölü-canlı spermatozoon oranını tespit etmek için hazırlanan preparatların çok rahat ve güvenilir bir şekilde morfolojik muayene amaçlı kullanılabilmesi kanısına varılmıştır.

Taze ve donmuş-çözünmüş spermada Hematoksilen-eosin boyası kullanılarak hazırlanan frotilerden yapılan muayenelerde sırasıyla %17.3±2.48 ve %38.4±2.37 oranında morfolojik bozukluk tespit edilmiştir.

Renton ve ark. (1986), farklı ırktan köpekler üzerinde yürüttükleri araştırmada tespit ettikleri anormal spermatozoon oranlarını sırasıyla %15, 30 ve 32 olarak bildirmektedirler. Schubert ve Seager (1991) ise, Dalmaçya ırkı köpeklerde toplam anormal spermatozoon oranlarının %7-47 arasında değiştiğini, ortalama olarak %22 oranında morfolojik anormalite tespit ettiklerini ifade etmektedirler. Çalışmada bildirilen %17.3'lük anormal spermatozoon oranı araştırmacıların bildirdikleri değerlerin kimilerinden düşük, kimilerine benzer ve bazılarında ise yüksek bulunmuştur. Irk farklılıklarının oranları etkilediği düşünülmektedir.

Hematoksilen-eosin boyası kullanılarak yapılan muayenelerde hazırlanan frothinin kuruması, hücrelerin tespit edilebilmesi ve hücrelerin boyanması için geçen toplam sürenin yaklaşık 45-60 dakika olması bu yöntemin dezavantajı olarak düşünülmektedir. Ancak mikroskopik muayenede froti zemininin renksiz olması ve spermatozoonların boya almalarından dolayı incelenen hücrelerin bireysel muayeneleri oldukça rahat ve kolay olmaktadır. Baş bölgesine ait muayeneler net bir şekilde yapılabilmektedir. Bu sebeplerden dolayı zahmetli olmasına rağmen anormal spermatozoon oranlarının tespiti amacıyla kullanılabilceği düşünülmektedir.

Taze ve donmuş-çözünmüş spermada Caserett boyası kullanılarak hazırlanan frotilerden yapılan muayenelerde sırasıyla %17.3±2.53 ve %36.5±2.59 oranında anormal spermatozoon tespit edilmiştir.

Takeishi ve ark. (1975), 235 ve 375 günlük Beagle ırkı köpeklerde morfolojik yönden anormal spermatozoon oranlarını sırasıyla %25.8 ve %14.6 olarak tespit ettiklerini bildirmektedirler. Çalışmada sunulan %17.3'lük anormal spermatozoon oranı araştırmacıların 235 günlük köpeklerden elde ettiği orandan düşük, 375 günlük köpeklerden elde ettiği orandan yüksek bulunmuştur. Kullanılan hayvan materyalinin gerek ırk gerekse yaşlarının farklı olmasının oranlar üzerine etkili olduğu düşünülmektedir.

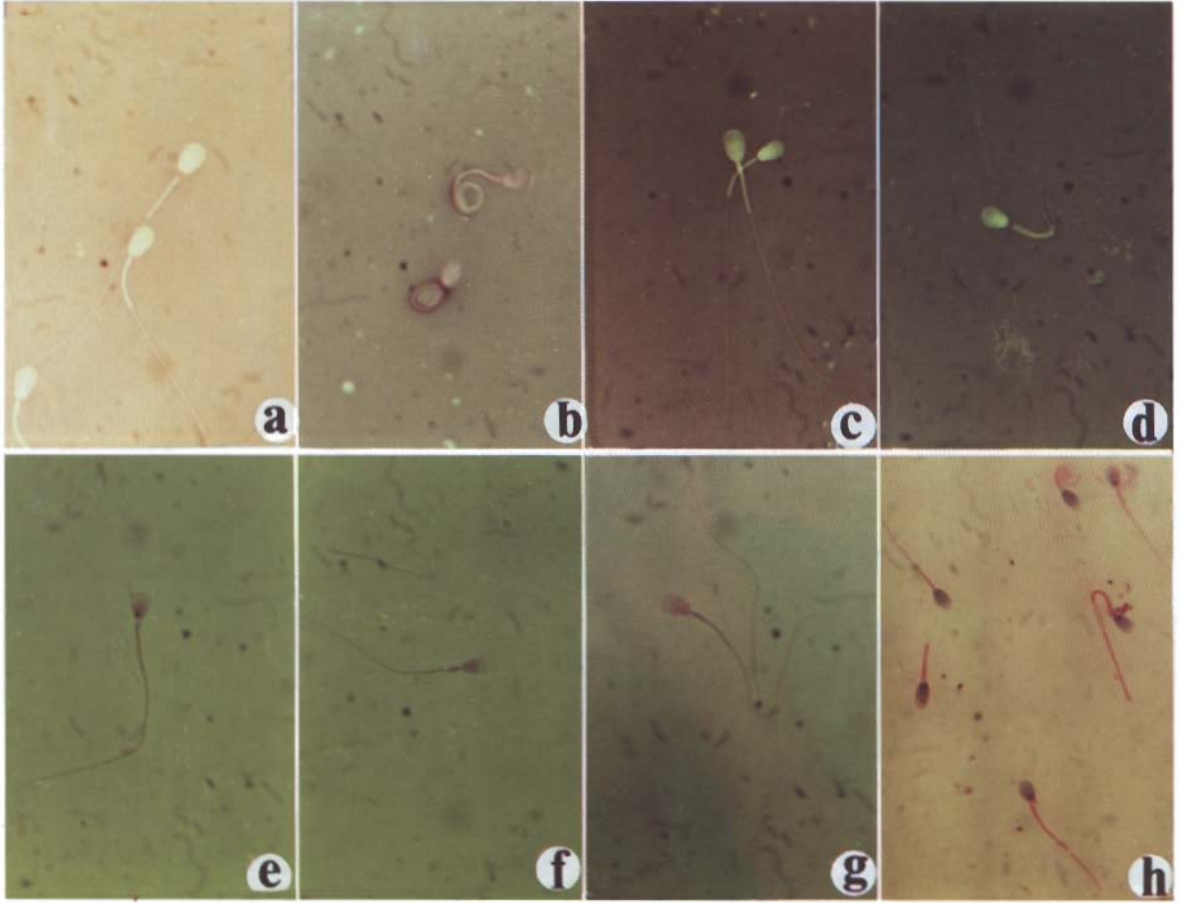
Linda Forsberg ve Forsberg (1989), köpekler üzerinde yürüttükleri bir araştırmada taze ve donmuş-çözünmüş sperma örneklerinde %30'dan düşük seviyelerde anormal spermatozoon oranı tespit ettiklerini bildirmektedirler. Sunulan çalışmada taze spermadan elde edilen %17.3'lük anormal spermatozoon oranı araştırmacıların elde ettikleri anormal spermatozoon oranları ile paralellik göstermektedir.

Caserett boyası kullanılarak yapılan muayenelerde ise, yine hazırlanan frothinin kuruması, hücrelerin tespit edilebilmesi ve hücrelerin boyanması için geçen toplam sürenin yaklaşık 45-60 dakika olması, ayrıca boyama işleminin 40-60°C'de tavsiye edilmesi de bir dezavantaj olarak görülmektedir. Ancak froti zemininin renksiz olması, spermatozoon çekirdeğinin pembe, diğer bölgelerin ise farklı renk tonlarında boyanmaları bu yöntemin başlıca avantajı olarak görülmektedir. Bu sebeplerden dolayı morfolojik muayenelerde başarılı bir şekilde kullanılabilceği düşünülmektedir.

Köpek spermasının morfolojik muayenesi amacıyla gerek Hematoksilen eosin gerekse Caserett boyasının kullanılmasına ilişkin literatür bilgiye rastlanılmamıştır. Bu yüzden sunulan araştırmada diğer boyama yöntemleri ile yeterince karşılaştırma olanağı bulunamamıştır.

Ferguson ve ark. (1989) ve Oettle (1986) çözünme sonrası hücrelerde özellikle akrozom bütünlüğünün, Calderon ve ark. (1987) ise akrozom bütünlüğünün yanısıra spermatozoonun diğer bölgelerinde de morfolojik bozuklukların arttığını bildirmektedirler. Sunulan çalışmada da dondurma-çözünme işlemini takiben spermatozoonların incelenen bölgelerinin tamamında morfolojik bozuklukların arttığı gözlenmiştir ($p<0.01$).

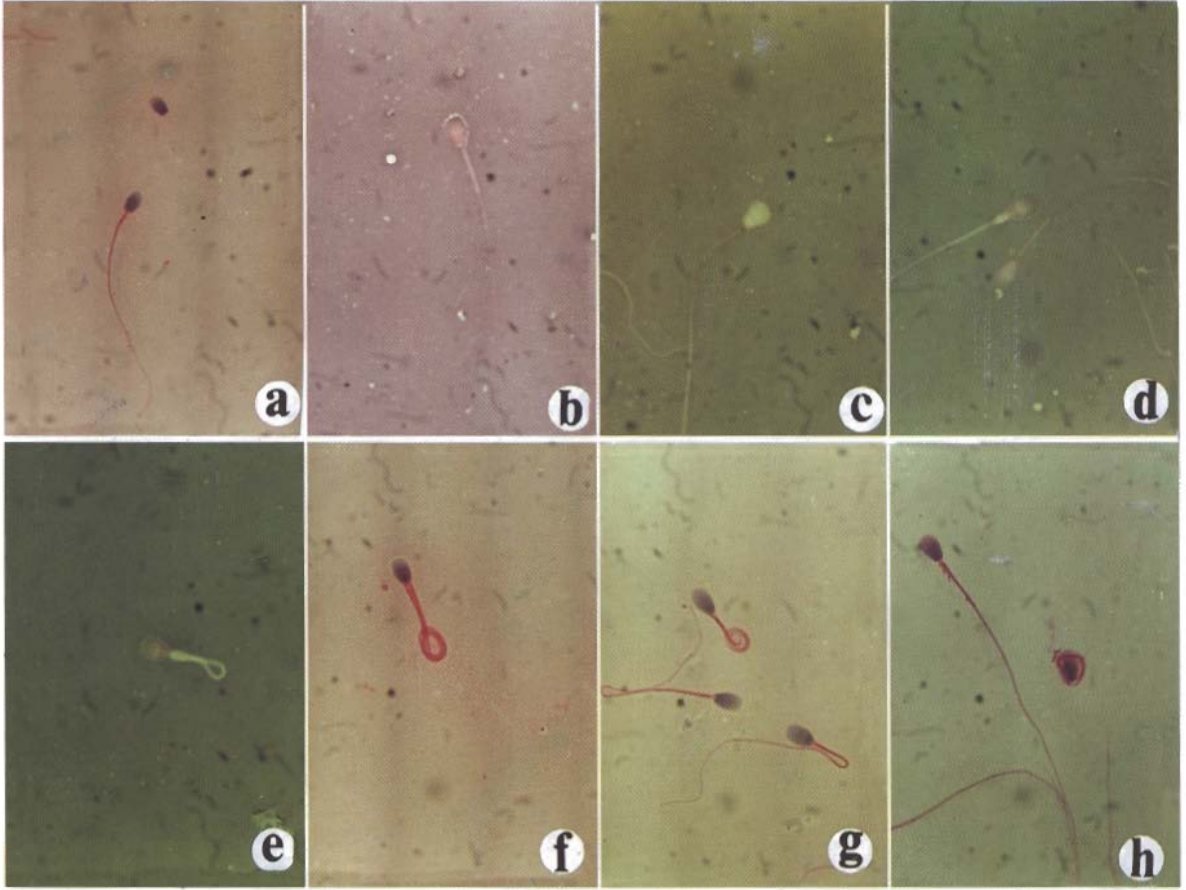
Sonuç olarak; köpeklerde donmuş sperma üzerinde gerçekleştirilen morfolojik muayenelerde akrozom bozukluklarının Hancock solusyonu ve Eosin-nigrosin boyası ile daha başarılı bir şekilde tespit edileceği, ancak gerek taze gerekse donmuş-çözünmüş spermada yapılacak olan morfolojik muayenelerde toplam anormal spermatozoon oranının belirlenmesinde kullanılan yöntemler arasında herhangi bir istatistikî fark elde edilememiştir. Bu nedenle Hancock solusyonu ile muayeneye alternatif olarak çeşitli boyama yöntemlerinin de kullanılabilceği kanısına varılmıştır.



Şekil 1. Taze spermada yapılan morfolojik muayenelerden elde edilen bozukluklar.

a: spermatozoonun orta kısmında kalınlaşma (EN), b: spermatozoonda kuyruk ucu kıvrımları (EN), c: büyük başlı spermatozoon (EN), d: çift kuyruklu spermatozoon (EN), e: çift orta kısımlı spermatozoon (C), f: proximal sitoplazmik damlacık (C), g: küçük başlı spermatozoon (C), h: abaxial implantasyon (HE)

EN: Eosin-nigrosin boyası, C: Caserett boyası, HE: Hematoksilen-eosin boyası



Şekil 2. Donmuş-çözünmüş spermada yapılan morfolojik muayenelerden elde edilen bozukluklar.

a: Normal spermatozoon ve kopuk baş (EN), b: Akrozom bozukluğu (EN), c: Armut başlı spermatozoon (EN), d: proximal sitoplazmik damlacık ve armut başlı spermatozoon (EN), e: spermatozoon orta kısmının kıvrılması (EN), f: çift orta kısım ve çift kuyruklu spermatozoon (HE), g: orta kısım ve kuyruk ucu kıvrımları (HE), h: spermatozoon orta kısmı ve kuyruğunun baş çevresinde kıvrılması

EN: Eosin-nigrosin boyası, C: Caserett boyası, HE: Hematoksilen-eosin boyası

Kaynaklar

- Andersen, K. (1975). Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. *Zucht-hygiene*, 10, 1-4.
- Barlett, D.J. (1962). Studies on dog semen. I. Morphological characteristics. *J. Reprod. Fert.*, 3, 173-189.
- Blom, E. (1981). The ultrasutstructure of some defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Atti del VII. Simposio Intemaziolo dir Zo-tecna*, Milano, 125-139.
- Calderon, A., Ferguson, J.M., Renton, J.P., Harker, S., Harvey, M.J.A., Bagyenji, B. and Douglas, I.A. (1987). Some observations on the dilution, cooling and freezing of canine semen. *J. Small Anim. Pract.*, 28, 753-761.
- Dott, H.M. and Foster, G.C. (1972). A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential live/dead stain. *J. Reprod. Fert.*, 29, 443-445.
- Evans, G. and Maxwell, W.M.C. (1987). *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Butterworths, Sydney.
- Feldman, E. and Richard, W.W. (1987). *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. Edited by D. Peterson, 481-525, W.B. Saunders Comp., Philadelphia.
- Ferguson, J.M., Renton, J.P., Forstad, W. and Douglas, T.A. (1989). Insemination of beagle bitches with frozen semen. *J. Reprod. Fert.*, 39, 293-298.
- Günzel, A.R., Syvanı, K. and Krause, D. (1987). Morphological examination of dog semen. *Anim. Breed. Abstr.*, 55, 10, 6497.
- Hafez, E.S.E. (1987). Semen Evaluation. In 'Reproduction in Farm Animals' Edited by E.S.E. Hafez, Fifth Edition, 455-481, Lea Febiger, Philadelphia.
- Harrop, A.E. (1955). Some observations on canine semen. *Vet. Rec.*, 67, 26, 494.
- Howard, T.H. and Pace, M.M. (1988). Seminal Evaluation and Artificial Insemination. In 'Fertility and Infertility in Veterinary Practice' Fourth Edition, 39-47; Bailliere, Tindall.
- Larsson, B. (1988). Distribution of spermatozoa in the genital tract of heifers inseminated with large numbers of abnormal spermatozoa. *J. Vet. Med. A.*, 35, 10, 721-728.
- Linda-Forsberg, C. and Forsberg, M. (1989). Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J. Reprod. Fert.*, 39, 299-310.
- Mickelsen, W.D., Memon, M.A., Anderson, P.B. and Freeman, D.A. (1993). The relationship of semen quality to pregnancy rate and litter size following artificial insemination in the bitch. *Theriogenology*, 39, 553-560.
- Nooder, H.J. (1950). Enkele Mededelingen Omtient DE KI by Teven En Het Sperma Van Reuen, *Tijdschr. V. Diergeneeski*, 75, 3, 81.
- Oettle, E.E. (1986). Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 12, 145-150.
- Özkoca, A. (1963). Boğa spermatozoitlerinin morfoloji yönünden incelenmesinde kullanılan çeşitli boyalar ile boyama metotlarının karşılaştırması ve elde edilen sonuçlar. *Lalahan Hay. Arş. Der.*, 3, 1, 28-51.
- Renton, J.P., Harvey, M.J.A. and Harker, S. (1986). A spermatozoal abnormality in dogs related to infertility. *The Vet. Rec.*, 12, 429-430.
- Renzel, L. (1968). Artificial insemination in the dog. *Issue*, 1, 17-30.
- Roberts, S.J. (1986). *Veterinary Obstetrics and Genital Diseases*. Third Edition, Ithaca, New York.
- Salisbury, G. W., Van Demark, N.L. and Rodge, J.R. (1978). Morphology and motility of spermatozoa. In 'Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle' Edited by G.W. Salisbury and W.H. Freeman, 286-328, San Francisco.
- Schubert, C.L. and Seager, S.W.J. (1991). Semen collection and evaluation for the assessment of fertility parameters in the male dalmatian. *Canine Practice*, 16, 5, 17-21.
- Takeishi, M., Toyoshima, T., Ryu, T., Takematsu, S., Miki, H. and Tsunekane, T. (1975). Studies on the reproduction of the dog. VI. Sexual maturity of male beagles. *Bull. Coll. Agric. Vet. Med., Nihon Univ.*, 32, 213-223.
- Tekin, N. (1994). Spermanın Muayenesi ve Değerlendirilmesi. In 'Reproduksiyon Suni Tohumlama Doğum ve İnfertilite' Editör: E. Alaçam, 69-81, Birinci Baskı, Dizgievi, Ankara.
- Tekin, N., İzgür, H. ve Özyurt, M. (1987). Köpeklerde penis masajı yöntemiyle sperma alma ve başlıca spermatozojik özellikler üzerinde araştırmalar. *S. Ü. Vet. Fak. Derg.*, 3, 1, 89-95.
- Wells, M.E. and Awa, O.A. (1970). New technique for assessing acrosomal characteristics of spermatozoa. *J. Dairy Sci.*, 53, 2, 227-232.
- Wong, W.T. and Dhaliwal, G.K. (1985). Observations on semen quality of dogs in the tropics. *Vet. Rec.*, 23, 313-314.
- Yurdaydın, N. ve Kotzab, E. (1987). Köpek spermasının dondurulması üzerinde araştırmalar. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 34, 3, 534-540.