



DERLEME

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2014; 28 (3): 159 - 161
<http://www.fusabil.org>

Flov Sitometre ile Boğa Spermlerinde Cinsiyetin Belirlenmesi*

Eşref DEMİRCİ

Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Dölerme ve Suni
Tohumlama Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

Cinsiyeti belirlenmiş sperma, X ve Y kromozomu taşıyan sperm popülasyonlarına göre yüksek derecede saflaştırılmış spermadır. Bu derlemede, boğa spermlerinde uygulanmakta olan cinsiyetin belirlenmesi çalışmalarında elde edilen son gelişmelerin güncelleştirilmesi amaçlanmıştır.

Flov sitometre kullanarak memeli hayvan spermlerinde cinsiyetin belirlenmesi veya hücrelerin ayrılması boğalarda yeterince başarılıdır. Geçerli tekniklerden birisi yüksek derecedeki bir saflıkta sperm cinsiyetini ayırmak için kullanılan flov sitometre cihazı, erkek ve dişi spermlerin DNA muhteviyatı arasındaki %3-4'lük bir farkı ortaya çıkarmak ve onları %90'dan daha fazla saflıkla ayırmak için kullanılır.

Sonuç olarak saniyede toplam 20.000 sperm cihazdan geçer ve her bir cinsiyetten saniyede takriben 4.000 canlı sperm eşzamanlı olarak ayrılabilir. Bugün geçerli sistem %85-95 doğruluk oranı ile yaklaşık olarak her bir cinsiyet için saatte $10-13 \times 10^6$ canlı sperm üretebilir. Cinsiyeti belirlenmiş sperma kullanılarak, yaklaşık 7.000 güncel buzağılama sonuçlarına göre elde edilen dişi buzağuların cinsiyet oranı %89 olarak gerçekleşmiştir.

Anahtar Kelimeler: Flov sitometre, boğa spermleri, cinsiyet tayini.

Flow Cytometric Sexing of Bull Sperm

Sexed semen is highly purified sperm which are sex sorted into X bearing chromosome and Y bearing chromosome population. The objective of this review is to update the current status of sperm sexing in cattle.

Flow cytometric sexing of mammalian sperm or cell sorting have been sufficiently accomplished in cattle. One of the current techniques to sex sort sperm at a high level of purity uses a device called a flow-cytometer to detect a 3 to 4% difference in DNA content between male and female sperm and sort them with upwards of 90% purity.

Thus, at an event rate of 20,000 total sperm/sec, nearly 4,000 live sperm/sec of each sex can be sorted simultaneously. The current system can produce approximately 10 to 13×10^6 live sperm/h of each sex with 85-95% accuracy. According to nearly 7,000 calvings after using sexed semen, 89% the calves were females.

Key Words: Flow cytometer, bull sperm, sex determination.

Giriş

Yavrunun cinsiyeti fekondasyonu oluşturan gametlerin taşıdığı cinsiyet kromozomlarının birleşmesiyle şekillenmektedir. Memelilerde, dişi cinsiyet kromozomları bakımından tek tip kromozom taşıyan erkeklerde gametlerin %50 si X- dişilik cinsiyet kromozomu diğer %50 si de Y- erkeklik kromozomu taşımaktadır. Öyleyse, tek tip cinsiyet kromozomu taşıyan ovum X- spermle döllenirse yavru dişi, Y- spermle döllenirse yavru erkek olacaktır. Bu da demektir ki memelilerde cinsiyetin oluşumunu belirleyen erkektir. Bize kalan spermleri sağlıklı bir şekilde X- spermler ve Y- spermler olarak iki kısma ayırıp istediğimiz cinsiyetteki spermleri kullanarak doğacak yavrunun cinsiyetini belirlemektir.

Dünyanın kuruluşundan beri insanoğlu gerek insanlarda gerekse hayvanlarda istenilen cinsiyette yavru elde etmeyi arzulamıştır. Bu maksatla santrifüj, sedimentasyon, elektroforezis, seçici öldürme, basınç değişiklikleri, pH değişiklikleri, viskozite, filtrasyon gibi teknikler kullanılmış. Ama bu tekniklerin kullanılması bilim adamlarını hüsrana uğratmaktan öteye gitmemiştir.

Bu derlemenin amacı boğa spermlerinde uygulanan flov sitometre ile cinsiyeti belirlemenin en son gelişmeleri hakkında bilgi vermektir.

* V. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 01-04 Ekim 2009, Elazığ.

Geliş Tarihi : 04.06.2014
Kabul Tarihi : 19.09.2014

Yazışma Adresi Correspondence

Eşref DEMİRCİ

Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Dölerme ve Suni
Tohumlama Anabilim Dalı,
Elazığ - TÜRKİYE

esrefdemirci@gmail.com

Spermatozoon DNA İçeriği

Fare sperminin DNA değişmezliği üzerine yapılan ilk çalışmalar ve diğer memelilerden elde edilen sonuçlar sperm başının düzleşmiş şeklinden dolayı açıklanamamaktadır (1, 2). Pinkel ve ark. (3)'nin geliştirdiği spermi yönlendiren flov sitometrede, sperm başının düzleşmiş tarafı kullanılarak DNA içeriğinin kesin ölümü başarılımiştır. Küçük, habloid kromozomlu olgun erkek gametleri DNA içeriği yönünden kesin olarak analiz edilebilir. Çünkü bu doğal özellik sağlıklı spermlerde sabittir. Spermlerin DNA muhteviyatının yüksek znrlkte ölümü ilk defa sperm nukleusları veya membranları çıkarılmış spermatidlerin flov sitometrik analizi ile başarılımiştır (3, 4). Bu DNA lmnn kesinleşmesiyle bir memeli türünün X- ve Y- kromozomunu taşıyan spermleri arasındaki DNA içeriği farkı belirlenmektedir (3, 5). Spesifik bir bisbenzimidazole DNA-bağlayıcı boyası Hoechst 33342'nin kullanılmasıyla canlı spermlerde DNA lm kesin olarak başarılımiştır (6). Memelilerin X- ve Y- kromozomu taşıyan spermler arasındaki DNA içeriği farkının tam olarak llmesi, ya X- ya da Y- kromozomlarını taşıyan canlı gametleri ayırmak için %85-95 doğruluk oranında etkili bir yöntem ortaya koymuştur (7, 8). Boğa spermlerinde X- kromozomunu taşıyan sperm, Y- kromozomunu taşıyan spermden %3.8 daha fazla DNA ihtiva ettiğinden spermin cinsiyeti flov sitometre ile belirlenebilmektedir. Söz konusu bu fark insanda %2.9, köpekte %3.9, atta %4.1, koyunda %4.2 dir (9).

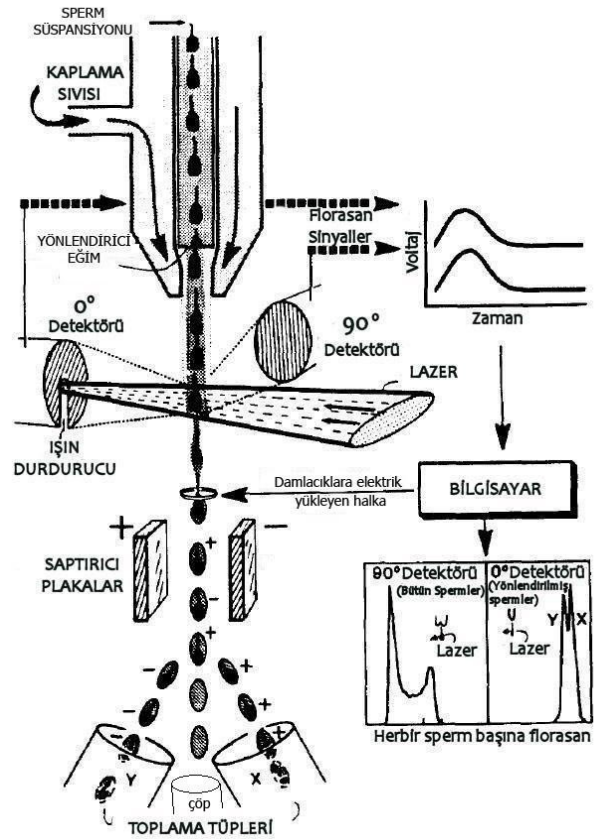
Flov sitometrik analiz metodu insan hariç birçok türde sperm cinsiyet oranını tayin etmek için etkili olarak kullanılmaktadır. İnsan spermleri daha çok köşeli ve yönlendirmeyi veya ortama alışmayı güçleştiren mermi şeklindeki başı ile tanımlanmaktadır. Aynı zamanda X- ve Y- kromozomları taşıyan bu spermler arasındaki DNA farkının % 3 den az olması analizdeki hassasiyetin artmasını gerekli kılmaktadır (10).

Sperm ayırmadaki ilerlemeler iki esas alanda olmuştur. Birincisi birim zamanda tam olarak elde edilen cinsiyeti belli sperm sayısını artırma, ikincisi spermlere daha az zarar veren yöntemlerin elde edilmesidir.

Flov Sitometre ile Sperm Cinsiyetinin Belirlenmesi Tekniği

Spermlerde DNA lm için modifiye edilmiş flov sitometre ve spermleri ayırma sisteminin şematik çizimi şekil 1'de gösterilmiştir. Erkek damızlıktan alınan sperma spesifik bir bisbenzimidazole DNA-bağlayıcı boyası Hoechst 33342 (Calbiochem, La Jolla, CA) ile bir saat süresince boyanır. Bu boyanmış spermler sıvı bir süspansiyon içerisinde basınçlı olarak flov sitometrenin tüpü içerisine yönlendirilir. Tp içerisine giren spermler tüpün eğim verilmiş ucundan dışarı çıkarken kaplama sıvısı içerisine yönlendirilir. Sperm süspansiyonu ve kaplama sıvısı ikisi birlikte tüpün 76 μ 'luk çıkış ucundan ayrılırken bu yöntem spermlerin laminar akış istikametini korur. Boyanmış spermler kısa dalga boylu bir lazer işinına (Innova 90-5 Argon-ion laser. Coherent, Palo Alto,

CA) maruz bırakıldığı zaman parlak mavi floresan işiği yayar. Daha büyük DNA içeriği nedeniyle boyanmış X-spermler, Y-spermlerden daha parlak bir floresan gösterir. Bu yayılan floresandaki fark bir fotomultiplikatr (ışıl çoğaltıcı) tüp tarafından llr ve analog formattan dijital yani sayısal formata dnştrlp bir frekans dağılımı olarak bilgisayardan alınır. En fazla DNA içeriğini ölçmek için sisteme güçlü bir bilgisayar entegre edilir. Fakat, bütün spermler fotomultiplikatr tüpü içerisinden sıvı akışı ile birlikte geçerken kesin olarak belirlenemez. Spermleri ihtiva eden akıntı cihazın boşalma deliğinden dışarı çıkarken ayrı damlacıklar oluşturmak için yüksek frekansta, yaklaşık saniyede 90.000 defa titreştirilir. Bütün damlacıklar sperm ihtiva etmemesine rağmen dedektör tarafından temin edilen DNA içeriği bilgisine bağlı olarak pozitif veya negatif bir yükle yüklenirler. Birden daha fazla sperm ihtiva eden damlacıklara yk uygulanmaz. Daha sonra aksi yüklü saptırıcı levhalar tek akıntıyı 3 akıntıya ayırır. Pozitif olarak yüklenmiş X-spermleri taşıyan damlacıklar negatif yüklü saptırma levhası tarafına, negatif olarak yüklenmiş Y-spermleri taşıyan damlacıklar ise pozitif yüklü saptırma levhası tarafına yönlendirilir. Birden fazla sperm taşıyan veya cinsiyeti belirlenmemiş spermleri taşıyan yüklenmemiş damlacıklar ise hiç bir tarafa sapmadan dosdoğru çöpe gider (9, 10).



şekil 1. Spermlerde DNA lm için modifiye edilmiş flov sitometre ve spermleri ayırma sisteminin şematik izimi (9,10).

Sonuç olarak saniyede toplam 20.000 sperm cihazdan geçer ve her bir cinsiyet için saniyede takriben 4.000 canlı sperm eşzamanlı olarak ayrılabilir. Bugünkü geçerli sistem yaklaşık olarak her bir cinsiyet için saatte $10-13 \times 10^6$ canlı sperm üretebilir (9).

Genellikle cinsiyeti belirlenmiş spermelerden $0.25 \text{ cm}^3/2-6$ milyon sperm konularak hazırlanmış payetler kullanılarak yapılan tohumlamalardan yeterli dölvürü alınmaktadır. Cinsiyeti belli dondurulmuş sperma suni tohumlamada kullanılarak ilk yavru 1999 yılında elde edilmiştir (11, 12).

Cinsiyeti Belli Sperma Kullanmanın Faydaları

1- Cinsiyeti belli sperma kullanıldığı zaman sonucu %93 civarında tahmin edilebildiğinden düve veya boğa sayısını artırmak için uygun bir seçim olabilir.

2- Dişi buzağılar erkeklere göre genellikle daha küçük olduğundan cinsiyetin önceden belirlenmesi, düvelerin ilk doğumunda doğum güçlüklerini azaltmak dolayısıyla ana ve yavru ölümlerini engellemek için faydalı bulunmaktadır.

3- Sürüyü büyütmek veya yenilemek için dışarıdan inek alınmayacak ise çok sayıda üretilecek düveler arasından sürüye katılacak olanların seçilmesi şansını doğurur.

4- Sahip olunan çok sayıda bütun düvelerden en üstün %10-15 düzeyindekilerin seçilmesiyle inek sürüsünü geliştirme, daha iyi dişileri elde tutma ve daha hızlı bir genetik ilerleme imkanı sağlar.

5- Dışarıdan herhangi bir dişi getirilmeden kapalı tutulan sürülerde istenmediği halde ortaya çıkan bir kısım sağlık problemleri azaltılabilir.

6- Bu teknoloji üreticilere seçim yapma şansını artırır ve ileride oluşacak potansiyel bir pazar için bir strateji geliştirme imkanı sağlar. Yetiştirici damızlık düveleri, sürüde pedigrî özelliklerine göre seçtikleri en iyi

ineklerinden, etlik yapılacak veya öküz olarak kullanılacak boğaları ise sürünün geriye kalan ineklerinden elde edebilir.

7- Bazı yetiştiriciler dişi cinsiyetli sperma ile tohumlattıkları inek ve düvelerinin dişi buzağıya sahip olduğunu garanti ederek ve daha az doğum güçlükleri görüleceğini bildirilerek değerinden fazla fiyata satabilirler.

Cinsiyeti Belli Sperma Üretiminde ve Yaygınlaşmasında Karşılaşılan Olumsuzluklar

Cinsiyeti belli sperma, iyi yönetilen suni tohumlama programlarında ve embriyo transferi çalışmalarında en yüksek başarı oranıyla oldukça etkindir. Fakat, cinsiyeti belli bir payet sperma hazırlamanın payet içerisindeki sperm sayısına bağlı olarak 35-60 dolara mal olması fazla kar sağlamamaktadır. Farklı boğaların spermaları ayırma cihazlarından farklı şekilde geçmekte olup bazı boğalar diğerine göre cinsiyeti belli sperma için daha iyi adaydırlar (11).

Başarılı sperma ayırma işlemlerinde gametlerle ilgili hassasiyet dikkate alındığında; DNA boyama boyası Hoechst 33342'nin kromozom saptırmalarına yönelik etkisi, spermelerin lazer ışınına maruz kalması, yüksek sulandırma oranı, santrifüj edilmesi, medyumdaki değişikliklere maruz kalması, flöv sitometrenin çıkış deliğinden yüksek hızla çıkması, ayırma işleminin uzun sürmesi ve spermelere yüksek basınç uygulanması gibi birtakım faktörler göz ardı edilmemelidir (12).

Cinsiyeti belirlenmiş spermanın kullanılması son zamanlarda birçok yetiştirici için bir gerçek olmuştur. Böylesi bir çalışmanın ülkemizde de uygulamaya konulmasıyla yetiştiricilerin amaçları doğrultusunda istediği cinsiyette yavru elde etme arzusunun gerçekleşmesi sağlanacaktır.

Kaynaklar

- Gledhill BL, Lake S, Steinmetz LL, et al. Flow microfluorometric analysis of sperm DNA content: Effect of cell shape on the fluorescence distribution. *J Cell Physiol* 1976; 87: 367-376.
- Van Dilla MA, Gledhill BL, Lake S, et al. Measurement of mammalian sperm deoxyribonucleic acid by flow cytometry problems and approaches. *J Histochem Cytochem* 1977; 25: 763-772.
- Pinkel D, Lake S, Gledhill BL, et al. High resolution DNA content measurements of mammalian sperm. *Cytometry* 1982; 3: 1-9.
- Otto FJ, Hacker U, Zante J, et al. Flow cytometry of human sperm. *Histochemistry* 1979; 62: 249-254.
- Garner DL, Gledhill BL, Pinkel D, et al. Quantification of the X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. *Biol Reprod* 1983; 28: 312-321.
- Johnson LA, Flook JP, Look MV. Flow cytometry of X- and Y-chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342. *Gamete Res* 1987; 17: 203-212.
- Johnson LA. Sexing mammalian sperm for production of offspring: The state of the art. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61: 93-107.
- Maxwell WMC, Evans G, Hollinshead FK, et al. Integration of sperm sexing technology into the art toolbox. *Anim Reprod Sci* 2004; 82-83: 79-85.
- Johnson LA. Gender preselection in domestic animals using flow cytometrically sorted sperm. *J Anim Sci* 1992; 70: 8-18.
- Bearden HJ, Fuquay JW, Willard ST. *Applied Animal Reprod*. 6th Edition, New Jersey: Upper Saddle River, 2004.
- Thomas HS. "Sexed Semen Is Now A Reality For Cattle Breeders". <http://www.cattletoday.com/archive/2008/February/CT1428.shtml/04.06.2014>.
- Garner DL. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology* 2006; 65: 943-957.