



79371

T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı

**FARKLI SULANDIRICILARLA SULANDIRILIP DONDURULAN
KÖPEK SPERMASININ SPERMATOLOJİK ÖZELLİKLERİ**

(DOKTORA TEZİ)

ÜLGEN GÜNAY

Danışman: Prof. Dr. M. KEMAL SOYLU

79371

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BURSA-1998

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

ÖZET	1
SUMMARY	3
GİRİŞ	5
GEREÇ VE YÖNTEM	26
BULGULAR	34
TARTIŞMA VE SONUÇ	39
KAYNAKLAR	47
TEŞEKKÜR	59
ÖZGEÇMİŞ	60

ÖZET

Bu çalışmanın amacı dondurmada kullanılan farklı sulandırıcıların spermatolojik özellikler üzerindeki etkilerini karşılaştırarak köpek sperması için en iyi sulandırıcının belirlenmesidir.

Araştırmada materyal olarak 10 adet Kurt Köpeği (Alman Çoban Köpeği) kullanıldı. Sperma, köpeklerden penis masajı yöntemi ile iki günde bir ve kızgın bir dişi köpeğin varlığında, alışık oldukları ortamda alındı. Ejakulasyon sırasında renk ve kıvam değişimleri gözlenerek spermatozoadan zengin olan ikinci fraksiyonun alınması sağlandı. Her köpekten 5'er olmak üzere toplam 50 ejakulat alındı. Alınan taze spermaların hacim, renk, pH, motilite, ölü spermatozoa ve morfolojik bozukluk oranlarından oluşan spermatolojik özellikleri incelendi.

Köpeklerden alınan her bir sperma örneği iki eşit hacme ayrıldı ve bu sperma örnekleri Tris-yumurta sarısı (T-YS) ile Sodyum-sitrat yumurta sarısı (SS-YS) sulandırıcıları ile 1:1 oranında sulandırıldı. Sulandırılmış spermalar içinde 37°C su bulunan cam bir behere konularak +5°C'deki buzdolabına yerleştirildi. Bu sırada gliserol içeren T-YS ve SS-YS sulandırıcıları da aynı behere konuldu. Spermanın ısı 2 saatte +5°C'ye düşürüldü. Isısı +5°C'de olan T-YS ve SS-YS ile sulandırılmış sperma örnekleri kendi hacimleri kadar %8 gliserol içeren T-YS ve SS-YS

sulandırıcıları ile finalde %4 gliserol içerecek şekilde sulandırıldılar. Gliserolizasyon işlemi 50 dak.'da tamamlandı. Daha sonra spermalar +5°C'de 2 saat ekilibrasyona bırakıldılar. Ekilibrasyonunu tamamlamış sulandırılmış sperma örnekleri payet yöntemine göre donduruldu. 0.5 ml.lik payetlerde dondurulan spermalar 37°C'lik su banyosunda 30 sn'de çözüldüler. Çalışmada sulandırma, +5°C'ye soğutma, gliserolizasyon, ekilibrasyon sonrası yapılan spermatolojik muayenelerde en yüksek motilite Tris sulandırıcısında saptandı (P< 0.05). Sulandırma ve +5°C'ye soğutma aşamalarında akrozomal ve toplam morfolojik bozukluklar incelendiğinde Tris ve Sodyum sitrat sulandırıcıları arasında istatistiksel açıdan fark saptanmamış, gliserolizasyon, ekilibrasyon ve çözüm sonrası aşamalarda ise fark saptanmıştır (P<0.05).

Araştırmanın sonucunda çözüm sonrasında Tris sulandırıcısında %53±1.59, Sodyum sitrat sulandırıcısında ise %48±1.46 motilite değeri saptandı ve aralarındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulundu (P< 0.05).

Anahtar Kelimeler: Köpek, sperma, sulandırma, soğutma, dondurma.

SUMMARY

Spermatological Characteristics of Dog Semen Diluted with Different Extenders After Freezing.

The aim of this study was to determine the best extender for dog sperm by comparing the effects of different extenders used for freezing on spermatological characters.

In the present study, 10 German Shepherd Dogs were used as materials. The semen was collected by manual massage every other day in the place where the male dogs were accustomed to be in the presence of a bitch in heat. Second sperm-rich fraction of the semen was collected by observing changes of the colour and the density of ejaculate during ejaculation. Five ejaculates per dog were collected and the total ejaculate number used for the study was 50. The semen was examined for volume, colour, pH, motility, dead spermatozoa and morphologically defected ones. Each sperm collected from each dog was divided into two equal parts and one of the parts was diluted with Tris-egg yolk (T-EY) and the other part was diluted with Sodium citrate-egg yolk (SC-EY) extenders by 1:1 ratio. The diluted semen samples were put into a glass cup including 37°C water and then they were fit in refrigerator at 5°C. Meanwhile, T-EY and SC-EY with 8% glycerol were put into the same cup.

The semen samples diluted with T-EY and SC-EY at 5°C were mixed with the same amount of T-EY and SC-EY including 8% glycerol. Thus final glycerol concentration became 4%. Glycerolisation was completed within 50 minutes. After this manipulation, the semen was incubated for equilibration at 5°C for 2 hours. Following equilibration the diluted semen samples were frozen according to the straw method. The freezing semen in 0.5 ml straws was thawed in water bath at 37°C for 30 seconds. In the study, the highest motility was determined with Tris extender ($P<0.05$) according to spermatological examinations which were done after dilution, cooling to 5°C, glycerolisation and equilibration. There was no statistical difference between Tris and Sodium citrate extenders on the acrosomal and total morphological defects at the steps of dilution and cooling at 5°C. However, there was statistical difference after glycerolisation, equilibration and thawing ($P<0.05$).

In conclusion, motility values were determined as 53 ± 1.59 for Tris and 48 ± 1.46 for Sodium citrate after thawing and the difference between them was found statistically important ($P<0.05$).

Key Words: Dog, semen, cooling, dilution, freezing.

GİRİŞ

Hızla gelişen modern yaşam koşulları ve hayvanları koruma bilincinin giderek artması sonucunda, köpek sadece ailenin bir ferdi haline gelmekle kalmamış insanların en vefalı dostu da olmuştur. Köpek yetiştiriciliği son yıllarda uluslararası bir hobi olarak güncellik kazanmaktadır. Bunun yanı sıra önemli parasal değerlere ulaşan köpek ırklarının üretilmeleri karlı bir yetiştiricilik haline gelmekte ve bu konuya yönelik talepler günden güne artmaktadır (1).

Pet sahiplerinin artışı ile belirli safkan ırklara olan talepler değişik ırktaki yavru köpek piyasasını ortaya çıkarmış ve bu işi yapan yetiştiricilerin gelişimini desteklemiştir (2). Bu talepler doğrultusunda gerek doğal çiftleşme, gerekse sun'i tohumlamada damızlık olarak kullanılacak erkek köpeklerin ırkının gerektirdiği özelliklere sahip olması ve bu özellikleri bir sonraki nesillere aktarabilmesi gerekir. Bu nedenle köpek spermasının tüm yönleri ile incelenmesi önem taşımaktadır.

Üstün verim özelliklerine sahip köpeklerin spermalarının düşük ısı derecelerinde dondurulup uzun süre saklanması ve gereksinim duyulan bölgelere ulaştırılabilmesi ile bu köpeklerden daha geniş ölçüde yararlanılma olanağı sağlanmış olacaktır (3).

İtalyan fizyolog Abbe L.Spallanzani'nin 1780 yılında köpeklerde ilk sun'i tohumlama çalışmalarına başlaması ile günümüze kadar bu konuda önemli gelişmeler kaydedilmiştir (4-8).

Spermanın dondurulması işleminde bir çok faktörün etkili olduğunu bildiren araştırmacılar, bu uygulamanın çok dikkat gerektirdiğini vurgulamışlardır (9,10). Aynı araştırmacılar, saklama ve dondurma yöntemlerini etkileyen faktörleri; sulandırıcının çeşidi, spermatozoa yoğunluğu, sulandırıcıya katılan kriyoprotektif ajanın uygunluğu, soğutma şekli, ekilibrasyon zamanı ve oranı ile çözme ısı ve zamanı olarak bildirmişlerdir. Köpek spermasının dondurulmasında etkili olan yöntemler köpek yetiştiriciliğinin temelini oluşturmuştur (11). Köpek spermasının dondurulmasında kullanılan metotlar ve etkileri kimi araştırmacılar tarafından incelenmiştir (4,9,12-14). Köpek spermasının gerek kısa süreli saklanmasında (12,15,16), gerekse dondurulmasında çeşitli sulandırıcılar kullanılmıştır (2,17-20). Köpek spermasının dondurulması dünyadaki en iyi köpeklerden genetik materyalin elde edilmesine olanak sağlamış ve köpek yetiştiriciliğinde yeni bir bölüm açılmıştır (11).

Erkek Köpeklerden Sperma Alma Yöntemleri:

Köpeklerden sperma penis masajı, sun'i vajen ve elektroejakulasyon yöntemleri ile alınabilmektedir (21-29). Klinik pratikte verimli, uygulanması kolay ve kalitesi yüksek sperma alınması nedeni ile penis masajı yöntemi öncelik kazanmaktadır (30,31).

Kirk (25), sun'i vajenin köpek spermasının toplanmasında memnuniyet verici olmadığını, erkek köpeğin vajene yanıtının bazen zayıf olduğunu ve bu metodun spermanın motilitesi ve viabilitesi üzerine zararlı etkileri olduğunu vurgulamıştır.

Sun'i vajenin özellikle küçük köpek ırklarında sıkıcı olduğunu belirten araştırmacılar, vajenin kauçuk kısmının spermanın sıcakla temasını uzatarak motiliteyi

olumsuz yönde etkileyebileceğini bildirmişlerdir (32-34). Elektroejakulasyon yöntemi ile alınan spermanın hacminin düşük olduğu ve bu yöntemin sıklıkla spermanın idrarla karışmasına ve fiziksel rahatsızlığa neden olduğu belirtilmiştir (34). Ayrıca bu yöntemle fraksiyonların ayrılması sorunu da söz konusudur (33). Sun'i vajen yönteminde de ejakulatın fraksiyonlarının ayrılması çok zor olmakta ve çoğunlukla da mümkün olmamaktadır. Bu yöntemde sperma örnekleri prepusyumdan gelen akıntı ile kontamine olabilmektedir (15,35).

Wright ve Parry (27), elektroejakulasyon yönteminin pratik olmadığını, genel anestezinin gerekli olduğunu, elle manuplasyona göre sun'i vajenin avantajlı olmadığını ve elle manuplasyonun başarısının pratik yapmaya ve hayvanın psikolojisinden anlamaya bağlı olduğunu ifade etmişlerdir.

Penis masajı ve sun'i vajen yöntemi ile sperma alınırken ortamda kızgın bir dişi köpeğin bulunmasının uygulamayı kolaylaştıracağı bildirilmiştir (32,36-40). Linde- Forsberg (41), penis masajı yönteminde kızgın bir dişinin genellikle gerekli olmadığını fakat kızgın dişinin varlığında ejakulattaki toplam spermatozoa sayısının daha yüksek olacağını belirtmiştir.

Köpeklerde Taze Spermanın Değerlendirilmesi:

Köpeklerin puberteye eriştikten sonraki ilk ejakulatları çoğunlukla anormal ve ölü spermatozoa içerir. Sonraki ejakulatlarda spermatozoa yoğunluğu artmakta, anormal spermatozoa oranı azalmakta ve sperma normal sayıda olgun spermatozoa içermektedir (42).

Köpek sperması, ayrılması her zaman kolay olmayan üç fraksiyondan oluşur (22,23,26,34,43-46). Birinci fraksiyon, berrak sulu kıvamda ve spermatozoa

içermezken ikinci fraksiyon beyaz renkli, az visköz ve çok sayıda spermatozoa içerir. Üçüncü fraksiyon ise berrak, sulu kıvamda olup ya çok az sayıda spermatozoa içerir ya da hiç spermatozoa içermez (4,15,25,30,41). Normalde köpek sperması beyaza yakın şeffaf olmayan renktedir (47).

Bazı yazarlar spermayı ikinci fraksiyon (1,15,20,30,33,48), bazıları bir ve ikinci fraksiyon (49,50), bazıları da tüm ejakulat (6,31,44,51) üzerinden değerlendirmişlerdir. Kimi araştırmacılara göre birinci fraksiyon prostatik sıvıdan oluşmakta (15,52), kimi araştırmacılara göre de üretral bezlerden salgılanmaktadır (30,33,53). England ve Allen (54), köpeklerde üretranın içerisinde glandular dokunun olmadığını, birinci fraksiyonun prostatik orijinli olabileceğini ve üretrada depolandıktan sonra salgılandığını öne sürmüşlerdir. Sperma hacminin, köpeğin yaşına, büyüklüğüne, sperma alma sıklığına ve toplanan prostatik sıvının miktarına bağlı olarak değiştiği belirtilmektedir (42).

Soderberg (47), köpek spermasının toplam hacminin toplanan prostatik sıvının miktarına bağlı olarak 0.5-30 cc, yoğunluğun $200-500 \times 10^6$ /ml arasında olduğunu ve hacmin fertilité ile ilişkili olmadığını vurgularken, Johnston (37), hacmin 1-30 cc, yoğunluğun 300×10^6 /ml - 1×10^9 /ml, pH' nın 6.3-6.7 arasında olduğunu bildirmiştir. Birinci, ikinci ve üçüncü fraksiyonların hacimlerini sırası ile, Settergren (30), 0.25-3 ml, 0.5-4 ml, 1-25 ml, Linde-Forsberg (22), 1-5ml, 1-3 ml, 30-40 ml (büyük cüsseli ırklarda), Seager (55) 1-2 ml, 1-3 ml, 2-40 ml olarak bildirmişlerdir.

Birinci ve üçüncü fraksiyonların, spermanın uzun süre depolanmasında spermatozoa için zararlı olduğu görülmüştür (41). Bu nedenle köpek sperması

değerlendirilmek istendiğinde spermatozoadan zengin olan ikinci fraksiyonun tümünün depolanması önem kazanmaktadır (42). Ayrıca prostatik sıvının spermatozoanın canlılık süresine ve donma toleransına zıt etkili olduğu öne sürülmektedir (4,42).

Köpek sperması saklanılmak istendiğinde, seminal plazmanın spermatozoanın canlı kalma süresi ve donma toleransı üzerine zararlı etkisi olduğu için, fraksiyonların birbirinden iyice ayırt edilmiş olması önemlidir. Bu zararlı etki plazmada bulunan bazı faktörlerin aktivasyonuna bağlı olabilir. Bu faktörlerden bir tanesinin, spermatozoanın soğuk şokundan ve derin dondurma işlemleri ile ilgili özel fiziksel ve kimyasal durumlardan daha fazla zarar görmesine yol açan hücre membran stabilitesinin azalmasına neden olduğuna inanılmaktadır. Böylece spermatozoa soğuk şokundan daha kolay etkilenebilmektedir (43).

Normal köpek spermasında ejakulattaki spermatozoa sayısının yaş, testiküler büyüklük, sperma alma sıklığı, stres, çevre ısısı ve sperma toplama metoduna bağlı olarak değişebileceği vurgulanmaktadır (28).

Araştırmacılar, köpek spermasının %70-90 oranında motiliteye sahip olduğunu saptamışlardır (11,22,47,56,57). Motilitenin köpek spermasının kalitesini belirleyen en önemli parametrelerden biri olduğunu vurgulayan Linde-Forsberg (41), normal sperma örneklerinde motilitenin %70'ten az olmaması ve primer ve sekonder defektli spermatozoa oranınının %30-40'ı aşmaması gerektiğini bildirmektedir. Motilitenin spermatozoa viabilitesinin değerlendirilmesinde kullanıldığı fakat fertilitenin bir garantisi olmadığı belirtilmiştir (58).

Primer anomalilerin %10'dan, sekonder anomalilerin %20'den fazla olmaması gerektiğini vurgulayan Meyers-Wallen (59), yüksek orandaki primer anomalilerin spermatogenezisten kaynaklandığını, yüksek orandaki sekonder anomalilerin ise epididimal hastalıklardan veya spermanın toplanması ve işlenmesi sırasında oluştuğunu bildirmiştir.

Spermatozodan zengin fraksiyonun motilitesini birkaç saat koruduğunu ve nispeten soğutmaya dirençli olduğunu açıklayan Soderberg (47) ve Larsen (49), toplanan spermalardaki hızlı motilite kaybının düşük fertilitenin belirtisi olabileceğini ifade etmişlerdir. Gomes (60), köpek spermasının hacmini 5 ml, yoğunluğunu 0.3×10^9 /ml, motilitesini %85, normal spermatozoa oranını %80 olarak saptamıştır. Köpek spermasının pH'sı nötre yakın alkali ya da asidik karakterde olabilir (39). Normal pH 6.3-6.7 arasında değişir ve kısmen toplanan prostatik sıvının miktarına bağlıdır. Prostatik sıvı 6.0-7.4 arasında değişen pH'ya sahip olup ortalama değer 6.8'dir (34,42). Meyers-Wallen (59), prostatik sıvının (üçüncü fraksiyonun) pH'sının 6.0-7.2 arasında olduğunu belirtmiştir. Normal köpek spermasında, ortalama anormal spermatozoa oranının %15, en fazla %20 olması gerektiğini, motiliteyi %70'in üzerinde, pH değerini de 6.3-6.7 olarak bildiren Johnstone (61) bu değerlerin iyi bir fertilitate için kriter olduklarını vurgulamıştır.

İleri ve ark. (39), fertilitesi yeterli bir köpekten alınan ejakulatın ortalama motilitesini %70-90, hacmini 2-25 ml, canlı spermatozoa oranını %80-85 olarak belirtirlerken, morfolojik bozukluk oranının da %20'den az olması gerektiğini, yoğunluğun ise ortalama 125×10^6 /ml olmakla beraber ırka ve yaşa göre 60×10^6 /ml ile 300×10^6 /ml arasında değişebileceğini belirtmişlerdir.

Theret ve ark. (48), spermatozoadan zengin ikinci fraksiyonun hacminin 0.3 ml, yoğunluğunun 3×10^8 /ml'den az, anormal spermatozoa oranının %10'dan, ölü spermatozoa oranının da %20'den fazla olmaması gerektiğini bildirmişlerdir.

Çeşitli ırktan 11 köpekten el masajı yöntemi ile aldıkları sperma örneklerinde Gökçen ve ark.(1), ortalama sperma hacmini 2.24 cm^3 , yoğunluğu $0.68 \times 10^9 / \text{cm}^3$, motiliteyi %60, ölü spermatozoon oranını %32.24, akrozom defektli spermatozoon oranını %0.24, anormal spermatozoa oranını %25, pH değerini de 6.16 olarak bulmuşlardır.

Büyükçoban (62), Kangal ve Alman Çoban Köpeklerinden penis masajı ile aldığı spermalarda her iki ırkın hacim, motilite, yoğunluk, pH, anormal, ölü ve akrozom defektli spermatozoon oranlarını genel ortalama olarak sırası ile, Kangallarda, 3.65 ml, %72.01, 335.2×10^6 /ml, 6.05, %10, %2.93 ve %1.78, Alman Çoban Köpeklerinde ise 3.32 ml, %80.80, 393.7×10^6 /ml, 6.34, %13.08, %2.98 ve %2.29 olarak bildirmiştir.

Kangal ırkı beş köpekten penis masajı yöntemi ile aldıkları 25 ejakulatta hacim, motilite, yoğunluk, anormal ve ölü spermatozoon oranları ile pH değerlerini ortalama olarak sırası ile, 25.4 ml, %62.6, $524 \times 10^6 / \text{cm}^3$, %7.9, %6.7 ve 6.1 olarak saptayan Tekin ve ark.(6), beş adet Alman Çoban köpeğinden aldıkları 25 ejakülatta ise aynı spermatolojik özellikleri sırası ile, 21.2 ml, %68, 305×10^6 /ml, % 6.2, %6.1, 6.2 olarak saptamışlardır.

Rota ve ark. (63), değişik ırktan 11 köpekten aldıkları taze spermalarda, motiliteyi 78.6 ± 13.6 , hacmi 4.9 ± 0.3 ml, normal spermatozoa oranını 63.7 ± 26.9 ,

baş anomalisini 5.9 ± 2.6 , kuyruk anomalisini 17.4 ± 22.0 , akrozom anomalisini de 10.7 ± 8.3 olarak bulduklarını ifade etmişlerdir.

Morton (32), fertil köpeklerde canlı spermatozoa oranının 89.2 , normal spermatozoa oranının 69.6 , baş, kuyruk ve orta kısım anomalilerinin de sırası ile, 5.3 , 13.4 ve 4.87 olduğunu bildirmiştir.

Sekiz ay ile altı yaş arasındaki 28 adet Dalmaçyalı köpeğin spermalarını sun'i vajen yöntemi ile aldıklarını belirten Schubert ve Seager (26), 3.9 ml hacim, 84 motilite ve 84 normal spermatozoa oranı elde etmişlerdir.

Yaşları 2-5 arasında olan dört adedi kontrol grubunda olmak üzere toplam altı köpekten el masajı ile beşer ejakulat alan Kawakami ve ark.(64), motilite oranı ile akrozom, baş, orta kısım, sitoplazmik damlacık, kıvrık ve dolanmış kuyruk anomalilerini sırası ile, birinci köpekte; 87.3 ± 3.0 , 23.4 ± 4.1 , 2.0 ± 0.1 , 2.7 ± 0.2 , 8.3 ± 2.5 , 25.3 ± 6.2 , 2.4 ± 0.1 , ikinci köpekte; 88.6 ± 2.7 , 28.1 ± 1.2 , 2.5 ± 0.2 , 2 ± 0.2 , 7.2 ± 2.2 , 23.6 ± 4.1 , 2.8 ± 0.1 , kontrol grubunda ise 91.8 ± 1.5 , 2.2 ± 0.2 , 1.1 ± 0.1 , 3.8 ± 0.3 , 2.0 ± 0.2 , 2.4 ± 0.2 , 2.2 ± 0.2 olarak saptamışlardır.

Köpeklerde gözlenen tipik morfolojik spermatozoa anomalilerinin, büyük baş, kopuk baş, kıvrık kuyruk, proksimal ve distal protoplazmik damlacıklardan oluştuğunu açıklayan Mickelsen ve ark. (56), Alman Çoban Köpeklerinden el masajı ile aldıkları taze spermalarda, motiliteyi 80 , normal spermatozoa oranını 70 olarak bulduklarını belirtmişlerdir. Köpeklerde çift baş ve çift kuyruk diğer evcil memelilerden daha fazla oranda gözleendiği de bildirilmektedir (30).

Köpek Spermasının Sulandırılması ve Kısa Süreli Saklanması:

Spermanın saklanması, sadece spermatozoanın viabilitesini değil, aynı zamanda depolama boyunca fertilizasyon kapasitesini de koruyan bir yöntemdir (58).

Spermatozoanın viabilitesinin uzatılması ejakulatın spermatozodan zengin fraksiyonuna özel sulandırıcıların katılması ile başarılabilir (42). Eğer sperma depolanacaksa veya başka bir yere götürülecekse ilk önce sulandırılması gerekmektedir (16,25,57,65). Sulandırılmış sperma eğer hemen kullanılmayacaksa 5°C'de 24 saat saklanabilir (16,62,66). Kimi-Diaka ve Badtram (67), 5°C'de 24 saat bekleyen köpek spermasının fiziksel ve fonksiyonel karakterinde önemli bir değişiklik olmadığını saptamışlardır.

Gill ve ark (68), 25 dişi köpeği Tris-yumurta sarısı ile sulandırılmış sperma ile hemen veya +5°C'de 24 saat depolamadan sonra yaptıkları tohumlamalardan %75 oranında gebelik elde etmişlerdir.

Sodyum sitrat sulandırıcısının +5°C'de depolamada çok başarılı olduğunu bildiren Province ve ark.(12), bu sulandırıcı ile sulandırılan spermada depolamadan 240 saat sonra %52'nin üzerinde motilite elde etmişlerdir.

Pastörize süt, köpek spermasının kısa süreli saklanması için kullanılmış ve 48 saat depolamadan sonra sperma fertil bulunmuştur (15,30,43). Soğutma yöntemi boyunca spermatozoa viabilitesi soğutma oranına, depolama ısısına ve kullanılan sulandırıcının çeşidine bağlıdır (14). İyi bir sulandırıcı, enerji veren besin maddelerini ve pH'yı değiştiren zararlı etkenlere karşı tampon maddeleri içermeli,

fizyolojik ozmotik basıncı ve elektrolit yoğunluğunu sağlamalı, bakteriyel gelişimi önleyen antibiyotikleri içermeli, soğutma işlemi boyunca spermatozoayı soğuk şokundan korumalı, dondurma ve çözme işlemleri boyunca spermatozoada oluşacak zararı azaltan kriyoprotektif maddeleri içermelidir (4,15,24,28,60).

Her sulandırıcının iki temel fonksiyona sahip olması gerekir. Bunlar:

1-Kriyoprezervasyon boyunca fertilitiyi korumak,

2-Her tohumlamada uygun spermatozoa sayısını sağlayarak ejakülatın hacmini artırmaktır (28).

Ayrıca sulandırıcılar, spermatozoal membranları transport boyunca oluşan sallantı ve ısı değişiklikleri nedeni ile şekillenen hasardan korumaya yardım ederler. Sulandırma işlemi metabolik aktiviteyi azaltmakta, bundan dolayı da spermatozoanın ömrü uzamaktadır (41).

Ejaküle edilmiş sperma, ısıdaki hızlı düşüşe çok duyarlıdır ki bu devre "soğuk şoku" olarak adlandırılan membran bütünlüğünün bozulması ile sonuçlanır. Spermatozoanın plazma membranı, akrozom ve mitokondri kısımları soğuk şokuna çok duyarlıdır. Bu nedenle, spermatozoayı donma ve çözme sırasında oluşacak hücre yaralanmalarına karşı koruyan kriyoprotektif maddelerin sulandırıcılara katılması gerekir. Lesitin ve fosfolipid içeren maddeler hızlı soğutmanın etkilerinden spermatozoayı koruyabilmektedirler. Bu maddelerin uygun miktarları süt ve yumurta sarısında bulunmuştur. Soğuk şoku boyunca fosfolipidler, spermatozoanın plazma membranının lipid yapılarını etkiler ve bu yapıların korunmasını sağlarlar. Bütün türler soğuk şokuna aynı oranda tepki vermezler (58,60). Boğa spermatozoası 15°C'nin altında soğutmaya tamamen duyarlıdır. Oysa köpek, insan, tavşan ve horoz

spermatozoasının diğerk evcil hayvanlara oranla soğuk şokuna daha dirençli oldukları bildirilmiştir (69).

Sulandırıcıya katılacak olan kriyoprotektanların hacimleri belirlenmelidir (70). Gliserolün dimetilsülfoksitten (DMSO) daha iyi kriyoprotektif özelliğe sahip olduğu ve spermaya +5°C'de katılmasının daha olumlu sonuç verdiği çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (4,16,28,71). Olar ve ark. (14), DMSO'nun sulandırıcıya yalnız başına veya gliserolle kombine olarak katılmasının, çözüm sonrasında köpek spermatozoasının canlılığına herhangi bir faydasının olmadığını vurgulamışlardır.

Köpeklerde sulandırma oranı, payetlerde pelletlerden daha yüksek olup, spermanın başlangıç yoğunluğuna bağlı olarak 1/3 ile 1/8 arasında değişir. Genellikle sulandırıcılara ml. başına 1 mg dihidrostreptomisin ve 1000 IU penisilin katılması önerilmiştir (4,15,43).

Linde-Forsberg (22), Illinois Variable Temperature (I.V.T.), pastörize süt, sodyum sitrat dihidrat ve %0.75 glisin gibi sulandırıcıların köpek spermasının sulandırılması amacı ile kullanıldığını, yaygın olarak kullanılan sulandırıcılardan birisinin de %20 yumurta sarısı içeren Tris-sitrat sulandırıcısı olduğunu belirtmiştir. %20 yumurta sarısı içeren sulandırıcıların spermatozoal bütünlüğü %0 veya %1 yumurta sarısına oranla daha iyi koruduğu bildirilmiştir (69). Yaygın olarak kullanılan diğerk bir sulandırıcı da %80 homojenize ve pastörize kremadır (12,22,43).

Rohloff ve ark. (71), 6 adet Beagle ırkı köpekten penis masajı yöntemi ile topladıkları spermatozodan zengin fraksiyonları, Tris-yumurta sarısı sulandırıcısı

ile sulandırmışlar ve DMSO ile gliserolün derin dondurmada donmaya karşı koruma oranlarını tartışarak DMSO'nun son yoğunluğunun %1, gliserolün son yoğunluğunun %8'i geçmemesi gerektiğini belirtmişlerdir.

Spermayı yumurta sarısı-fruktoz ve yumurta sarısı-sitratla sulandırıp +4°C' de 4 gün saklayan Brochard ve Coulomb (72), bu süre sonunda %50 oranında motilite elde etmişlerdir.

Rota ve ark.(63), 11 köpekten el masajı yöntemiyle aldıkları sperma örneklerini otolog seminal plazma, Tris-yumurta sarısı, süt-yumurta sarısı, krema-yumurta sarısı ile sulandırarak +4°C'de 4 gün saklamışlardır. Otolog seminal plazmada, motilite 2. günde %0 olarak saptanırken, diğerlerinde sırası ile, %53.6 , %30.4, ve %11.1 olarak tespit edilmiştir. Tris sulandırıcısı ile sulandırdıkları köpek sperması ile sulandırılmamış spermayı +4°C' de 5 gün saklayarak motilitelerini karşılaştıran Foote (73), Beagle ırkı köpeklerden aldığı spermaları %4 gliserol içeren sodyum sitrat sulandırıcısı ile sulandırmıştır. Araştırmacı +5°C'de 1, 4, 8, 12 gün süreyle depolama sonunda elde ettiği motilite oranlarını sırası ile, %67, %58, %50 ve %30 olarak bildirirken, aynı sulandırıcı %8 gliserol içerdiğinde aynı depolama süreleri sonundaki motilite oranlarını sırası ile %64, %52, %43 ve %19 olarak saptadığını ifade etmiştir.

Köpek Spermasının Dondurulması:

Spermanın uzun süreli saklanması derin dondurma yöntemi ile gerçekleştirilebilir (43). Yapılan çalışmalarda, köpek sperması yaklaşık 1ml'lik ampullerde, pellet şeklinde ya da payetlerde dondurulmuştur (4,10,14,42).

Günümüzde ise pellet şeklinde veya payetlerde dondurulmaktadır (4,15,41,53). Payetlerin çeşit ve büyüklükleri uluslararası kullanılmakla birlikte ya 0.25 ya da 0.5 ml.lik tipleri kullanılmaktadır (28).

Linde-Forsberg (41) ve Olar (74), pellet yönteminin dezavantajlarına değinerek pelletlerin identifiye edilmesinin zor, yöntemin zaman alıcı olduğunu, Olar ve ark. (14) ise payet yönteminin identifikasyon, depolama ve çözme kolaylığı sağlamasından dolayı bu dondurma yönteminin tercih edildiğini ifade etmişlerdir. Christiansen (16), spermanın dondurulması yöntemi ile önemli derecede fertilitite kaybı olmaksızın spermanın yıllarca depolanabilmesinin mümkün olacağını açıklamıştır. Köpek spermasının çözüm sonrası motilitede önemsiz bir azalma ile 9 yıl depolanabileceğini belirten Feldman ve Nelson (42), çözme yöntemleri ile tohumlama başına kullanılan payet ve pelletlerin sayısının eldeki olanaklara göre değişeceğini bildirmişlerdir.

Pek çok türde spermanın dondurma öncesinde bir sulandırıcı ile soğutma işlemi altında ekilibrasyonuna gerek vardır. En iyi sonuçlar genellikle spermanın toplanmasından hemen sonra soğutma işlemine başlanması ile sağlanmış, düşük soğutma oranlarının soğuk şoku hasarını azalttığı ve +5°C'de depolama süresinin dondurma öncesinde bir saatten daha fazla olduğu ifade edilmiştir (4). Aynı araştırmacılar, dondurma hızının çözüm sonrası canlılık ve fertilitiyi etkilediğini, aşırı hızlı dondurmanın intrasellüler kristal oluşumuna ve hücre hasarına neden olduğunu, optimal dondurma oranının ise sperma hacmine, çevre ısısına, sulandırıcıya, kriyoprezervatife, hayvan türüne ve çözme yöntemine göre değiştiğini vurgulamışlardır.

Köpek spermasının dondurulması amacıyla kullanılan sulandırıcılar genellikle bir kriyoprotektan olan gliserolü içermekte (41), payetlerde dondurma amacıyla ise genellikle %2-8 gliserol içeren Tris-yumurta sarısı sulandırıcısı kullanılmaktadır (14,17,18,75). Yubi ve ark.(20), ırkları farklı olan iki grup köpektan aldıkları spermaları, Tris-yumurta sarısı ve laktoz-yumurta sarısı ile sulandırarak 0.5 ml.lik payetlerde dondurup 35°C'de 15 sn'de çözmüşlerdir. Araştırmacılar, çözüm sonrasında birinci grupta ortalama motilite, ölü ve anormal spermatozoa oranlarını Tris sulandırıcısında sırası ile, %45, %45, %20,5 olarak saptarlarken, laktoz sulandırıcısında veri alamadıklarını, ikinci grupta ise aynı değerleri Tris sulandırıcısında, %29.17, %60.8, %39.0, laktoz sulandırıcısında ise %24.17, %46.0 ve %34.41 olarak bulduklarını ifade etmişlerdir.

Aldıkları sperma örneklerini Tris-sitrik asit-yumurta sarısı ile sulandıran Morton (32), sulandırdığı spermaları +4°C'de 2 saat bekletmiş ve bu sürenin 4-5 saate kadar uzatılabileceğini belirtmiştir. Aynı araştırmacı, bu süre sonunda spermayı payetlere çekerek uçlarını polivinil pirolidon (PVP) ile kapatıp 30 dak. buzla soğutulmuş distile suda bekletmiş, payetleri kuruladıktan sonra sıvı azotun 6-7 cm yukarısında azot buharının geçmesine izin veren parmaklıklı rafta 5-10 dak. tutarak dondurmuş ve payetleri sıvı azot içinde depolamıştır. Araştırmacı 37-40°C'de 1 dak.'da çözdüğü payetlerde çoğunlukla % 70-80 oranında motilite elde ettiğini bildirmiştir.

Silva ve Verstegen (9), Laiciphos, Tes/Tris ve biociphos sulandırıcıları ile 1/1 oranında sulandırdıkları spermaları +4°C'de 2 saat ekilibrasyona bırakmışlardır.

Araştırcılar spermaları aynı hacim sulandırıcı ile tekrar sulandırılıp aynı ısıda 2 saat daha ekilibre etmişler ve 0.5 ml.lik payetlere çektikleri ekilibrasyonunu tamamlamış spermaları -20°C 'deki sıvı azot buharında 20 dakikada dondurup -196°C 'deki sıvı azot içinde depolamışlardır. Aynı araştırcılar, çözüm sonrasında Laiciphos, Tes/Tris ve biociphos sulandırıcılarında sırası ile, %65, %65, %50 motilite ve %80, %80, %78 oranında canlı spermatozoa bulduklarını, anormal spermatozoa oranının ise tüm örneklerde %15'den az olduğunu ifade etmişlerdir.

Değişik ırktan 4 köpektan aldıkları 20 ejakulatı Tris-yumurta sarısı ile 1/3 oranında sulandıran Yurdaydın ve Kotzab (5), 0.25 ml.lik payetlerde dondurdukları spermaları 40°C 'de 10 sn'de çözmüşlerdir. Çözüm sonrası ortalama motilite, ölü ve anormal spermatozoa oranlarını sırası ile, %46.5, %33.12 ve %27.91 olarak saptamışlardır. Oettle (76), Tris-yumurta sarısı sulandırıcısını iki eşit hacme ayırmış, ilk kısma gliserol katmamış, ikinci kısma ise %20 (v/v) gliserol eklemiştir. Sperma ilk kısım sulandırıcı ile 1/2 oranında sulandırılıp 450 devirde 10 dak. santrifüj edilmiş ve üstte kalan kısım atılarak orijinal hacmine bakılmaksızın 1.8 ml.lik sediment bırakılmıştır. Sediment, $1^{\circ}\text{C}/\text{dak}$ soğutma hızıyla $+5^{\circ}\text{C}$ 'ye ulaşınca 0.6 ml ikinci kısım sulandırıcı ile sulandırılmış ve son gliserol yoğunluğu %5 olmuştur. Örnek, $+5^{\circ}\text{C}$ 'de 3 saat ekilibrasyona bırakılmış ve bu süre sonunda 0.25 ml.lik payetlere çekilerek sıvı azotun 25 mm üzerinde 10 dakikada dondurulmuştur. Donmuş sperma, 30°C 'de 30 sn'de çözülmüş ve %60'ın üzerinde motilite tespit edilmiştir.

Beş farklı ırktan köpeğe ait toplam 50 ejakulatı 0.2 ml.lik pelletlerde donduran Baran (77), aldığı taze spermaları iki eşit hacme ayırıp %1 glikoz ve %10 yumurta sarısı içeren yağsız sütlü sulandırıcı ve Tris sulandırıcısı ile 1:1 oranında sulandırmıştır. +5°C'ye soğutma sonunda süt ve Tris sulandırıcılarını iki eşit hacme ayırmış ve finalde bu sulandırıcılar %4 ve %7 gliserollü olacak şekilde gliserolizasyon işlemi uygulayarak 4 grup oluşturmuştur. Araştırmacı dondurma ve çözüm sonrasında en yüksek motiliteyi %68.36±11.71 ile %4 gliserollü sütlü sulandırıcıda elde etmiştir. Araştırmacı buna en yakın bulguları %60.02±13.21 ile Tris sulandırıcısında saptadığını bildirmiştir.

Hopkins ve Evans (24), gliserol içeren Pipes-sitrat-yumurta sarısı sulandırıcısı ile 1/1 oranında damlalar şeklinde sulandırdıkları spermanın ısısını buzdolabında 30 dak.'da +5°C'ye soğutmuşlardır. Soğutulan sulandırılmış sperma, ısısı +5°C'deki sulandırıcı ile 1/2 oranında sulandırılıp 0.5 ml.lik payetlere çekilmiştir. Payetler sıvı azot buharında yaklaşık 8 dakikada dondurulup sıvı azot içinde depolanmış ve çözüm sonrasında %30 motilite oranı saptamıştır.

Donmuş Köpek Spermasının Çözülmesi:

Araştırmacılar tarafından donmuş köpek sperması için çeşitli çözme yöntemleri bildirilmiştir (2,14,17,48,52). Dondurdukları sperma örneklerini, Oettle (13), 35°C'lik su banyosunda 1 dakikada, Howard ve Pace (28), 37°C'de 30 sn'de, Theret ve ark. (48), 37°C' de 60 sn'de çözdüklerini bildirirlerken, Andersen (43) ise 0.5 ml.lik payetleri 75°C'de 6.5 sn'de, 0.25 ml.lik payetlere ise 75°C 5 sn'de çözdüğünü belirtmiştir. Linde-Forsberg (41), 0.5 ml.lik payetlerin 37°C'de 15 sn'de veya 6 sn'de,

35°C'de 30 sn'de veya 2 dakikada, 75°C'de 6.5 sn'de ya da 70°C'de 8 sn'de veya 12 sn'de çözülebileceğini bildirirken, 0.25 ml.lik payetlerin ise 75°C'lik su banyosunda 5 sn'de çözülebileceğini ifade etmiştir.

Tris-yumurta sarısı ve laktoz-yumurta sarısı sulandırıcıları ile 0.5 ml.lik payetlerde dondurdukları spermaları, 1°C'de 2 dak.'da (yavaş), 35°C'de 30 sn'de (orta) ve 75°C'de 12 sn'de (hızlı) çözen Olar ve ark. (14), en yüksek motiliteyi hızlı çözme yönteminde bulduklarını, çözme ısıları karşılaştırıldığında motilite oranları arasında önemli bir farklılık olmadığını vurgulamışlardır.

Battista ve ark.(17), Beagle ırkı köpeklerden aldıkları spermatozoidlerden zengin fraksiyonları, Tris-sitrik asit-yumurta sarısı, laktoz-yumurta sarısı, pipes-yumurta sarısı, tes-tris-yumurta sarısı sulandırıcıları ile sulandırıp pellet şeklinde ve 0.5 ml.lik payetlerde dondurmuşlardır. Bu araştırmacılar, pelletleri 37°C'de 45 sn'de, payetleri de 37°C'de 45 sn'de veya 70°C'de 6 sn'de çözmüşler, pellet yönteminde en yüksek motiliteyi laktoz sulandırıcısında, payet yönteminde ise her iki ısı derecesinde de Tris sulandırıcısında bulmuşlardır.

Pek çok araştırmacı (19,65,68,76), çözüm sonrası motilite oranlarını %50-65 arasında bulmuşlardır. Bunun yanı sıra %30-45 oranında çözüm sonrası motiliteye sahip sperma örneklerinin de tohumlamada kullanılması gerektiği vurgulanmaktadır (4). Linde-Forsberg ve Forsberg (11), çözüm sonrası %20-30 arası motiliteye sahip donmuş-çözülmüş sperma ile gebelik elde ettiklerini belirtmişlerdir. Smith (70), köpek spermasının kriyoprezervasyonunda kullanılmak üzere 4 zwitterionik tampon sulandırıcıya (PIPES, BES, TES, TRIS), 3 potasyumlu tampon (KHCO_3 , K_3PO_4 ,

KOH) eklemiş, çözüm sonrası en iyi motilite oranını %50 PIPES/KOH, %25 sodyum sitrat ve %25 dekstrozu ile %20 yumurta sarısından oluşan sulandırıcıda bulmuştur. Araştırıcı, payet ve pellet şeklinde dondurulan spermalarda çözüm sonrası en iyi motiliteyi 0.5 ml.lik payetlerde saptadığını bildirmiştir.

Concannon ve Battista (4), kriyoprotektanlar katılmadan sulandırılan köpek spermasının dondurulması halinde, çözüm sonrası motil spermatozoa sayısında önemli oranda azalma görüldüğünü ve kullanılacak gliserol miktarının hayvan türlerine göre değiştiğini ifade etmişlerdir. Garner (58), gliserolün sulandırılmış spermaya yavaş yavaş ya da kademeli olarak katılması halinde çözüm sonrası en yüksek progresif motilite yüzdesinin elde edilebileceğini vurgulamıştır.

Gill ve ark. (68), Tris-yumurta sarısı sulandırıcısına gliserol katmadan yaptıkları dondurma işleminden sonra çözüm sonrası ortalama %28 oranında motilite elde ederlerken, gliserol kattıklarında çözdükleri örneklere %40-50'den fazla motilite saptadıklarını belirtmişlerdir. Foote (78), ampul yöntemi ile dondurduğu sperma örneklere, çözüm sonrası motilite oranını, %11 gliserol içeren Tris yumurta sarısı sulandırıcısında %41 olarak saptarken, %8 gliserol içeren sodyum sitrat yumurta sarısı sulandırıcısında %27 olarak bulmuştur.

Tris-sitrik asit-yumurta sarısı sulandırıcısı ile sulandırdığı spermaları 0.25 ve 0.5 ml.lik payetlerde donduran Dumon (65), payetleri 40°C'de 30 sn'de çözdüğünü ve çözüm sonrasında %50'den fazla motilite saptadığını ifade etmiştir. Olar ve ark.(14), yaptıkları bir çalışmada dondurdukları spermaları, 75°C'de 12 sn'de

çözdüklerindeki çözüm sonrası motilitenin 1°C'de 2 dak. veya 35°C'de 30 sn'de elde ettikleri motiliteden daha yüksek olduğunu vurgulamışlardır.

Yaşları 2-6 arasında değişen 6 adet Alman Çoban köpeğinden 18 ejakulat alan Ivanova-Kicheva ve ark.(79), Tris-fruktoz (TF), Tris-glukoz (TG) ve Sukroz-laktoz (SL) sulandırıcıları ile dondurdukları spermaları 55°C'de 5 sn'de ve 37°C 8 sn'de çözmüşlerdir. TF, TG, SL sulandırıcılarında 37°C'de çözüm sonrası motilite değerleri sırası ile %27.77±0.89, %26.11±0.63, %29.44±0.87 iken, 55°C'de %34.72±0.62, %29.27±0.62 ve %39.33±0.96 olarak bulunmuştur. Aynı araştırmacılar, 55°C'de 5 sn çözme ısısının spermatozoanın depolanmasında 37°C'de 8 sn'den daha etkili olduğunu, -196°C' den 55°C'ye hızlı ısı artışının belki de intrasellüler kristalizasyonu önlediğini belirtmişlerdir.

Farstad ve Berg (19), 0.5 ml.lik payetlerde dondurdukları spermaları, 70°C'de 8 sn'de çözdüklerini ve çözüm sonrası motiliteyi %40-80 bulduklarını, Theret ve ark.(48) ise 37°C'de 60 sn'de çözdüklerini ve %60-80 arasında motilite tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Penis masajı ile aldıkları spermaları payet yöntemi ile dondurduklarını belirten Nothling ve Volkmann (18), çözme işlemini 35°C'de 2 dak.'da gerçekleştirdiklerini ve %35'ten fazla motiliteye sahip donmuş spermaları tohumlamada kullandıklarını ifade etmişlerdir. Yedi köpekten aldıkları 21 ejakulatı pelletlerde, 0.5 ve 2.5 ml.lik payetlerde, Tris-sitrat ve Bes-laktoz sulandırıcıları ile donduran Thomas ve ark. (80), kullandıkları sulandırıcıların hangi dondurma metodunda en yüksek çözüm sonrası motiliteye sahip olduklarını belirlemeyi

amaçlamışlardır. Çözme işlemini 37°C'de 30 sn'de yaptıklarını belirten araştırmacılar en yüksek motiliteyi hem Tris-sitrat hem de Bes-laktoz sulandırıcısı için pellet formunda elde etmişlerdir. 0.5 ve 2.5 ml.lik payetlerden elde edilen motilite oranları karşılaştırıldığında, çözüm sonrası motilite oranı, Bes-laktoz sulandırıcısında 2.5 ml.lik payetlerde daha yüksek iken, Tris-sitrat sulandırıcısında 0.5 ml.lik payetlerde daha yüksek bulunmuştur.

Donmuş Köpek Spermasının Kullanım Avantajları:

Donmuş köpek spermasının kullanımının en büyük yararlarından birisi farklı ülkelerden köpek ırklarının yetiştirilebilme kolaylığıdır (81). Farklı ırk köpek spermalarının ithal edilmesi günümüzde bazı ırklarda yaygın olan kalıtsal defektleri azaltmada ve hatta eradike etmede yardımcı olmaktadır. Dünya çapındaki uygun damızlık köpeklerin seçiminin, potansiyel olarak yetiştiricilere kalıtsal hastalıkları elimine etmede şans tanıyacağı bildirilmektedir (42,55,81,82).

Değerli genetik hatlar, donmuş spermanın depolanması ile korunabilmektedir (82-84). Spermanın alınıp dondurulması ve depolanması ile arzu edilen bazı karakterleri taşıyan yeni nesiller üretmeye devam edilebilmektedir. Ayrıca spermanın depolanması, damızlık bir köpeğin zamansız ölümü ya da bir yetiştirme programı sırasında steril kalması veya olabilecek bir kazaya karşı spermanın korunmasını sağlamaktadır (3,81). Eğer köpek çiftleşmeyi engelleyecek bir kaza geçirirse donmuş sperma, dişi bir köpek kızgınlık dönemine girdiğinde büyük değer taşır. Spermanın dondurulması, genital yolla bulaşan hastalıkların yayılmasının sınırlanması açısından önemlidir. Diğer bir avantajı da dişi köpeklerin seçilmiş eşleri ile çiftleşmek üzere yapacakları uzun yolculukların önüne geçilmesidir (81).

Böylece nakliye sırasında stresten oluşan etkileri dişilerden elimine etmek mümkün olmaktadır (47,85,86).

Donmuş spermanın başlıca kullanım amaçlarını kısaca özetleyecek olursak;

- Arzu edilen genetik özelliklerin yayılmasını sağlamak,
- Araştırma gruplarında yer alan damızlık erkek köpeklerin sayısını azaltmak,
- Köpekler arasında çiftleşme ile bulaşan hastalıkları önlemek,
- Spermayı erkeğin üreme yaşamı dışında da koruyabilmek,
- Kalıtsal hastalıklar yönünden test edilmiş ırkların kullanımında yarar sağlamak,
- Spermanın çok uzak mesafelere naklini mümkün kılmak,
- Üstün genetik özelliklere sahip köpeklerin spermalarının hazır olarak elde var olması ile köpek ırklarının genetik ilerlemesine katkıda bulunabilmektir.

Sunulan çalışmada, köpek spermasının farklı sulandırıcılarla sulandırılarak payet yöntemi ile dondurulması ve dondurmanın sulandırma, +5°C'ye soğutma, gliserolizasyon, ekilibrasyon ve çözüm sonrası aşamalarından elde edilen spermatolojik özelliklerinin incelenmesi ve karşılaştırılması, çözüm sonrasında en iyi spermatolojik özelliklere sahip sulandırıcı tipinin belirlenmesi, başka bir deyişle farklı sulandırıcıların ve payet yöntemi ile dondurmanın köpek spermasının motilite ve morfolojik özellikleri üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmada materyal olarak, Gemlik Askeri Veteriner Okulu ve Eğitim Merkez Komutanlığı Köpek Üretim Bölüğünde bulunan 10 adet Kurt Köpeği (Alman Çoban Köpeği; German Shepherd Dog) kullanıldı. Çalışmada kullanılan köpeklerin bakım ve beslenme şartlarında herhangi bir değişiklik yapılmadı.

1. Köpeklerden Spermanın Alınması ve Spermatolojik Özelliklerin

Değerlendirilmesi:

Araştırmada kullanılan spermalar el masajı (Onani) yöntemi ile alındı. Sperma alınırken o gün östrusta olan dişi köpekler kullanıldı. Sperma alma işlemi iki günde bir ve köpeklerin çiftleşmeye alışık oldukları ortamda yapıldı. Her köpekten 5'er olmak üzere 50 ejakulat alındı.

Sperma alınırken steril cerrahi eldiven kullanıldı ve eldivenin yüzeyine kayganlığı sağlamak için vazelin, herhangi bir enfeksiyon riskine karşı da antibiyotikli bir pomat sürüldü. Köpeğin sol tarafından yaklaşılarak prepusyuma yapılan el masajı ile bulbus glandis uyarıldı. Uyarım ile ereksiyon sağlandı ve prepusyal kılıf bulbus glandisi açığa çıkaracak şekilde kaydırıldı. Ereksiyondan dolayı şişmeye başlayan bulbus glandis baş ve işaret parmakları ile kavrandıktan sonra penis doğal çiftleşmeye benzer şekilde köpeğin arka bacakları arasından geriye çevrildi. Bulbusa avuç içi ile yapılan ritmik basınçlarla ejakulasyonun başlaması sağlandı. Spermatozodan zengin olan ikinci fraksiyon, renk ve kıvam

değişimleri gözlenerek diğer elde bulunan ısıtılmış sperma toplama kadehine alındı. Kadeh avuç içinde tutularak ısısı 37°C'ye ayarlanmış su banyosuna yerleştirildi. Froti için kullanılan boyalar ile serum fizyolojik aynı su banyosunda, cam malzeme de ısısı 37°C'ye ayarlanmış etüv içersinde saklandı.

Spermanın değerlendirilmesinde aşağıdaki kriterlere bağlı kalındı:

1.1. Sperma Hacmi:

Dereceli sperma toplama kadehinden okunup ml. olarak kaydedildi.

1.2. Spermatozoa Motilitesi:

Mikroskobun ısıtıcı tablasında bulunan lam üzerine 1 damla serum fizyolojik ve küçük bir damla da sperma damlatılıp karıştırılarak üzerine lamel kapatıldı. Motilite, x 40 büyütmede üç ayrı sahada ileri yönde hareket eden spermatozoitler incelenip ortalamaları alınarak % olarak belirlendi.

1.3. Sperma Rengi:

Spermatozodan zengin ikinci fraksiyonun rengi, çıplak gözle değerlendirildi.

1.4. Spermatozoa Yoğunluğu:

Spermatozoa yoğunluğu birim hacimde bulunan spermatozoa sayısı olarak değerlendirilip "hemositometrik yöntem" ile saptandı. Bu yöntemde sulandırma eritrosit sayma pipetinin 0.5 çizgisine kadar taze sperma, 101 çizgisine kadar da %3'lük sodyum klorür solüsyonu çekilerek yapıldı. Thoma lamında, köşelerdeki 4 büyük ve ortadaki herhangi bir karede bulunan spermatozoitler sayılarak yoğunluk $\times 10^6/\text{ml}$ cinsinden hesaplandı.

1.5. Spermannın pH Değeri:

Özel renk skalası bulunan pH indikatör kağıdına bir damla sperma damlatılarak saptandı.

1.6. Ölü-Canlı Spermatozoa Oranının Saptanması:

Ölü-canlı spermatozoa oranını saptamak için eosin-nigrosin boyama tekniğinden yararlanıldı (39). Önce 5 gr eosin distile suda eritilerek %5'lik solüsyonu hazırlandı. Aynı şekilde nigrosinin de %10'luk solüsyonu hazırlandı. %5 eosin solüsyonundan 1 kısım, %10 nigrosin solüsyonundan da 4 kısım karıştırılarak eosin-nigrosin boyası elde edildi. Lam üzerine 1 damla eosin-nigrosin ana solüsyonundan yanına da 1 damla serum fizyolojik ve üzerine 1 damla sperma damlatılarak birbirleri ile karıştırıldı ve sürme froti hazırlanarak havada kurutuldu. Ölü spermatozoitler eosin boyasının rengini alarak kırmızı renkte görünürken, boyayı almamış renksiz görünen spermatozoitler canlı olarak değerlendirildi. Hazırlanan preparatlar faz kontrast mikroskopun immersiyon objektifi (x100) ile muayene edildi. Her preparat 333 adet spermatozoa sayılarak değerlendirildi. Boya alan spermatozoa sayısı 3 ile çarpılıp 10'a bölünerek ölü spermatozoa oranı % olarak hesaplandı.

1.7. Morfolojik Muayene:

Sperm hücrelerinin morfolojisi ;

- Başa ait bozukluklar
- Orta kısma ait bozukluklar
- Kuyruk kısmına ait bozukluklar

•Akrozomal bozukluklar, olarak dört kısımda incelendi. Baş, orta, kuyruk kısımları ile akrozomal bozuklukların toplamı "toplam morfolojik bozukluklar" olarak değerlendirildi. Akrozom defektli spermatozoa oranını saptamak için Giemsa boyama yöntemi kullanıldı (37). 10 damla Giemsa ana solüsyonu, 5 ml. distile su ile karıştırılarak Giemsa boyası elde edildi. Lam üzerine bir damla serum fizyolojik bir damla da taze sperma konularak froti çekildi ve kuruması beklendi. Hazırlanan froti 10 dak. metil alkolde tespit edildi. Metil alkol döküldükten sonra frotilerin üzerine Giemsa boyası yayılarak 30 dak. beklendi. Boyama işleminden sonra preparatlar distile su ile yıkanarak kurutuldu. Hazırlanan preparatlar, faz kontrast mikroskopun immersiyon objektifinde (x100) incelendi. Her preparattan toplam 333 adet spermatozoit sayılarak akrozomal bozukluğa sahip spermatozoitlerin sayısı 3 ile çarpılıp 10'a bölünerek akrozomal bozukluk oranı % olarak hesaplandı.

Baş, orta kısım ve kuyruğa ait morfolojik bozuklukların incelenmesinde, ölücanlı spermatozoa oranının saptanmasında kullanılan eosin-nigrosin boyama ve hesaplama yöntemi kullanıldı. Tüm boyama yöntemlerinde cam malzemenin steril, lam, lamel ve boyaların sperma ile aynı ısıda ve boyaların taze olmasına dikkat edildi.

2. Spermmanın Sulandırılması ve Dondurulması:

2.1. Tris-Yumurta sarısı ve Sodyum sitrat-Yumurta sarısı

Sulandırıcılarının Hazırlanması:

Çalışmada kullanılan sulandırıcıların hazırlanmasında günlük taze tavuk yumurtaları kullanıldı. Yumurtaların kabukları alkolle silindikten sonra kurutuldu ve ortadan ikiye bölünerek bir kurutma kağıdı üzerinde akı ile sarısı birbirinden ayrıldı.

Toplanan yumurta sarıları vitellin membran ayrıldıktan sonra dereceli bir mezüre aktarıldı.

2.1.1. Tris-Yumurta sarısı (T-YS) Sulandırıcısının Hazırlanması (63):

TRİS (hidroksimetil aminometan).....	3.025 g
Sitrik asit.....	1.70 g
Fruktoz.....	1.25 g
Penisilin.....	1000 IU/ml
Streptomisin.....	1 mg/ml
Yumurta sarısı.....	20 ml
Bidistile su.....q.s.p..	100 ml

2.1.2 Sodyum sitrat-Yumurta Sarısı (SS-YS) Sulandırıcısının

Hazırlanması (25):

Sodyum sitrat dihidrat	1.45 g
Glukoz.....	1.25 g
Glisin.....	0.93 g
Penisilin.....	1000 IU/ml
Streptomisin	1 mg/ml
Yumurta sarısı	20 ml
Bidistile su	q.s.p.. 100 ml

Çalışmada kullanılan köpeklerden sperma örnekleri alınıp spermatolojik özellikleri incelendikten sonra sperma iki eşit hacme ayrıldı ve ısısı 37°C'ye ayarlanmış su banyosuna konuldu. Her bir hacim sperma aynı su banyosunda bulunan gliserol içermeyen T-YS ve SS-YS sulandırıcıları ile 1:1 oranda sulandırıldı. Dereceli cam tüpte bulunan T-YS ve SS-YS ile sulandırılmış sperma içerisinde 37°C su bulunan cam bir behere konularak ısısı +5°C olan buzdolabına yerleştirildi. Bu sırada gliserol içeren T-YS ve SS-YS sulandırıcıları da aynı behere konuldu. Spermanın ısısı, kademeli olarak spermaya değmeyecek şekilde beherdeki suya küçük buz parçaları atmak sureti ile 2 saatte +5°C'ye soğutuldu. Sulandırılmış spermanın ısısı bu süre içinde behere yerleştirilmiş bir termometre yardımı ile ölçüldü.

2.1.3. %4 Gliserollü T-YS ve SS-YS Sulandırıcılarının Hazırlanması:

%8 Gliserollü T-YS Sulandırıcısının Hazırlanması:

T-YS sulandırıcısı : 92 ml

Gliserol : 8 ml

100 ml

%8 Gliserollü SS-YS Sulandırıcısının Hazırlanması:

SS-YS sulandırıcısı : 92 ml

Gliserol : 8 ml

100 ml

Isısı +5°C'de bulunan T-YS sulandırıcısı ile işlem görmüş sperma kendi hacmi kadar %8 gliserollü T-YS sulandırıcısı ile, SS-YS ile işlem görmüş sperma da

kendi hacmi kadar %8 gliserol içeren SS-YS sulandırıcısı ile finalde % 4 gliserol içerecek şekilde sulandırıldı. Gliserolizasyon olarak adlandırılan bu işlem 5'er dak. aralıklarla 10 eşit hacimde ve 50 dak.da tamamlandı. Bu süre sonunda spermalar +5°C'de 2 saat süre ile ekilibrasyona bırakıldı. Dondurma işlemine başlamadan önce strafor bir kutunun içine sıvı azot dolduruldu ve sıvı azot yüzeyinin yaklaşık 4 cm üzerine tel bir ızgara yerleştirildi. Sıvı azotun ısını ölçen dijital termometrenin probu da tel ızgaranın üzerine konularak straforun üzeri cam bir kapakla kapatıldı. +5°C'de ekilibrasyonu tamamlamış sulandırılmış sperma örnekleri payet yöntemine göre donduruldu. Bu amaçla 0.5 ml.lik polivinil klorid (PVC) payetler kullanıldı. Payetlerin açık olan uçları spermaya daldırılarak 0.5 ml sperma çekildi. Payetlerin açık uçları taraklanıp bir petri kutusu içindeki polivinil piroolidon (PVP) tozuna batırılarak kapatıldı. Payetler ısı +5°C'de olan soğuk suya daldırılarak kapama tozunun katılması sağlandı. Ardından payetler sudan çıkarılarak dikkatlice kurulandı. Önceden hazırlanan ve dijital termometre ile ölçülen azot buharının ısı -120°C'ye ulaştığında azot buharının geçmesine izin veren tel ızgara üzerine payetler bir pens aracılığı ile üst üste gelmeyecek şekilde aralıklı olarak dizildiler. Payetler -120°C' deki sıvı azot buharında 7 dak. süre ile bekletilip donduruldular. Bu süre sonunda payetler bir pensle straforun içinde bulunan -196°C' deki sıvı azotun içine daldırılarak 30 dak. bekletildiler. Daha sonra payetler pensle alınarak saha konteynerinde her köpek için ayrı numaralı kanisterlerde bulunan gobletlere konularak hemen sıvı azot içine daldırılıp saklandılar. Karışıklığa yol açmamak

amacıyla her köpek için ayrı renk payet ve kapama tozu kullanılmasına dikkat edildi.

3. Payetlerin Çözülmesi:

0.5 ml.lik payetlerde dondurulan spermalar 37°C'lik su banyosunda 30 sn'de çözüldüler. Her köpek için iki farklı sulandırıcı grubunun her birinden 5 adet olmak üzere toplam 100 adet payet çözüldü.

Çalışmada, taze spermada, sulandırma, +5°C'ye soğutma, gliserolizasyon, ekilibrasyon ve çözüm sonrası aşamalarda motilite ve morfolojik muayeneler yapıldı ve elde edilen sonuçlar kaydedildi. Aynı işlem 5 kez yinelendi.

4. Sonuçların İstatistiksel Açıdan Değerlendirilmesi:

Spermatolojik bulguların istatistiksel değerlendirilmesinde t-testi kullanıldı (87).

BULGULAR

1.Taze Spermada Saptanan Spermatolojik Özellikler:

Çalışmada kullanılan 10 adet Kurt Köpeğinin her birinden spermatolojik özelliklerini değerlendirmek amacıyla alınan 5'er ejakulattan genel ortalama olarak 1.6 ± 0.06 ml hacim, $\%85.7 \pm 0.55$ motilite, $431.9 \pm 15.80 \times 10^6$ /ml spermatozoa yoğunluğu, $\%6.1 \pm 0.44$ ölü spermatozoa ve 6.4 ± 0.00 pH değeri saptandı. Morfolojik olarak $\%0.8 \pm 0.09$ akrozom, $\%1.7 \pm 0.13$ baş, $\%0.7 \pm 0.09$ orta ve 2.8 ± 0.24 kuyruk anomalileri olmak üzere toplam $\%6.1 \pm 0.34$ bozukluk tespit edildi. (Tablo 1).

2.Tris ve Sodyum Sitrat Sulandırıcıları ile Sulandırılan Spermalarda Ekilibrasyon Aşamasına Kadar Saptanan Spermatolojik Özellikler:

Tris sulandırıcısı ile sulandırma sonrası tüm köpeklerde saptanan ortalama motilite, ölü spermatozoa, akrozom, baş, orta, kuyruk ve toplam morfolojik bozukluk oranları sırası ile $\%82.7 \pm 0.87$, $\%8.4 \pm 0.60$, $\%1.4 \pm 0.14$, $\%2.2 \pm 0.13$, $\%1.2 \pm 0.10$, $\%4.2 \pm 0.32$ ve $\%9.1 \pm 0.44$ olarak bulundu. Aynı özellikler Sodyum Sitrat sulandırıcısında ise sırası ile $\%78.1 \pm 0.71$, $\%10.1 \pm 0.62$, $\%1.5 \pm 0.16$, $\%2.5 \pm 0.15$, $\%1.2 \pm 0.11$, $\%4.5 \pm 0.33$ ve $\%9.7 \pm 0.42$ olarak saptandı (Tablo 2).

Tablo-1: 10 Adet Alman Çoban Köpeğinin Taze Spermasında Saptanan

Spermatolojik Bulgular (n=10).

Köpek no	Hacim (ml) $\bar{x}\pm S\bar{x}$	Motilite (%) $\bar{x}\pm S\bar{x}$	Spermatozoa Yoğunluğu ($\times 10^6/ml$) $\bar{x}\pm S\bar{x}$	Ölü (%) $\bar{x}\pm S\bar{x}$	PH $\bar{x}\pm S\bar{x}$	Akrozom (%) $\bar{x}\pm S\bar{x}$	Baş (%) $\bar{x}\pm S\bar{x}$	Orta (%) $\bar{x}\pm S\bar{x}$	Kuyruk (%) $\bar{x}\pm S\bar{x}$	Toplam morfolojik bozukluk (%) $\bar{x}\pm S\bar{x}$
1	1.9±0.08	83.0±1.22	312.0±12.40	7.5±0.16	6.4±0.00	0.3±0.09	1.6±0.17	0.5±0.18	2.5±0.15	4.9±0.48
2	1.5±0.16	89.0±1.00	424.0±38.00	4.7±0.28	6.4±0.00	0.5±0.15	2.2±0.28	0.5±0.15	0.9±0.26	4.2±0.30
3	1.4±0.17	82.0±1.22	371.0±19.90	3.4±0.17	6.4±0.00	0.8±0.11	2.5±0.22	1.9±0.15	3.2±0.20	8.6±0.39
4	1.9±0.12	90.0±0.00	590.0±11.40	2.7±0.21	6.4±0.00	1.9±0.22	1.7±0.11	0.5±0.15	5.3±0.31	8.7±0.65
5	0.9±0.10	83.0±1.22	272.4±18.00	5.0±0.16	6.4±0.00	1.9±0.26	2.5±0.68	1.4±0.39	2.2±0.20	7.9±0.47
6	1.5±0.13	86.0±1.00	430.0±22.40	8.2±0.29	6.4±0.00	0.5±0.11	0.9±0.16	0.3±0.09	4.6±0.17	6.3±0.41
7	1.8±0.18	91.0±1.00	483.6±18.90	11.5±0.28	6.4±0.00	0.2±0.07	2.2±0.17	1.0±0.12	4.9±0.31	8.8±0.59
8	1.9±0.09	81.0±1.00	450.0±23.00	7.9±0.31	6.4±0.00	0.2±0.11	2.5±0.15	0.4±0.07	1.7±0.79	5.0±0.99
9	1.1±0.12	86.0±1.00	377.2±19.40	9.0±0.16	6.4±0.00	1.7±0.07	0.4±0.11	0.3±0.16	1.6±0.15	3.9±0.29
10	2.2±0.09	89.0±1.00	608.8±7.58	1.3±0.11	6.4±0.00	0.5±0.17	1.0±0.12	0.6±0.19	0.9±0.27	3.1±0.46
Genel Ort.	1.6±0.06	85.7±0.55	431.9±15.80	6.1±0.44	6.4±0.00	0.8±0.09	1.7±0.13	0.7±0.09	2.8±0.24	6.1±0.34

Tablo-2: Tris ve Sodyum Sitrat Sulandırıcıları ile Sulandırılan Spermalarda Sulandırma Sonrası Saptanan Spermatojik Bulgular (n=50).

Sulandırıcı	Motilite (%) $\bar{x}\pm S\bar{x}$	Ölü Spermatozoa (%) $\bar{x}\pm S\bar{x}$	Akrozom (%) $\bar{x}\pm S\bar{x}$	Baş (%) $\bar{x}\pm S\bar{x}$	Orta (%) $\bar{x}\pm S\bar{x}$	Kuyruk (%) $\bar{x}\pm S\bar{x}$	Toplam Morfolojik Bozukluk(%) $\bar{x}\pm S\bar{x}$
Tris	82.7±0.87 ^a	8.4±0.60 ^a	1.4±0.14 ^a	2.2±0.13 ^a	1.2±0.10 ^a	4.2±0.32 ^a	9.1±0.44 ^a
Sodyum Sitrat	78.1±0.71 ^b	10.1±0.62 ^a	1.5±0.16 ^a	2.5±0.15 ^a	1.2±0.11 ^a	4.5±0.33 ^a	9.7±0.42 ^a

a,b: Aynı sütunda değişik harf taşıyan gruplar arası fark önemlidir (P<0.05).

Tris ve Sodyum sitrat sulandırıcıları ile sulandırılan spermaların ısısı +5°C'ye düşürüldüğünde saptanan spermatojik özellikler Tablo 3'de sunulmuştur. Tris sulandırıcısında saptanan ortalama motilite, ölü spermatozoa, akrozom, baş, orta, kuyruk ve toplam morfolojik bozukluk oranları sırası ile, %77.3±0.88, %10.7±0.58, %5.8±0.29, %2.4±0.15, %1.3±0.09, %5.2±0.30 ve %16.4±1.82 olarak tespit edildi. Belirtilen özellikler Sodyum sitrat sulandırıcısında ise sırası ile, %73.6±0.90, %12.9±0.72, %6.3±0.32, %3.1±0.15, %1.6±0.09, %5.6±0.32 ve %16.5±0.57 olarak saptandı.

Tablo-3: Tris ve Sodyum Sitrat Sulandırıcıları ile Sulandırılan Spermalarda +5°C'de Saptanan Spermatojik Bulgular (n=50).

Sulandırıcı	Motilite (%) $\bar{x}\pm S\bar{x}$	Ölü Spermatozoa (%) $\bar{x}\pm S\bar{x}$	Akrozom (%) $\bar{x}\pm S\bar{x}$	Baş (%) $\bar{x}\pm S\bar{x}$	Orta (%) $\bar{x}\pm S\bar{x}$	Kuyruk (%) $\bar{x}\pm S\bar{x}$	Toplam Morfolojik Bozukluk(%) $\bar{x}\pm S\bar{x}$
Tris	77.3±0.88 ^a	10.7±0.58 ^a	5.8±0.29 ^a	2.4±0.15 ^a	1.3±0.09 ^a	5.2±0.30 ^a	16.4±1.82 ^a
Sodyum Sitrat	73.6±0.90 ^b	12.9±0.72 ^b	6.3±0.32 ^a	3.1±0.15 ^b	1.6±0.09 ^b	5.6±0.32 ^a	16.5±0.57 ^a

a,b: Aynı sütunda değişik harf taşıyan gruplar arası fark önemlidir (P<0.05).

Tris ve Sodyum sitrat sulandırıcılarında gliserolizasyon sonrası saptanan spermatozojik özellikler Tablo 4'te gösterilmiştir. Tris sulandırıcısında saptanan ortalama motilite, ölü spermatozoa, akrozom, baş, orta, kuyruk ve toplam morfolojik bozukluk oranları sırası ile, %69.8±1.03, %15.9±0.88, %8.5±0.35, %2.9±0.18, %2.0±0.10, %6.7±0.34 ve %20.3±0.67 olarak bulundu. Aynı özellikler Sodyum sitrat sulandırıcısında sırası ile %65.3±0.97, %17.4±0.94, %9.3±0.38, %3.5±0.19, %2.4±0.11, %7.6±0.34 ve %22.7±0.69 olarak tespit edildi.

Tablo-4: Gliserolizasyon Sonrası Saptanan Spermatozojik Bulgular (n=50).

Sulandırıcı	Motilite (%) $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Ölü Spermatozoa (%) $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Akrozom (%) $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Baş (%) $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Orta (%) $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Kuyruk (%) $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Toplam Morfolojik Bozukluk (%) $\bar{x} \pm S\bar{x}$
Tris	69.8±1.03 ^a	15.9±0.88 ^a	8.5±0.35 ^a	2.9±0.18 ^a	2.0±0.10 ^a	6.7±0.34 ^a	20.3±0.67 ^a
Sodyum Sitrat	65.3±0.97 ^b	17.4±0.94 ^a	9.3±0.38 ^a	3.5±0.19 ^b	2.4±0.11 ^b	7.6±0.34 ^a	22.7±0.69 ^b

a,b: Aynı sütunda değişik harf taşıyan gruplar arası fark önemlidir (P<0.05).

Ekilibrazyon sonrası ortalama motilite, ölü spermatozoa, akrozom, baş, orta, kuyruk ve toplam morfolojik bozukluk oranları sırası ile Tris sulandırıcısında; %63.6±1.09, %19.1±0.95, %10.8±0.31, %3.8±0.25, %2.0±0.07, %7.1±0.33 ve %23.8±0.60 iken Sodyum sitrat sulandırıcısında; %59.6±0.99, %21.4±1.11, %11.9±0.34, %4.3±0.25, %2.4±0.08, %8.1±0.35 ve %26.9±0.62 olarak saptandı (Tablo 5).

Tablo-5: Ekilibrasyon Sonrası Saptanan Spermatojistik Bulgular (n=50).

Sulandırıcı	Motilite (%) $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Ölü Spermatozoa (%) $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Akrozom (%) $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Baş (%) $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Orta (%) $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Kuyruk (%) $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Toplam Morfolojik Bozukluk(%) $\bar{x} \pm S\bar{x}$
Tris	63.6±1.09 ^a	19.1±0.95 ^a	10.8±0.31 ^a	3.8±0.25 ^a	2.0±0.07 ^a	7.1±0.33 ^e	23.8±0.60 ^e
Sodyum Sitrat	59.6±0.99 ^b	21.4±1.11 ^a	11.9±0.34 ^b	4.3±0.25 ^a	2.4±0.08 ^c	8.1±0.35 ^f	26.9±0.62 ^f

a,b: Aynı sütunda değişik harf taşıyan gruplar arası fark önemlidir (P<0.05).

3.Tris ve Sodyum sitrat Sulandırıcılarında Çözüm Sonrası Saptanan Spermatojistik Özellikler:

Çözüm sonrası motilite ve morfolojik muayenelerde elde edilen ortalama değerler Tablo 6' da sunulmuştur. Tris sulandırıcısında çözüm sonrası ortalama motilite, ölü spermatozoa, akrozom, baş, orta, kuyruk ve toplam morfolojik bozukluk oranları sırası ile, %53.8±1.59, %27.6±1.42, %23.6±1.12, %5.4±0.28, %2.4±0.08, %8.8±0.34 ve %40.6±1.35 olarak; Sodyum sitrat sulandırıcısında ise sırası ile, %48.0±1.46, %30.7±1.47, %26.9±1.18, %5.9±0.28, %2.8±0.09, %9.7±0.34 ve %45.4±1.39 olarak saptandı.

Tablo-6: Çözüm Sonrası Saptanan Spermatojistik Bulgular (n=250)

Sulandırıcı	Motilite (%) $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Ölü Spermatozoa (%) $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Akrozom (%) $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Baş (%) $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Orta (%) $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Kuyruk (%) $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Toplam Morfolojik Bozukluk(%) $\bar{x} \pm S\bar{x}$
Tris	53.8±1.59 ^a	27.6±1.42 ^a	23.6±1.12 ^a	5.4±0.28 ^a	2.4±0.08 ^a	8.8±0.34 ^a	40.6±1.35 ^a
Sodyum Sitrat	48.0±1.46 ^b	30.7±1.47 ^a	26.9±1.18 ^b	5.9±0.28 ^a	2.8±0.09 ^b	9.7±0.34 ^a	45.4±1.39 ^b

a,b: Aynı sütunda değişik harf taşıyan gruplar arası fark önemlidir (P<0.05).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Araştırmada kullanılan 10 adet Kurt Köpeğinden 5'er ejakulat alınmış ve bireysel spermatolojik özellikleri saptanmıştır (Tablo 1). Köpeklerde en yüksek ve en düşük değerler olarak 2.2 ± 0.09 - 0.9 ± 0.10 ml hacim, $\%91.0 \pm 1.00$ - $\%81 \pm 1.00$ motilite, $608.8 \pm 7.58 \times 10^6/\text{ml}$ - $272.4 \pm 18.00 \times 10^6/\text{ml}$ spermatozoa yoğunluğu, $\%9.0 \pm 0.16$ - $\%1.3 \pm 0.11$ ölü spermatozoa oranı ve $\%1.9 \pm 0.26$ - $\%0.2 \pm 0.07$ 'si akrozoma, $\%2.5 \pm 0.68$ - $\%0.4 \pm 0.11$ başa, $\%1.9 \pm 0.15$ - $\%0.3 \pm 0.09$ orta kısma, $\%5.3 \pm 0.31$ - $\%0.9 \pm 0.26$ kuyruğa ait olmak üzere $\%8.8 \pm 0.59$ - $\%3.1 \pm 0.46$ toplam morfolojik bozukluk bulunmuştur. 10 köpeğin genel ortalama spermatolojik özellikleri ise 1.6 ± 0.06 ml hacim, $\%85.7 \pm 0.55$ motilite, $431.9 \pm 15.80 \times 10^6/\text{ml}$ spermatozoa yoğunluğu, $\%6.1 \pm 0.44$ ölü spermatozoa, 6.4 ± 0.00 pH, $\%0.8 \pm 0.09$ akrozoma, $\%1.7 \pm 0.13$ başa, $\%0.7 \pm 0.09$ orta kısma ve $\%2.8 \pm 0.24$ kuyruğa ait olmak üzere toplam $\%6.1 \pm 0.34$ toplam morfolojik bozukluk elde edilmiştir.

Sunulan çalışmada taze spermada saptanan spermatolojik özelliklerin normal sınırlar içerisinde bulunduğu, çoğu araştırmacının (11,23,31,37,55,82,83) buldukları değerlerle benzerlik gösterdiği ve alınan spermaların dondurmaya elverişli olduğu tespit edilmiştir. Taze spermada saptanan başlangıç motilitesi spermanın dondurulmasında en önemli kriterlerdendir (20,41,58). Çok sayıda araştırmacı

köpeklerde taze spermanın %70-90 oranında motiliteye sahip olması gerektiğini vurgulamışlardır (11,22,47,56,57). Sunulan çalışmada elde edilen ortalama %85.7±0.55 motilite değeri spermanın dondurulması için yeterli düzeyde bulunmuştur. Ayrıca elde edilen sperma hacminin Tekin ve ark.'nın (6), Alman Çoban Köpeklerinde saptadıkları değerden biraz düşük olmakla beraber normal sınırlar içerisinde olduğu ileri sürülebilir. Erkek köpeklerden elde edilen spermatolojik özellikler arasında saptanan farklılıklar sperma alma yöntemine, çevresel faktörlere, ırka hatta bireye bağlı olarak değişkenlik gösterebilir (1,6,23,27,50,59). Çalışmada taze spermada saptanan ölü ve anormal spermatozoa oranı bazı araştırmacıların (1,5,20) değerlerinden daha düşük bulunmuştur. Akrozom defektli spermatozoa oranı da yine bazı araştırmacıların (1,62-64) sonuçlarından daha düşük saptanmıştır.

Sulandırma sonrası elde edilen motilite bulguları değerlendirildiğinde Tris sulandırıcısının Sodyum sitrat sulandırıcısına göre daha yüksek motiliteye sahip olduğu dikkati çekmektedir ($P<0.05$). Her iki sulandırıcıda saptanan morfolojik bozukluklar ise istatistiksel olarak benzer bulunmuştur (Tablo 2).

+5°C'ye soğutma sonrası elde edilen motilite ve morfolojik bozukluklar Tablo 3'de sunulmuştur. Bu aşamada Tris ve Sodyum sitrat sulandırıcıları arasında motilite, ölü spermatozoa, baş ve orta kısma ait morfolojik bozukluklar açısından istatistiksel olarak fark saptanmıştır ($P<0.05$). Pek çok araştırmacı köpek spermasının sulandırılması ve +5°C'de depolanmasında gerek Tris sulandırıcısının (15,32,48,63,68,78), gerekse Sodyum sitrat sulandırıcısının (12,15,22,25,43,73)

başarılı sonuç verdiğini belirtmişlerdir. Soğutma sırasında spermatozoa viabilitesinin ve fonksiyonunun korunması soğutma hızına, depolama ısısına ve kullanılan sulandırıcının çeşidine bağlı olarak değişmektedir (14). Sunulan çalışmada +5°C’de elde edilen spermatojik bulguların genel olarak literatürlerde bildirilenlerle uyum içerisinde olduğu gözlenmektedir (15,62,66,69). Sulandırma safhasına oranla +5°C’ye soğutma aşamasında toplam morfolojik bozukluk oranlarının önemli derecede arttığı dikkati çekmekle beraber her iki sulandırıcıda toplam morfolojik bozukluk oranları arasında fark gözlenmemiştir.

Gliserolizasyon sonrası Tris ve Sodyum sitrat sulandırıcılarından elde edilen motilite ve morfolojik değerler Tablo 4’te gösterilmiştir. Her iki sulandırıcıda da %4 gliserol oranı kullanılmış olup en yüksek motilite Tris sulandırıcısında saptanmıştır (P<0.05). Yüksek gliserol oranlarının özellikle akrozom başta olmak üzere spermatozoada önemli hasarlara neden olduğu bildirilmektedir (71,84).

Ekilibrasyon sonrasında da yine Tris sulandırıcısında elde edilen motilite değeri daha yüksek bulunmuştur (P<0.05). Ölü spermatozoa oranı ile akrozom, baş, orta kısım ve kuyruğa ait morfolojik bozukluklar incelendiğinde, gliserolizasyon sonrasında her iki sulandırıcıda baş ve orta kısım, ekilibrasyon sonrasında ise akrozom, orta kısım ve kuyruğa ait morfolojik bozukluklar arasında farklılıklar gözlenmiştir (P<0.05). Dondurma işleminin gliserolizasyon ve ekilibrasyon evrelerinde saptanan spermatojik özelliklerle ilgili literatür verileri elde edilemediğinden tartışma olanağı bulunamamıştır. Ancak bu evrelerde elde edilen değerlerin normal sınırlar içerisinde olduğu söylenebilir. Özellikle +5°C’de ve gliserolizasyondan sonraki spermatojik özelliklerde bir kötüleşmenin olduğu

dikkati çekmektedir. Nitekim bu sonucun şaşırtıcı olmadığı çünkü spermatozoanın soğuk şokuna karşı duyarlı olduğu ve sperma sulandırıcılarına katılan gliserolün kristal buz oluşumuna ve dondurma sırasında elektrolitlerin konsantrasyonundaki azalmaya engel olduğu ancak az da olsa spermatozoa üzerine zararlı etkisinin olduğu bilinmektedir (10,88).

Köpek spermasını pellet yöntemi ile donduran ve farklı gliserol oranlarını tartışan Baran (77), süt ve Tris sulandırıcılarında %4 gliserol oranının optimal olduğunu belirtmiştir. Sunulan çalışmada çözüm sonrası saptanan spermatolojik bulgular (Tablo 6) incelendiğinde en yüksek motilite 53.8 ± 1.59 ile Tris sulandırıcısında elde edilmiştir. Motilite, akrozom, baş ve toplam morfolojik bozukluklar arasında istatistiksel açıdan fark saptanmıştır ($P < 0.05$). Pek çok araştırmacı Tris sulandırıcısının köpek spermasının dondurulmasında en iyi sonucu verdiğini bildirmiştir (14,27,43,65,80,88,89). Bunun yanında dondurma amacıyla Sodyum sitrat sulandırıcısının da kullanılabileceğini belirten çalışmalarda bulunmaktadır (21,78).

Köpeklerde dondurma ve çözme periyotları sonrasında akrozomal bütünlükte belirgin bir azalma olmaktadır (9). Oettle (13), akrozomda meydana gelen hasarın sulandırma, soğutma ve ekilibrasyon periyotları boyunca arttığını ancak bu hasarın önemli derecede dondurma ve çözme safhalarından sonra oluştuğunu bildirmiştir. Sunulan çalışmada da akrozomal bozukluk oranı sulandırma, $+5^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutma, gliserolizasyon ve ekilibrasyon periyotları boyunca artmış ve en önemli artışın çözüm sonrasında oluştuğu dikkati çekmiştir. Ayrıca bu çalışmada motilitenin sulandırma ve soğutma safhalarında taze spermadan, gliserolizasyon ekilibrasyon ve

çözme safhalarında ise sulandırma ve soğutma safhalarından daha fazla oranda düştüğü gözlenmektedir. Bunun yanı sıra dondurma işleminin tüm safhalarında motilite yüksek iken akrozomal bütünlüğün daha fazla olduğu ve motilite düştükçe akrozomal bozukluk oranının arttığı dikkati çekmektedir.

Çözüm sonrası akrozomal bütünlük çözüm sonrası fertilitiyi önceden belirlemede güvenilir kriterlerden biri olabilmektedir (4,9). Ancak donmuş köpek spermasında motilite, morfoloji ve fertilitie arasındaki ilişki kapsamlı olarak araştırılmamıştır. Köpek spermasında dondurma metotlarını karşılaştırmada akrozom morfolojisini araştıran yayınların yokluğu talihsizlik olarak değerlendirilmiştir (9,18).

England ve Ponzio (85), taze spermada %88-95 normal akrozom oranı saptarlarken, bu oranın çözüm sonrasında %52-84'e düştüğünü bildirmişlerdir. England ve Verstegen (83) ise spermatozoanın en fazla dondurma ve çözme safhalarında zarar gördüğünü vurgulamışlardır. İki farklı metotla köpek spermasını Tris-fruktoz-sitrik asit sulandırıcısı ile payetlerde donduran Strom ve ark. (88), %49.6±7.1 ile %49.8±10.1 çözüm sonrası normal akrozom oranı olarak tespit etmişlerdir. Sunulan araştırmada saptanan akrozomal bozukluk oranı yukarıda bildirilen araştırmacıların (88) saptadıkları değerden düşük, England ve Verstegen'in (83) saptadıkları değerle benzer bulunmuştur. Bu çalışmada akrozomal bütünlüğün Tris sulandırıcısında Sodyum sitrat sulandırıcısından daha iyi korunduğu gözlenmiştir (P<0.05).

Köpek spermasını payet yöntemi ile donduran araştırmacılar (5,9,16,20,65,78) çözüm sonrası farklı motilite ve morfolojik bozukluk oranı saptamışlardır. Bu

araştırcılardan çoğu Tris sulandırıcısını kullanmış olup Gill ve ark. (68), 0.5ml.lik payetlerde Tris-sitrik asit-fruktoz sulandırıcısı ile dondurdukları spermalardan çözümler sonrası %40-50 oranında, Theret ve ark. (48) %60-80, Morton (32) %70-80, Christiansen (16) ve Andersen (52) %50-70, Dumon (65) ise %50'den fazla motilite elde etmişlerdir. Aynı yöntemle spermayı donduran Oettle (76) %60, Takeishi ve ark. (90) %35-50, Farstad (91) ise %30-70 oranında motilite saptadıklarını bildirmişlerdir. Foote (78), %11 gliserol içeren Tris ve %8 gliserol içeren Sodyum sitrat sulandırıcıları ile dondurduğu spermalarda çözümler sonrasında sırası ile %41 ve %27 motilite bulmuşlardır.

Thomas ve ark. (80), aldıkları spermaları Tris-sitrat ve Bes-laktoz sulandırıcıları ile 0.5 ml. ve 0.25 ml.lik payetlerde dondurmuşlar, çözümler sonrası en iyi motiliteyi 0.5ml.lik payetlerde 33.1 ± 2.3 , 0.25 ml.lik payetlerde ise 27.5 ± 3.2 ile Tris sulandırıcısında bulduklarını bildirmişlerdir. Farstad ve Berg (19), topladıkları spermaları Tris-fruktoz sulandırıcısı ile 0.5 ml.lik payetlerde dondurmuşlar ve %40-80 çözümler sonrası motilite elde etmişlerdir. Tris, Test, Laktoz ve Pipes sulandırıcıları ile 0.5 ml.lik payetlerde dondurdukları köpek spermalarını iki farklı ısıda çözen Battista ve ark. (17), çözümler sonrası en yüksek motiliteyi 37°C'de %62, 70°C'de %56 ile Tris sulandırıcısında saptamışlardır.

Dondurdukları spermalardan elde ettikleri çözümler sonrası motilite değerleri yanında ölü ve anormal spermatozoa oranını bildiren araştırcılardan Yurdaydın ve Kotzab (5), %46.25 motilite, %33.12 ölü ve %27.91 anormal spermatozoa, Yubi ve ark. (20), %30 motilite, %60 ölü, %39.0 anormal spermatozoa oranı, England ve Ponzio (85), %20-32 canlı spermatozoa, Kabasakal (92), %55 motilite ve %35

anormal spermatozoa oranı saptadıklarını bildirmişlerdir. Sunulan araştırmada ölü spermatozoa oranı araştırcıların (5,20,85) belirttikleri değerlerden daha düşük, anormal spermatozoa oranı ise daha yüksek bulunmuştur.

Yapılan araştırmalardan çözümler sonrası elde edilen motilite oranlarının %30-80 arasında olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Sunulan araştırmada, çözümler sonrası saptanan motilite değerleri bazı araştırcıların (32,48,76) buldukları değerlerden düşük, bazı araştırcıların (20,78,80) değerlerinden yüksek, bazı araştırcıların (5,19,52,68,85,88-92) ile de benzer bulunmuştur.

Yapılan araştırmalarla sunulan çalışmadan elde edilen sonuçlar arasındaki farklılıklar çeşitli etmenlerden kaynaklanmış olabilir. Özellikle bu durumun ırka, sulandırıcı çeşitine ve dondurma tekniğindeki farklılıklara bağlı olarak şekillendiği düşünölebilir. Ayrıca yapılan araştırmalarda spermanın değişik ısı ve sürelerde çözölmeleri sonuçlarda bir ölçüde ayrıcalık yaratmış olabilir. Nitekim, Olar ve ark. (14), payetlerde donmuş köpek spermasında çözümler sonrası motilite ile çözme hızı ve ısıları arasında korelasyon bulunduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmalarda kullanılan damızlık köpekler arasında sperma kalitesi açısından farklılıklar bulunması ve buna bağlı olarak çözümler sonrası canlı spermatozoa yüzdesinde değişiklikler olabileceği düşünölebilir.

Sonuç olarak sunulan araştırmada, köpek spermasının payet yöntemi ile dondurulmasında Tris sulandırıcısının Sodyum sitrat sulandırıcısına oranla daha üstün özellikte olduğu, köpek spermatozoasının motilite ve morfolojik bütönlüğünü daha iyi koruduğu ve pratikte de rahatlıkla kullanılabilenine sonucuna varılmıştır. Bunun yanında sunulan bu araştırmada köpek spermasının dondurulması ile belli

ıktan köpeklerden genetik materyalin elde edilip depolanabileceği sonucuna varılmış ve bir ölçüde köpek yetiştiriciliğine katkıda bulunabilmeye çalışılmıştır.



KAYNAKLAR

1. **GÖKÇEN, H., SOYLU, M.K., TÜMEN, H.:** Erkek köpeklerin kimi spermatolojik özellikleri üzerinde araştırmalar, U.Ü.Vet. Fak. Derg., 10:1-2-3, 67-73, 1991.
2. **PRISCILLA, K., STOCKNER, M.S.:** Status of the canine frozen semen industry, Modern Veterinary Practice, 66:2, 98-101, 1985.
3. **NOTHLING, J.O. :** Success with intravaginal insemination of frozen-thawed canine semen, W.S.A.V.A. X.I.X. World Congress, Durban, 612-613, 1994.
4. **CONCANNON, P.W., BATTISTA, D.W.H.:** Canine semen freezing and artificial insemination, Current Veterinary Therapy, Ed. KIRK. R.W., Small Animal Practice, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1989, 1247-1259.
5. **YURDAYDIN, N., KOTZAB, E.:** Köpek spermasının dondurulması üzerinde araştırmalar, A.Ü. Vet. Fak. Derg., 34:3, 534-540, 1987.
6. **TEKİN, N., İZGÜR, H., ÖZYURT, M.:** Köpeklerde penis masajı yöntemiyle sperma alma ve başlıca spermatolojik özellikler üzerinde araştırmalar, S.Ü. Vet. Fak. Derg., 3:1, 83-95, 1987.
7. **YURDAYDIN, N.:** Köpeklerde sun'i tohumlama, A.Ü. Vet. Fak. Derg., 34:3, 486-497, 1987.

- 8. WATSON, P.F.:** Artificial insemination and the preservation of semen, Marshall's Physiology of Reproduction, Volume 2, Reproduction In The Male, Fourth edition, Ed. LAMMING, G.E., Churchill Livingstone, 1990, 769-811.
- 9. SILVA, L.D.M., VERSTEGEN, J.P.:** Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa, Theriogenology, 44:4, 571-579, 1995.
- 10. HUNTER, R.H.F.:** Physiology and Technology of Reproduction in Female Domestic Animals, Academic Press, London, 1980, 250-253.
- 11. LINDE-FORSBERG, C., FORSBERG, M.:** Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen, J.Reprod.Fert., Suppl., 39: 299-310, 1989.
- 12. PROVINCE, C.A., AMANN, R.P., PICKETT, B.W., SQUIRES, E.L.:** Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C, Theriogenology, 22:4, 409-415, 1984.
- 13. OETTLE, E.E.:** Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen, Animal Reproduction Science, 12:2, 145-150, 1986.
- 14. OLAR, T.T., BOWEN, R.A., PICKETT, B.W.:** Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws, Theriogenology, 31:2, 451-461, 1989.
- 15. LINDE-FORSBERG, C.:** Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen, Small Animal Practice, 21:3, 467-485, 1991.

- 16. CHRISTIANSEN, IbJ.:** Reproduction in the Dog and Cat, Bailliere Tindall, London, 1984, 117-123.
- 17. BATTISTA, M., PARKS, J., CONCANNON, P.:** Canine sperm post-thaw survival following freezing in straws or pellets using pipes, lactose, tris or test extenders, 11th. Int. Congr. on Anim. Reprod. and Artif. Insem., Dublin, Vol.3, 229-231, 1988.
- 18. NOTHLING, J.O., VOLKMANN, D.H.:** Effect of addition of autologous prostatic fluid on the fertility of frozen-thawed dog semen after intravaginal insemination, J. Reprod. Fert., Suppl., 47: 329-333, 1993.
- 19. FARSTAD, W., BERG, A.K.:** Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog, J. Reprod. Fert. Suppl., 39: 289-292, 1989.
- 20. YUBI, A.C., FERGUSON, J.M., RENTON, J.P., HARKER, S., HARVEY, M.J.A., BAGYENJI, B., DOUGLAS, T.A.:** Some observations on the dilutions, cooling and freezing of canine semen, J. Small Anim Prac., 28:8, 753-761, 1987.
- 21. KAWAKAMI, E., TSUTSUI, T., YAMADA, Y., YAMAUCHI, M.:** Cryptorchidism in the dog : Occurrence of cryptorchidism and semen quality in the cryptorchid dog, Jpn. J. Vet. Sci., 46:3, 303-308, 1984.
- 22. LINDE-FORSBERG, C.:** Artificial insemination in the dog, W.S.A.V.A. XIXth. World Congress, Durban, 606-611, 1994 .
- 23. ENGLAND, G.C.W., ALLEN, W.E.:** The lack of effect of parvovirus vaccination on the seminal characteristics of dogs, Vet. Res., 128: 611-612, 1991.

- 24. HOPKINS, S.M., EVANS, L.E.:** Artificial insemination, *Veterinary Endocrinology and Reproduction*, Fourth edition, Ed. McDONALD, L.E., Lea & Febiger, Philadelphia, 1989, 355-388.
- 25. KIRK, R.W.:** Dogs, *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals*, Ed. HAFEZ, E.S.E., Lea & Febiger, Philadelphia, 1970, 224-236.
- 26. SCHUBERT, C.L., SEAGER, S.W.J.:** Semen collection and evaluation for the assesment of fertility parameters in the male Dalmatian, *Canine Practice*, 16: 5, 17-21, 1991.
- 27. WRIGHT, P.J., PARRY, B.W.:** Cytology of the canine reproductive system, *Small Animal Practice*, 19:5, 851-874, 1989.
- 28. HOWARD, T.H., PACE, M.M.:** Seminal evalution and artificial insemination, *Fertility and Infertility in Veterinary Practice*, Fourth edition, Ed. LAING, A., MORGAN, W.I., Bailliere Tindall, London, 1988, 39-51
- 29. TSUTSUI, T., TEZUKA, T., SHIMIZU, T., MURAO, I., KAWAKAMI, E., OGASA., A.:** Artificial insemination with fresh semen in Beagle bitches, *Jpn. J. Vet. Sci.*, 50:1, 193-198, 1988.
- 30. SETTERGREN, I.:** Examination of the canine genital system, *Vet. Clinics of N. Am.*, 1:1, 103-118, 1971.
- 31. PINEDA, M.H.:** Reproductive patterns of dogs, *Veterinary Endocrinology and Reproduction*, Fourth edition, Ed. McDONALD, L.E., PINEDA, M.H., Lea & Febiger, Philadelphia, 1989, 460-481.

- 32. MORTON, D.B.:** Artificial insemination with frozen semen in the dog: Principles of DNA Fingerprinting, Reproductive Clinical Problem in the Dog, Ed. JONES, D.E., JOSHUA, J.O., London, 1988, 169-179.
- 33. ARTHUR, H.G., NOAKES, D.C., PEARSON, H.:** Normal sexual apparatus, in Veterinary Reproduction and Obstetrics, Sixth edition, Bailliere Tindall, W.B. Saunders, London, 1989, 509-524.
- 34. STABENFELDT, G.H., SHILLE, V.M.:** Reproduction in the dog and cat, Reproduction in Domestic Animals, Third edition, Ed. COLE, H.H., CUPPS, P.T., Academic Press, London, 1977, 257-284.
- 35. ENGLAND, G.C.W., ALLEN, W.E.:** Factors affecting the viability of canine spermatozoa II. effects of seminal plasma and blood, Theriogenology, 37:2, 373-381, 1992.
- 36. OLSON, P.N.:** Collection and evaluation of canine semen, Current Veterinary Therapy Small Anim. Prac., Ed. KIRK, R.W., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1992, 938-943.
- 37. JOHNSTON, S.D.:** Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital, Vet. Clin. of N. Am. Small Anim. Pract., 21:3, 545-550, 1991.
- 38. JOHNSTON, S.D.:** Noninfectious causes of infertility in the dog and cat, Fertility and Infertility in Veterinary Practice, Fourth edition, Ed. LARNG, J.A., MORGAN, W.J.B., WAGNER, W.C., Bailliere Tindall, London, 1988, 160-172.
- 39. İLERİ, İ.K., AK, K., PABUÇÇUOĞLU, S., USTA, S.:** Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Ders Notları, İ.Ü. Vet. Fak. Yayını, No: 59, 228-241, 1996.

- 40. OETTLE, E.E., SOLEY, J.T.:** Sperm abnormalities in the dog: A light and electron microscopic study, *Vet. Med. Rev.*, 59: 28-70, 1988.
- 41. LINDE-FORSBERG, C.:** Artificial insemination with fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog, *Sem. Vet. Med. Surg. (Small Anim.)*, 10:1, 48-58, 1995.
- 42. FELDMAN, E.C., NELSON, R.W.:** Disorders of canine male reproductive tract, *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*, Ed. Feldman, E.C., Nelson, R.W., W.B.Saunders Company, Philadelphia, 1987, 481-524.
- 43. ANDERSEN, K.:** Artificial insemination and storage of canine semen, *Current Therapy in Theriogenology*, Ed. MORROW, D.A., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1980, 661-663.
- 44. SHILLE, V.M.:** Clinical examination for reproductive disorders in the dog, *Current Therapy in Theriogenology*, Ed. MORROW, D.A., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1980, 579-583.
- 45. GUNZEL-APEL, A.R., SCHNEE, C., KRAUSE, D.:** Investigations on retrograde ejaculation in the dog, 11th. *Int. Congr. on Anim. Reprod. and Artif. Insem.*, Dublin, 4: 557-558, 1988.
- 46. SHILLE, V.M., STABENFELDT, G.H.:** Clinical reproductive physiology in dogs, *Current Therapy in Theriogenology*, Ed. MORROW, D.A., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1980, 571-574.
- 47. SODERBERG, S.F.:** Canine Breeding Management, *Small Animal Practice*, 16:3, 419-433, 1986.

- 48. THERET, M., TREIZE, G., DUMON, C.:** Artificial insemination of the bitch using the osiris gun, *Modern Veterinary Practice*, 68:4, 229-230, 1987.
- 49. LARSEN, R.E.:** Infertility in the male dog, *Current Therapy in Theriogenology*, Ed. MORROW, D.A., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1980, 646-654.
- 50. AMANN, R.P.:** Reproductive physiology and endocrinology of the dog, *Current Therapy in Theriogenology*, Ed. MORROW, D.A., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1986, 532-538.
- 51. PINEDA, M.H.:** Male reproduction, *Veterinary Endocrinology and Reproduction*, Fourth edition, Ed. McDONALD, L.E., Lea & Febiger, Philadelphia, 1989, 278-301.
- 52. ANDERSEN, K.:** Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique, *Zuchthygiene*, 10:1, 1-4, 1975.
- 53. PIRLOT, A., HENROTEAUX, M., ECTORS, F.:** Insemination artificielle canine et conservation du sperme, *Ann. Med. Vet.*, 132:7, 607-610, 1988.
- 54. ENGLAND, G.C.W., ALLEN, W.E.:** An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculate, *Res. in Vet. Sci.*, 49:1, 66-70, 1990.
- 55. SEAGER, S.W.J.:** Semen collection and evaluation in the dog, *Current Therapy in Theriogenology 2*, Ed. MORROW, D.A., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1986, 539-541.

- 56. MICKELSEN, W.D., MEMON, M.A., ANDERSON, P.B., FREEMAN, D.A.:** The relationship on semen quality to pregnancy rate and litter size following artificial insemination in the bitch, *Theriogenology*, 39: 553-560, 1993.
- 57. ARTHUR, H.G., NOAKES, D.C., PEARSON, H.:** Artificial insemination in *Veterinary Reproduction and Obstetrics*, Sixth edition, Bailliere Tindall, W.B. Saunders, London, 1989, 567-581.
- 58. GARNER, D.L.:** Artificial insemination, *Reproduction in Domestic Animals*, Fourth edition, Academic Press, London, 1991, 260-266.
- 59. MEYERS-WALLEN, V.N.:** Clinical approach to infertile male dog with sperm in the ejaculate, *Vet. Clinics of N. Am.: Small Anim. Prac.*, 21:3, 609-633, 1991.
- 60. GOMES, W.R.:** Artificial Insemination, *Reproduction in Domestic Animals*, Third edition, Ed. COLE, H.H., CUPPS, P.T., Academic Press, London, 1977, 257-284.
- 61. JOHNSTONE, I.:** Breeding difficulties with a stud dog, *Australian Veterinary Journal*, 62:2, 65, 1985.
- 62. BÜYÜKÇOBAN, M.:** Kurt ve Kangal Irkı Köpeklerin Taze ve Sulandırılmış Spermalarının Spermatolojik Özellikleri ve Viabilitesi Üzerinde Araştırmalar, Doktora Tezi, Bursa, 1996.
- 63-. ROTA, A., STROM, B., LINDE-FORSBERG, C.:** Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C, *Theriogenology*, 44:6, 885-900, 1995.

- 64. KAWAKAMI, E., TSUTSUI, T., OGASA, A.:** Two cases of acrosome and folded tail abnormality in dog spermatozoa, *Jpn. J. Vet. Sci.*, 50:6, 1274-1276, 1988.
- 65. DUMON, C.:** Artificial insemination: Interest and performance in canine practice, XVII. W.S.A.V.A. World Congress, Durban, 1411-1417, 1994.
- 66. GUNZEL-APEL, A.R., EKROD, B.:** Einflüsse von Prostatasekret und Verdüner auf die Spermienmotilität und ATP-Konzentration sowie die Aktivität der sauren und alkalischen Phosphatase von Beagle-Samen, *Reprod. Dom. Anim.*, 26:1, 31-41, 1991.
- 67. KIMI-DIAKA, J., BADTRAM, G.:** Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro bioassay for canine semen, *Theriogenology*, 41:7, 1355-1366, 1996.
- 68. GILL, H.P., KAUFMAN, C.F., FOOTE, R.H., KIRK, R.W.:** Artificial insemination of Beagle bitches with freshly collected, liquid-stored and frozen-stored semen, *Am. J. Vet. Res.*, 31:10, 1807-1813, 1970.
- 69. BOUCHARD, G.F., MORRIS, J.K., SIKES, J.D., YOUNGQUIST, R.S.:** Effect of storage temperature cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility, *Theriogenology*, 34:1, 147-157, 1990.
- 70. SMITH, F.O.:** Cryopreservation of canine semen: Technique and Performance, *Diss. Abst. Int., B. Sci. and Engin.*, 45:11, 3441, 1985.

- 71. ROHLOFF, Von D., LAIBLIN, C.H., PEIDRICH, S.:** Untersuchungen über die Gefrierschutzwirkung von Glycerin und DMSO bei der Tiefgefrierung von Rüdensperma, Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 91: 31-33, 1978.
- 72. BROCHART, M., COULOMB, J.:** Recherches sur la dilution et la conservation du sperma de chien, Bull. Acad. Vet. Fr., 25: 59-62,1952, Alınmıştır
YURDAYDIN, N., KOTZAB, E., Köpek spermasının dondurulması üzerinde araştırmalar, A.Ü. Vet. Fak. Der., 34:3, 534-540, 1987.
- 73. FOOTE, R.H.:** The effects of electrolytes, sugars, glicerol and catalase on survival of dog sperm stored in buffered-yolk mediums, Am. J. Vet. Res., 25:104, 32-36, 1964.
- 74. OLAR, T.:** Using frozen canine semen: a guide for practitioners, Vet. Med., 80: 22-30, 1985.
- 75. YURDAYDIN, N.:** Spermanın alınması, saklanması ve sun'i tohumlama, Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Doğum ve İnfertilite, Birinci Baskı, Ed. ALAÇAM, E.,Dizgi Kitabevi, Konya, 1994, 89-102.
- 76. OETTLE, E.E.:** Preliminary Report: A pregnancy from frozen centrifuged dog semen, Journal of the South African Veterinary Association, 53:4, 269-270, 1982.
- 77. BARAN, A.:** Köpek Spermasının Farklı Oranlarda Glycerol İçeren Sulandırıcılarda Dondurulması, Doktora Tezi, İstanbul, 1997.
- 78. FOOTE, R.H.:** Extenders for freezing dog semen, Am. J. Vet. Res., 25:104, 37-40, 1964.

- 79. IVANOVA-KICHEVA, N.G., SUBEV, M.S., BOBADOV, N.D., DACHEVA, D.P., ROUSEVA, I.A.:** Effect of thawing regimens on the morphofunctional state of canine spermatozoa, *Theriogenology*, 44:4, 564-569, 1995.
- 80. THOMAS, P.G.A., LARSEN, R.E., BURNS, J.M., HAHN, C.N.:** Comparison of three packaging techniques using two extenders for the cryopreservation of canine semen, *Theriogenology*, 40:6, 1199-1205, 1993.
- 81. MORTON, D.B.:** Review on the use of frozen semen in dog breeding, *Animal Technology*, 37:1, 67-71, 1985.
- 82. BUCKRELL, B.:** The use of frozen semen from dogs in Canada, *Can. Vet. J.*, 27: 161-163, 1986.
- 83. ENGLAND, G.C.W., VERSTEGEN, J.P.:** Radiographic contrast medium for uterine insemination in the bitch and its effect upon the quality and fertility of fresh dog semen, *Theriogenology*, 46: 1241-1243, 1996.
- 84. RAVASZOVÁ, O., MESÁROS, P., CIGÁNKOVÁ, V., LUKACINOVÁ, M.:** A study of the properties of dog ejaculate during long-term storage, *Folia Veterinaria*, 40:3-4, 95-99, 1996.
- 85. ENGLAND, G.C.W., PONZIO, P.:** Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen, *Theriogenology*, 46: 165-171, 1996.
- 86. SEAGER, W.J., PLATZ, C.C.:** Puppies from frozen semen. Purebred dog: *A.K.C. Gazette*, 98:6, 48-54, 1981.

- 87. SÜMBÜLOĞLU, K., SÜMBÜLOĞLU, V:** Biyoistatistik, 6. baskı, Özdemir yayım, 1995, 59-67.
- 88. STROM, B., ROTA, A., LINDE-FORSBERG, C.:** In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected two methods of cryopreservation, Theriogenology, 48:2, 247-256, 1997.
- 89. CHRISTIANSEN, IbJ., SCHMIDT, M.:** Freezing of dog semen, Kgl. Vet. Og Landbohøjskole. Inst. Sterilitetsforsk., Arsberetn., 23: 69-75, 1980.
- 90. TAKEISHI, M., MIKAMI, T., KODAMA, Y., TSUNEKANDE, T., IWAKI, T.:** Studies on reproduction in the dog. Artificial insemination using frozen semen, Japanese Journal of Animal Reproduction, 22:1, 28-33, 1976.
- 91. FARSTAD, W.:** Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen, J. Small Anim. Pract., 25: 561-565, 1984.
- 92. KABASAKAL, G.:** Değişik Sulandırıcılarla Dondurulan Köpek Spermalarından Elde Edilen Döl Verimi Üzerinde Çalışmalar, Doktora Tezi, Ankara, 1995.

ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında Bursa'da doğdum. İlkokulu 1982 yılında bitirip, ortaokul ve lise öğrenimimi 1988 yılında Bursa Kız Lisesinde tamamladım. 1988 yılında girdiğim Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesinden 1993 yılında mezun oldum. 1994 yılında Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak doktora eğitimine başladım. Halen aynı Anabilim Dalı'nda görevimi sürdürmekteyim. Evli ve bir kız çocuğu annesiyim.

TEŞEKKÜR

Doktora tezim sırasında sonsuz bilgi, destek ve yardımlarını esirgemeyen, her zaman bilimsel ve kişisel desteklerinden yararlandığım değerli danışman hocam Sayın Prof.Dr.M. Kemal SOYLU' ya, emekliliğine kadar bilimsel yardımlarına ve tecrübelerine başvurduğum saygıdeğer hocam Prof.Dr. Hazım GÖKÇEN'e en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Araştırma materyalinin sağlanmasında yardımcı olan Gemlik Askeri Veteriner Okulu ve Eğitim Merkez Komutanlığına ve çalışmalarımı yürüttüğüm Köpek Üretim Bölüğüne teşekkür ederim.

Ayrıca doktora çalışmam boyunca özveri ve desteklerini esirgemeyen eşim Araş.Gör.Dr.Aytekin Günay'a ve bugünlere erişmemi sağlayan aileme sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.