

## Damızlık İki Boğanın Ejakülatlarında Bulunan Anormal Yapıların Ultrastrüktürü

Hasan Hakan BOZKURT

Istanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı İstanbul-TÜRKİYE

Geliş Tarihi : 24 / 3 / 1997

**Özet:** İngiltere'de boğa sperma payeti üreten bir merkezde, iki boğanın ejakülatları ışık mikroskopunda incelenirken yaygın olarak yabancı yapılar izlendi. Bu yapılara faz-kontrast ve karanlık saha mikroskopisi ile tanı konulmadığı için örnekler, elektron mikroskobu ile incelendi. Bu amaçla rutin elektron mikroskopik tekniklerle hazırlanan plastik bloklardan alınan ince kesitler kullanıldı. Birinci örnekteki yapıların baş ve kuyruk anomalisinin birlikte izlendiği anormal spermatozoonlar olduğu, ikinci örnektekilerin ise spermatozoon anomalisi olmayıp, ejakülasyon içine infiltrate olan lenfosit ve makrofajlar olduğu anlaşıldı.

**Anahtar Sözcükler:** Spermatozoon, anomali, elektron mikroskobu

### The Ultra Structure of Abnormal Objects in the Semen of Two Bulls

**Abstract:** In the semen of the two bulls, abnormal structures, which were not identified with phase-contrast and dark-field microscopy, were observed. These samples were fixed, embedded in the plastic blocks and sectioned for examining with T.E.M. It was understood that the objects in the first sample were abnormal spermatozoa which have both head and tail anomalies. The objects in the second sample were not abnormal spermatozoa. They were leukocytes which infiltrated into the semen.

**Key Words:** Spermatozoon, anomali, electron microscopy

### Giriş

Spermatozoon anomalileri, erkeklerde infertiliteye yol açan önemli nedenlerden biridir (1,2,3). Spermatozoonların baş, akrozom, orta-kısım ve kuyruğunda izlenen anomalilerin bir çoğu ışık mikroskobuyla tanınabilir (1,2,3,4). Anomalilerin ışık mikroskobu ile ayırımı yapılamadığında veya yapısal özelliklerinin daha ayrıntılı anlaşılabilmesi için elektron mikroskobu ile inceleme yapılması gerekir (1,3,5). Bu çalışmada da sahaya ticari olarak damızlık sperma payetleri üreten bir merkezde, iki ayrı boğanın örneklerinde faz-kontrast ve karanlık-saha mikroskopunda birbirleriyle benzer özellik gösteren ve tanımı yapılamayan anormal yapıların özellikleri ultrastrüktürel olarak açıklanmıştır.

### Materyal ve Metot

Bu çalışmanın materyalini İngiltere'de Somerset Cattle Breeding Centre'da damızlık olarak yetiştirilmesi dü-

şünülen iki boğanın ejakülasyonları oluşturdu. Ejakülatlar ayrı ayrı yapay vajinaya toplandıktan sonra 1+3 oranında sulandırıldı. Sulandırma solusyonu olarak 100ml yağsız UTH süt, %10 yumurta sarısı, %1.25 fruktoz, %3 gliserol, 500 ünite streptomisin sülfat, 600 ünite Linco-spektin karışımı kullanıldı. Örnekler kullanılmadan önce santrüfuj ile izotonik sitrat tamponuyla (0.097M sodyum sitrat, 5mM MgSO<sub>4</sub>, 20mM fruktoz, 1mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4) yıkandı (6).

Işık mikroskobu için, lam üzerine kenarlarından vaks ile desteklenerek yerleştirilmiş lamel altına sitrat tamponu içindeki örnekler konuldu, faz-kontrast ve karanlık-saha mikroskoplarında incelendi.

Elektron mikroskobu için örnekler santrüfujle paletlendikten sonra 0.1M Na cacodylate tamponunda hazırlanmış %1lik glutaraldehytte ön tesbite alındı. 1 saat tesbitte tutulduktan sonra, aynı tamponda çözün-

müş %0.1 osmium tetraoksit içerisinde 1 saat süreyle ikinci kez tesbit edildi. Etanolde dehidrasyon uygulanan örnekler daha sonra 50:50 Epon 812 ve propylene oxide karışımı içinde 24 saat bekletildi ve Epon 812 de bloklandı (7). Bloklardan alınan ince kesitler kurşun asetat ve uranyl asetat ile kontrastlaştırılarak Philips E.M. 300 elektron mikroskobunda incelendi ve fotoğrafları alındı. Bu uygulamalar Bristol Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Bölümü Laboratuvar olanakları ile gerçekleştirildi.

## Bulgular

Her iki boğadan alınan sperma örneğinde, faz-kontrast ve karanlık-saha mikroskobide normal görünümdeki spermatozoonların yanında, yaygın olarak, yuvarlak veya oval şekilde, çeşitli büyüklükte, bir kısmı spermatozoon başından daha büyük yapılar görüldü. Bu yapılar spermatozoon anomalisinden çok yabancı bir yapı görünümündeydiler.

Birinci örneğin ince kesitleri elektron mikroskobunda incelendiğinde; bu yapıların yabancı yapılar olmayıp, spermatozoon anomalisi olduğu ortaya çıktı. Spermatozoonların nükleusunun normalden daha geniş olduğu izlendi. Nükleusun girinti ve çıkıntılar taşıyan düzensiz kenarlı olduğu ve içerisinde iri vakuoller bulunduğu görüldü (Şekil 1). Bu spermatozoonların flagellalarının nükleusun etrafını yumak gibi sardığı izlendi (Şekil 2). Bu görünüm ışık mikroskobunda görülen yapının çapının neden normal sperm başından çok daha büyük ol-

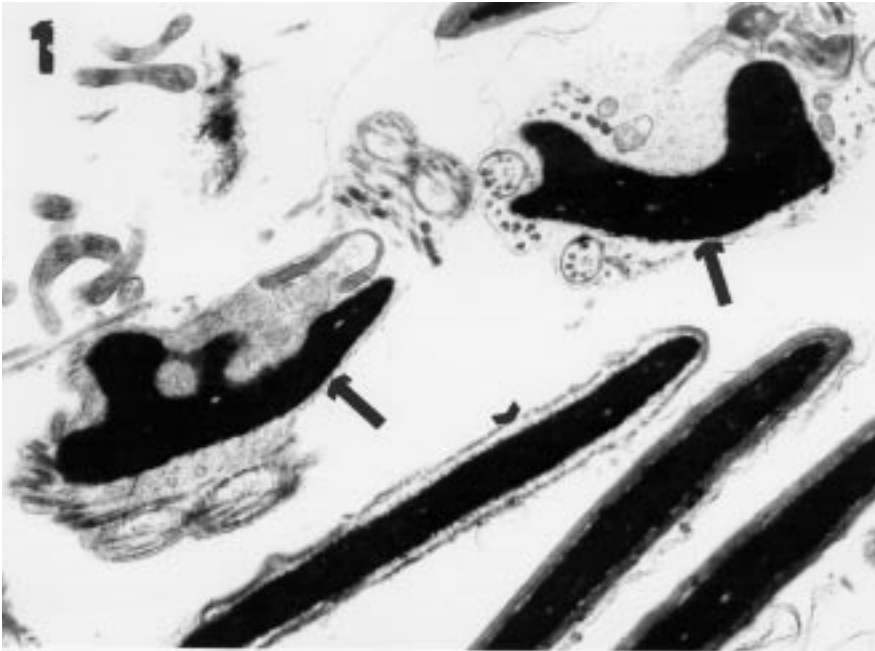
duğunu açıklığa kavuşturdu. Nükleus etrafındaki flagella kesitlerinin aynı spermatozoonla ait olduğu, tek bir hücre zarıyla çevrili olmalarından anlaşıldı (Şekil. 2 ve 3).

İkinci örnek E.M.'de incelendiğinde; ışık mikroskobunda görülen yuvarlak yapıların bir spermatozoon anomalisi olmayıp, ejakülatta yer alan lenfosit ve makrofajlar olduğu anlaşıldı. Lenfositlerin ultrastrüktürel özellikleri birbirine benzer bulundu. Makrofajların yoğun vakuolizasyon gösterdiği ve spermatozoonları fagosite ettiği izlendi (Şekil. 3).

## Tartışma

Sun'i tohumlama uygulamalarında kullanılan rutin sperma kontrolleri ışık mikroskobuyla yapılır. Bu kontrollerde spermatozoon morfolojisi incelenen kriterlerden biridir. Çünkü morfolojik özellikler spermanın fertilizasyon yeteneğini doğrudan etkilemektedir (1,2,3,4). Bazı örneklerde morfolojik bozuklukların tam olarak anlaşılabilmesi için, elektron mikroskobik incelemeler gereklidir (3,5). Bu çalışmada, rutin incelemeler esnasında, ışık mikroskobunda birbirine benzer özellikler gösteren anormal yapılar taşıyan iki sperma örneğinin ultrastrüktürel incelenmesi tanı için gerekli olmuştur.

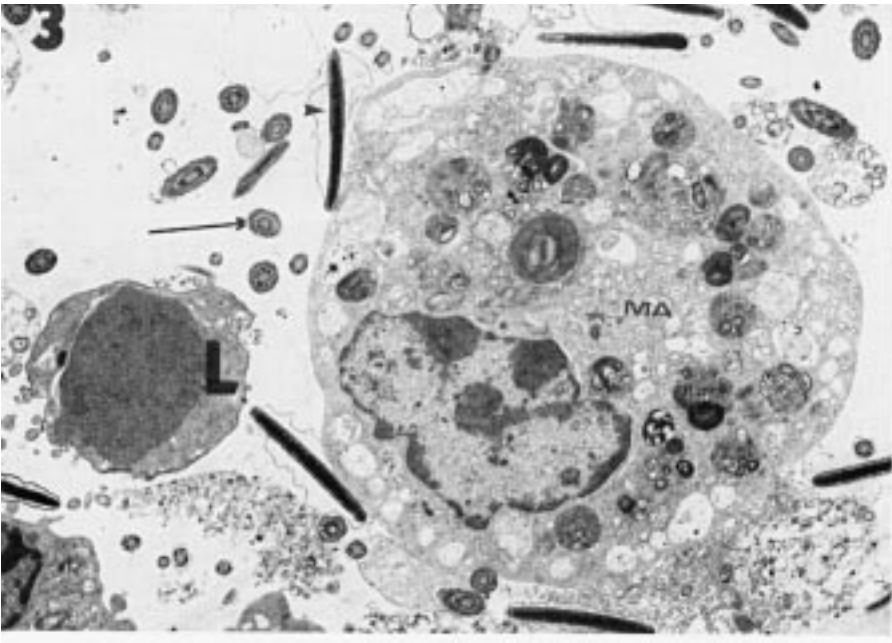
Işık mikroskobuyla yapılan incelemelerde spermatozoon anomalileri baş, akrozom, orta-kısım ve kuyruk anomalileri olarak sınıflandırılır (4,8). Bazı anormal spermatozoa örnekleri ise bu anomalilerin birden fazlasını taşıy ve miks anomali olarak adlandırılırlar. Miks



Şekil 1. Sahada iki anormal spermatozoon nükleusunun (Oklar) ve normal morfoloji gösteren spermatozoon nükleuslarının kesitleri (Ok başı) görülmektedir. X 31170.



Şekil 2. Anormal nükleus burada da görülmekte. Nükleus çevresine sarılmış kuyruk kısmının dört enine kesiti proksimalden distale doğru 1, 2, 3, 4 olarak işaretlenmiştir. Bu dört kesitin aynı spermatozoona ait olduğu tek bir hücre zarı (Ok) tarafından kuşatılmılarından anlaşılıyor. Normal bir spermatozoon flagellası etrafındaki hücre zarı ok başı ile gösterilmiştir. X41,550.



Şekil 3. Lökositlerin (L), makrofajların (MA) spermatozoon nükleuslarının (ok başı) ve spermatozoon flagellalarının (ok) kesitleri görülmektedir. X15,580.

anomalilerin bir kısmı ise, anomalilerin nasıl ve nerede olduğu anlaşılamadığından sınıflandırılmayan anomaliler olarak bilinirler (4). Bu çalışmadaki birinci örnek ışık mikroskopunda ayırt edilemediği halde EM'de baş ve kuyruk anomalisini birlikte içeren miks anomali olarak belirlendi. Bu sperma örneğinde izlenen anormal spermatozoonların diğer bir özelliği flagellanın nükleusun çevresini yumak tarzında sarmasıdır. Işık mikroskopunda bu spermatozoonların görünümü immatür sperma-

tozoonlarla benzerlik gösterdiğinden (4) immatür spermatozoonlarla karıştırılabiliyorlar. Bu durum ultrastrüktürel incelemenin kesin tanı için gerekliliğini ortaya koymuştur.

Ejakülat içinde çok az miktarda lökosit bulunması normal kabul edilmektedir (4). Lökositlerinin sayıca artışı aglutinasyon, motilitenin engellenmesi, fagositoz, antijen-antikor reaksiyonu ve enzim reaksiyonu gibi sakıncalar doğurmaktadır (3). İncelediğimiz sperma örne-

ğinde, ışık mikroskopunda yaygın izlenen yabancı yapıların EM incelemelerinde lenfosit ve makrofajlar olduğu anlaşılmıştır. Ejakülat içinde lenfosit ve makrofajların yoğunluğuna karşılık herhangi bir yabancı cisim ve mikroorganizmaya rastlanmamıştır. Bu durum ejakülat içindeki lenfosit ve makrofajların herhangi bir enfeksiyona değil otoimmuniteye bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Spermatozoon vücut için antijenik özelliğe

sahip olduğundan kan-testis bariyerinin fonksiyonunun aksamasının otoimmuniteye yol açtığı bildirilmiştir (9). EM incelemeleri bu tür hayvanların damızlık olarak kullanılmayacağı sonucunu doğurmuştur. Bu çalışma; elektron mikroskopunun spermatozoon anomalilerinin tanısında güvenilir bir inceleme yöntemi olduğunu göstermektedir.

### Kaynaklar

1. Blom, E. (1973): The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. Nord. Vet. Med. 25:283.
2. Bisop, M.W.H. (1972): Genetically determined abnormalities of the reproductive system. Journal of Reprod. Fertil. Suppl. 15. 51.
3. Hafez E.S.E.(1987): Reproduction in farm animals. Ed: E.S.E Hafez, Lea and Febiger. Cahp:22 458-466.
4. Orhon, E. (1996): Sperm morfoloji atlası. Ed. Esat Orhon, Türkiye Infertilite Vakfı Yayınları No:4.
5. Aytekin, D.M., Turan, O., Gülgün, C., Özkara H. (1995): Methods on ultrastructural and biochemical analysis of sperm and their bearing trapy. Turkish J. Medical Sciens. Supp. p:62.
6. Bozkurt, H.H. and Woolley, D.M. (1993): Morphology of nexin links in relation to the inderdoublet sliding in sperm flagellum. Cell Motil. Cytoske. 24:109-118.
7. Woolley, D.M. and Brammall, A. (1987): Direction of sliding and relative sliding velocities within trypsinized sperm axonemes of gallus domesticus. J. Cell Sci. 88: 361-367.
8. İleri, İ.K., Ak, K., Pabuççuoğlu, S., Birler, S (1996): Evcil hayvanlarda reproduksiyon ve sun'i tohumlama. İ.Ü. Vet. Fak. Yay. Ders Notu No:59. Bölüm:B5.
9. Garner D.L. and . Hafez E.S.E.(1987): Reproduction in farm animals. Ed: E.S.E Hafez, Lea and Febiger. Cahp:8 206-207.