

T.C.  
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**VAN KEDİLERİNDEN ELEKTRO-EJEKÜLASYONLA  
SPERMA ALINMASI, DEĞERLENDİRİLMESİ  
VE DONDURULMASI**

Veteriner Hekim Saadet BELHAN  
DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Fetih GÜLYÜZ

VAN-2012

Bu araştırma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından 2006-VF-B68 nolu proje olarak desteklenmiştir

T.C.  
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**VAN KEDİLERİNDEN ELEKTRO-EJEKÜLASYONLA  
SPERMA ALINMASI, DEĞERLENDİRİLMESİ  
VE DONDURULMASI**

Veteriner Hekim Saadet BELHAN  
DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

Jüri Başkanı  
Prof. Dr. Fetih GÜLYÜZ

Üye  
Prof. Dr. Muhammet ALAN

Üye  
Prof. Dr. İbrahim TAŞAL

Üye  
Doç. Dr. Seyfettin GÜR

Üye  
Yrd. Doç. Dr. Barış Atalay USLU

TEZ KABUL TARİHİ

/ / 2012

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında hiçbir desteğini esirgemeyen Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Fetih GÜLYÜZ'e, tez çalışması sırasında yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Mustafa KAYA ve Yrd. Doç. Dr. Barış Atalay USLU'ya, istatistik çalışmalarının yapılmasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Seyfettin GÜR'e, materyal sağlanması konusunda her türlü kolaylığı gösteren Y.Y.Ü. Van Kedisi Araştırma Merkezi Müdürlüğü çalışanlarına, projeyi maddi olarak destekleyen ve her türlü kolaylığı sağlayan Y.Y.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na, eşime ve çalışmam süresince bana destek olan babama tüm içtenliğimle teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| Kabul ve Onay .....                                                 | II   |
| Teşekkür .....                                                      | III  |
| İçindekiler .....                                                   | IV   |
| Simgeler ve Kısaltmalar .....                                       | VI   |
| Tablolar Listesi .....                                              | VII  |
| Şekiller Listesi .....                                              | VIII |
| 1. GİRİŞ .....                                                      | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                             | 2    |
| 2.1. Kedinin Tarihçesi .....                                        | 2    |
| 2.2. Van Kedisinin Özellikleri .....                                | 2    |
| 2.3. Erkek Kedilerde Reprodüktif Özellikler .....                   | 2    |
| 2.3.1. Genital organlar .....                                       | 2    |
| 2.3.2. Puberta .....                                                | 4    |
| 2.3.3. Testosteron .....                                            | 5    |
| 2.4. Kedilerden Sperma Almak .....                                  | 5    |
| 2.4.1. Sperma kalitesine sperma alma metodunun etkisi .....         | 7    |
| 2.4.2. Kedilerde elektro-ejekülasyon yöntemi ile sperma almak ..... | 7    |
| 2.5. Sperma Muayenesi .....                                         | 13   |
| 2.5.1. Spermanın miktarı .....                                      | 13   |
| 2.5.2. Spermanın rengi .....                                        | 15   |
| 2.5.3. Sperm motilitesi .....                                       | 15   |
| 2.5.4. Sperm yoğunluğu .....                                        | 18   |
| 2.5.5. Ölü sperm oranı .....                                        | 20   |
| 2.5.6. Anormal sperm oranı .....                                    | 21   |
| 2.6. Spermanın Dondurulması .....                                   | 24   |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM .....                                            | 30   |
| 3.1. Gereç .....                                                    | 30   |
| 3.1.1. Deney grubunun sağlanması .....                              | 30   |
| 3.1.2. Kullanılan alet ve malzemeler .....                          | 30   |
| 3.2. Yöntem .....                                                   | 31   |

|                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.1. Kedilerin anestezisi .....                            | 31 |
| 3.2.2. Kediden elektro-ejekülatörle spermanın alınması ..... | 31 |
| 3.2.3. Spermanın değerlendirilmesi .....                     | 33 |
| 3.2.4. Spermanın sulandırılması ve dondurulması .....        | 36 |
| 3.2.5. Dondurulmuş spermanın çözündürülmesi .....            | 38 |
| 3.2.6. Çözündürülmüş spermanın değerlendirilmesi .....       | 38 |
| 3.2.7. İstatistiksel analizler .....                         | 38 |
| 4. BULGULAR .....                                            | 39 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....                                   | 48 |
| ÖZET .....                                                   | 60 |
| SUMMARY .....                                                | 61 |
| KAYNAKLAR .....                                              | 62 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                               | 68 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|               |                                           |
|---------------|-------------------------------------------|
| <b>A</b>      | : Amper                                   |
| <b>ABP</b>    | : Androjen Bağlayıcı Protein              |
| <b>AC</b>     | : Alternatif Akım                         |
| <b>EYT-FC</b> | : Tris-Fructose Citric Acid Sulandırıcısı |
| <b>EYC</b>    | : Yumurta Sarısı Laktoz Sulandırıcısı     |
| <b>FSH</b>    | : Folikül Stimulan Hormon                 |
| <b>Hz</b>     | : Saniyedeki frekans sayısı               |
| <b>IVF</b>    | : İn Vitro Fertilizasyon                  |
| <b>im</b>     | : İntramuskuler                           |
| <b>iv</b>     | : İntravenöz                              |
| <b>LH</b>     | : Lüteinleştirici Hormon                  |
| <b>mA</b>     | : Mili Amper                              |
| <b>mOsm</b>   | : Miliosmol                               |
| <b>ng</b>     | : Nanogram                                |
| <b>PBS</b>    | : Fosfat Buffer Solüsyonu                 |
| <b>sc</b>     | : Subkutan                                |
| <b>SEM</b>    | : Standart sapma                          |

## TABLÖLER LİSTESİ

|                 |                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.</b> | Kedilerin ağırlık ve yaşları ile anestezi için verilen ketamine hydrochloride + xylazine hydrochloride dozu ve anestezi süreleri .....                                                                                                                  | 41 |
| <b>Tablo 2.</b> | Kedilerin ejakülatlarındaki sperma miktarları, sperm motilite ve yoğunlukları, ölü sperm oranı, toplam anormal sperm oranı, uyarım süresi ve uyarım sayılarının ortalama±SEM değerleri ile bu değerler arasında yapılan varyans analizi sonuçları ..... | 42 |
| <b>Tablo 3.</b> | %3'lük Equiex ile sulandırılmış kedi spermasında, sulandırma ve çözündürme sonrası sperm motilite ve canlılık değerlerinin ortalama±SEM değerleri ile bu değerler arasında yapılan $\chi^2$ testi sonuçları .....                                       | 43 |
| <b>Tablo 4.</b> | %6'lık Equiex ile sulandırılmış kedi spermasında, sulandırma ve çözündürme sonrası sperm motilite ve canlılık değerlerinin ortalama±SEM değerleri ile bu değerler arasında yapılan $\chi^2$ testi sonuçları .....                                       | 44 |
| <b>Tablo 5.</b> | Biosfos ile sulandırılmış kedi spermasında, sulandırma ve çözündürme sonrası sperm motilite ve canlılık değerlerinin ortalama±SEM değerleri ile bu değerler arasında yapılan $\chi^2$ testi sonuçları .....                                             | 45 |
| <b>Tablo 6.</b> | Taze ve çözündürme sonrası anormal sperm oranlarının ortalama±SEM değerleri ile bu değerler arasında yapılan $\chi^2$ testi sonuçları .....                                                                                                             | 46 |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                 |                                                                  |    |
|-----------------|------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1.</b> | Tez çalışmasında kullanılan alet ve malzemelerin bir kısmı ..... | 31 |
| <b>Şekil 2.</b> | Anestezi uygulanmış kediler .....                                | 32 |
| <b>Şekil 3.</b> | Kediden elektro-ejekülasyon yöntemiyle sperma alınması .....     | 33 |
| <b>Şekil 4.</b> | Van Kedisi Spermi .....                                          | 37 |
| <b>Şekil 5.</b> | Van Kedisi Sperminde akrozom görünümü .....                      | 37 |

## 1. GİRİŞ

Evcil kediler, tehlikede olan kedi türlerinin bir temsilcisi ve biyoteknolojik çalışmaların deneysel aşamasında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Howard ve ark., 1992).

Çağlar boyunca insanların dikkatini çekmiş olan ve sayıları giderek azalan Van Kedileri son yıllarda yoğun ilgi odağı haline gelmiştir (Odabaşoğlu ve Ateş, 2000). Ailelerin Van Kedilerine olan merakı ve evde besleme alışkanlıklarının giderek artması, bu kedilerin reproduktif fizyolojilerinin bilinmesini zorunlu hale getirmiştir (Yur, 1994).

Ülkemiz için bir kültür zenginliği olan Van Kedileri her zaman insanların beğenisini kazanmıştır. Ne yazık ki, son yıllarda bir takım sebeplerden ötürü (farklı ırktan kedilerle çiftleşmeleri, turistler tarafından ülke dışına çıkarılmaları, bazı kaza ve hastalıklar sonucu ölmeleri vb.) saflıkları kaybolmaya başlamış, ya da nesilleri giderek yok olmaya yüz tutmuştur (Yur, 1994). Van Kedilerinin soyunun devamı ve saflığının korunması bakımından bilim adamlarımızın çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bilimsel çalışmalarla hem Van Kedilerinin soyu koruma altına alınacak hem de Van Kedilerinin fizyolojik özelliklerinin anlaşılmasıyla yetiştirmede ortaya çıkan kimi sorunlar aşılabilecek ve bu alanda atılan adımlar etkin bir sonuç verebilecektir. Yine bu kedilerin ırk özellikleri belirlenecektir (Odabaşoğlu ve Ateş, 2000).

Spermayı dondurarak saklama özellikle nesli tükenmekte olan hayvanların korunması için, türlerin gametinin saklanması adına önemli bir tekniktir (Tsustsui ve ark., 2003). Van Kedilerinin ırk özelliklerinin korunmasında, saf genetik yapılarının bozulmasını önlemek ve genetik materyali dondurarak saklamak önemli bir aşamayı oluşturmaktadır. Bu gerekçeyle söz konusu doktora çalışmasında, Van Kedilerinden elektro-ejekülasyon yöntemiyle spermanın alınması ve dondurulması amaçlanmıştır. Sperma elektro-ejekülasyon yöntemiyle anestezi altındaki kedilerden alınmış, 3 sulandırıcı ile sulandırılmış ve gerekli değerlendirmeler yapıldıktan sonra dondurulmuştur.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Kedinin Tarihçesi**

Son arkeolojik bulgular kedilerin M.Ö. 3000 ile 6000 yıllarında Mısır, Mezopotamya, Anadolu ve Eski Harapan uygarlığında evcilleştirildiği yönündedir (İnan, 1992; Odabaşıoğlu ve Ateş, 2000).

Yapılan araştırmalara göre Van Kedilerinin Anavatanı, Altay Dağları'nın eteklerinde olan Buhtamara Şehri'dir. Yetiştirildiği yerler; Türkiye, İran ve Rusya olarak bildirilmektedir. Van Kedisinin Avrupa'da ilk olarak tanınması 1950 yılında İngiltere'ye Van'dan bir çift kedi götürülmesi ile olmuştur (Ateş, 2000).

### **2.2. Van Kedisinin Özellikleri**

Van kedisi safkan bir tür olarak Van Gölü ve çevresinde yetiştirilmektedir. Günümüzde safkan Van Kedisine Van'da bile çok az rastlanmaktadır (Kaya, 1995). Baş, üçgen şeklinde, burun küçük, kulaklar başa göre büyük ve diktir (Odabaşıoğlu ve Ateş, 2000). Yüz kulaklardan başlayarak çeneye doğru sivrileşir, çenede tekrar yuvarlaklaşır (Kaya, 1995). Gözler, tek göz (bir gözü mavi, bir gözü açık amber sarısı), her ikisi mavi ya da her ikisi de sarı olmak üzere üç şekilde olabilir (Ateş, 2000).

Van Kedilerinin uzun, orta uzun ve kısa tüylü olanları vardır. Van yöresinde yetiştirilen Van Kedilerinde hakim ve yaygın tüy rengi, fil dişi beyazıdır. Türkiye'de yetiştirilen Van Kedilerinin baş ve kuyruklarında siyah ya da renkli tüyler bulunabilmektedir (Odabaşıoğlu ve Ateş, 2000).

### **2.3. Erkek Kedilerde Reprodüktif Özellikler**

#### **2.3.1. Genital organlar**

##### **Scrotum**

Scrotum; derinin devamı olup düz ve ince yapıdadır (Çoyan ve ark., 2002). Erkek kedide scrotum anüsün birkaç santimetre altında bulunur (Demirci, 1994) ve

scrotal deri tamamen kıllarla kaplıdır (Christiansen, 1984; Demirci, 1994). Kedilerde scrotum köpeklerdeki gibi asılı değildir (Christiansen, 1984).

### **Testisler**

Olgun erkek kedilerin testisleri 14x8 mm olup, scrotum içerisinde bulunurlar. Testisler normal olarak doğumda scrotum içine inerler. Ancak birkaç ay süreyle inguinal kanala inip çıkabilirler. Testis ve epididimisler kedi yavrusu 3-5 aylık olduğunda ölçü ve ağırlıkça belirgin bir şekilde artarlar. Kedi 5 aylık olduğunda LH tarafından leydig hücrelerinde testosteron salgılanarak spermilerin üretimi başlar. 6-7 aylık iken tubuller içinde spermilerin bulunabildiği kaydedilmektedir (Christiansen, 1984).

### **Prostat**

Bağ dokusundan oluşan bir bölme (septum) ile sağ ve sol olarak ikiye ayrılır, bu prostat lobları üretranın ventral kısmını kaplamaz (Christiansen, 1984). Prostat kedilerde korpus prostat ve prostat pars disseminata adlı iki loptan oluşur (Çoyan ve ark., 2002). Boyutları ortalama 5x2 mm kadardır (Christiansen, 1984).

### **Bulbo-üretal bezler**

Kediler 4x3 mm boylarında, bir çift bulbo-üretal beze sahiptirler (Christiansen, 1984). Kedilerde bu bez küçük olup, salgısı glikoproteince zengindir (Çoyan ve ark., 2002). Bu bezler lateral ve anterior olarak penisin tabanına yerleşmişler ve prostat büyüklüğündedir (Christiansen, 1984).

### **Penis**

Erkek çiftleşme organı olan penisin idrarı boşaltmak ve spermayı dişinin genital kanalına iletmek gibi iki görevi vardır (Deveci, 1994).

Kedi penisi vasküler tiptedir. Köpek ve kedilerde korpus kavernosumun distalinde os penis vardır (Çoyan ve ark., 2002). Os penis köpektaki gibi derin değildir (Christiansen, 1984). Kedilerin penisinde bulunan bu kemik oluşum, organa özel bir

destek sağlar. Kedide penis geriye ve aşağıya (kaudo-ventrale) dönük olup, kemik oluşum köpektekine göre daha kısadır (Deveci, 1990; Deveci, 1994). Glans penis bölünmemiştir ve koniktir (Christiansen, 1984).

Serbest prepusyumla sarılmış olan penis, scrotumun ventralinde yerleşmiştir ve geriye doğru yönelmiştir. Glans penisin kranial 2/3'ünde 0.75-1 mm uzunluğunda 100-200 epitelyal çıkıntı (kornifiye papil) vardır. Bu papillalar penisin tabanına doğru yönelmişlerdir. Papillaların gelişimlerini tam olarak 6-7 aylıkken tamamladıkları ve dişinin çiftleşme anında daha büyük oranda ovulasyona ulaşmasında uyarıcı bir etkiye sahip oldukları bildirilmektedir (Christiansen, 1984).

### **2.3.2. Puberta**

Puberta, idrar sıçratma, dişiye pelvik sürtünme ve dişinin boynunu ısırma hareketleriyle 4. ayda başlar. Spermatogenezis 5. aya kadar oluşmadığı için bu yaşta cinsel ilişki ve ejakülasyon pek görülmez (Christiansen, 1984). Kedilerde spermatogenezis, testiküler ağırlık ve testosteron üretiminde artışın gözlenebildiği 6-8 aylarda oluşur. Genç erkeklerde spermatogenik fonksiyon 8. ay sonuna kadar olgun erkeklerinkiyle kıyaslanamaz durumdadır (Tsutsui ve ark., 2004b; Siemieniuch ve Woclawek-Potocka, 2007). Günlük sperm üretiminin  $16 \times 10^6$  olduğu bildirilmiştir (França ve Godinho, 2003). Puberta yaşı kedi 3.5 kg ağırlığa ulaştığında ortalama 9 aylıkken oluşur. Bazı yabani kediler 10-18 aylığa kadar pubertaya ulaşamazken, evcil kediler 7 aylıkken çiftleşebilirler (Christiansen, 1984).

Kedilerde spermatogenezis diğer hayvanlara benzer şekilde gerçekleşmektedir. Spermiler, tubulus seminiferus kontortuslar içinde oluşmaktadır. Spermatogenezis, testosteron, FSH, LH ve ABP'in kontrolü altında gerçekleşmektedir. Üretilen spermiler ejaküle olana kadar bir dizi kanal sistemi içinde ilerlerken önce testiküler sıvıyla daha sonra eklenti bezlerinin sıvıları ile karşılaşmaktadır. Spermilerin olgunlaşması tamamlandıktan sonra eklenti bezlerinin sıvıları içinde ejaküle edilirler (Gökçen, 1994).

Erkek kedinin reproduktif aktivitesinin 14 yıla kadar devam edebildiği ancak, kedilerden optimum dölverimi elde etmek için 4-6 yaş arasında kullanılması gerektiği bildirilmektedir (Christiansen, 1984).

Dişi kediler mevsimsel olarak siklus göstermelerine rağmen, erkek kediler yıl boyu çiftleşebilirler. Sperma kalitesi ileriki yaşlarda azalır fakat değişim oranı bilinmemektedir. Erkek kedi, düşük hacim ve yoğunluğu yüksek sperma ejaküle eder. Normal sağlıklı kedi, sperm yoğunluğu ciddi şekilde tükenmeksizin haftada 3 kez çiftleşebilir. Daha sık çiftleşme doğacak yavruların küçük olması veya infertilite ile sonuçlanabilir. Kedi spermleri fertilizasyondan 2-24 saat önce uterusu olmalıdır. Testiküler ısıyı artıran herhangi bir şey spermatogenezisi deprese eder. Scrotum veya testisin lokal enfeksiyonları ve scrotal dermatitis sperm üretimini geçici olarak deprese edebilir. Koşullar düzeltilirse sperm kalite ve kantitesi 30-60 gün içinde düzelir. Kedilerde hem bilateral hem de unilateral kriptorşidizm meydana gelebilir. Kriptorşidik testisler testosteron üretir fakat sperm üretemezler. Bilateral kriptorşidik testisler sterilidir. Unilateral kriptorşidik kediler fertil olduğu halde kriptorşidizm kalıtsal olabileceği için bu hayvanlar yetiştirmeden çıkartılmalıdır (Thomas ve Burke, 1986).

### **2.3.3. Testosteron**

Erkek hayvanlarda testosteron, testislerin interstisyel leydig hücrelerinde sentezlenir (Ünal ve ark., 1997). Ayrıca az miktarda böbrek üstü bezi korteksinden, ovaryumlardan ve büyük bir olasılıkla plasentadan da salınır (Yılmaz, 1999).

Testosteron hormonu, temel olarak erkeklerde libido seksüalis ve spermatogenezisin uyarılmasında görev almaktadır (Çoyan, 1994).

Goodrowe ve ark. (1985) tarafından erkek kedilerde kan testosteron seviyelerinin 6 saat arayla yapılan ölçümlerinde 0.10–3.25 ng/ml düzeylerinde dalgalanmalar gösterdiği bildirilmektedir.

### **2.4. Kedilerden Sperma Almak**

Sperma alma, saklama ve suni tohumlamayla bağlantılı prosedürlerin gelişimi yok olma tehlikesiyle karşı karşıya olan kedilerin sayısının artışına imkan sağlar, genetik çeşitliliği artırır ve farklı kedi genotiplerinin oluşmasını sağlar (Holt ve Pickard, 1999).

Sperma almak, suni tohumlama için materyal elde etmeye, diagnostik amaç ve araştırmalarda kullanmaya olanak verir (Zambelli ve Cunto, 2006). Kediden sperma almak için en yaygın metotlar elektro-ejekülasyon ve suni vagina yöntemidir (Zambelli ve Cunto, 2006; Rijsselaere ve Soom, 2010). Epididimal sıkma veya dilimleme gibi diğerk sperma alma metotlarının araştırmalarda materyal elde etmek için kullanıldığını bildirilmiştir (Bowen, 1977). Benzer şekilde medetomidine ile sedasyon sonrası üretral koterizasyon ve epididimal spermin geri alımı da sayılabilir (Rijsselaere ve Soom, 2010). Sperma, kastrasyondan sonra veya postmortem olarak epididimisten de elde edilebilir (Axner ve ark., 1998; Axner ve Forsberg, 2002). Yine doğal çiftleşme sonrasında vaginal lavajla da sperma alınabilir (Axner ve Forsberg, 2002).

Suni vagina metodu uygun maliyetli olması, fiziksel ve kimyasal kısıtlamaların olmaması, bir kişinin sperma alma işlemini yapabilmesi nedeniyle avantajlı bir metot olarak görülebilir (Sojka, 1986). Sayılan bu avantajlarının yanısıra bir takım dezavantajları da vardır. Suni vaginayla sperma almak için erkeğin bu metoda alışkın (eğitilmiş) olması gerekir (Axner ve Forsberg, 2002). Erkek kedi yabancı çevrede bulunursa, bu metodun alışkın bir erkekte bile çalışma olasılığı oldukça zayıftır (Axner ve Forsberg, 2002; Chatdarong ve ark., 2008). Suni vagina ile sperma almanın başka bir problemi de östrusta olan bir dişi kedinin gerekli olmasıdır (Chatdarong ve ark., 2008). Fiziksel ya da psikolojik sebepler nedeniyle bazı erkek kediler suni vagina ile sperma almak ve tabii aşım için kullanışlı olmayabilir (Sojka, 1986). Üstelik suni vagina ile sperma almak kediler için doğru bir alternatif değildir (Chatdarong ve ark., 2008).

Elektro-ejekülasyon yöntemi ile sperma almak için önceden alışkın erkek kedi gerekli değildir (Sojka, 1986). Vahşi kedilerde elektro-ejekülasyon sperma almak için en yaygın kullanılan yöntem olmuştur (Tebet ve ark., 2006). Erkek kedinin dişiyle fiziksel temas içinde olması gerekli değildir. Böylelikle hastalık riski azalır. Kedilerde sperma almak için elektro-ejekülasyonun üstün ve yaygın bir metot olduğu görülür (Axner ve Forsberg, 2002; Zambelli ve Cunto, 2006). Bu nedenle elektro-ejekülasyon güvenle anesteziye alınmış olan herhangi bir erkek kedide bilgili ve deneyimli bir kişi tarafından rahatlıkla uygulanabilir (Sojka, 1986).

#### **2.4.1. Sperma kalitesine sperma alma metodunun etkisi**

Elektro-ejekülasyonla alınan sperma genellikle suni vagina ile alınan spermadan daha büyük hacme, daha düşük sperm yoğunluğuna, daha düşük toplam sperm sayısına ve daha yüksek pH değerine sahiptir (Platz ve ark., 1978). Elektro-ejekülasyonla elde edilen daha büyük hacimlerin, erkek eklenti bezlerinin aşırı stimülasyonundan dolayı olduğu bildirilmektedir (Platz ve Seager, 1978).

#### **2.4.2. Kedilerde elektro-ejekülasyon yöntemi ile sperma almak**

Kedide elektro-ejekülasyon kullanımı ilk olarak 1970’de Scott tarafından bildirilmiştir. Elektro-ejekülasyon kedi güvenle anesteziye alındıktan sonra uygulanmalıdır (Platz ve Seager, 1978; Axner ve Forsberg, 2002; Daşkın, 2002; Zambelli ve Cunto, 2006). Kedinin penis ve anüs bölgesindeki uzun tüyler kesilerek temizlenmelidir (Daşkın, 2002). Kedi yan yatırılıp, ticari bir jel ile kayganlaştırılan prob rektum içine nazıkçe sokulmalıdır (Platz ve Seager, 1978; Axner ve Forsberg, 2002; Daşkın, 2002). Giderek artan oranda elektrik akımı verilerek ereksiyon ve ejakülasyon oluşturulmalıdır (Yurdaydın, 1994). Uygulama sırasında zorlukla karşılaşıldığında prob ventral veya dorsale doğru ilerletilmeli, feçes bulaşması söz konusu olduğunda prob dışarı çıkarılıp temizlendikten ve kayganlaştırıldıktan sonra tekrar sokulmalıdır. Arasına fekal materyal elektriksel stimülasyona cevabı etkileyebilir. Rektumdaki fekal engellenmenin göstergesi mA gücündeki yükseliş veya stimülasyon cevabın eksikliği ya da her ikisi olabilir. Sperma alma kabı penis üzerine yerleştirilmelidir (Platz ve Seager, 1978; Daşkın, 2002). Elektriksel uyarım öncesinde, penis ortaya çıkacak şekilde kranial olarak nazik basınçlar uygulanmalıdır (Platz ve Seager, 1978; Axner ve Forsberg, 2002). Sperma, glans penis üzerine yerleştirilen önceden ısıtılmış bir sperma alma kabına alınmalıdır (Axner ve Forsberg, 2002). Elektriksel uyarımla, ejaküle olmuş sperm sayısı ve sperma hacmi bakımından kediler arasında ve her bir kedinin farklı ejakülasyonlarında dikkate değer değişimler olabilir (Zambelli ve Cunto, 2006).

#### **Elektro-ejekülasyon için anestezi uygulaması**

Birkaç araştırmacı spermayı farklı dozlarda im ketamin HCl kullanarak sağladıkları genel anestezi sonrasında almışlardır. Ketamin HCl’ü Platz ve ark. (1978),

33.0 mg/kg; Howard ve ark. (1990) ile Howard ve ark. (1992), 25 mg/kg miktarında kullanmıştır. Niwa ve ark. (1985), 20 mg/kg ketamin HCl ve 0.1 mg/kg droperidol; Axnér ve ark. (1998) ile Axnér ve Forsberg (2002), 5mg/kg ketamin HCl ile 80µg/kg medetomidine sc; Daşkın (2002), 5mg/kg ketamin HCl ve 2.3 mg/kg xylazin HCl; Baran ve ark. (2004a), 5mg/kg ketamin HCl ve 2 mg/kg xylazine HCl; Neubauer ve ark. (2004), 3.5-4.0 mg/kg ketamin HCl ve 3.5-4.0 mg/kg xylazine HCl uygulamışlardır. Axnér ve Forsberg (2002), kediye anesteziden uyandırmak için atipamezol kullanmışlardır.

Wildt ve ark. (1983), çita ve evcil kediler üzerinde yürüttükleri çalışmada, elektro-ejekülasyon yöntemiyle sperma almadan önce en az 4 hafta boyunca ve elektro-ejekülasyon uygulaması süresince kedileri çiftleştirmemişlerdir. Daha sonra hayvanları CT 1341 (2.0 mg/kg, iv) enjeksiyonu ile genel anestezide aldıklarını bildirmişlerdir.

Byers ve ark. (1989), 5 adet Sibirya Kaplanını (*Panthera tigris*) ketamine, xylazine ve diazepam ile anestezide alıp, elektro-ejekülasyonla haftada 1 kez sperma almışlardır.

Howard ve ark. (1993), Long ve ark. (1996) ile Pukazhenthı ve ark. (1999), Tiletamine hydrochloride-zolazepam (Telazol; 4.5 mg/kg, im) ile kedileri anestezide alarak elektro-ejekülasyon yöntemiyle sperma aldıklarını bildirmişlerdir.

Axnér ve ark. (1997), elektro-ejekülasyon için kedileri ketamine-HCl (10mg/kg, im) ile kombine xylazine (2mg/kg, sc) ile veya ketamine-HCl (5mg/kg, im) ile kombine medetomidine (80µg/kg, sc) ile anestezide almışlardır. Anestezide yeterli seviyede korumak için ihtiyaç duydukça tamamlayıcı ketamine-HCl (2.5-5 mg, im) vermişlerdir. Sperma alma prosedürü sonrasında anesteziden hızlı çıkmaları için kedilere im atipamezol uygulamışlardır.

Zambelli ve ark. (2002), toplam 65 ejekülatı 1-6 yaşlar arası evcil normospermik kedilerden ketamine chlorohydrate (1.5 ml Ketavet 50<sup>®</sup> im ) ile genel anestezisi altında almışlardır.

Tebet ve ark. (2006), çalışmalarında aşağıda verilmiş olan 2 anestezi protokolünden birini kullanarak kedileri anesteziye almışlardır. Tüm enjeksiyonları im vermişlerdir.

1) 15 mg/kg tiletamine/zolazepam (Zoletil 50; Virbac do Brazil, São Paulo, SP, Brazil) ve 0.3mg/kg morphine (Dimorf %1; Crista'lia, São Paulo, SP, Brazil) veya

2) 13 mg/kg tiletamine/zolazepam, 0.3 mg/kg butorphanol (Torbugesic %1; Fort Dodge do Brazil, Campinas, SP, Brazil) ve 0.1 mg/kg acepromazine (Acepran %0.2; univet, São Paulo, SP, Brazil).

Siemieniuch ve Dubiel (2007), vahşi kedilerden kastrasyon sonrası epididimisli testisleri çıkarıp sperma alımını gerçekleştirmek için, 20mg/1kg ketamine ile (Bioketan® Ve'toquinol im) kombine 0.5 mg/1kg acepromazine (Calmivet® Ve'toquinol im) kullanıp kedileri anesteziye almışlardır.

Chatdarong ve ark. (2008), Tayland'da 4-6 kg ağırlığındaki 6 kediden elektro-ejekülasyon yöntemiyle sperma almak için iv 10 mg/kg propofol ile genel anestezi sağlamışlardır.

Cocchia ve ark. (2009), kedileri sakinleştirmek için atropine sulphate'ı (0.25 mg/kg im) bir premedikasyon olarak uygulamışlardır. Anestezi 6 mg/kg propofol ile indüklenmiş ve endotrakeal entübasyondan sonra %1,9'luk isofluorane ile sürdürülmüştür.

### **Elektro-ejekülatör ve rektal probun özellikleri**

Kedilerde elektro-ejekülasyon için kullanılan elektro-ejekülatör özel yapılıdır. Makinede bir ampermetre, bir voltmetre ve 3 longitudinal elektrodu olan bir rektal prob bulunur (Axnér ve Forsberg, 2002).

Birçok araştırmacı yaptıkları çalışmada değişik ölçülerde rektal prob kullandıklarını bildirmişlerdir. Platz ve Seager (1978) ile Axnér ve ark. (1997), 12 cm uzunluk ve 1 cm çapında olan, üzerinde 5 cm uzunluk ve 1.5 mm çapında 3 tane paslanmaz çelik elektrodu bulunan bir prob kullandıklarını, Baran ve ark. (2004a), aynı

ölçüde ancak üzerinde 3 cm uzunluk ve 1.5 mm çapında 3 elektrodu olan prob kullandıklarını ifade etmişlerdir.

Diğer araştırmacılar ise 13 cm uzunluğunda ve 1 cm çapında olan, üzerinde 3.75 cm uzunluğunda ve 2.6 mm genişliğinde 3 longitudinal paslanmaz çelik elektrodu bulunan bir prob kullandıklarını rapor etmişlerdir (Carter ve ark.,1984; Howard ve ark., 1990).

### **Elektro-ejekülasyon uygulama prosedürü**

Elektro-ejekülasyonla kedilerden sperma almak için uygulanan elektrik uyarımları düşük frekanslı olup, aralıklı olarak uygulanır. Bunun için farklı programlar tarif edilmiştir. Fakat çoğunlukla Howard ve ark. (1990) tarafından tarif edilmiş olan ve 3 seride uygulanan (30, 30 ve 20 uyarım) 2-5 V ve toplam 80 elektriksel uyarımdan oluşan prosedür kullanılmaktadır. Her uyarım 0 V'tan istenen voltaja çıkıncaya kadar yaklaşık olarak 1 sn sürmekte, 2-3 sn istenen voltajda kalınıp ardından 0 V'a ani bir düşüş yapılmaktadır. İlk seri 2 V'ta 10, 3 V'ta 10 ve sonuçta 4 V'ta 10 uyarım ile sürdürülmektedir. Kedi daha sonra 2-3 dak dinlendirilmektedir. Sonraki seri 3 V'ta 10, 4 V'ta 10 ve finalde 5 V'ta 10 uyarımdan oluşmaktadır. Kedi tekrar 2-3 dak dinlendirilmektedir. Son seri 4 V'ta 10 ve 5 V'ta 10 uyarım şeklinde takip etmektedir. Her bir uyarıma kedi arka bacaklarının kasılmasıyla cevap vermektedir (Axnér ve Forsberg, 2002).

Platz ve Seager (1978), elektriksel uyarımları 3 set altında 4'er basamak çerçevesinde verdiklerini bildirmişlerdir. Uygulamaya 0 V ile başlayıp pençelerin çıktığı ana kadar voltajı dereceli olarak arttırmışlardır. Bu etki gözlemlendikten sonra voltajı kaydedip 0 V'a geri çekmişlerdir. Uyarım başlangıç voltajını belirlemek için voltajı artırıp tekrar 0 V'a düşürmüşlerdir. Böylece uyarım siklusu 0 V'tan istenilen voltaja kadar yaklaşık olarak 2 sn, maksimumda 3 sn, 0 V'a indirmek için 1 sn ve uyarım yoksa 2 sn olmuştur. Setlerde uyguladıkları voltajları 2 V'tan başlatıp 7 V'a kadar çıkarmışlardır. Araştırmacılar bu dereceli artış ve daha sonra voltajın düşüşü ile en yüksek kaliteli spermayı aldıklarını bildirmişler, ancak bazı kedilerde ejakülasyonun daha yüksek voltajlara ulaşıncaya kadar başlamadığını görmüşlerdir.

Platz ve ark. (1978), 6 aylık bir periyot boyunca 6 kediden elektro-ejekülasyon yöntemiyle, daha sonra manuel uyarım ve suni vagina kullanarak sperma almışlardır. Araştırmacılar 2-8 V ve 5-220 mA arasında değişen bir elektro-ejekülasyon programında elektriksel uyarımları maksimum voltaja 2 sn'de yükselterek 3 sn süreyle uygulamışlar ve spermayı bu metotla her bir kediden haftada bir kez rutin olarak almışlardır.

Wildt ve ark. (1983), spermayı daha önceki araştırmacılar (Platz ve Seager, 1978; Platz ve ark., 1983) tarafından bildirilen benzer prosedürlerle, elektro-ejekülasyon yöntemiyle almışlardır. Araştırmacılar çitalar ve evcil kediler arasında seminal özelliklerin karşılaştırmalı analizlerini oluşturmak için, elektro-ejekülasyon uygulamasını her bir kediye 30 dak aralıkla 4-7 V ve 50-200 mA benzeri 80 elektriksel uyarım olacak şekilde standardize etmişlerdir.

Carter ve ark. (1984), erkek kedilerde serum kortizol, progesteron ve testosteronu üzerinde ketamin HCl ve elektro-ejekülasyonun etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, elektro-ejekülasyon uygulamasına orta derecede anestezi elde ettikten sonra başladıklarını bildirmişlerdir. Uyguladıkları elektro-ejekülasyon programında uyarım siklusu 0 V'tan istenilen voltaja kadar yaklaşık olarak 1 sn'de oluşturulmuştur. İstenilen voltajda 2-3 sn kalıp, 3 sn'de 0 V'a düşürülmüştür. Başlangıçta 10 ardışık uyarım 5 V'ta uygulanmıştır. Voltaj diğer 10 uyarımda 6 V'a ve ek 10 uyarımda tekrar 7 V'a yükseltilmiştir. Bu ilk uyarım setinden sonra hayvan 2-3 dak dinlendirilmiştir. İlk set örneğini 30 uyarım siklusundan oluşan ikinci set takip etmiştir. Fakat 6 V'ta başlatılmış ve 8 V'ta tamamlanmıştır. İkinci dinlenme periyodundan (2-3 dak) sonra, 10 uyarımdan oluşan üçüncü ve final set sırasıyla 7 ve 8 V şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Byers ve ark. (1989), 5 adet Sibirya Kaplanından (*Panthera tigris*) Howard ve ark. (1984) tarafından tarif edilmiş olan metoda göre [Toplam 120 elektriksel uyarımdan oluşan elektro-ejekülasyon programı 3 seri şeklinde verilmiştir. Kırk uyarımdan oluşan her bir seri sırasıyla; 10 ve 20V (Seri1), 20 ve 25 V (Seri2) 25 ve 30 V (Seri3) olacak şekilde iki set şeklinde bölünmüştür. Her bir seri arasında 3-5 dak dinlenme süresi olmuştur. Elektriksel uyarımlar 0 V'tan arzu edilen pik voltaja kadar sürekli bir artışla 3 sn'de verilmiş, arkasından 0 V'a ani düşüş yapılmıştır.] elektro-ejekülasyonla haftada 1 kez sperma almışlardır. Araştırmacılar 80 uyarımdan oluşan ejakülasyon prosedürünü 4 seri şeklinde uygulamışlardır. Yirmi uyarımlık her bir seriyi

25-400 mA'lık değişimle 25 V'tan 40 V'a kadar 5 V artırarak uyguladıklarını bildirmişlerdir.

Howard ve ark. (1990), teratospermik ve normospermik kedilere toplam 80 elektriksel uyarımdan oluşan standardize edilmiş bir elektro-ejekülasyon rejimini, aynı voltaj değerlerinde her bir kediye 1-2 hafta aralıklarla (12 ejekülat/kedi) uyguladıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar toplam seriyi sırasıyla 30 (2, 3 ve 4 V'larda 10 uyarım: seri1), 30 (3, 4, 5 V'larda 10 uyarım: seri2) ve 20 (4 ve 5 V'larda 10 uyarım: seri3) uyarımdan oluşan 3 seri olarak bölmüşlerdir. Uyarım siklusunu, 0 V'tan istenilen voltaja kadar yaklaşık olarak 1 sn'de oluşturmuşlardır. İstenilen voltajda 2-3 sn bırakıp, 3 sn'de 0 V'a düşürmüşlerdir. Her bir hayvanı seriler arasında 2-3 dak dinlendirmişlerdir.

Howard ve ark. (1992), 6 adet evcil damızlık kediden daha önceki araştırmacıların (Wildt ve ark., 1983; Howard ve ark., 1990) belirttiği gibi elektro-ejekülasyon yöntemiyle sperma aldıklarını rapor etmişlerdir.

Axnér ve ark. (1997), kedilere standardize edilmiş bir elektro-ejekülasyon rejimini (Howard ve ark., 1990) uygulayarak, her bir ejekülat için 2-5 V'luk 80 elektriksel uyarım vermişlerdir. Yaklaşık 5-10 dak'lık dinlenme sonrasında 80 uyarımlık ikinci seti kullanarak elektro-ejekülasyonu tekrarlamışlar.

Daşkın (2002), kediden elektro-ejekülasyon yöntemiyle sperma almak için 50 Hz frekans modülasyonunda 3V/dak 300 mA elektriksel uyarım sağlayan bir elektro-ejekülatör kullanmıştır.

Baran ve ark. (2004a), kedilerden sperma almak için özel olarak yapılmış bir elektro-ejekülatör (P-T Electronics, Model 302, Boring, Oregon, USA) kullanmışlardır. Elektrik titreşimlerini Platz ve Seager (1978) prosedürünü izleyerek (3 sn titreşim, 2 sn ara) uygulamışlardır. Uygulamanın oturması 2-7 V arasında olmuş ve her bir set toplamda 180 olmakla birlikte, 60 titreşim içermiştir.

Neubauer ve ark. (2004), kastrasyondan hemen önce teratospermik kedileri sperma almak için standardize edilmiş bir elektro-ejekülasyon programına maruz bırakmışlardır. Araştırmacılar Howard ve ark. (1990)'nın prosedürünü izleyerek 80 düşük

voltajlı (2-5 V) uyarımın tümünü 20 dak boyunca 3 seride uygulamışlardır. Rijsselaere ve Soom (2010), anesteziye aldıkları kedilere 2, 3 ve 4 V'luk 80 elektriksel uyarım vererek ejakülasyonu gerçekleştirmişlerdir.

## **2.5. Sperma Muayenesi**

Kedilerde sperma muayenesi değişik amaçlarla yapılmaktadır. Bunlar arasında; damızlık erkek kedilerin fertilité gücünü tespit etmek, suni tohumlama yapmak, kullanılacak spermanın fertilitésini test etmek ve bilimsel araştırmalarda kullanmak sayılabilir (Zambelli ve Cunto, 2006). Fakat küçük hacmi ve sperma elde etmedeki zorluktan dolayı sperma muayenesi yüzeyseldir (Axnér ve Forsberg, 2002; Zambelli ve Cunto, 2006). Hem taze hem de dondurulmuş sperma suni tohumlama için kullanılabilir. Taze sperma genellikle hastalık kontrolü veya damızlık problemi olduğu zaman (psikolojik veya fiziksel) kullanılmaktadır. Dondurulmuş sperma, tekrarlayan deneysel manüplasyonlar için yeterli materyal sağlamak, ölü ve yaralı damızlıkların spermasını kullanmak, coğrafi uzaklığı ortadan kaldırmak gibi avantajlar sunar (Zambelli ve Cunto, 2006).

Sperma; hacmi, pH'sı, sperm yoğunluğu, motilitesi, morfolojisi ve canlılığı için değerlendirilir (Zambelli ve Cunto, 2006).

Çalışma materyalini oluşturan Van Kedilerine ait spermatolojik özellikler bilinmediğinden, takip eden bölümlerde diğér kedi ırklarına ait spermatolojik özelliklerden bahsedilecektir.

Spermanın makroskobik muayenesinde spermanın miktarı, rengi, kıvamı, kokusu ve pH'sı değerlendirilmektedir. Spermanın mikroskobik muayenesinde ise sperm motilitesi, sperm yoğunluğu, ölü sperm ve anormal sperm oranları değerlendirilmektedir.

### **2.5.1. Spermanın miktarı**

Sperma miktarı bir ejakülasyonla dışarıya verilen spermanın hacmidir. Sperma miktarı, sperma alma işleminden hemen sonra, genellikle derecelendirilmiş sperma alma kabından okunarak, gerektiğinde ölçüm pipetleri veya silindirleri yardımıyla saptanır ve

“ml” olarak belirtilir. Sperma, sperm ve eklenti bezlerinin salgılarından oluşur. (Tekin, 1990; Tekin, 1994). Sperma miktarı hayvan türüne, ırkına, yaşına, çevre koşullarına ve sperma alma yöntemine bağlı değişiklik gösterebilir (Tekin, 1994).

Evcil kedilerin sperma miktarı oldukça düşüktür. Miktar çok yetersizse daha ileri işlemlerden önce örneği sulandırmak gerekebilir. Ancak sulandırma sırasında, sulandırma ortamı ve seminal sıvılar arasındaki osmotik basınç farkı, sperm kuyruklarının kıvrılma ve bükülmelerine neden olabilir (Howard ve ark., 1990; Axnér ve ark., 1998).

Platz ve ark. (1978), 2.5-4.5 kg ağırlıklı 6 evcil kediye 6 aylık bir periyot boyunca 12 saatlik aydınlatma uygulamışlardır. Araştırmacıların, elektro-ejekülasyon (2-8 V ve 5-220 mA) ve suni vagina yöntemi ile aldıkları sperma miktarları sırasıyla  $223.6 \pm 49.8 \mu\text{l}$  ve  $33.8 \pm 4.8 \mu\text{l}$  olmuştur.

Platz ve Seager (1978), evcil kedide elektro-ejekülasyon yöntemiyle haftada 1 kez olmak üzere ejakülasyon başına 0.077-0.738 ml, ortalama 0.233 ml; Carter ve ark. (1984), aynı yöntemle 40  $\mu\text{l}$  ile 160  $\mu\text{l}$ , ortalama  $100 \pm 1.0 \mu\text{l}$  sperma aldıklarını bildirmişlerdir.

Howard ve ark. (1990), normospermik ve teratospermik evcil kedilerden elektro-ejekülasyon yöntemi ile sırasıyla  $124.1 \pm 9.5 \mu\text{l}$  ve  $97.4 \pm 9.5 \mu\text{l}$ ; Long ve ark. (1996) ise aynı yöntemle sırasıyla  $246.9 \pm 10.1 \mu\text{l}$  ve  $256.7 \pm 7.1 \mu\text{l}$  sperma almışlardır.

Axnér ve ark. (1998)’nın kediye elektriksel uyarımlar vererek elde ettikleri sperma 0.02 ve 0.15 ml, ortalama 0.07 ml’dir. Kaya (2000)’nın Ankara Kedilerinden aynı yöntemle aldığı sperma ortalama  $61.37 \pm 0.27 \mu\text{l}$ ’dir.

Tanaka ve ark. (2000a), 3-5 yaşlı 4 erkek kedide sperma kalitesi ve ejakülasyon aralıkları arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Suni vagina kullanarak her gün, iki günde bir, üç günde bir ve her sperma alma gününde ard arda 2 kez olmak üzere toplam 20 kez sperma almışlardır. Her gün aldıkları spermada; ilk hacmi 55.6  $\mu\text{l}$ , ikinci hacmi 49.1  $\mu\text{l}$ , İki günde bir aldıkları spermada; ilk hacmi 54.8  $\mu\text{l}$ , ikinci hacmi 59.3  $\mu\text{l}$ , 3 günde bir aldıkları spermada; ilk hacmi 51.2  $\mu\text{l}$ , ikinci hacmi ise 61.9  $\mu\text{l}$  olarak saptamışlardır.

Daşkın (2002), elektro-ejekülasyon yöntemiyle kediden 24 saat arayla 2 kez sperma almış, sperma miktarını ilk ejekülatta 360 µl, ikinci ejekülatta ise 246 µl olarak elde ettiğini rapor etmiştir.

Kedilerden elektro-ejekülasyon yöntemiyle Neubauer ve ark. (2004),  $0.10 \pm 0.01$  ml; Tebet ve ark. (2006),  $0.14 \pm 0.1$  ml; Zambelli ve Cunto (2006), 30-400 µl arasında, ortalama  $127.5 \pm 132.3$  µl; Chatdarong ve ark. (2008), 20-162 µl arasında, ortalama  $64.5 \pm 34.9$  µl sperma aldıklarını bildirmişlerdir.

### **2.5.2. Spermanın rengi**

Spermanın rengi; hayvan türü ve ırkına göre farklılıklar göstermekle beraber (Tekin, 1990), kıvamına, içerdiği sperm sayısına ve erkek eklenti bezlerinin salgısına da bağlıdır (Çoyan ve ark., 2002). Spermalarda normalin dışında renklere de rastlanabilir. Bu durumlar, genital organlarda anormal bir durumun olduğunun veya spermaya yabancı maddelerin karıştığının belirtisidir (Tekin, 1994).

Sperma görünüşte homojen ve krembeyaz renkte olmalıdır (Zambelli ve Cunto, 2006). Örneklerin idrarla kontaminasyonu sarı renk değişimini ortaya çıkarır. Özellikle yüksek voltaj kullanılırsa elektro-ejekülasyonla alınan örneklerde bazen idrar söz konusu olabilir (Pineda ve Dooley, 1984).

Daşkın (2002), 24 saat arayla kediden aldığı iki ejekülatta, rengin açık krem olduğunu tespit etmiştir.

### **2.5.3. Sperm motilitesi**

Bir yönde ve güçlü hareket eden spermaların hareketsiz veya diğer hareket biçimi gösterenlere oranıdır (Tekin, 1990; Tekin, 1994). Yalnızca motil spermaların dölleme yeteneği olduğu kabul edildiğinden, yapılacak muayenelerde motilite tespiti önemli yer tutar (Tekin, 1990; Tekin, 1994; Çoyan ve ark., 2002).

Motilite muayenesi için öncelikle mikroskobun ısıtma tablası olmalı ve tabla ısısı 37 °C'ye ayarlanmalıdır. Sperma ile temas edecek tüm malzemeler (lam, lamel, baget, vb.) steril ve vücut ısısında olmalıdır (Çoyan ve ark., 2002).

Motilite muayenesi için sulandırılmış spermadan küçük bir damla alınarak lam üzerine konur ve üzerine 45°'lik açıyla lamel kapatılır. Işık mikroskopunda genellikle orta büyütmede (x200, x400) değerlendirme yapılır (Tekin, 1990; Tekin, 1994). Spermilerin hareket biçimleri ve oranları kısa süre içinde değerlendirilmeli, ayrıca ejakülatı ve preparatı temsil edebilmesi için en az üç değişik mikroskop alanında gözlenmelidir (Tekin, 1994).

Platz ve ark. (1978), 6 kediden haftada bir kez olmak üzere 6 ay boyunca suni vagina ve elektro-ejekülasyon programı uygulayarak sperma almışlardır. Elde ettikleri motilite değerlerini; suni vaginayla alınan spermalarda ortalama  $82.5 \pm 2.7$  olarak, elektro-ejekülasyon yöntemiyle alınan spermalarda ise  $70.4 \pm 2.6$  olarak bildirmişlerdir.

Platz ve Seager (1978), haftada bir kez olmak üzere elektro-ejekülasyon kullanarak evcil kedilerden aldıkları 52 ejakülatın motilitesinin  $47-81$  arasında değişmekle birlikte ortalama  $60$  olduğunu tespit etmişlerdir.

Wildt ve ark. (1983), evcil kediden elektro-ejekülasyon yöntemiyle aldıkları ejakülatlarda motilitenin  $77.0 \pm 3.0$  olduğunu, aynı yöntemle sperma alan Carter ve ark. (1984), motilitenin  $50-95$  arasında değişmekle birlikte ortalama  $75 \pm 5$  olduğunu bildirmişlerdir.

Howard ve ark. (1990), düşük ya da yüksek miktarlarda normal sperm üreten evcil kedilerden elektro-ejekülasyon yöntemiyle aldıkları spermayı faz kontrast mikroskop kullanarak x250 büyütmede hemen değerlendirmişler ve normospermik ejakülatlarda motiliteyi  $84.4 \pm 5.9$ , teratospermik ejakülatlarda  $73.3 \pm 5.9$  olarak tespit etmişlerdir.

Stachecki ve ark. (1993), 8-36 aylık kedilerden (n=30) aldıkları testisleri uygulama sürecine kadar 23 °C'de muhafaza edip, epididimisleri kastrasyonun 2 saati içinde sperma almak için çıkarmışlardır. Araştırmacılar epididimal sperm motilitesini normospermik kedilerde  $78.99 \pm 1.58$ , teratospermik kedilerde ise  $56.93 \pm 5.30$  olarak saptamışlardır.

Long ve ark. (1996), sürekli olarak normospermik (%60 normal sperm/ejekülat, n=3 erkek kedi) ya da teratospermik (%40 normal sperm/ejekülat, n=3 erkek kedi) sperm üreten iki evcil kedi popülasyonundan 6 yetişkin kediye sperm kaynağı olarak kullanmışlardır. Araştırmacılar elektro-ejekülasyon yöntemiyle aldıkları spermada motiliteyi; normospermik ejekülatlarda  $82.1 \pm 1.1$ , teratospermik ejekülatlarda ise  $69.6 \pm 8.9$  olarak tespit etmişlerdir.

Axnér ve ark. (1997), 15 evcil kediden aynı anestezi periyodunda 5-10 dak aralıklarla kastrasyondan önce elektro-ejekülasyon yöntemiyle sperma almışlardır. Araştırmacılar motilite değerinin ilk ejekülatta  $55.7 \pm 20.8$  iken, ikinci ejekülatta  $70.7 \pm 12.7$  olmasını epididimiste spermin yaşlanmasına bağlamışlardır.

Axnér ve ark. (1998), elektro-ejekülasyonla aldıkları spermada motilitenin %50-85 arasında değişmekle birlikte ortalama  $70.6$  olduğunu; Kaya (2000), Ankara Kedilerinden aynı yöntemle aldığı spermada motilitenin  $62.45 \pm 1.67$  olduğunu bildirmiştir.

Tanaka ve ark. (2000a), kedilerde sperma kalitesi üzerinde ejakülasyon aralıklarının etkilerini araştırmak için yaptıkları bir çalışmada, 4 deneme kedisinden her gün, günde bir ve üç günde bir suni vagina ile 10 kez sperma almışlardır. Araştırmacılar kedilerden herhangi bir aralıkta aldıkları sperma için motilitede fark gözlemediklerini ve motilitenin %75-90 arasında değiştiğini kaydetmişlerdir.

Tanaka ve ark. (2000b), Tsutsui ve ark. (2000a) ile Tsutsui ve ark. (2000b) sperma kalitesi, kopulasyon yeteneği ve fertilitesi normal olan 2-12 yaşları arasındaki 6 kediden suni vagina ile aldıkları ejekülatlarda motiliteyi %80-95 olarak bildirmişlerdir.

Daşkın (2002), elektro-ejekülasyon yöntemiyle aldığı spermayı Tris sulandırıcısıyla sulandırıp motiliteyi değerlendirmiştir. İlk gün aldığı spermada motiliteyi %70, ikinci gün aldığı spermada ise motiliteyi %75 olarak saptamıştır. Aynı yöntemle sperma alan Zambelli ve ark. (2002), motilitenin  $81.87 \pm 6.5$  ile  $83.75 \pm 9.4$  arasında değiştiğini; Penfold ve ark. (2003) ise normospermik ve teratospermik kedilerde sırasıyla  $63.1 \pm 9.6$  ve  $52.5 \pm 4.9$  olduğunu tespit etmişlerdir.

Tsutsui ve ark. (2003), kaput epididimisten aldıkları spermada motilitenin hayvanlar arasında geniş ölçüde değiştiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar sol epididimisin baş kısmından aldıkları spermada motilitenin ortalama  $17.5 \pm 4.2$ , kuyruk kısmında  $66.5 \pm 4.8$  olduğunu, yine sağ epididimisin baş kısmında  $19.0 \pm 5.0$ , kuyruk kısmında ise  $67.0 \pm 4.5$  olduğunu bildirmişlerdir.

Baran ve ark. (2004a), rastgele seçtikleri 5 kediden elektro-ejekülasyon yöntemiyle aldıkları toplam 40 ejekülattaki motiliteyi ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopla x200 büyütmede, en az 3 alanda inceleme sonucunda ortalama  $87.87 \pm 6.88$  olarak tespit etmişlerdir.

Neubauer ve ark. (2004), teratospermik kediler üzerinde yaptıkları bir çalışmada, epididimal sperm motilitesini  $74.0 \pm 4.9$  olarak, elektro-ejekülasyon yöntemiyle aldıkları spermada ise sperm motilitesini  $69.7 \pm 3.1$  olarak bildirmişlerdir.

Epididimal sperm motilitesini; Kashiwazaki ve ark. (2005),  $80.8 \pm 2.0$ ; Luvoni (2006),  $59 \pm 14$  ile  $83 \pm 1$  arasında; Tebet ve ark. (2006),  $77.5 \pm 8.2$ ; Siemieniuch ve Dubiel (2007),  $77.9 \pm 6.8$ ; Cocchia ve ark. (2009) ise  $54.7 \pm 11.3$  olarak saptamışlardır.

Tebet ve ark. (2006), elektro-ejekülasyon yöntemiyle aldığı spermada motilitenin  $82.0 \pm 6.7$  olduğunu; aynı yöntemle sperma alan Chatdarong ve ark. (2008) ise motilitenin  $70-95$  arasında değişmekle birlikte ortalama  $85.5 \pm 6.8$  olduğunu rapor etmişlerdir.

#### **2.5.4. Sperm yoğunluğu**

Sperm yoğunluğu; birim hacim spermada bulunan sperm sayısı olarak tanımlanabilir (Tekin, 1990; Tekin, 1994; Demirci, 2000). Özellikle spermanın kullanılmasında ve değerlendirilmesinde ejekülat miktarı ve motilitesi yanında çok önemli bir spermatolojik özelliği oluşturur (Tekin, 1990). Aynı türdeki hayvanlar arasında, hatta bireyler ve aynı bireyden alınan değişik ejekülatlar arasında çevresel faktörler, bakım-besleme ve sperma alma şekline bağlı olarak sperm yoğunluğu değişebilir (Çoyan ve ark., 2002).

Elektro-ejekülasyonla alınan spermanın hacmi artarken, yoğunluğu azalmaktadır. Bu olgu, elektro-ejekülasyon tarafından aşırı uyarılmış olduğu görülen ve normal ejakülattaki hacmin çoğuna katkıda bulunan prostat ve bulbo-üretral bezlerin uyarılmasından ileri gelir (Platz ve ark., 1978).

Wildt ve ark. (1983), elektro-ejekülasyon yöntemiyle aldıkları spermada yoğunluğun  $147.0 \pm 39.0 \times 10^6/\text{ml}$  olduğunu; aynı yöntemle sperma alan Carter ve ark. (1984), yoğunluğun ortalama  $107.0 \pm 39.1 \times 10^6/\text{ml}$  olduğunu bildirmişlerdir.

Howard ve ark. (1990), sperm yoğunluğunu normospermik ejakülatlarda  $167.6 \pm 43.6 \times 10^6/\text{ml}$  ve teratospermik ejakülatlarda  $361.3 \pm 6.4 \times 10^6/\text{ml}$  olarak; Long ve ark. (1996), aynı değerleri sırasıyla  $222.3 \pm 13.1 \times 10^6/\text{ml}$  ve  $199.0 \pm 50.3 \times 10^6/\text{ml}$  olarak saptamışlardır.

Roth ve ark. (1994), normal sperm oranları %60, %45-55 ve %40 olan evcil kedilerden elektro-ejekülasyon yöntemiyle elde ettikleri ejakülatlarda sperm yoğunluğunu sırasıyla  $307 \pm 122 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $194 \pm 61 \times 10^6/\text{ml}$  ve  $148 \pm 55 \times 10^6/\text{ml}$  olarak bildirmişlerdir.

Kaya (2000), Ankara Kedilerinden elektro-ejekülasyonla aldığı spermada yoğunluğun ortalama  $184.53 \pm 26.87 \times 10^6/\text{ml}$  olduğunu; aynı yöntemle sperma alan Chatdarong ve ark. (2008), sperm yoğunluğunun ortalama  $613.9 \times 10^6/\text{ml}$  olduğunu tespit etmişlerdir.

Daşkın (2002), elektro-ejekülasyon yöntemiyle kedilerden 1. gün  $90 \times 10^6/\text{ml}$  yoğunlukta, 2. gün ise  $65 \times 10^6/\text{ml}$  yoğunlukta sperm içeren ejakülatlar almıştır. Araştırmacı, sperma miktarının azlığı nedeniyle ejakülatları eşit miktarda Tris sulandırıcısı ile sulandırdıktan sonra yoğunluğu saptamıştır.

Baran ve ark. (2004a), 5 kediden elektro-ejekülasyon yöntemiyle aldıkları spermada yoğunluğu hemositometrik metotla hesaplamışlar ve  $123.75 \pm 20.66 \times 10^6/\text{ml}$  ile  $185.00 \pm 71.51 \times 10^6/\text{ml}$  arasında değiştiğini kaydetmişlerdir.

Neubauer ve ark. (2004), kastrasyondan hemen önce teratospermik kedilerden elektro-ejekülasyon yöntemiyle aldıkları ejekülatlarda sperm yoğunluğunun  $1297.4 \pm 252.3 \times 10^6/\text{ml}$  olduğunu bildirmişlerdir.

Tebet ve ark. (2006), çalışmalarında kauda epididimisten ve elektro-ejekülasyonla aldıkları evcil kedi spermasının özelliklerini karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar, sperm yoğunluğunu elektro-ejekülasyonla elde ettikleri spermada  $111.2 \pm 75.3$  olarak, kauda epididimisten aldıkları spermada ise  $44.1 \pm 54.9$  olarak saptamışlardır.

Siemieniuch ve Dubiel (2007), 12 Avrupa kedisinden aldıkları epididimal spermalarda yoğunluğun  $32.5 \pm 3.4 \times 10^6/\text{ml}$  olduğunu; Cocchia ve ark. (2009) ise evcil kedilerden aldıkları epididimal spermada yoğunluğun  $58.15 \pm 18.3 \times 10^6/\text{ml}$  olduğunu kaydetmişlerdir.

#### **2.5.5. Ölü sperm oranı**

Ölü spermelerin boyayı alma, canlı olanların ise boyayı almama özelliğine dayanılarak, boyama testleriyle ölü sperm oranı belirlenir. Boyama işleminde genellikle eosin kullanılmakla beraber, eosin-nigrosin, opal blue ve fast green gibi boyalardan da yararlanılabilir (Tekin, 1990; Tekin, 1994).

Ölü sperm oranının saptanması, spermatolojik özellikler bakımından ancak tamamlayıcı bilgi verir. Çünkü yerinde sallanan ve çember hareketliler de canlı sperm özelliği gösterebilirler. Spermada yüksek bulunan ölü sperm oranı olumsuzluk işaretidir. Bu durumda diğer spermatolojik özelliklerde gözden geçirilmelidir (Tekin, 1990; Tekin, 1994).

Byers ve ark. (1989), 5 adet Sibirya Kaplanından (*Panthera tigris*) haftada 1 kez elektro-ejekülasyon yöntemiyle aldıkları spermayı eosin nigrosin ile boyamışlar ve canlı sperm oranının  $\%41.8 \pm 7.5$  ile  $\%66.8 \pm 6.6$  arasında değişmekle birlikte ortalama  $\%58.1 \pm 12.9$  olduğunu saptamışlardır.

Kaya (2000)'nın Ankara Kedilerinden aldığı spermada, eosin ile boyama sonrasında tespit ettiği ölü sperm oranı  $\%20.80 \pm 1.30$ 'dur.

Suni vagina ile sperma alan Tanaka ve ark. (2000a), canlı sperm oranının %86.3 ile %95.5 arasında olduğunu; Tsutsui ve ark. (2000a), canlı sperm oranının  $90.1 \pm 4.4$  olduğunu; Tanaka ve ark. (2000b) ile Tsutsui ve ark. (2000b), suni vaginayla aldıkları spermallerden, canlı sperm oranı %83 ile %98 arasında değişenleri suni tohumlamada kullandıklarını bildirmişlerdir.

Tsutsui ve ark. (2003), ortalama canlı sperm oranını sol ve sağ epididimislerin kaput kısmında sırasıyla  $73.0 \pm 4.2$  ve  $76.9 \pm 4.6$  olarak, kaudal kısımlarında ise sırasıyla  $82.5 \pm 2.5$  ve  $80.9 \pm 2.6$  olarak saptamışlardır.

Siemieniuch ve Dubiel (2007), klinik olarak sağlıklı Avrupa kedilerinden kastrasyon sonrasında aldıkları taze epididimal spermada, canlı sperm oranının  $84.9 \pm 7.8$  olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bu değeri eosin nigrosin boyamayla belirlediklerini ve spermayı buzdolabında sulandırıcı içinde saklamanın 3. gününde canlı sperm oranının  $52.5 \pm 13.8$ 'e düştüğünü bildirmişlerdir.

Cocchia ve ark. (2009), canlı sperm oranını eosin boyamayla kriyopreservasyondan önce ve çözündürme sonrası boyalı smearlarda mikroskopta x400 büyütmede 200 sperm sayarak incelemişler ve  $74.3 \pm 8.6$  olarak saptamışlardır.

#### **2.5.6. Anormal sperm oranı**

Spermada bulunan spermelerin morfolojik muayenesi, anormal formlu hücrelerin biçim ve oranlarının saptanması amacıyla yapılır. Anormal yapılı spermelerin fertilizasyon güçlerinin olmaması ve kimi kalıtsal bozuklukları taşıması bakımından, spermanın morfolojik muayenesi çok önemlidir (Tekin, 1990). Spermanın morfolojik testleri için değişik boyama tekniklerinin yanı sıra tespit solüsyonları kullanılabilir (İleri ve ark., 1998).

a) Boyama Yöntemi: Spermeler eosin, nigrosin, nigrosin-eosin, methylenblue, opalblue, anilinblue, fast green, bromfenolblue vb. boyalar kullanılarak boyanabilir.

b) Sıvı Fikzasyon Yöntemi: Bu yöntemde sperma numunesi herhangi bir tespit solüsyonu içinde fikse edilerek incelenir. Sıvı fikzasyon yönteminde sperma numuneleri çoğunlukla Hancock solüsyonu içinde tespit edilirler (Tekin, 1990).

Çoğu kedi çalışmalarında yalnızca bir fikzasyon metodu tüm sperm anormalliklerini değerlendirmek için kullanılmaktadır. Kedilerde sperm morfolojisini değerlendirmek için kullanılan örnek metotlar; eosin-nigrosin veya papanicolao boya ile smearları boyamak ya da gluteraldehyde veya Hancock solüsyonunda fikzasyondur (Howard ve ark., 1990; Stachecki ve ark., 1993; Schäfer ve Holzman, 2000).

Bazı evcil (Howard ve ark., 1990; Axnér ve ark., 1997) ve vahşi kedi türlerinin spermalarında anormal sperm oranları nispeten yüksektir (Axnér ve Forsberg, 2002). Morfolojik olarak kusurlu sperm, fertilizasyon yeteneğine sahip değildir (İleri ve ark., 1998). Spermalarında %60'dan daha yüksek normal sperm bulunduran kediler normospermik olarak, %40'dan daha düşük normal sperm bulunduranlar teratospermik olarak değerlendirilmektedir (Howard ve ark., 1990; Howard ve ark., 1993; Long ve ark., 1996).

Wildt ve ark. (1983), elektro-ejekülasyon yöntemiyle elde ettikleri ejakülatlarda %29.1'lik anormal sperm saptamışlardır.

Howard ve ark. (1990), normal sperm oranını, normospermik ejakülatlarda %71.6±6.4, teratospermik ejakülatlarda %33.8±6.4 olarak; Stachecki ve ark. (1993), aynı değerleri sırasıyla %84.40±1.46, %27.83±2.66 olarak tespit etmişlerdir.

Long ve ark. (1996), Transmission elektron mikroskop ile belirledikleri anormal akrozom oranının, teratospermik örneklerde (%30.0±3.9) normospermik örneklerdekinden (%3.1±1.3) daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Axnér ve ark. (1997), 15 evcil kediden 5-10 dak aralıklarla elektro-ejekülasyonla aldıkları ejakülatlarda; normal sperm oranının 2. ejakülatlarda anlamlı olarak daha yüksek olduğunu (ilk ejakülatta %40.9±24.5, ikinci ejakülatta %54.6±17.2), ilk ejakülatlarda ikincisinden belirgin olarak daha yüksek distal damlacık (sırasıyla %12.4±11.6, %7.5±6.7) ve sarmal kuyruk (sırasıyla %15.8±17.5, %7.4±7.6) olduğunu, anormal baş oranının ise hem ilk hem de ikinci ejakülatta yüksek olduğunu (ortalama %13-14) saptamışlardır. Araştırmacılar çalışmalarındaki kedilerin ilk ejakülatlarda daha yüksek oranlarda farklı morfoloji gösteren sperm ürettiklerini, kısa bir dinlenme

periyodundan sonra (5-10 dak) aldıkları ikinci ejakülatın ilkinden daha kaliteli olduğunu rapor etmişlerdir. Evcil kedideki bu farkın sebebi hakkında kesin bilgi verilmemektedir.

Axnér ve ark. (1998), evcil kedi üzerinde yaptıkları çalışmada, ejakülasyon öncesi ve sonrasında kauda epididimisten aldıkları spermada sperm morfolojisini incelemiş, ejaküle olmuş sperma ile karşılaştırmışlar ve ejakülasyonun bu oranı etkileyip etkilemediğini anlamaya çalışmışlardır. Araştırmacılar ejakülasyondan önce ve sonra çıkarılmış kauda epididimisler arasında sperm anormallikleri açısından anlamlı farkların olmadığını görmüşlerdir. Yine beklendiği gibi ejakülatlarda distal damlacıklı sperm oranı, kauda epididimisten alınmış spermadakine göre daha düşük olurken (sırasıyla %35.1 ve %75.9), kuyruk anormallikli sperm oranının ejakülatlarda, kauda epididimisten alınmış sperma ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha yüksek (sırasıyla %11.1 ve %1.6) olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarında elektro-ejakülasyon yöntemiyle aldıkları ejakülatlardaki spermelere ait anormal baş, proksimal ve distal damlacık, kopmuş baş, akrozomal defekt, akrozomal anormallik, orta kısım ve kuyruk bozukluklarını sırasıyla  $12.4 \pm 4.4$ ,  $5.2 \pm 5.3$ ,  $35.1 \pm 28.7$ ,  $7.0 \pm 14.8$ ,  $1.3 \pm 1.7$ ,  $1.8 \pm 1.7$ ,  $1.6 \pm 0.9$ ,  $11.1 \pm 8.6$  olarak saptamışlardır.

Kaya (2000), Ankara Kedilerine ait ejakülatlarda anormal yapı ve bozukluk gösteren sperm ortalamasının  $26.84 \pm 1.29$  olduğunu bildirmiştir.

Tanaka ve ark. (2000a), 4 kediden her gün, gınaşırı ve 3 günde bir (sperma alma gününde ard arda 2 kez) aldıkları spermalarda anormal sperm oranları farklılık göstermiştir. Her gün aldıkları spermada ilkinde anormal sperm oranını  $4.8 \pm 0.5$ , ikincisinde  $7.3 \pm 3.3$  olarak, iki günde bir aldıkları spermalarda aynı değerleri sırasıyla  $8.5 \pm 1.5$  ve  $6.9 \pm 1.7$  olarak, üç günde bir aldıkları spermalarda ise sırasıyla  $6.8 \pm 1.1$  ve  $5.6 \pm 0.6$  olarak tespit etmişlerdir.

Tsutsui ve ark. (2000a), sperma kalitesi ve fertilitesi normal 6 kediden suni vagina ile aldıkları spermada  $3.8 \pm 1.7$  ile  $6.0 \pm 0.8$  arasında anormal sperm saptamışlardır.

Baran ve ark. (2004a), toplam morfolojik defekt oranının  $15.88 \pm 5.41$  ile  $19.50 \pm 5.93$  arasında olduğunu yine Baran ve ark. (2004b), akrozom, diğer (baş, orta

ve kuyruk) ve toplam morfolojik bozukluk oranlarının sırasıyla  $9.20 \pm 2.55$ ,  $9.20 \pm 3.49$  ve  $18.40 \pm 4.79$  olduğunu bildirmişlerdir.

Neubauer ve ark. (2004), çalışmalarında teratospermik kedileri kastrasyona maruz bırakıp testislerini çıkarmışlar, kastrasyondan hemen önce elektro-ejekülasyon yöntemi ile sperma almışlardır. On adet teratospermik kedinin epididimal spermasında  $11.4 \pm 0.8$ , ejeküle spermalarında ise  $9.3 \pm 2.2$  oranında normal sperm saptamışlardır.

Tebet ve ark. (2006), 10 yetişkin evcil kedi ( $>4$  kg) üzerinde yaptıkları çalışmada kauda epididimisten (EP;  $n=10$ ) ve elektro-ejekülasyonla (EL;  $n=10$ ) elde ettikleri taze spermada sırasıyla  $23.1 \pm 13.9$  ve  $53.4 \pm 16.6$  oranında normal sperm bildirmişlerdir.

Siemieniuch ve Dubiel (2007), klinik olarak sağlıklı 12 Avrupa kedisinden kastrasyon işleminden sonra elde ettikleri testislerden aldıkları spermada, spermaların  $72.7 \pm 8.8$ 'inin morfolojik olarak normal olduğunu tespit etmişlerdir.

Chatdarong ve ark. (2008), sperm başlarının morfolojisi için 500 spermi, karbol-fuksil ile boyalı smearlarda ışık mikroskobu altında ve  $\times 1000$  büyütmede değerlendirmişlerdir. Orta kısmı ve kuyruk morfolojisini ise formol-saline ile tespit edilmiş örneklerde faz kontrast mikroskop altında  $\times 1000$  büyütmede 200 sperm sayarak incelemişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarında baş kısmı normal sperm oranının  $78 \pm 5.1$  olduğunu, orta kısmı ve kuyruk kısmı normal sperm oranının  $76.5 \pm 5.2$  olduğunu bildirmişlerdir.

## **2.6. Spermının Dondurulması**

Ülkemiz için çok önemli bir kültür varlığı olan Ankara ve Van Kedilerinin genetik materyalinin korunması acil bir zorunluluktur.

Uzun süreyle spermayı saklama, tehlikede olan populasyonların genetik çeşitliliğini korumak için önemli bir araçtır (Tebet ve ark., 2006). Epididimal spermayı dondurarak saklama, özellikle nesli tükenmekte olan hayvanların korunması için, türlerin gametinin saklanması adına önemli bir tekniktir (Tsustsui ve ark., 2003).

Spermanın saklanması, spermin uygun sulandırıcılar içinde hareketlerinin sınırlandırılmasını sağlamakla olasıdır. Bu da, ancak spermanın ısısının uygun biçimde düşürülmesiyle olabilmektedir (Yurdaydın, 1990; Yurdaydın, 1994).

Spermilerin dölleme gücünü yitirmeden uzun süre saklanabilmesi ancak dondurulması ile mümkündür. Spermier ejakölasyondan sonra soğuk şokuna karşı çok duyarlıdır. Ejakölasyondan sonra bir süre inkübe edildikleri taktirde soğuşa karşı direnç kazanabilmektedirler (Çoyan ve ark., 2002).

Gametlerin kryopreservasyonu; yardımcı üreme programlarında önemli bir araçtır. IVF veya suni tohumlama gelecekteki bir tarihte yapılacaksa oosit veya spermin uzun süreli depolanması bir zorunluluktur (Luvoni, 2006).

Suni tohumlama programında soğutulmuş ve dondurulmuş spermanın kullanımı, uzun mesafelerde genetik materyal değişimini çok kolaylaştırır. Bulaşıcı hastalıkların taşınma riskini de azaltır (Axnér ve Forsberg, 2002).

Taze sperma ile suni tohumlamada daha iyi gebelik sonuçları elde etmek mümkünse de, dondurulmuş sperma kullanımı spermanın sevkıyatı ve bankacılığına müsaade ettiğı ve planlanmış suni tohumlamayı kolaylaştırdığı için genellikle daha fazla ilgi çekmektedir (Tsutsui ve ark., 2004a).

Evcil kedi sperm ve oositleri, diğier bazı türlerin gametleriyle kıyaslandığında, dondurma metotlarının başarısını zorlaştıran fiziksel özelliklere sahiptir. Bunun için değişik prosedürler araştırılsa bile, hem sperm hem de oositler için optimal kryopreservasyon teknikleri henüz geliştirilememiştir (Luvoni, 2006).

Ejeküle kedi spermasının kryopreservasyonu ilk kez Platz ve ark. (1978) tarafından bildirilmiştir. Dondurulmuş-çözdürölmüş sperma kullanılarak yapılan vaginal tohumlamayla kedilerde sadece %10'luk bir gebelik elde edildiğı bildirilmiştir (Platz ve ark., 1978; Tsutsui ve ark., 2003).

Kedi sperması; küçük şişeler (Lengwinat ve Blottner, 1994), payetler (Hay ve Goodrowe, 1993) ve pelletler (Platz ve ark., 1978) kullanılarak dondurulmaya çalışılmıştır. Örneğın kedi sperması %3'lük gliserollü EYC sulandırıcısı ile pelletlerde

(Platz ve ark., 1978; Howard ve ark., 1992; Zambelli ve ark., 2002) ve %4-8'lik gliserollü EYT-FC sulandırıcısı ile payetlerde dondurulmuştur. Ancak dondurulmuş kedi spermasının optimal gliserol seviyeleri belirsizdir.

Sperma sulandırıcılarındaki maddeler, dondurma ve çözündürme esnasında spermayı korur fakat aynı zamanda kimi toksik etkileri de olabilir. Gliserol çoğunlukla bir kriyoprotektan olarak kullanılır. Ancak kendi toksisitesi ve yüksek osmolaritesinden dolayı sperm üzerinde negatif bir etki de yapar. Yumurta sarısının koruyucu etkilerini geliştiren bir temizleyici olan Equex Sim Paste, ekseriya köpek sperması dondurma sulandırıcılarına katılırsa da, aynı zamanda kedi sperması için kullanılmaktadır (Axnér ve ark., 2004; Axnér ve Forsberg, 2007). Equex Sim Paste dondurma-çözündürme esnasında epididimal spermin akrozomlarını korumasına rağmen, çözündürme sonrası inkubasyon esnasında negatif bir etkiye sahiptir (Axnér ve ark., 2004).

Platz ve ark. (1978), 6 kediden haftada bir kez olmak üzere 6 ay boyunca suni vagina ve elektro-ejekülasyon yöntemi ile aldıkları spermayı pelletlerde dondurup, -196 °C'de muhafaza etmişlerdir. Araştırmacılar motiliteyi dondurma öncesinde elektro-ejekülasyonla aldıkları spermada %70.4±2.6, suni vagina ile aldıkları spermada %82.5±2.7 olarak saptamışlardır. Çözündürme sonrasında ise aynı değerlerin sırasıyla %53.8±4.8, %70.6±2.3 olduğunu bildirmişlerdir.

Pukazhenthı ve ark. (1999), 25 °C'den 0 °C'ye hızlı soğutmanın (14 °C/dak), kedi sperminin morfolojik bütünlüğü üzerinde, yavaş soğutmadan (0.5 °C/dak) daha zararlı olduğunu görmüşlerdir.

Schäfer ve Holzman (2000), çalışmalarında %65±10 olarak tespit ettikleri epididimal sperm motilitesini, çözündürme sonrasında %47±14 olarak saptamışlardır. Araştırmacılar Spermac boyama tekniğinin çözündürme sonrası morfolojik değerlendirmede daha başarılı olduğunu öne sürmüşlerdir.

Tsutsui ve ark. (2000a), kedilerde yaptıkları bir çalışmada suni vaginayla aldıkları ve dondurdukları sperma örneklerini 37 °C'deki su banyosunda 30 sn çözdürmüşlerdir. Araştırmacılar motiliteyi sperma alma esnasında %80-90, canlı sperm oranını ise %90 olarak tespit etmişlerdir. Çözündürme sonrası EYT-FC ile dilüe edilmiş

spermada motiliteyi ve canlı sperm oranını sırasıyla  $30.0 \pm 9.7$  ve  $53.1 \pm 6.2$  olarak, EYC grubunda ise aynı değerleri sırasıyla  $30.0 \pm 3.3$  ve  $50.7 \pm 5.4$  olarak saptamışlardır. Anormal sperm oranının; taze spermada  $3.8 \pm 1.7$ -% $6.0 \pm 0.8$  arasında değiştiğini, aynı değerlerin çözündürme sonrası EYT-FC grubunda  $18.8 \pm 4.8$ , EYC grubunda ise  $28.9 \pm 3.1$  olduğunu bildirmişlerdir.

Zambelli ve ark. (2002), 3.85, 9, 22.8, 36, 43 °C/dak'lık 5 farklı dondurma oranını karşılaştırmak için yaptıkları çalışmada, elektro-ejekülasyonla evcil normospermik kedilerden aldıkları 65 ejekülatta dondurma ve çözündürme sonrasında motilite ve normal akrozom oranlarını saptamaya çalışmışlardır. Araştırmacılar 3.85 °C/dak'da dondurmadaki motilite ve normal akrozom değerleri ile çözündürme işlemi sonrasındaki motilite ve normal akrozom değerlerini sırasıyla  $80.34 \pm 6.8$  ve  $91 \pm 4$  ile  $61.55 \pm 10.5$  ve  $77 \pm 4$  olarak tespit etmişlerdir. Aynı değerleri 9 °C/dak'da sırasıyla  $81.33 \pm 6.3$  ve  $92 \pm 3$  ile  $49.66 \pm 8.7$  ve  $66 \pm 3$  olarak, 22.8 °C/dak'da sırasıyla  $81.11 \pm 6.5$  ve  $90 \pm 3$  ile  $40.55 \pm 6.8$  ve  $47 \pm 4$  olarak, 36 °C/dak'da  $78 \pm 75$  ve  $90 \pm 3$  ile  $28.12 \pm 8.4$  ve  $37 \pm 3$  olarak, 43 °C/dak'da ise aynı değerleri  $80.00 \pm 7$  ve  $90 \pm 0.8$  ile  $21.25 \pm 4.7$  ve  $32 \pm 3$  olarak saptamışlardır. Araştırmacılar 3.85 °C/dak'lık dondurma değerinin diğer dondurma oranlarından anlamlı olarak ( $P < 0,01$ ) daha yüksek motilite ve normal akrozomla sonuçlandığını, böylece daha yavaş bir dondurma değeriyle daha iyi sonuçlar elde ettiklerini rapor etmişlerdir.

Tsutsui ve ark. (2003), çözündürme sonrasında motilite değerini %10 ile %50 arasında değişmekle birlikte  $24.0 \pm 4.4$  olarak, canlı sperm oranını ise %39.2 ile %72.7 arasında değişmekle birlikte  $52.9 \pm 4.6$  olarak kaydetmişlerdir.

Baran ve ark. (2004a), 5 adet evcil kediden elektro-ejekülasyon yöntemiyle aldıkları spermayı %3 ve %4 gliserol içeren Tris sulandırıcısı ile sulandırıp, 0.25 ml'lik payetlerde -110 °C'de 7 dak süreyle sıvı azot buharında dondurmuşlardır. Sıvı azot içerisinde -196 °C'de 1 ay süreyle muhafaza ettikleri payetleri muayene için, 37 °C'de 30 sn sürede çözdürmüşlerdir. Araştırmacılar çalışmalarında çözündürme sonrası %3 gliserollü Tris sulandırıcısı ile sulandırdıkları spermada ortalama motilite, akrozom, diğer ve toplam anormal sperm oranlarını sırasıyla  $53.00 \pm 10.85$ ,  $26.35 \pm 8.55$ ,  $14.43 \pm 3.99$  ve  $40.53 \pm 11.00$  olarak, aynı değerleri %4 gliserol içeren Tris

sulandırıcısı ile sulandırdıkları spermada sırasıyla  $50.50 \pm 13.90$ ,  $25.45 \pm 7.08$ ,  $15.20 \pm 4.36$  ve  $40.40 \pm 10.22$  olarak saptamışlardır.

Kashiwazaki ve ark. (2005), evcil kedilerden aldıkları epididimal spermayı dondurup çözündürme sonrasında motilitenin  $31.8 \pm 4$  ve plazma membran bütünlüğünün  $32.2 \pm 4.2$  olduğunu tespit etmişlerdir.

Tebet ve ark. (2006), kauda epididimisten ve elektro-ejekülasyonla aldıkları taze spermada sırasıyla  $7.4 \pm 8.9$  ve  $5.4 \pm 2.9$  oranında akrozomal defekt görürken,  $42^{\circ}\text{C}$ 'de 15 sn çözündürme sonrasında akrozomal defektlerin arttığını ve aynı değerlerin sırasıyla  $23.5 \pm 11.6$  ve  $28.3 \pm 10.2$  olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca kauda epididimisten ve elektro-ejekülasyonla elde ettikleri spermalarda normal morfolojiyi sırasıyla  $23.1 \pm 13.9$  ve  $53.4 \pm 16.6$  olarak, çözündürme sonrasında ise  $31.7 \pm 12.8$  ve  $37.4 \pm 8.8$  olarak saptamışlar ve distal damlacık kaybından dolayı çözündürme sonrası iki tür spermada morfolojik olarak normal sperm yüzdesinin benzer olduğunu fark etmişlerdir. Axnér ve ark. (2004), distal damlacıkların normalde kauda epididimisteki spermada mevcut olduğunu, ancak ejakülasyon esnasında kaybolduğunu bildirmişlerdir.

Siemieniuch ve Dubiel (2007), klinik olarak sağlıklı 12 Avrupa kedisinden kastrasyon sonrasında aldıkları spermayı dondurmuşlar, çözündürme sonrasında motilite ve canlı sperm oranını sırasıyla  $57.5 \pm 6.4$  ve  $62 \pm 6.9$  olarak tespit etmişlerdir. Spermayı  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de sulandırıcı içinde sakladıklarında motilitenin 3. günde  $52.5 \pm 13.8$ , 4. günde  $20.0 \pm 5.7$  ve 7. günde  $3.7 \pm 1.8$  olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar spermayı sulandırıcı içinde saklamanın 3. gününde  $30$ 'dan fazla motil sperm elde ettiklerini kaydetmişler, dolayısıyla spermanın kastrasyondan sonra 3 gün boyunca kullanımının, kısa süreliğine kryopreservasyondan daha iyi olacağını ileri sürmüşlerdir.

Chatdarong ve ark. (2008), 6 kediden elektro-ejekülasyon yöntemiyle aldıkları 36 ejekülatı sulandırıp,  $5^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutup, 0.25 ml'lik payetler içinde sıvı azot buharında dondurmuşlardır. Araştırmacılar zarar görmemiş akrozom tespitini taze spermada, çözündürme sonrasında hemen (0. saat), 2., 4., ve 6. saatlerde olmak üzere 5 bölümde, her bir örnekten 5  $\mu\text{l}$ 'lik kısmı inceleyerek tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Ejekülatlardaki bozulmamış akrozomun  $65-90$  arasında değişmekle birlikte ortalama  $74.0 \pm 11.2$  olduğunu görmüşlerdir. Araştırmacılar çözündürme ısısının toplam sperma kalitesini

etkilemediğini, halbuki çözündürme sonrası sulandırmanın (seyreltmenin) akrozom bütünlüğü, membran bütünlüğü ve sperm motilitesinin önemli derecede iyileşmesiyle sonuçlandığını vurgulamışlardır. Çalışmada 37 °C’de çözündürmede inkubasyondan sonra 36 ejakülattaki bozulmamış akrozomlu sperm oranları 0., 2., 4. ve 6. saatlerde sırasıyla %39.4±19.0, %32.0±17.7, %28.2±17.4, %18.7±12.9 olurken, 37 °C’de çözündürmede seyreltmeyle birlikte aynı değerler sırasıyla %46.4±20.3, %39.7±18.6, %34.2±14.8, %23.7±13.2 olmuştur. Yine bu değerler 70 °C’de çözündürmede %39.6±22.1, %31.3±19.3, %28.0±17.8, %17.8±13.0 olurken, 70 °C’de çözündürmede seyreltmeyle birlikte sırasıyla %42.7±20.2, %34.6±16.2, %32.3±16.0, %24.0±13.4 olmuştur. Araştırmacılar equex içeren Yumurta Sarısı Tris Sulandırıcısını dondurma sulandırıcısı olarak kullandıklarında, 37 ya da 70 °C’de çözündürme sonrası seyreltmenin sperma kalitesini hemen arttırdığını ifade etmişlerdir.

Cocchia ve ark. (2009), evcil kediden aldıkları epididimal spermayı 0.25 ml’lik mini payetler içine doldurup, 20 dak sıvı nitrojen buharına (sıvı nitrojen yüzeyi üzerinde 6 cm) maruz bırakmışlar, daha sonra sıvı nitrojende depolamışlardır. Dört hafta sonra örnekleri 37 °C’deki sıcak su banyosunda 30 sn çözdürmüşler, 1 ml Tris Yumurta Sarısı Sulandırıcısıyla dilüe edip değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar kauda epididimislerden elde ettikleri taze, çözündürme sonrası hemen (0. saatte) ve 38 °C’de inkubasyonun 3 saati boyunca 1., 2., 3. saatlerde motiliteyi sırasıyla %54.7±11.3, %32±13.1 ve %31.4±9.2, %29.9±11.4, %27.6±8.7 olarak, canlı sperm oranını ise sırasıyla %74.3±8.6, %45.2±9.4 ve %45.1±9.7, %42.7±8.4, %37.2±8.7 olarak saptamışlardır. Araştırmacılar çalışmalarında anormal sperm oranını taze spermada %43.2±28.6, çözündürme sonrası spermada ise %52.8±31.5 olarak kaydetmişlerdir.

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Gereç**

##### **3.1.1. Deney grubunun sağlanması**

Çalışmada Van Kedisi Araştırma Merkezi Kedi Evi'nde bulunan erkek kedilerden 7 sağlıklı erkek Van Kedisi araştırma materyali olarak kullanıldı. Kediler endüstriyel kedi maması ile beslendi ve önlerinde her an içebilecekleri miktarlarda temiz su bulunduruldu. Uygulama yapılan kediler 3-6 yaş arasında ve 2.5-6 kg arası vücut ağırlığına sahip olup, çalışma süresince çiftleştirmede kullanılmadı.

##### **3.1.2. Kullanılan alet ve malzemeler**

###### **Elektro-ejekülatör**

Çalışmada kullanılan elektro-ejekülatör cihazı kediler için özel olarak yapılmış olup, 1 cm kalınlık, 12 cm uzunluğunda 3 elektrotlu (her biri 1.5 mm kalınlık ve 3 cm uzunlukta) bir rektal probu, voltmetresi ve ampermetresi vardır. Güç kaynağı olarak AC kullanan ve 50 Hz frekans modülasyonunda sinüzoidal dalga üreten elektro-ejekülatör cihazının kediyi ve operatörü elektrik akımına karşı koruyan sigorta sistemi ile verilecek elektrik dozunu ayarlayabilen bir ayar düğmesi bulunmaktadır.

###### **Diğer alet ve malzemeler**

Toplama kadehi olarak 2 ml'lik kapaklı eppendorf tüpler kullanıldı. Ayrıca; enjektör, makas, kayganlaştırıcı, otomatik pipet, otomatik pipet ucu, payet, 3 ayrı sperma sulandırıcısı, lam, lamel, Thoma lamı, hassas terazi, sperma dondurma kabı, sıvı azot ve sıvı azot tankı kullanıldı. Tez çalışmasında kullanılan alet ve malzemelerin bir kısmı Şekil 1'de verilmiştir.



**Şekil 1.** Tez çalışmasında kullanılan alet ve malzemelerin bir kısmı.

### **3.2. Yöntem**

#### **3.2.1. Kedilerin anestezisi**

Çalışma materyali kedilere Samsar (1977)'ın bildirdiği gibi 0.3 ml ketamine hydrochloride (Ketalar, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ve 0.3 ml xylazin hydrochloride (Rompun, Bayer, İstanbul, Türkiye) im verilerek istenilen sürede (Tablo 1) genel anestezi sağlandı. Çalışmada elektro-ejekülasyonla sperma almak için anestezi uygulanmış kedilerden birkaçı Şekil 2’de verilmiştir.

#### **3.2.2. Kediden elektro-ejekülatörle spermanın alınması**

Anestezi uygulanmış kediler sperma alınacak masada yan yatırıldı. Kedinin penis ve anüs bölgesindeki uzun tüyler kesilip, rektum ve prepusyum çevresi dikkatli bir şekilde temizlendi. Literatür bilgilere (Platz ve Seager, 1978; Axner ve Forsberg, 2002; Daşkın, 2002) uygun olarak; rektal prob kayganlaştırılarak, 7-8 cm kadar rektuma sokuldu. Daha sonra eppendorf tüp, penis üzerine yerleştirildi. Penis ortaya çıkacak

şekilde kranial olarak nazik basınçlar uygulandı ve uyarım düğmesiyle elektriksel uyarımlar verilmeye başlandı.



**Şekil 2.** Anestezi uygulanmış kediler.

Voltaj uygulamasına 0 V ile başlandı, yaklaşık 3 sn'lik bir süreçte kedinin arka ayak salınımları gerçekleşinceye kadar voltaj artırıldı. Maximum seviyede 2 sn kaldıktan sonra 1 sn'de voltaj 0 V'a düşürüldü. İki sn beklendikten sonra, arka ayak pençeleri çıkıncaya kadar uyarım voltajı yine 3 sn'de yükseltildi. Maximumda 2 sn kaldıktan sonra, voltaj tekrar 1 sn'de 0 V'a düşürüldü. Elektriksel uyarımlara bu şekilde devam edildi. Uygulanan voltajlarda kedinin arka ayaklarında azda olsa kasılmalar oluşturan en düşük voltaj değeri 2 V oldu.

Sunulan çalışmada uygulanan voltaj 2-8 V arasında değişti. Sekiz V'un aşıldığı az sayıda vakada spermaya idrar karıştı. Uyarımlarda frekans ve akım sabit olmasına karşın, voltaj ve uyarım sayısı değişti. Kediden elektro-ejekülasyon yöntemiyle sperma alınması Şekil 3'de verilmiştir.

Elektro-ejekülatör cihazına ait probun rektuma yerleşimi ve ayar düğmesi ile uyarımların verilmesi sonrasında uygulanan elektro-ejekülasyon programına ait seriler ve bu serilerin tekrarlanması ile ejakülasyonun gerçekleşmesi arasında geçen süre elektro-ejekülasyon süresini (uyarım süresini) oluşturdu. Kısacası sperma alma işlemi esnasında kedilere verilen elektriksel uyarımların ne kadar süreyle uygulandığına ait değer, uyarım süresini (elektro-ejekülasyon süresi=elektro-ejekülasyona cevap süresi) oluşturdu. Çalışma süresince her bir kediden bir hafta ara ile 10 kez sperma alındı.



**Şekil 3.** Kediden elektro-ejekülasyon yöntemiyle sperma alınması.

### **3.2.3. Spermanın değerlendirilmesi**

Spermanın makroskobik ve mikroskobik muayeneleri yapıldı. Spermanın makroskobik muayenesinde sperma miktarı ve sperma rengi değerlendirildi. Spermanın mikroskobik muayenesinde ise sperm motilitesi, sperm yoğunluğu, ölü sperm ve anormal sperm oranlarına bakıldı.

### **Sperma miktarı**

Sperma alma işleminden hemen sonra eppendorf tüp içindeki sperma ayarlanabilir otomatik pipetle çekildi ve ayar vidası yanındaki rakam okunarak miktar  $\mu$ l olarak tespit edildi.

### **Spermanın rengi**

Sperma rengini belirleme inspeksiyonla yapıldı. Elde edilen renkler beyaz ile şeffaf arasında değişti.

### **Sperm motilitesi**

Sperma ile temas edecek olan tüm malzemelerin temiz, steril ve vücut ısısında olmasına dikkat edildi. Faz kontrast mikroskobun ısıtma tablasının ısısı 37 °C'ye ayarlandıktan sonra, 1 damla sulandırılmış sperma lam üzerine bırakılıp lamelle kapatıldı ve x200 büyütmede preparatın en az 3 değişik sahasında ileri yönde aktif hareket eden spermlerin % oranlarının ortalaması ile sperm motilitesi tespit edildi.

### **Sperm yoğunluğu**

Sunulan çalışmada yoğunluk tespiti hemositometrik yöntemle, Sevinç (1977) ile Bearden ve Fuquay (1992)'ın sperm yoğunluğunu veren formülü kullanılarak yapıldı. Yoğunluk tayininde Hayem solüsyonu kullanıldı. Öncelikle (100 $\mu$ l) Hayem solüsyonu bulunan eppendorf tüp içine otomatik pipetle (10 $\mu$ l) sperma bırakıldı ve karışım sağlandı. Daha sonra bu karışımdan alınan örnek Thoma lamında sayıldı ve sperm yoğunluğu tespit edildi. Hayem solüsyonunun formülü aşağıda verilmiştir.

#### **Hayem solüsyonu:**

|                                 |          |
|---------------------------------|----------|
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | : 5.0 g  |
| NaCl                            | : 1.0 g  |
| HgCl <sub>2</sub>               | : 0.5 g  |
| Bidistile su                    | : 200 ml |

$$\text{Yoğunluk} = \frac{\text{Sayılan Sperm Sayısı}}{\text{Sayılan Küçük Kare Sayısı}} \times \text{TKKS} \times \text{SO} \times \text{TLD} \times V$$

TKKS : Toplam Küçük Kare Sayısı  
SO : Sulandırma Oranı  
TLD : Tahoma Lamının Derinliği  
V : ml'nin mm<sup>3</sup>'e Değeri

### **Ölü sperm oranı**

Ölü sperm oranını belirlemede %3'lük Sodyum Sitrat ile hazırlanmış %2'lik Eosin kullanıldı. Ölü olan hücreler boyayı alarak pembe kırmızı renk aldı. Canlı olanlar ise boya almadı. Spermada bulunan ölü sperm oranını belirlemek için ilk önce temiz bir lam üzerine bir damla eosin arkasından 1 damla sperma bırakılıp karışım sağlandı. Bu karışımdan zaman kaybetmeden sürme froti çekildi ve süratle kurutma makinesi üzerine bırakılarak kurutuldu. Froti hazırlama ve kurutma işleminin uzun sürmesi ölü sperm oranını artıracığından zamana çok dikkat edildi. Sayım x400 büyütmede yapıldı. Toplamda 200 sperm sayıldı.

### **Anormal sperm oranı**

Sunulan çalışmada anormal sperm oranı tespiti sıvı fizyasyon yöntemiyle yapıldı. Tespit solüsyonu olarak Hancock solüsyonu kullanıldı. Öncelikle Hancock tespit solüsyonu bulunan eppendorf tüp içine otomatik pipetle sperma (100 µl Hancock solüsyonu içine 10 µl sperma) bırakıldı ve karışım sağlandı. Daha sonra temiz bir lam üzerine bu karışımdan küçük bir damla bırakıldı ve hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde lamel kapatıldı. Hazırlanan bu düzenekte frothinin tek tek izlenebileceği sıklıkla hücre bulundurmasına özen gösterildi ve x1000 büyütmede 200 sperm sayıldı. Hancock solüsyonu formülü aşağıda verilmiştir.

### **1. Solüsyon**

|               |           |
|---------------|-----------|
| NaCl          | : 1.13 g  |
| Bidistile su. | : 62.5 ml |

### **2. Solüsyon**

#### **a)**

|                                                     |           |
|-----------------------------------------------------|-----------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | :2.71 g   |
| Bidistile su                                        | : 62.5 ml |

#### **b)**

|                                 |           |
|---------------------------------|-----------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | : 2.78 g  |
| Bidistile ad.                   | : 62.5 ml |

25 ml (a) + 10 ml (b) karıştırılır

### **Hancock solüsyonu:**

|             |          |
|-------------|----------|
| 1. Solüsyon | 18.75 ml |
| 2. Solüsyon | 12.50 ml |

|              |           |
|--------------|-----------|
| Formalin     | : 7.81 ml |
| Bidistile su | : 62.5 ml |

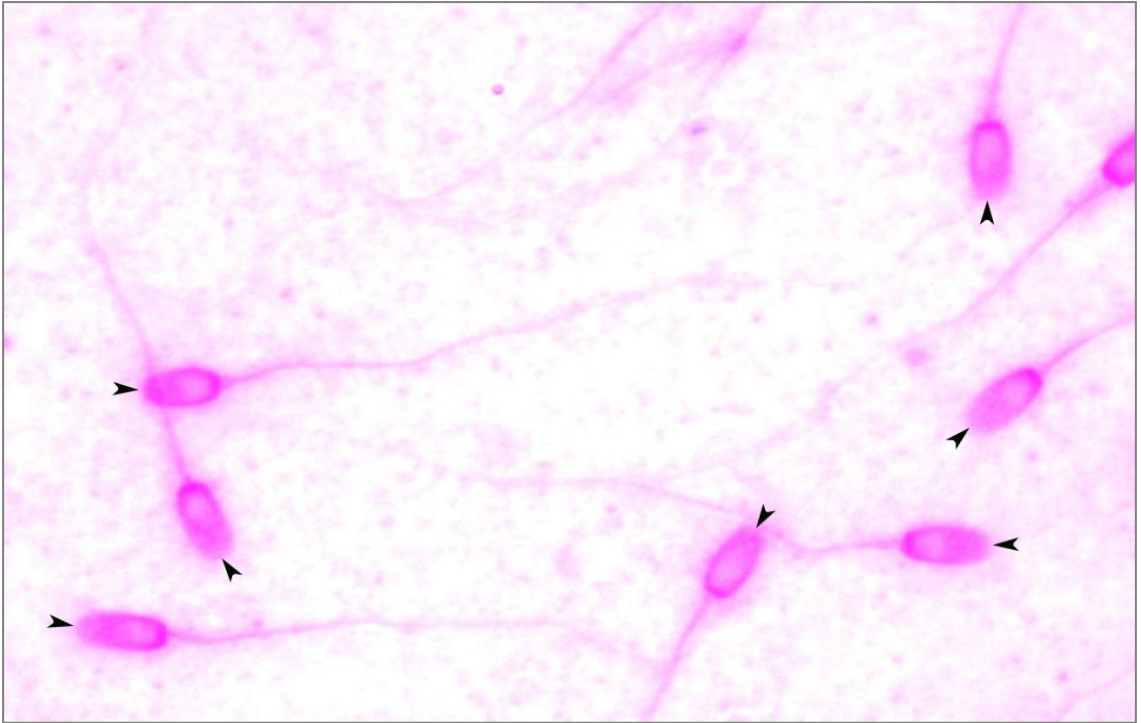
Van Kedilerine ait sperm Şekil 4’de, spermelerdeki akrozom görünümü ise Şekil 5’de verilmiştir.

### **3.2.4. Spermanın sulandırılması ve dondurulması**

Sunulan çalışmada, her bir kediden haftada 1 kez olmak üzere toplam 10 kez sperma alındı. Alınan her sperma için 3 payet donduruldu. Dolayısıyla çalışma süresince toplam 210 payet donduruldu.



**Şekil 4.** Van Kedisi Spermi.



**Şekil 5.** Van Kedisi Sperminde akrozom görünümü.

İçlerinde gliserolü hazır olarak bulunduran Biosfos, %3'lük Equiex ve %6'lık Equiex sulandırıcıları sperma alımından bir gün önce otomatik pipetle kapaklı eppendorf tüplere 100 µl bırakılıp, çalışmanın yapılacağı ana kadar +4 °C'de muhafaza edildi. Daha sonra elektro-ejekülasyon yöntemiyle alınan sperma 3 eşit kısma ayrılıp, +26 °C'de 3 sulandırıcı ile sulandırıldı. Ön sulandırması yapılan sperma gliserolizasyon işleminden sonra 0.25 ml'lik payetlere (Kruuse 340670) çekildi ve +4 °C'de 2.5 saat süreyle equilibrasyona bırakıldı. Equilibrasyondan alınan payetler, sıvı azot bulunan dondurma kabı içindeki ızgara üzerine dizilerek (sıvı azot yüzeyinden 6 cm yukarıda) 7 dak süreyle sıvı azot buharına maruz bırakıldı. Sıvı azot buharında dondurulan payetler daha sonra sıvı azot içerisine daldırıldı.

### **3.2.5. Dondurulmuş spermanın çözündürülmesi**

Hatalı olarak yapılacak bir çözdürme işlemi en iyi hazırlanmış payetlerin dahi telef olmasına neden olacağından, çözdürme ısısı ve çözdürme süresine dikkat edildi. Sıvı azot (-196 °C) içerisinde bulunan payetler, 37 °C'de 30 sn'de çözdürüldü.

### **3.2.6. Çözdürülmüş spermanın değerlendirilmesi**

Çözdürme sonrası spermada; motilite, canlılık ve anormal sperm oranları, taze spermadakine benzer metotlarla yapıldı.

### **3.2.7. İstatistiksel analizler**

Tüm değerler (%3'lük Equiex, %6'lık Equiex ve Biosfos ile sulandırılmış kedi spermasının, sulandırma ve çözdürme sonrası sperm motilite ve canlılık değerleri) arasındaki farkı belirlemek için  $\chi^2$  testi uygulandı. Ayrıca kedilerin kendi aralarındaki spermatolojik özellikleri, kedilerden sperma alırken uygulanan uyarım sayısı ve uyarım süreleri arasındaki farkı belirlemek için one-way varyans analizi ve post-hoc Tukey-HSD testi kullanıldı. Tüm verilerin istatistik analizi SPSS soft ware paket programı kullanılarak yapıldı. Elde edilen değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi (Akgül, 2003).

#### 4. BULGULAR

Kedilerin her birinden değişik miktarlarda spermalar alındı. Bu farklılık aynı kedinin değişik ejakölasyonlarında da görüldü. Tablo 2'deki analiz sonuçlarından hareketle çalışma materyalini oluşturan 7 adet Van Kedisinden elektro-ejakölasyonla alınan spermalar miktar açısından karşılaştırıldığında en düşük miktarlı spermanın  $80.80 \pm 14.56$   $\mu$ l ile 6. kediden, en yüksek miktarlı spermanın ise  $109.50 \pm 26.99$   $\mu$ l ile 7. kediden alındığı saptandı. Yedi kedinin her birinden alınan ortalama sperma miktarının ise  $91.92 \pm 21.49$   $\mu$ l olduğu tespit edildi.

Kedilerin ortalama sperma miktarları arasında yapılan varyans analizi sonucunda 6. kedi ile 7. kedi arasındaki fark istatistik olarak  $p < 0.05$  düzeyinde önemliyken, diğer kediler arasında istatistik olarak fark bulunamadı.

Tablo 2'den izlenimle sperm motilite değerleri karşılaştırıldığında en düşük motiliteye sahip spermanın  $65.50 \pm 3.68$  ile 2. kediden, en yüksek motiliteye sahip spermanın  $70.50 \pm 4.37$  ile 5. kediden alındığı bununla birlikte çalışma materyali kedilerden alınan spermalarındaki ortalama sperm motilitesinin  $67.42 \pm 4.94$  olduğu saptandı.

Ölü sperm oranları karşılaştırıldığında Tablo 2'deki ortalama sonuçlara göre; en düşük ölü sperm oranına  $18.30 \pm 5.96$  ile 6. kediden alınan spermada, en yüksek ölü sperm oranına ise  $29.30 \pm 5.90$  ile 7. kediden alınan spermada rastlandı. Ölü sperm oranı açısından genel ortalamanın  $23.91 \pm 8.59$  olduğu tespit edildi.

Çalışma materyali kedilerden alınan spermalarda spermaların morfolojik değerlendirmeleri sonucunda en düşük anormal sperm oranına 2. kediden alınan spermada rastlandığı ve bu değerin  $24.20 \pm 7.52$  olduğu, en yüksek anormal sperm oranına ise  $26.70 \pm 3.30$ 'luk bir oranla 4. kediden alınan spermada rastlandığı tespit edildi. İstatistik değerlendirmeye göre Van Kedilerinde ortalama anormal sperm oranının  $25.57 \pm 4.57$  olduğu saptandı.

Ortalama sperm motilitesi, ölü sperm ve toplam anormal sperm oranı açısından kediler arasında yapılan varyans analizi sonucunda istatistik olarak önemli bir fark tespit edilmedi.

Sunulan çalışmada, kedilerden alınan spermalar sperm yoğunlukları açısından karşılaştırıldıklarında hayvanlar arasında değişimler gösterdiği, en düşük yoğunluklu spermanın  $22.38 \pm 8.14 \times 10^6/\text{ml}$  ile 7. kediden alındığı, en yüksek yoğunluklu spermanın  $236.94 \pm 11.21 \times 10^6/\text{ml}$  ile 6. kediden alındığı ve 7 kediden alınan spermalardaki ortalama sperm yoğunluğunun  $109.20 \pm 66.12 \times 10^6/\text{ml}$  olduğu saptandı.

Kedilerin ortalama sperm yoğunlukları arasında yapılan varyans analizi sonucu 1. kedi ile diğer kediler arasında  $p < 0.05$  düzeyinde önemli fark bulundu. İkinci kedi ile 5. kedi arasında sperm yoğunluğu açısından istatistik olarak fark önemsizken, bu kediler ile diğer kediler arasında  $p < 0.05$  düzeyinde önemli fark tespit edildi. Ayrıca 3. kedi ile 4. kedi arasında sperm yoğunluğu açısından istatistik olarak fark bulunmazken, bu kediler ile diğer kediler arasında da  $p < 0.05$  düzeyinde önemli fark belirlendi. Sperm yoğunluğu açısından 6. kedi ile diğer kediler arasında  $p < 0.05$  düzeyinde ve 7. kedi ile yine diğer kediler arasında  $p < 0.05$  düzeyinde önemli fark bulundu.

Kedilerin uyarım süreleri arasında yapılan varyans analizi sonunda 6. kedi ile 7. kedi arasındaki fark  $p < 0.05$  düzeyinde istatistik olarak önemliyken, diğer kediler arasında önemli bir fark tespit edilmedi.

Kedilerden elektro-ejekülator ile sperma alırken uygulanan uyarım sayıları arasında yapılan varyans analizi sonucunda 6. kedi ile 7. kedi arasında istatistik olarak fark  $p < 0.05$  düzeyinde önemliyken, diğer kediler arasında fark önemsiz sayıldı.

**Tablo 1.** Kedilerin ağırlık ve yaşları ile anestezi için verilen ketamine hydrochloride + xylazin hydrochloride dozu ve anestezi süreleri.

|   | Kedi No         | Yapılan İşlem                         | Ağırlık (g) | Yaş | ketamine hydrochloride +<br>xylazin hydrochloride (ml) | Anestezi süresi<br>(dak) |
|---|-----------------|---------------------------------------|-------------|-----|--------------------------------------------------------|--------------------------|
| 1 | 972000000160629 | Elektro-ejekülasyonla<br>sperma almak | 3.52        | 4.5 | 0.3 + 0.3                                              | 55                       |
| 2 | 972000000135038 | "                                     | 3.44        | 5.5 | 0.3 + 0.3                                              | 55                       |
| 3 | 972000000164333 | "                                     | 3.75        | 3.5 | 0.3 + 0.3                                              | 55                       |
| 4 | 972000000127807 | "                                     | 3.77        | 5.5 | 0.3 + 0.3                                              | 50                       |
| 5 | 972000000128714 | "                                     | 4.50        | 6   | 0.4 + 0.4                                              | 60                       |
| 6 | 972000000163527 | "                                     | 2.50        | 3   | 0.3 + 0.3                                              | 40                       |
| 7 | 972000000161142 | "                                     | 6           | 6   | 0.4 + 0.4                                              | 55-60                    |

**Tablo 2.** Kedilerin ejakülatlarındaki sperma miktarı, sperm motilite ve yoğunluğu, ölü sperm oranı, toplam anormal sperm oranı, uyarım süresi ve uyarım sayılarının ortalama  $\pm$  SEM değerleri ile bu değerler arasında yapılan varyans analizi sonuçları.

| Kedi no  | Sperma miktarı<br>( $\mu$ l)    | Sperm motilitesi<br>(%) | Ölü sperm<br>(%)  | Sperm yoğunluğu<br>(...x10 <sup>6</sup> / ml) | Toplam anormal<br>sperm (%) | Uyarım süresi<br>(sn)          | Uyarım sayısı                  |
|----------|---------------------------------|-------------------------|-------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 1        | 82.90 $\pm$ 12.81 <sup>ab</sup> | 68.00 $\pm$ 5.37        | 22.80 $\pm$ 8.75  | 110.66 $\pm$ 9.53 <sup>c</sup>                | 26.40 $\pm$ 3.27            | 84.00 $\pm$ 4.21 <sup>ab</sup> | 10.30 $\pm$ 0.48 <sup>ab</sup> |
| 2        | 97.20 $\pm$ 24.26 <sup>ab</sup> | 65.50 $\pm$ 3.68        | 27.70 $\pm$ 11.90 | 139.04 $\pm$ 22.78 <sup>d</sup>               | 24.20 $\pm$ 7.52            | 84.00 $\pm$ 4.2 <sup>ab</sup>  | 10.50 $\pm$ 0.52 <sup>ab</sup> |
| 3        | 91.90 $\pm$ 18.18 <sup>ab</sup> | 67.50 $\pm$ 4.85        | 23.00 $\pm$ 8.45  | 70.62 $\pm$ 9.96 <sup>b</sup>                 | 24.60 $\pm$ 3.68            | 84.00 $\pm$ 5.65 <sup>ab</sup> | 10.50 $\pm$ 0.70 <sup>ab</sup> |
| 4        | 92.50 $\pm$ 14.56 <sup>ab</sup> | 67.50 $\pm$ 5.40        | 24.90 $\pm$ 8.25  | 57.36 $\pm$ 8.50 <sup>b</sup>                 | 26.70 $\pm$ 3.30            | 81.60 $\pm$ 3.37 <sup>ab</sup> | 10.20 $\pm$ 0.42 <sup>ab</sup> |
| 5        | 88.70 $\pm$ 26.70 <sup>ab</sup> | 70.50 $\pm$ 4.37        | 21.40 $\pm$ 6.60  | 127.40 $\pm$ 6.85 <sup>d</sup>                | 24.80 $\pm$ 3.15            | 81.60 $\pm$ 3.37 <sup>ab</sup> | 10.20 $\pm$ 0.42 <sup>ab</sup> |
| 6        | 80.80 $\pm$ 14.56 <sup>a</sup>  | 67.50 $\pm$ 3.53        | 18.30 $\pm$ 5.96  | 236.94 $\pm$ 11.21 <sup>e</sup>               | 26.40 $\pm$ 3.89            | 86.40 $\pm$ 6.31 <sup>b</sup>  | 10.80 $\pm$ 0.78 <sup>b</sup>  |
| 7        | 109.50 $\pm$ 26.99 <sup>b</sup> | 65.50 $\pm$ 6.43        | 29.30 $\pm$ 5.90  | 22.38 $\pm$ 8.14 <sup>a</sup>                 | 25.90 $\pm$ 6.02            | 80.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>  | 10.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>  |
| Ortalama | 91.92 $\pm$ 21.49               | 67.42 $\pm$ 4.94        | 23.91 $\pm$ 8.59  | 109.20 $\pm$ 66.12                            | 25.57 $\pm$ 4.57            | 83.08. $\pm$ 4.57              | 10.35 $\pm$ 0.56               |

- Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasında p<0.05 düzeyinde önemli fark vardır.

**Tablo 3.** %3'lük Equiex ile sulandırılmış kedi spermasında, sulandırma ve çözündürme sonrası sperm motilite ve canlılık değerlerinin ortalama  $\pm$  SEM değerleri ile bu değerler arasında yapılan  $\chi^2$  testi sonuçları.

| Kedi No  | %3'lük Equiex ile sulandırmada  |                               | Önemlilik derecesi | %3'lük Equiex ile sulandırmada  |                               | Önemlilik derecesi |
|----------|---------------------------------|-------------------------------|--------------------|---------------------------------|-------------------------------|--------------------|
|          | Sulandırma sonrası motilite (%) | Çözdürme sonrası motilite (%) |                    | Sulandırma sonrası canlılık (%) | Çözdürme sonrası canlılık (%) |                    |
| 1        | 65.00 $\pm$ 4.71**              | 44.00 $\pm$ 4.59**            | ** P< 0.001        | 75.50 $\pm$ 8.32**              | 53.50 $\pm$ 6.26**            | **P< 0.001         |
| 2        | 61.00 $\pm$ 4.59**              | 42.00 $\pm$ 4.83**            | "                  | 70.00 $\pm$ 12.02**             | 49.50 $\pm$ 6.85**            | "                  |
| 3        | 64.50 $\pm$ 5.99**              | 44.00 $\pm$ 6.58**            | "                  | 74.50 $\pm$ 8.32**              | 53.50 $\pm$ 6.26**            | "                  |
| 4        | 65.00 $\pm$ 4.71**              | 44.50 $\pm$ 3.69**            | "                  | 72.50 $\pm$ 7.55**              | 51.50 $\pm$ 5.80**            | "                  |
| 5        | 69.50 $\pm$ 4.38**              | 50.50 $\pm$ 4.38**            | "                  | 75.50 $\pm$ 7.25**              | 55.50 $\pm$ 4.38**            | "                  |
| 6        | 65.50 $\pm$ 3.69**              | 48.00 $\pm$ 4.83**            | "                  | 80.00 $\pm$ 6.24**              | 58.00 $\pm$ 5.37**            | "                  |
| 7        | 64.50 $\pm$ 6.85**              | 47.50 $\pm$ 5.40**            | "                  | 69.00 $\pm$ 5.68**              | 53.50 $\pm$ 4.74**            | "                  |
| Ortalama | 65.00 $\pm$ 5.38**              | 45.79 $\pm$ 5.49**            | "                  | 73.86 $\pm$ 8.52**              | 53.57 $\pm$ 6.03**            | "                  |

%3'lük Equiex ile sulandırılmış kedi spermasında sulandırma ve çözündürme sonrası sperm motiliteleri arasında yapılan  $\chi^2$  testi sonucunda tüm kedilerin motilite değerleri arasında istatistik olarak  $p<0.001$  düzeyinde önemli bir fark bulundu. Yine %3'lük Equiex ile sulandırılmış kedi spermasında sulandırma ve çözündürme sonrası tüm kedilerin sperm canlılık değerleri arasında da istatistik olarak  $p<0.001$  düzeyinde önemli bir fark belirlendi.

**Tablo 4.** %6'lık Equiex ile sulandırılmış kedi spermasında, sulandırma ve çözündürme sonrası sperm motilite ve canlılık değerlerinin ortalama  $\pm$  SEM değerleri ile bu değerler arasında yapılan  $\chi^2$  testi sonuçları.

| Kedi No  | %6'lık Equiex ile sulandırmada  |                               | Önemlilik derecesi | %6'lık Equiex ile sulandırmada  |                               | Önemlilik derecesi |
|----------|---------------------------------|-------------------------------|--------------------|---------------------------------|-------------------------------|--------------------|
|          | Sulandırma sonrası motilite (%) | Çözdürme sonrası motilite (%) |                    | Sulandırma sonrası canlılık (%) | Çözdürme sonrası canlılık (%) |                    |
| 1        | 60.00 $\pm$ 4.71**              | 40.50 $\pm$ 5.50**            | **P< 0.001         | 75.50 $\pm$ 8.31**              | 53.00 $\pm$ 6.32**            | **P< 0.001         |
| 2        | 58.50 $\pm$ 3.37**              | 38.00 $\pm$ 4.83**            | "                  | 70.00 $\pm$ 12.01**             | 49.50 $\pm$ 6.85**            | "                  |
| 3        | 62.00 $\pm$ 5.86**              | 41.50 $\pm$ 6.68**            | "                  | 74.50 $\pm$ 8.31**              | 52.00 $\pm$ 6.32**            | "                  |
| 4        | 62.00 $\pm$ 5.37**              | 42.50 $\pm$ 4.24**            | "                  | 72.50 $\pm$ 7.54**              | 50.50 $\pm$ 5.98**            | "                  |
| 5        | 64.50 $\pm$ 4.37**              | 45.50 $\pm$ 4.37**            | "                  | 75.50 $\pm$ 7.24**              | 55.00 $\pm$ 5.27**            | "                  |
| 6        | 60.50 $\pm$ 3.68**              | 43.00 $\pm$ 4.83**            | "                  | 80.00 $\pm$ 6.23**              | 58.00 $\pm$ 5.37**            | "                  |
| 7        | 59.50 $\pm$ 6.85**              | 41.50 $\pm$ 7.47**            | "                  | 68.50 $\pm$ 6.25**              | 50.50 $\pm$ 5.50**            | "                  |
| Ortalama | 61.00 $\pm$ 5.14**              | 41.78 $\pm$ 5.71**            | "                  | 73.78 $\pm$ 8.61**              | 52.64 $\pm$ 6.35**            | "                  |

%6'lık Equiex ile sulandırılmış kedi spermasında sulandırma ve çözündürme sonrası tüm kedilerin motilite değerleri arasında  $p<0.001$  düzeyinde istatistik fark bulundu. Yine %6'lık Equiex ile sulandırılmış kedi spermasında sulandırma ve çözündürme sonrası tüm kedilerin sperm canlılık değerleri arasında da  $p<0.001$  düzeyinde istatistik fark belirlendi.

**Tablo 5.** Biosfos ile sulandırılmış kedi spermasında, sulandırma ve çözündürme sonrası sperm motilite ve canlılık değerlerinin ortalama  $\pm$  SEM değerleri ile bu değerler arasında yapılan  $\chi^2$  testi sonuçları.

| Kedi No  | Biosfos ile sulandırmada        |                                 | Önemlilik derecesi | Biosfos ile sulandırmada        |                                 | Önemlilik derecesi |
|----------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------|
|          | Sulandırma sonrası motilite (%) | Çözündürme sonrası motilite (%) |                    | Sulandırma sonrası canlılık (%) | Çözündürme sonrası canlılık (%) |                    |
| 1        | 59.00 $\pm$ 5.16**              | 38.50 $\pm$ 5.29**              | **P< 0.001         | 75.50 $\pm$ 8.31**              | 50.50 $\pm$ 6.43**              | **P< 0.001         |
| 2        | 56.00 $\pm$ 4.59**              | 37.00 $\pm$ 4.83**              | "                  | 70.00 $\pm$ 12.01**             | 48.50 $\pm$ 6.68**              | "                  |
| 3        | 59.00 $\pm$ 4.59**              | 39.50 $\pm$ 6.43**              | "                  | 74.00 $\pm$ 9.36**              | 51.50 $\pm$ 5.79**              | "                  |
| 4        | 60.00 $\pm$ 4.71**              | 41.00 $\pm$ 4.59**              | "                  | 72.50 $\pm$ 7.54**              | 50.50 $\pm$ 5.98**              | "                  |
| 5        | 63.50 $\pm$ 4.74**              | 45.00 $\pm$ 4.71**              | "                  | 75.50 $\pm$ 7.24**              | 55.00 $\pm$ 5.27**              | "                  |
| 6        | 60.00 $\pm$ 3.33**              | 40.50 $\pm$ 2.83**              | "                  | 80.00 $\pm$ 6.23**              | 57.00 $\pm$ 6.74**              | "                  |
| 7        | 58.50 $\pm$ 6.68**              | 38.50 $\pm$ 6.25**              | "                  | 68.50 $\pm$ 6.25**              | 47.50 $\pm$ 6.34**              | "                  |
| Ortalama | 59.42 $\pm$ 5.14**              | 40.00 $\pm$ 5.45**              | "                  | 73.71 $\pm$ 8.75**              | 51.50 $\pm$ 6.72**              | "                  |

Biosfos ile sulandırılmış kedi spermasında sulandırma ve çözündürme sonrası tüm kedilerin motilite değerleri arasında  $p<0.001$  düzeyinde önemli fark bulundu. Yine Biosfos ile sulandırılmış spermada sulandırma ve çözündürme sonrası sperm canlılıkları arasında tüm kedilerde  $p<0.001$  düzeyinde istatistik fark saptandı.

**Tablo 6.** Kedilerin taze ve çözündürme sonrası spermalarında anormal sperm oranlarının ortalama  $\pm$  SEM değerleri ile bu değerler arasında yapılan  $\chi^2$  testi sonuçları.

| Kedi No  | Taze spermada anormal sperm oranları (%) |                    |                  | Çözündürme sonrası spermada anormal sperm oranları (%) |                     |                  |
|----------|------------------------------------------|--------------------|------------------|--------------------------------------------------------|---------------------|------------------|
|          | Baş kısmı (%)                            | Orta kısmı (%)     | Kuyruk kısmı (%) | Baş kısmı (%)                                          | Orta kısmı (%)      | Kuyruk kısmı (%) |
| 1        | 1.90 $\pm$ 0.73**                        | 7.90 $\pm$ 1.19*** | 16.60 $\pm$ 2.98 | 3.70 $\pm$ 1.05**                                      | 11.80 $\pm$ 2.61*** | 23.00 $\pm$ 4.29 |
| 2        | 2.30 $\pm$ 0.94**                        | 7.10 $\pm$ 2.60*** | 14.80 $\pm$ 4.58 | 4.10 $\pm$ 0.99**                                      | 15.60 $\pm$ 3.34*** | 23.50 $\pm$ 2.27 |
| 3        | 2.00 $\pm$ 0.81**                        | 8.20 $\pm$ 2.39*** | 14.40 $\pm$ 2.27 | 3.50 $\pm$ 0.97**                                      | 13.90 $\pm$ 3.78*** | 23.00 $\pm$ 3.91 |
| 4        | 2.10 $\pm$ 0.73**                        | 9.40 $\pm$ 1.34*** | 15.20 $\pm$ 2.09 | 3.80 $\pm$ 0.91**                                      | 14.30 $\pm$ 1.82*** | 22.50 $\pm$ 3.37 |
| 5        | 2.20 $\pm$ 0.78**                        | 8.60 $\pm$ 1.26*** | 14.00 $\pm$ 2.44 | 3.30 $\pm$ 0.48**                                      | 13.30 $\pm$ 1.56*** | 19.80 $\pm$ 3.15 |
| 6        | 2.10 $\pm$ 0.73**                        | 8.60 $\pm$ 1.89*** | 15.70 $\pm$ 2.49 | 3.80 $\pm$ 0.78**                                      | 12.50 $\pm$ 0.97*** | 19.10 $\pm$ 4.58 |
| 7        | 1.90 $\pm$ 0.73**                        | 7.20 $\pm$ 1.13*** | 16.80 $\pm$ 5.39 | 4.00 $\pm$ 1.05**                                      | 14.00 $\pm$ 2.00*** | 22.50 $\pm$ 4.88 |
| Ortalama | 2.07 $\pm$ 0.76                          | 8.14 $\pm$ 1.86    | 15.35 $\pm$ 3.39 | 3.74 $\pm$ 0.91                                        | 13.62 $\pm$ 2.63    | 21.91 $\pm$ 4.03 |

\*\* Taze ve çözündürme sonrası baş kısmına bağlı anormal sperm oranları arasında  $p < 0.001$  düzeyinde önemli fark tespit edildi.

\*\*\* Taze ve çözündürme sonrası orta kısmına bağlı anormal sperm oranları arasında  $p < 0.0001$  düzeyinde önemli fark saptandı.

Sunulan çalışmada elektro-ejekülatörle alınan spermalar 3 ayrı sulandırıcı (%3'lük Equiex, %6'lık Equiex ve Biosfos) ile sulandırılıp, motilite ve canlılık değerlerine bakıldı. Sulandırma sonrası ortalama motilite (Tablo 3, 4, 5); %3'lük Equiex ile sulandırmada  $65.00 \pm 5.38$ ; %6'lık Equiex ile sulandırmada  $61.00 \pm 5.14$ ; Biosfos ile sulandırmada  $59.42 \pm 5.14$  oldu. Tablo 3, 4, 5'deki verilerden hareketle sulandırma ve çözündürme sonrası en iyi motilitenin %3'lük Equiex sulandırıcısından alındığı söylenebilir. Aynı sulandırıcılarla sulandırılmış kedi spermalarındaki canlılık değerlerinin hemen hemen aynı olup yaklaşık %73 (Tablo 3, 4, 5) olduğu tespit edildi.

Biosfos, %3'lük Equiex ve %6'lık Equiex ile sulandırılmış kedi spermasında sulandırma ve çözündürme sonrası sperm motiliteleri arasında yapılan istatistiksel çalışma sonucunda tüm kedilerin motilite değerleri arasında istatistik olarak  $p < 0.001$  düzeyinde önemli bir fark bulundu.

Sunulan çalışmada çözündürme sonrası ortalama sperm motilitesi değerlerine genel olarak bakıldığında (Tablo 3, 4, 5) %3'lük Equiex ile sulandırılmış kedi spermasında  $45.79 \pm 5.49$ ; %6'lık Equiex ile sulandırılmış kedi spermasında  $41.78 \pm 5.71$ ; Biosfos ile sulandırılmış kedi spermasında ise  $40.00 \pm 5.45$  olduğu görüldü. Yine Tablo 3, 4, 5'deki verilere göre çözündürme sonrası ortalama canlılık değerleri; %3'lük Equiex ile sulandırılmış kedi spermasında  $53.57 \pm 6.03$ ; %6'lık Equiex ile sulandırılmış kedi spermasında  $52.64 \pm 6.35$ ; Biosfos ile sulandırılmış kedi spermasında ise  $51.50 \pm 6.72$  oldu. Kedilerde alınan spermaların dondurulup çözündürülmeleri sonrasında en iyi canlılık değerinin (Tablo 3, 4, 5'den hareketle) %3'lük Equiex ile sulandırılmış spermalardan elde edildiği saptandı.

Tablo 6'daki sonuçlardan hareketle çalışmadaki 7 kediden alınan spermalarda baş, orta ve kuyruk kısmına bağlı anormal sperm oranlarının taze spermada sırasıyla  $2.07 \pm 0.76$ ,  $8.14 \pm 1.86$  ve  $15.35 \pm 3.39$  olduğu, aynı değerlerin çözündürme sonrasında sırasıyla  $3.74 \pm 0.91$ ,  $13.62 \pm 2.63$  ve  $21.91 \pm 4.03$  olduğu tespit edilmiştir.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sunulan çalışmada sperma alma esnasında kullanılan elektro-ejekülatörün rektal probu 1 cm çapında ve 12 cm uzunluğunda olup, 3 tane paslanmaz çelik elektrodu (her biri 1.5 mm kalınlık ve 3 cm uzunlukta) bulunmaktadır. Rektal probun elektrotları; Carter ve ark. (1984) ile Howard ve ark. (1990)'nın kullanmış oldukları elektro-ejekülatörde 2.6 mm genişlik ve 3.75 cm uzunluğundayken, Platz ve Seager (1978) ile Axner ve ark. (1997)'nin kullandıkları elektro-ejekülatörde 1.5 mm genişlik ve 5 cm uzunluğundadır.

Literatürlerde elektro-ejekülasyon süresi hakkında doğrudan bir bilgi verilmemektedir. Sunulan çalışmada uygulanan elektro-ejekülasyon programında ortalama ejekülasyon süresi  $83.08 \pm 4.57$  sn olarak saptanmıştır. Bu süre Platz ve Seager (1978)'in ortalama 21 sn'lik ejekülasyon süresine göre oldukça uzun olmasına karşılık, Kaya (2000) tarafından bildirilen ejekülasyon süresine ( $125.53 \pm 5.62$  sn) göre düşüktür. Kaya (2000)'nin çalışmasında elektro-ejekülasyon süresinin bu denli yüksek olması, kullandığı elektro-ejekülatör cihazıyla uygulamada ki voltajın maximum 3 V olmasına bağlanabilir. Zira, Kaya (2000) çalışmasında 3 V'u aştığı durumlarda spermaya idrar karıştığını bildirmişti. Platz ve Seager (1978)'in çalışmasındaki elektro-ejekülasyon süresinin düşük olması, kedilerin farklı ırkta olmalarına bağlanabilir.

Sunulan çalışmada elektro-ejekülasyon yöntemiyle sperma alınırken elektriksel uyarımlar maximum voltaja 3 sn'de yükselmeye 2 sn uygulanmış ve voltaj 2-8 V arasında değişmiştir. Platz ve ark. (1978), elektriksel uyarımları maximum voltaja 2 sn'de yükselmeye 3 sn uygulamışlardır. Araştırmacıların çalışmalarında uyguladıkları 2-8 V'luk voltaj, sunulan çalışmayla birebir örtüşmektedir.

Platz ve Seager (1978), elektriksel uyarımları 3 set altında 4'er basamak çerçevesinde vermişlerdir. Araştırmacıların çalışmalarındaki uyarım siklusu 0 V'tan istenilen voltaja kadar yaklaşık olarak 2 sn, maximumda 3 sn, sıfıra indirmek için 1 sn ve uyarım yoksa 2 sn olmuştur. Setlerde uyguladıkları voltajları ise 2 V'tan başlatıp 7 V'a kadar çıkarmışlardır. Sunulan çalışma başlangıç voltajı, maximum voltaja çıkış,

maximumda kalış ve 0 V'a düşüş süresi ile uygulanan voltajlar bakımından Platz ve Seager (1978)'in çalışması ile kısmi olarak paralellik göstermektedir.

Carter ve ark. (1984)'nın uyguladıkları elektro-ejekülasyon programında uyarım siklusu 0 V'tan istenilen voltaja kadar yaklaşık olarak 1 sn'de oluşturulmuş, 2-3 sn istenilen voltajda kalıp, 3 sn'de 0 V'a düşürülmüştür. Araştırmacıların çalışmalarındaki maximum voltaja çıkış, maximumda kalış ve 0 V'a düşüş süresi sunulan çalışmayla uyumludur.

Howard ve ark. (1990)'nın 3 seri şeklinde uyguladığı elektro-ejekülasyon rejiminin ilk serideki başlangıç voltajını oluşturan 2 V değeri ile Axnér ve ark. (1998)'nin ayrıca Neubauer ve ark. (2004) ile Baran ve ark. (2004a)'nın yine Rijsselaere ve Soom (2010)'un çalışmalarında uyguladıkları uyarım siklusunun başlangıç voltajı olan 2 V değeri, sunulan çalışmadaki kedilerde azda olsa kasılmalar oluşturan alt voltaj değeri (2 V) ile aynıdır.

Wildt ve ark. (1983)'nin elektro-ejekülasyonda uyguladıkları 4-7 V'luk voltaj değeri ile Axnér ve ark. (1998) ile Neubauer ve ark. (2004)'nin uyguladıkları 2-5 V'luk voltaj değeri yine Rijsselaere ve Soom (2010)'un uyguladıkları 2-3-4 V'luk voltaj değerleri sunulan çalışmadaki 2-8 V aralığı içindedir.

Sunulan çalışmada sperma alma kabı olarak 2 ml'lik kapaklı eppendorf tüpler kullanılmıştır. Howard ve ark. (1990), elektro-ejekülasyon yöntemiyle aldıkları spermayı 5 ml'lik steril plastik kaplarda muhafaza etmişlerdir. Axnér ve ark. (1997), spermaları önceden ısıtılmış eppendorf tüplerde toplamışlardır.

Van kedilerinden elektro-ejekülasyon yöntemiyle alınan spermalarda ortalama miktarın  $91.92 \pm 21.49$   $\mu$ l olduğu saptanmıştır. En düşük miktarlı sperma  $80.80 \pm 14.56$   $\mu$ l ve en yüksek miktarlı sperma  $109.50 \pm 26.99$   $\mu$ l olmuştur. Ortalama  $91.92 \pm 21.49$   $\mu$ l'lik sperma miktarı; Carter ve ark. (1984)'nin evcil kedilerden elektro-ejekülasyon yöntemiyle aldıkları  $100 \pm 1.0$   $\mu$ l'lik değerle, Howard ve ark. (1990)'nın teratospermik evcil kedilerden elektro-ejekülasyon yöntemiyle aldıkları  $97.4 \pm 9.5$   $\mu$ l'lik değerle ve Neubauer ve ark. (2004)'nin teratospermik kedilerden elektro-ejekülasyonla elde ettikleri  $0.10 \pm 0.01$  ml'lik değerle uyum içindedir.

Platz ve Seager (1978)'in kedilerden haftalık aralarla 52 elektro-ejekülasyondan elde ettikleri ortalama 0.233 ml değerindeki sperma miktarı ile Platz ve ark. (1978)'nın 6 evcil kediden elektro-ejekülasyon yöntemiyle aldıkları  $223.6 \pm 49.8$  µl değerindeki spermalar yine Long ve ark. (1996)'nın elektro-ejekülasyon yöntemiyle normospermik kedilerden  $246.9 \pm 10.1$  µl ve teratospermik kedilerden  $256.7 \pm 7.1$  µl olarak elde ettikleri spermalar miktar olarak sunulan çalışmada bildirilenin hemen hemen 2.5 katıdır.

Daşkın (2002), elektro-ejekülasyon yöntemiyle kediden 24 saat arayla 2 kez sperma almıştır. Sperma miktarları ilk ejakülatta 360 µl, ikinci ejakülatta ise 246 µl olmuştur. İlk gün alınan miktar, sunulan çalışmadaki miktarın yaklaşık olarak 4 katıyken, ikinci gün alınan miktar ise 2.5 katı kadar olmuştur. Farkın bu kadar fazla olması araştırıcının uyguladığı voltajlarda 3 V'un ştne çıkamamasına bağlanabilir. Zira bu durumda uyarım süresi uzayacağından seminal plazma da artmış olacaktır.

Tebet ve ark. (2006), 10 adet evcil kediden elektro-ejekülasyonla aldığı  $0.14 \pm 0.1$  ml miktarındaki sperma, sunulan çalışmadaki sperma miktarından 1.5 kat fazladır. Bu farklılık, araştırıcıların sperma alırken elde ettikleri miktarların düşük olduğu durumlarda ilave 10-20 uyarım vermelerinden kaynaklanmış olabilir.

Elektriksel uyarımlar vererek Axnér ve ark. (1998)'nın elde ettikleri ortalama 0.07 ml miktarındaki sperma, Kaya (2000)'nın elde ettiği  $61.37 \pm 0.27$  µl'lik sperma ile Chatdarong ve ark. (2008)'nin elde ettikleri  $64.5 \pm 34.9$  µl değerindeki sperma miktarları sunulan çalışmada bildirilen miktardan daha düşüktür.

Tanaka ve ark. (2000a), 3-5 yaşlarında 4 kediden suni vagina kullanarak her gün, iki günde bir,  günde bir ve her sperma alma gününde ard arda 2 kez olmak üzere toplam 20 kez sperma almışlardır. Her gün aldıkları spermada ilk hacmi 55.6 µl, ikinci hacmi 49.1 µl; iki günde bir aldıkları spermada ilk hacmi 54.8 µl, ikinci hacmi 59.3 µl; 3 günde bir aldıklarında ilk hacmi 51.2 µl, ikinci hacmi ise 61.9 µl olarak saptamışlardır. Araştırıcıların bildirdikleri tüm değerler sunulan çalışmayla karşılaştırıldığında düşük kalmıştır. Bu durumun suni vagina yöntemi ve elektro-ejekülasyon farkından olduğu düşünmektedir.

Van Kedilerinden alınan sperma miktarının araştırıcıların elde ettikleri miktardan düşük veya yüksek olması normaldir. Çünkü sperma miktarı kedinin ırkına, yaşına, çevre koşullarına, bakım-besleme ve sperma alma yöntemine bağlı değişiklik gösterebilir. Yine elektro-ejekülasyon hem doğal bir ejakülasyon yöntemi olmadığından, hem de araştırıcıların bu yöntemle sperma alırken farklı prosedürler izlemelerinden dolayı farklılıkların olması kaçınılmazdır.

Sunulan çalışmada, Van Kedilerinden alınan spermalarda en düşük motilitenin  $65.50 \pm 3.68$ , en yüksek motilitenin  $70.50 \pm 4.37$  ve ortalama motilitenin  $67.42 \pm 4.94$  olduğu tespit edilmiştir. Tsutsui ve ark. (2003), kaput epididimisten aldıkları spermada motilitenin hayvanlar arasında geniş ölçüde değiştiğini saptamışlardır. Araştırıcılar sol epididimisin baş kısmından aldıkları spermada ortalama motilitenin  $17.5 \pm 4.2$ , kuyruk kısmında  $66.5 \pm 4.8$  olduğunu, yine sağ epididimisin baş kısmında  $19.0 \pm 5.0$ , kuyruk kısmında ise  $67.0 \pm 4.5$  olduğunu bildirmişlerdir. Araştırıcıların çalışmalarında sağ ve sol epididimisin kuyruk kısımlarında tespit ettikleri ortalama motilite, sunulan çalışmadaki ortalama motilite değeri ile örtüşmektedir.

Axnér ve ark. (1997), aynı anestezi periyodunda 5-10 dak aralıklarla kastrasyondan önce elektro-ejekülasyon yöntemiyle sperma almışlardır. Araştırıcılar ilk ejakülatta  $55.7 \pm 20.8$  olan motilite değerini, ikinci ejakülatta  $70.7 \pm 12.7$  olarak saptamışlar ve ilk ejakülattaki değerin düşük olmasını epididimiste spermin yaşlanmasına bağlamışlardır. Araştırıcıların ikinci ejakülatta saptadıkları motilite değeri, sunulan çalışmanın sonuçları ile genel olarak uyum içindedir.

Axnér ve ark. (1998)'nın elektro-ejekülasyonla aldıkları spermada ortalama  $70.6$  olan motilite ile Neubauer ve ark. (2004)'nın teratospermik kedilerden aldıkları spermada ortalama  $69.7 \pm 3.1$  olarak saptadıkları motilite değeri, sunulan çalışmadaki motilite ile benzerlik göstermektedir.

Daşkın (2002), elektro-ejekülasyon yöntemiyle 24 saat arayla 2 kez sperma almıştır. Araştırıcı ilk gün aldığı spermada motilitenin  $70$  olduğunu, ikinci gün aldığı spermada ise motilitenin  $75$  olduğunu kaydetmiştir. Her iki değer de sunulan çalışmadaki motiliteden biraz yüksektir.

Elektro-ejekülasyon yöntemiyle aldıkları spermalarda motiliteyi Wildt ve ark. (1983),  $77.0 \pm 3.0$ ; Carter ve ark. (1984),  $75 \pm 5$ ; Howard ve ark. (1990), normospermik ejakülatlarda  $84.4 \pm 5.9$ , teratospermik ejakülatlarda ise  $73.3 \pm 5.9$ ; Zambelli ve ark. (2002),  $81.87 \pm 6.5$  ile  $83.75 \pm 9.4$  arasında; Baran ve ark. (2004),  $87.87 \pm 6.88$ ; Tebet ve ark. (2006),  $82.0 \pm 6.7$ ; Chatdarong ve ark. (2008),  $85.5 \pm 6.8$  olarak bildirmişlerdir. Araştırmacıların saptadıkları motilite değerleri sunulan çalışmada bildirilen değerden biraz yüksek olurken, Platz ve Seager (1978)'in  $60$ ; Penfold ve ark. (2003)'nın normospermik ve teratospermik kedilerde sırasıyla  $63.1 \pm 9.6$  ve  $52.5 \pm 4.9$ ; Kaya (2000)'nın Ankara Kedilerinde  $62.45 \pm 1.67$  olarak rapor ettiği motilite değerleri ise sunulan çalışmada bildirilen değerden düşüktür.

Platz ve ark. (1978), haftada bir kez olmak üzere 6 ay boyunca suni vagina ve elektro-ejekülasyon programı uygulayarak sperma almışlardır. Elde ettikleri motilite değerleri; suni vaginayla alınan spermalarda ortalama  $82.5 \pm 2.7$  iken, elektro-ejekülasyon yöntemiyle alınan spermalarda  $70.4 \pm 2.6$  olmuştur. Elektro-ejekülasyonla alınan spermadaki motilite sunulan çalışmayla hemen hemen paralellik sergilerken, suni vaginayla alınan spermalarda motilite yüksek olmuştur. Yine Tsutsui ve ark. (2000a)'nın suni vaginayla aldıkları spermada  $80-90$  arasında değişen motilite, sunulan çalışmada tespit edilen motiliteden daha yüksektir. Bu durum, sperma alma yöntemindeki farklılıkla açıklanabilir.

Epididimal spermada motiliteyi Stachecki ve ark. (1993), normospermik kedilerde  $78.99 \pm 1.58$ , teratospermik kedilerde ise  $56.93 \pm 5.30$  olarak; Kashiwazaki ve ark. (2005),  $80.8 \pm 2.0$  olarak; Siemieniuch ve Dubiel (2007),  $77.9 \pm 6.8$  olarak; Cocchia ve ark. (2009),  $54.7 \pm 11.3$  olarak tespit etmişlerdir. Bildirilen değerlerin sunulan çalışmadaki değerden farklı olması, araştırmacıların epididimal sperma üzerinde değerlendirme yapmalarına bağlanabilir.

Tanaka ve ark. (2000a)'nın her gün, gınaşırı ve üç günde bir suni vagina kullanarak aldıkları spermada tespit ettikleri  $90$ 'a varan motilite değeri sunulan çalışmada bildirilen değerden bir hayli yüksektir. Bu durum, araştırmacının sperma alırken suni vagina yöntemini kullanmasına bağlanabilir. Zira suni vagina yöntemi ile doğala daha yakın sperma alınabilmektedir.

Sunulan çalışmada tespit edilen motilitenin araştırmacıların bildirdikleri değerlerden farklı olması; değişik yaş ve ırkta kediler kullanılmasına, sperma alma yöntemlerine, uygulanan elektro-ejekülasyon prosedürlerine ve alınan sperma miktarının az olduğu durumlarda sulandırılmasına bağlanabilir.

Van Kedilerinden elektro-ejekülasyon yöntemiyle alınan spermallerdeki en düşük sperm yoğunluğu  $22.38 \pm 8.14 \times 10^6/\text{ml}$ , en yüksek sperm yoğunluğu  $236.94 \pm 11.21 \times 10^6/\text{ml}$  ve tüm kedilerden elde edilen ortalama sperm yoğunluğu  $109.20 \pm 66.12 \times 10^6/\text{ml}$  olmuştur. Sunulan çalışmada bildirilen ortalama sperm yoğunluğu, aynı yöntemle sperma alan Carter ve ark. (1984)'nın  $107.0 \pm 39.1 \times 10^6/\text{ml}$  olarak, Tebet ve ark. (2006)'nın  $111.2 \pm 75.3 \times 10^6/\text{ml}$  olarak rapor ettikleri değerle birebir örtüşmektedir.

Daşkın (2002), elektro-ejekülasyon yöntemiyle 24 saat arayla 1. gün  $90 \times 10^6/\text{ml}$  ve 2. gün  $65 \times 10^6/\text{ml}$  yoğunlukta sperma almıştır. Araştırmacının bildirdiği sperm yoğunlukları sunulan çalışmadaki değerden düşüktür.

Siemieniuch ve Dubiel (2007)'in  $32.5 \pm 3.4 \times 10^6/\text{ml}$  olarak, Cocchia ve ark. (2009)'nın  $58.15 \pm 18.3 \times 10^6/\text{ml}$  olarak tespit ettikleri sperm yoğunlukları, sunulan çalışmada bildirilen ortalama yoğunluk değerinden çok düşük ancak iki kedinin bireysel değerlerine yakınlık göstermektedir.

Wildt ve ark. (1983)'nin elektro-ejekülasyon yöntemiyle aldıkları spermada  $147.0 \pm 39.0 \times 10^6/\text{ml}$  olarak tespit ettikleri, Roth ve ark. (1994)'nin morfolojik olarak farklı oranlarda normal sperm üreten ( $>60\%$ ,  $45-55\%$ ,  $<40\%$ ) evcil kedilerden elde ettikleri spermalarda sırasıyla  $307 \pm 12 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $194 \pm 61 \times 10^6/\text{ml}$  ve  $148 \pm 55 \times 10^6/\text{ml}$  olarak saptadıkları, Kaya (2000)'nin Ankara Kedilerinde  $184.53 \pm 26.28 \times 10^6/\text{ml}$  olarak rapor ettiği yine Baran ve ark. (2004)'nin  $123.75 \pm 20.66 \times 10^6/\text{ml}$  ile  $185.00 \pm 71.51 \times 10^6/\text{ml}$  arasında bildirdikleri yoğunluk değerleri, sunulan çalışmadaki ortalama sperm yoğunluğundan yüksek olmakla birlikte bildirilen bireysel sperm yoğunluklarına ait aralık içinde kalmaktadırlar. Sadece Roth ve ark. (1994)'nin normospermik kedilerde  $307 \pm 12 \times 10^6/\text{ml}$  olarak tespit ettiği yoğunluk değeri bu aralığın epeyce üzerindedir.

Howard ve ark. (1990), yoğunluğu normospermik ejakülatlarda  $167.6 \pm 43.6 \times 10^6/\text{ml}$ , teratospermik ejakülatlarda ise  $361.3 \pm 6.4 \times 10^6/\text{ml}$  olarak; Long ve ark. (1996), yoğunluğu normospermik ejakülatlarda  $222.3 \pm 13.1 \times 10^6/\text{ml}$ , teratospermik ejakülatlarda ise  $199.0 \pm 50.3 \times 10^6/\text{ml}$  olarak tespit etmişlerdir. Araştırmacıların bildirdikleri değler, sunulan çalışmadaki ortalama sperm yoğunluğundan yüksektir.

Aynı türdeki hayvanlar hatta bireyler ve aynı bireyden alınan değışik spermalar arasında; çevresel faktörler, bakım-besleme ve sperma alma şekline bağı olarak sperm yoğunluğu değışebildiğinden, sunulan çalışmadaki yoğunluk değlerinin diğar araştırmacıların bildirdikleri değlerden düşük ya da yüksek olması çalışmanın doğası gereğidir.

Van Kedilerinden elektro-ejakülasyon yöntemiyle alınan spermalarda baş, orta ve kuyruk kısmına bağı anormal sperm oranlarının sırasıyla  $\%2.07 \pm 0.76$ ,  $\%8.14 \pm 1.86$  ve  $\%15.35 \pm 3.39$  olduğu, toplam anormal sperm oranının ise ortalama  $\%25.57 \pm 4.57$  olduğu tespit edilmiştir. Bu değ, Kaya (2000)'nın tespit ettiğ  $\%26.48 \pm 1.29$ 'luk değle uyum içindedir.

Platz ve Seager (1978), elektro-ejakülasyon yöntemiyle aldıkları ejakülatlarda anormal sperm oranının  $\%2$ 'den az olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacıların bildirdikleri değ, sunulan çalışmada tespit edilen değlerden oldukça farklıdır. Ancak araştırmacıların hangi bozuklukları esas aldıkları belli değildir.

Howard ve ark. (1990), elektro-ejakülasyon yöntemiyle aldıkları normospermik ejakülatlarda  $\%71$  oranında normal sperm tespit etmişlerdir. Yine Siemieniuch ve Dubiel (2007), elde ettikleri epididimal spermalarda spermelerin  $\%72$ 'sinin morfolojik olarak normal olduğunu bildirmişlerdir. Buradan morfolojik bozukluk gösteren sperm oranının ilk çalışmada  $\%29$ , ikinci çalışmada ise  $\%28$  olduğu anlaşılmaktadır. Her iki değ de sunulan çalışmada bildirilen toplam anormal sperm oranıyla benzerdir.

Baran ve ark. (2004a), kedilerde toplam morfolojik bozukluğun  $\%15.88 \pm 5.41$  ile  $\%19.50 \pm 5.93$  arasında olduğunu yine Baran ve ark. (2004b), yaptıkları bir başka çalışmada, toplam morfolojik bozukluğun  $\%18.40 \pm 4.79$  olduğunu rapor etmişlerdir. Her iki çalışmada bildirilen toplam morfolojik bozukluk değeri, sunulan çalışmadaki

değerden biraz düşüktür. Bu durum çalışmalarda farklı ırk kedilerin kullanılmasına veya morfolojinin farklı yöntemlerle tespitine bağlanabilir.

Tsutsui ve ark. (2000a), suni vagina ile aldıkları spermada  $\%3.8 \pm 1.7$  ile  $\%6.0 \pm 0.8$  arasında anormal sperm tespit etmişlerdir. Tanaka ve ark. (2000a), kediden her gün, gūnaşırı ve her 3 günde bir suni vagina kullanarak (sperm alma gününde ard arda 2 kez) sperma almışlardır. Her gün aldıkları spermada ilk alma gününde anormal sperm oranını  $\%4.8 \pm 0.5$ , ikinci alma gününde  $\%7.3 \pm 3.3$  olarak, iki günde bir aldıkları spermalarda aynı değerleri sırasıyla  $\%8.5 \pm 1.5$  ve  $\%6.9 \pm 1.7$  olarak, üç günde bir aldıkları spermalarda ise sırasıyla  $\%6.8 \pm 1.1$  ve  $\%5.6 \pm 0.6$  olarak saptamışlardır. Her iki araştırmacının suni vagina ile aldıkları spermalarda tespit ettikleri anormal sperm değeri, sunulan çalışmada bildirilen değerden düşüktür. Bunun nedeni, araştırmacılar spermayı suni vagina yöntemiyle almışlardır. İki yöntem arasında bu tür farklılık olması normal kabul edilebilir.

Cocchia ve ark. (2009), epididimal spermada anormal sperm oranını  $\%43.2 \pm 28.6$  olarak saptamışlardır. Bildirilen değerin bu denli yüksek olması, spermanın epididimisten alınmasına bağlanabilir. Oysa sunulan çalışmada ejaküle sperma üzerinde değerlendirme yapılmıştır. Spermelerin epididimiste kalma süresi ve epididimisin sperma alınan bölgesi de göz önüne alınması gereken bir durumdur.

Axnér ve ark. (1997), 5-10 dak aralıklarla elektro-ejekülasyonla aldıkları spermalarda, anormal baş oranının hem ilk hem de ikinci ejakülatta yüksek olduğunu (ortalama  $\%13-14$ ) saptamışlardır. Araştırmacılar çalışmalarındaki kedilerin ilk ejakülatlarda farklı şekillerde morfoloji gösteren daha yüksek sperm ürettiğini, kısa bir dinlenme periyodundan sonra (5-10 dak) aldıkları ikinci ejakülatın ilkinden daha kaliteli olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacıların, spermelerin baş kısmıyla ilgili bildirdikleri anormallik oranı sunulan çalışmada tespit edilenin yaklaşık 6-7 katı kadardır.

Stachecki ve ark. (1993), normospermik kedilerden aldıkları epididimal spermada  $\%84$  oranında normal sperm saptamışlardır. Dolayısıyla  $\%16$  oranında anormal sperm varlığından bahsedilebilir. Bu değerin sunulan çalışmadaki değerden daha düşük olması ırk ya da uygulanan metot farklılığındandır.

Roth ve ark. (1994), morfolojik olarak farklı oranlarda ( $>60\%$ ,  $45-55\%$ ,  $<40\%$ ) normal sperm üreten kedilerden aldıkları spermalarda normal sperm oranını sırasıyla  $68\%$ ,  $53\%$  ve  $34\%$  olarak saptamışlardır. Bu değerlerden hareketle anormal sperm oranlarının sırasıyla  $32\%$ ,  $47\%$  ve  $66\%$  olduğu ortaya çıkmaktadır. Değerlerin bu denli yüksek oluşu, bazı evcil (Howard ve ark., 1990; Axnér ve ark., 1997) ve vahşi kedi türlerinin spermalarında anormal sperm oranlarının nispeten yüksek olmasına (Axnér ve Forsberg, 2002) bağlanabilir.

Axnér ve ark. (1998), ejakülasyon öncesi ve sonrasında kauda epididimisteki spermaların morfolojisini incelemiş, ejaküle olmuş sperma ile karşılaştırmışlar ve ejakülasyonun bu oranı etkileyip etkilemediğini anlamaya çalışmışlardır. Araştırmacılar, ejakülatlarda kuyruk anormallikli sperm oranının, kauda epididimisten aldıkları spermadakinden anlamlı olarak daha yüksek (sırasıyla  $11.1\%$  ve  $1.6\%$ ) olduğunu tespit etmişlerdir. Sunulan çalışmada kuyruk kısmına bağlı anormal sperm oranı ( $15.35 \pm 3.39$ ) araştırmacıların ejaküle spermada tespit ettikleri değer ile uyumludur.

Van Kedilerinden alınan spermalarda tespit edilen ölü sperm oranı ortalama  $23.91 \pm 8.59\%$ 'dur. En düşük oran  $18.30 \pm 5.96\%$  ve en yüksek oran ise  $29.30 \pm 5.90\%$ 'dır. Kaya (2000) çalışmasında ölü sperm oranını  $20.80 \pm 1.30\%$  olarak bildirmiştir. Yine Tsutsui ve ark. (2003), ortalama canlı sperm oranını sol ve sağ epididimislerin kaput kısmında sırasıyla  $73.0 \pm 4.2\%$  ve  $76.9 \pm 4.6\%$  olarak, kaudal kısımlarında ise sırasıyla  $82.5 \pm 2.5\%$  ve  $80.9 \pm 2.6\%$  olarak saptamışlardır. Bu bilgilerden hareketle Van Kedilerindeki ölü sperm oranı; Tsutsui ve ark. (2003)'nın sol ve sağ epididimisin kaput kısmında tespit ettikleri değer ile Kaya (2000)'nın çalışmasında elde ettiği değer bakımından paralellik göstermektedir.

Tanaka ve ark. (2000a), suni vagina ile aldıkları spermalarda canlı sperm oranını  $86.3-95.5\%$  olarak, Tsutsui ve ark. (2000a), suni vagina ile aldıkları spermalarda canlı sperm oranını  $90.1 \pm 4.4\%$  olarak saptamışlardır. Araştırmacıların çalışmalarındaki canlı sperm oranından hareketle ölü sperm oranlarının sunulan çalışmada tespit edilen değerden düşük olması, sperma alma yönteminin farklılığına bağlanabilir.

Cocchia ve ark. (2009), epididimal spermada canlı sperm oranını  $74.3 \pm 8.6\%$ , Siemieniuch ve Dubiel (2007) ise epididimal spermada aynı değeri  $84.9 \pm 7.8\%$  olarak

tespit etmişlerdir. Bu değerlerden hareketle %36'lık ölü sperm oranı sunulan çalışmada tespit edilenden yüksek, %16'lık değer ise düşüktür. Bu durum, farklı ırk kedilerden ve üzerinde değerlendirme yapılan spermadan (epididimal, ejaküle) kaynaklanmış olabilir.

Sunulan çalışmada elektro-ejekülatörle alınan spermalar 3 sulandırıcı (%3'lük Equiex, %6'luk Equiex ve Biosfos) ile sulandırılmış, motilite ve canlılık oranlarına bakılmıştır. Sulandırma sonrası ortalama motilite %3'lük Equiex ile sulandırmada  $65.00 \pm 5.38$ , %6'luk Equiex ile sulandırmada  $61.00 \pm 5.14$  ve Biosfos ile sulandırmada  $59.42 \pm 5.14$  olmuştur. Üç sulandırıcı içinde en iyi motilitenin %3'lük Equiex ile sulandırılan spermadan elde edildiği tespit edilmiştir. Üç sulandırıcıyla sulandırılmış Van Kedisi Spermasındaki canlılık oranları hemen hemen aynı olup yaklaşık %73'dür.

Van Kedilerinden alınan spermalarda, çözündürme sonrası motilite değerlerine genel olarak bakıldığında %3'lük Equiex ile sulandırılmış spermada çözündürme sonrası ortalama motilite değeri  $45.79 \pm 5.49$ , %6'luk Equiex ile sulandırılmış spermada çözündürme sonrası ortalama motilite değeri  $41.78 \pm 5.71$ , Biosfos ile sulandırılmış spermada çözündürme sonrası ortalama motilite değeri ise  $40.00 \pm 5.45$ 'dir. Bu durumda, çözündürme sonrası en yüksek motilite elde edilen sulandırıcı %3'lük Equiex olmuştur. Sunulan çalışmada sperma alma esnasında  $67.42 \pm 4.94$  olan motilite değerinin, çözündürme sonrasında %40-45 olduğu görülmüştür. Dolayısıyla çözündürme sonrası motilite değerlerine genel olarak bakıldığında spermanın %40-45 başarıyla dondurulabildiği söylenebilir. İn vivo olarak değerlendirme için bu spermayla tohumlama sonuçlarına bakılması uygun olacaktır.

Platz ve ark. (1978), elektro-ejekülasyon ve suni vagina ile elde ettikleri spermayı pelletlerde dondurup,  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza etmişlerdir. Çözündürme sonrasında motiliteyi sırasıyla  $53.8 \pm 4.8$  ve  $70.6 \pm 2.3$  olarak tespit etmişlerdir. Araştırmacıların bildirdikleri her iki motilite, sunulan çalışmada tespit edilen değerden yüksektir.

Tsutsui ve ark. (2000a), suni vaginayla aldıkları ve dondurdıkları sperma örneklerini  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'deki su banyosunda 30 sn çözdürmüşler ve çözündürme sonrası EYT-FC ile dilüe edilmiş spermada motiliteyi  $30.0 \pm 9.7$  olarak, EYC grubunda ise  $30.0 \pm 3.3$  olarak; Kaya (2000) ise çözündürme sonrasında motiliteyi %35 olarak

saptamıştır. Araştırmacıların tespit ettikleri motilite değerleri, sunulan çalışmada bildirilen değerden düşüktür.

Zambelli ve ark. (2002), motilite değerini 3.85 °C/dak'da dondurmada %61.55±10.5, 9 °C/dak'da %49.66±8.7, 22.8 °C/dak'da %40.55±6.8, 36 °C/dak'da %28.12±8.4 ve 43 °C/dak'da ise %21.25±4.7 olarak saptamışlardır. Araştırmacılar 3.85 °C/dak'lık dondurma değerinin diğerlerinden anlamlı olarak daha yüksek ( $P<0,01$ ) motilite ile sonuçlandığını, böylece daha yavaş dondurma ile (3.85 °C/dak) daha iyi sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada çözündürme sonrasında elde edilen en yüksek motilite değeri (%45), araştırmacıların 9 °C/dak'da ve 22.8 °C/dak'da elde ettikleri değerlere yakınlık göstermektedir.

Epididimal spermanın dondurulup çözündürülmesi sonrasında motiliteyi Schäfer ve Holzman (2000) %47±14 olarak; Tsutsui ve ark. (2003), %10 ile %50 arasında değişmekle birlikte %24.0±4.4 olarak, Kashiwazaki ve ark. (2005), %31.8±.4 olarak; Cocchia ve ark. (2009) ise %32±13.1 olarak saptamışlardır. Schäfer ve Holzman (2000)'ın tespit ettiği motilite değeri sunulan çalışmayla uyumluyken, diğer araştırmacıların kaydettikleri motilite değerleri sunulan çalışmada bildirilenden düşüktür.

Baran ve ark. (2004a), elektro-ejekülasyon yöntemiyle aldıkları spermayı Tris sulandırıcısı ile sulandırıp, 0.25 ml'lik payetlerde dondurmuşlar ve daha sonra çözdürmüşlerdir. Çözündürme sonrası ortalama motiliteyi %3 gliserol içeren Tris sulandırıcısı ile sulandırılmış spermada %53.00±10.85 ve %4 gliserol içeren Tris sulandırıcısı ile sulandırılmış spermada %50.50±13.90 olarak tespit etmişlerdir. Araştırmacıların kaydettikleri motilite değerleri sunulan çalışmada bildirilen motiliteden yüksektir.

Araştırmacıların spermanın dondurulup çözündürülmesi sonrasında tespit ettikleri motilite değerlerinin sunulan çalışmadaki değerden yüksek ya da düşük olması; farklı ırk kedilere ve farklı sperma sulandırıcılarına (Sperma sulandırıcılarındaki malzemeler dondurma ve çözündürme esnasında spermleri korudukları gibi, zaman zaman zararlı da olabilmektedir.), sperma alma yöntemindeki seçimlerine veya üzerinde değerlendirme yaptıkları spermaya (epididimal, ejeküle) bağlanabilir.

Van Kedilerinden alınan spermanın dondurulup çözündürülmesi sonrasında elde edilen %48'lik ölü sperm oranı, Kaya (2000)'nın Ankara Kedilerinde çözündürme sonrasında tespit ettiği  $48.94 \pm 3.90$ 'lık ölü sperm oranı ile birebir örtüşmektedir.

Tsutsui ve ark. (2000a), suni vaginayla aldıkları ve dondurdukları sperma örneklerinde çözündürme sonrası canlı sperm oranını EYT-FC ile dilüe edilmiş spermada  $53.1 \pm 6.2$ , EYC ile dilüsyonda ise  $50.7 \pm 5.4$  olarak saptamışlardır. Tsutsui ve ark. (2003), çözündürme sonrası canlı sperm oranını  $52.9 \pm 4.6$  olarak tespit etmişlerdir. Her iki çalışmada bildirilen çözündürme sonrası canlı sperm oranı sunulan çalışmada tespit edilen değerle uyum içindedir.

Epididimal spermanın dondurulup çözündürülmesi sonrası canlı sperm oranını Siemieniuch ve Dubiel (2007),  $62 \pm 6.9$  olarak; Cocchia ve ark. (2009),  $45.2 \pm 9.4$  olarak saptamışlardır. Bu değerlerin sunulan çalışmayla uyumlu olmaması; üzerinde değerlendirme yapılan spermaya (epididimal, ejaküle), farklı ırk kedilere, farklı sperma sulandırıcılarına ve farklı dondurma yöntemlerine bağlanabilir.

Van Kedilerinden alınan spermanın dondurulup çözündürülmesi sonrası elde edilen %38'lik toplam anormal sperm oranı; Kaya (2000)'nın %38 olarak, Baran ve ark. (2004a)'nın %40 olarak tespit ettikleri değerlerle birebir örtüşürken, Cocchia ve ark. (2009)'nın epididimal spermayı dondurup çözündürme sonrasında bildirdikleri  $52.8 \pm 31.5$ 'lik değerden düşük kalmıştır. Bu durum, üzerinde değerlendirme yapılan sperma (epididimal, ejaküle) ile ilgili olabilir.

Sonuç olarak, sunulan çalışma hem Van Kedilerinin spermatolojik özelliklerinin tespit edilmesi, hem de Van Kedisi Spermasının dondurulması yönüyle yapılan ilk çalışmadır. Bu çalışma ile Van Kedisinden elektro-ejekülasyon yöntemiyle alınan spermanın dondurulup çözündürülmesi sonrasında elde edilen yaklaşık %43'lük motilite Van Kedisi Spermasının %43 başarıyla dondurulabildiğini göstermektedir.

Daha sonraki araştırmalarda, dondurulmuş Van Kedisi Sperması ile suni tohumlama yapıldığı takdirde elde edilecek başarıya göre, belki de Van Kedisinin safkan bir ırk olarak varlığının devamı ve sayılarının artışı mümkün olacaktır.

## ÖZET

**Belhan S, Van Kedilerinden elektro-ejekülasyonla sperma alınması değerlendirilmesi ve dondurulması, YYÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Doktora Tezi, Van, 2012.** Bu çalışmada; Van Kedilerinden spermanın elektro-ejekülasyon yöntemiyle alınması, spermatolojik muayenelerinin yapılması ve dondurulması amaçlandı. Araştırmada 3-6 yaşları arasında 7 Erkek Van Kedisi kullanıldı. Kedilerden genel anestezi altında (Ketamine-Xylazin HCl kombinasyonu) elektro-ejekülatörle haftada 1 kez olmak üzere 10 kez sperma alındı. (Sperma miktarı ayarlanabilir otomatik pipetle ölçüldü. Sperm motilitesi tespitinde faz kontrast mikroskop kullanıldı. Sperm yoğunluğu hemositometrik yöntem ile, Anormal sperm ise sıvı fiksasyon yöntemi ile tespit edildi. Ölü sperm oranını belirlemede %3'lük Sodyum Sitrat ile hazırlanmış %2'lik Eosin kullanıldı). Sperma 3 sulandırıcı (%3'lük Equiex, %6'luk Equiex, Biosfos) ile sulandırıldı. Motilite ve canlılık değerlerine bakıldı. Daha sonra sperma 7 dak sıvı azot buharında donduruldu. 37 °C'de 30 sn'de çözündürülen spermada motilite ve canlılık değerlerine bakıldı. Çalışmada sperma miktarı, sperm motilitesi, ölü sperm, sperm yoğunluğu, toplam anormal sperm, uyarım süresi ve uyarım sayısı değerleri sırasıyla  $91.92 \pm 21.49 \mu\text{l}$ ,  $\%67.42 \pm 4.94$ ,  $\%23.91 \pm 8.59$ ,  $109.20 \pm 66.12 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $\%25.57 \pm 4.57$ ,  $83.08 \pm 4.57 \text{ sn}$ ,  $10.35 \pm 0.56$  olarak tespit edildi. Sulandırma sonrası motilite ve canlılık değerleri; %3'lük Equiex ile sulandırmada  $\%65.00 \pm 5.38$  ve  $\%73.86 \pm 8.52$ , %6'luk Equiex ile sulandırmada  $\%61.00 \pm 5.14$  ve  $\%73.78 \pm 8.61$ , Biosfos ile sulandırmada  $\%59.42 \pm 5.14$  ve  $\%73.71 \pm 8.75$  olarak saptandı. Çözdürme sonrası motilite ve canlılık değerleri; %3'lük Equiex ile sulandırmada  $\%45.79 \pm 5.49$  ve  $\%53.57 \pm 6.03$ , %6'luk Equiex ile sulandırmada  $\%41.78 \pm 5.71$  ve  $\%52.64 \pm 6.35$ , Biosfos ile sulandırmada  $\%40.00 \pm 5.45$  ve  $\%51.50 \pm 6.72$  olarak tespit edildi. Çözdürme sonrası baş, orta ve kuyruk kısmına bağlı anormal sperm oranlarının  $\%3.74 \pm 0.91$ ,  $\%13.62 \pm 2.63$ ,  $\%21.91 \pm 4.03$  olduğu görüldü. Sonuç olarak, spermanın dondurulup çözündürülmesi ile elde edilen yaklaşık %43'lük motilite, Van Kedisi spermasının %43 başarıyla dondurulabildiğini gösterdi. Daha sonraki araştırmalarda, dondurulmuş Van Kedisi Sperması ile suni tohumlama yapıldığı takdirde elde edilecek başarıya göre, belki de Van Kedisinin safkan bir ırk olarak varlığının devamı ve sayılarının artışı mümkün olacaktır.

**Anahtar Sözcükler:** Elektro-ejekülasyon, Sperma alma, Sperma Dondurma, Van Kedisi.

## SUMMARY

**Belhan S, Collection of Semen from Van Cats using electroejaculation, and freezing of Semen, Y.Y.Ü. Institute of Medical Sciences, Reproduction and Artificial Insemination Department, Doctoral Thesis, Van, 2012.** In this study, the aim was to collect semen from Van Cats using electroejaculation, to perform spermatologic examinations and to freeze the semen. In the research, 7 Male Van Cats aged between 3-6 years were used. Semen was collected from cats at 10 different times at weekly intervals using electroejaculation with general anesthesia (Ketamine-Xylazine HCl combination). (Amount of semen was measured with an adjustable automatic pipette. A phase contrast microscope was used to analyze sperm motility. Sperm concentration was determined by hemocytometric method whereas abnormal sperm was determined by liquid fixation method. 2% Eosin prepared with 3% Sodium Citrate was used to determine dead sperm rate). The semen was diluted with 3 diluents (3% Equiex, 6% Equiex, Biosfos). Motility and vitality values were analyzed. Then the semen was frozen in liquid nitrogen vapor for 7 minutes. The semen dissolved at 37°C in 30 sec was analyzed for motility and vitality values. In the study, amount of semen, sperm motility, dead sperm, sperm concentration, total abnormal sperm, stimulation time and stimulation count were found to be  $91.92 \pm 21.49 \mu\text{l}$ ,  $\%67.42 \pm 4.94$ ,  $\%23.91 \pm 8.59$ ,  $109.20 \pm 66.12 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $\%25.57 \pm 4.57$ ,  $83.08 \pm 4.57 \text{ sec}$ , and  $10.35 \pm 0.56$ , respectively. After dilution, motility and vitality values were found to be, respectively,  $65.00 \pm 5.38\%$  and  $73.86 \pm 8.52\%$  with 3% Equiex diluent,  $61.00 \pm 5.14\%$  and  $73.78 \pm 8.61\%$  with 6% Equiex diluent,  $59.42 \pm 5.14\%$  and  $73.71 \pm 8.75\%$  with Biosfos diluent. After dissolution, motility and vitality values were found to be, respectively,  $45.79 \pm 5.49\%$  and  $53.57 \pm 6.03\%$  with 3% Equiex diluent,  $41.78 \pm 5.71\%$  and  $52.64 \pm 6.35\%$  with 6% Equiex diluent,  $40.00 \pm 5.45\%$  and  $51.50 \pm 6.72\%$  with Biosfos diluent. After the dissolution, abnormal sperm rates related to the head, middle piece and tail were  $3.74 \pm 0.91\%$ ,  $13.62 \pm 2.63\%$ ,  $21.91 \pm 4.03\%$ , respectively. In conclusion, approximately 43% motility achieved with the freezing and dissolution of the semen suggests that the semen of Van Cat can be frozen with 43% success. It may be possible to continue the existence of Van Cat as a full blooded species and to increase their numbers according to the success to be achieved in further researches if artificial insemination is performed with the semen of Van Cat.

**Keywords:** Electroejaculation, Semen Collection, Semen Freezing, Van Cat.

## KAYNAKLAR

- Akgül A (2003). Tıbbi Araştırmalarda İstatiksel Analiz Teknikleri “SPSS Uygulamaları”. 2. Baskı, Emek Ofset Ltd. Ştd.
- Ateş CT (2000). Van Kedilerinde morfolojik ve fizyolojik özellikler ile tek gözlülüğün dağılımının araştırılması. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Zootečni Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Van.
- Axnér E, Hermansson U, Linde-Forsberg C (2004). The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 84, 179–191.
- Axnér E, Linde Forsberg C (2007). Sperm morphology in the domestic cat, and its relation with fertility: a retrospective study. *Reprod Domest Anim*, 42, 282-291.
- Axnér E, Linde-Forsberg C (2002). Semen collection and assessment and artificial insemination in the cat. <http://www.ivis.org>.
- Axnér E, Ström B, Linde-Forsberg C (1997). Sperm morphology is better in the second ejaculate than in the first in domestic cats electroejaculated twice during the same period of anesthesia. *Theriogenology*, 47, 929-934.
- Axnér E, Ström Holst B, Linde-Forsberg C (1998). Morphology of spermatozoa in the cauda epididymidis before and after electroejaculation and a comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. *Theriogenology*, 50, 973-979.
- Baran A, Bacinoğlu S, Evecen M, Şahin BE, Alkan S, Demir K (2004a). Freezing of cat semen in straws with different glycerol levels containing Tris extender. *Turk J Vet Anim Sci*, 28, 545-52.
- Baran A, Şahin BE, Evecen M, Demir K, İleri Kİ (2004b). Use of spermac® staining technique in the determination of acrosomal defects in cat semen. *Turk J Vet Anim Sci*, 28, 519-525.
- Bearden HJ, Fuquay JW (1992). Applied Animal Reproduction. 3<sup>rd</sup> Ed; Prentice Hall, New Jerje, USA.
- Bowen RA (1977). Fertilization in vitro of feline ova by spermatozoa from ductus deferens. *Biol Reprod*, 17, 144-147.
- Byers AP, Hunter AG, Seal US, Binczik GA, Graham EF, Reindl NJ, Tilson RL (1989). In-vitro induction of capacitation of fresh and frozen spermatozoa of the Siberian tiger (*Panthera tigris*). *J Reprod Fertil*, 86, 599-607.
- Carter KK, Chakraborty KL, Bush M, Wildt DE (1984). Effects of electroejaculation and ketamine-HCL on serum cortisol, progesterone and testosterone in the male cat. *J Androl*, 5, 431-437.

Chatdarong K, Thuwanut P, Manee-in S, Lohachit C, Axnér E (2008). Effect of thawing temperature and post-thaw dilution on the quality of cat spermatozoa. *Reprod Domest Anim.* 1-8.

Christiansen IBJ (1984). Reproduction in the Cat (In): Reproduction in the Dog and Cat, Baillere Tindall, 225-295, Philadelphia.

Cocchia N, Ciani F, El-Rass R, Russo M, Borzacchiello G, Esposito V, Montagnaro S, Avallone L, Tortora G, Lorzio R (2010). Cryopreservation of feline epididymal spermatozoa from dead and alive animals and its use in assisted reproduction. *Zygote*, 18 (1), 1-8.

Çoyan K (1994). Evcil hayvanlarda seksüel sikluslar. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon Suni Tohumlama Doğum ve İnfertilite, 25-36, Dizgievi Konya.

Çoyan K, Ataman MB, Kaya A, Karaca F (2002). Evcil Hayvanlarda Dölerme ve Suni Tohumlama. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, Konya.

Daşkın A (2002). Elektro-ejekülasyon yöntemiyle kediden spermanın alınması ve suni tohumlama. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 49, 35-38.

Demirci (2000). Spermanın muayenesi ve değerlendirilmesi. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Suni Tohumlama ve Androloji Ders Notları. 191-201, Elazığ.

Demirci E (1994). Erkek üreme organlarının muayenesi. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Suni Tohumlama, Doğum ve İnfertilite. Birinci Baskı, 61-67, Dizgievi, Konya,

Deveci H (1990). Reprodüktif anatomi. Evcil Hayvanlarda Suni Tohumlama, Obstetrik ve İnfertilite. Theriogenology, 3-15, Nurol Matbaacılık AŞ, Ankara.

Deveci H (1994). Reprodüktif anatomi, Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Suni Tohumlama, Doğum ve İnfertilite. Birinci Baskı, 1-13, Dizgievi, Konya.

França LR, Godinho CL (2003). Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol Reprod*, 68, 1554–1561.

Goodrowe KL, Chakraborty PK, Wildt DE (1985). Pituitary and gonadal response to exogenous LH-releasing hormone in the male domestic cat. *J Endocrinol*, 105, 175-181.

Gökçen H (1994). Reprodüktif fizyoloji. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Suni Tohumlama, Doğum ve İnfertilite. Birinci Baskı, 15-23, Dizgievi, Konya.

Hay MA, Goodrowe KL (1993). Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymides and vasa deferentia of the domestic cat. *J Rep Fer S*, 47, 297–305.

Holt WV, Pickard AR (1999). Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Rev Reprod*, 4, 143–150.

Howard JG, Barone MA, Donoghue AM, Wildt DE (1992). The effect of pre-ovulatory anesthesia on ovulation in laparoscopically inseminated domestic cats. *J Reprod Fertil*, 96, 175-186.

Howard JG, Brown JL, Bush M, Wildt DE (1990). Teratospermic and normospermic domestic cats: Ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing. *J Androl*, 11, 204-215.

Howard JG, Bush M, deVos V, Wildt DE (1984) Electroejaculation, semen characteristics and serum testosterone concentrations of free-ranging African elephants (*Loxodonta africana*). *J Reprod Fertil*, 72, 187-195.

Howard JG, Donoghue AM, Johnston LA, Wildt DE (1993). Zona pellucida filtration of structurally abnormal spermatozoa and reduced fertilization in teratospermic cats. *Biol Reprod*, 49, 131-139.

İleri İK, Ak K, Pabucçuoğlu S, Birler S (1998). Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Ders Notu, No: 84, Masaüstü Yayıncılık, İstanbul.

İnan MS (1992). Van Kedisinde göz pigmentlerinin biyolojik dağılımı. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü, Yüksek Lisans Tezi, Van.

Kashiwazaki N, Yamaguchi R, Uesugi R, Hishiyama N, Kim M, Nakatsukasa E, Kojima Y, Okuda Y, Hisamatsu S, Inomata T, Sihino M (2005). Sperm motility, plasma membrane integrity and binding capacity to homologous zona pellucida of cryopreserved epididymal spermatozoa in the domestic cat. *J Reprod Develop*, 51, 735-739.

Kaya M (1995). Evcil kedide dölerimsel özellikler. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Doktora Semineri, Ankara.

Kaya M (2000). Ankara Kedilerinde elektro-ejekülasyon yöntemiyle sperma alınması ve dondurulması. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.

Lengwinat T, Blottner S (1994). In vitro fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 35, 291-301.

Long JA, Wildt DE, Wolfe BA, Critser JK, Derossi RV, Howard J (1996). Sperm capacitation and the acrosome reaction are compromised in teratospermic domestic cats. *Biol Reprod*, 54, 638-646.

Luvoni GC (2006). Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology*, 66, 101-111.

Neubauer K, Jewgenow K, Blottner S, Wildt DE, Pukazhenth BS (2004). Quantity rather than quality in teratospermic males: A histomorphometric and flow cytometric

evaluation of spermatogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Biol Reprod*, 71, 1517-1524.

Niwa K, Ohara K, Hosoi Y, Iritani A (1985). Early events of in vitro fertilization of cat eggs by epididymal spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 74, 657-660.

Odabaşioğlu F, Ateş CT (2000). Van Kedisi. Selçuk Üniversitesi Basımevi, 1. Baskı, Konya.

Penfold LM, Jost L, Evenson DP, Wildt DE (2003). Normospermic versus teratospermic domestic cat sperm chromatin integrity evaluated by flow cytometry and intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod*, 69, 1730-1735.

Pineda MH, Dooley MP (1984). Effects of voltage and order of voltage application on seminal characteristics of electroejaculates of the domestic cat. *Am J Vet Res*, 45, 1520-1525.

Platz CC, Seager SWJ (1978). Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. *J Am Vet Med Assoc*, 173, 1353-1355.

Platz CC, Wildt DE, Howard JG, Bush M (1983). Electroejaculation and semen analysis and freezing in the Giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *J Reprod Fertil*, 67, 9-12.

Platz CC, Wildt DE, Seager SWJ (1978). Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 52, 279-282.

Pukazhenth B, Pelican K, Wildt DE, Howard JG (1999). Sensitivity of domestic cat (*Felis catus*) sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold-induced acrosomal damage. *Biol Reprod*, 61, 135-41.

Rijsselaere T, Soom AV (2010). Semen collection, assessment and artificial insemination in the cat. *Vlaams Diergen Tijds*, 79, 468-471.

Roth TL, Howard J, Wildt DE (1994). Zona pellucida piercing enhances zona penetration by spermatozoa from normospermic and teratospermic domestic cats. *J Androl*, 15, 165-173.

Samsar E (1977). Kedi şırurjisinde ketalar ve ketalar rompun anestezisi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 24 (3-4), 402-415.

Schäfer S, Holzmann A (2000). The use of transmigration and Spermac (tm) stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 59, 201-211.

Sevinç A (1977). Dölerme ve Suni Tohumlama. Ankara Basımevi, Ankara.

Siemieniuch M, Dubiel A (2007). Preservation of tomcat (*Felis catus*) semen in variable temperatures. *Anim Reprod Sci*, 99, 135-144.

Siemieniuch MJ, Woclawek-Potocka I (2007). Morphological features of the seminiferous epithelium in cat (*Felis catus*, L. 1758) testes. *J Reprod Develop*, 53, 1125-1130.

Sojka NJ (1986). Management of artificial breeding in cats, In: Morrow DA editor current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in large and small animals. 2nd ed, WB Saunders, 805-8, Philadelphia.

Stachecki JJ, Ginsburg KA, Leach RE, Armant DR (1993). Computer-assisted semen analysis (CASA) of epididymal sperm from the domestic cat. *J Androl*, 14, 60-65.

Tanaka A, Kuwabara S, Takagi Y, Nakagawa K, Fujimoto Y, Murai M, Tsutsui T (2000a). Effect of ejaculation intervals on semen quality in cats. *J Vet Med Sci*, 62(11), 1157-1161.

Tanaka A, Takagi Y, Nakagawa K, Fujimoto Y, Hori T, Tsutsui T (2000b). Artificial intravaginal insemination using fresh semen in cats. *J Vet Med Sci*, 62(11), 1163-1167.

Tebet JM, Martins MIM, Chirinea VH, Souza FF, Campagnol D, Lopes MD (2006). Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology*, 66, 1629-1632.

Tekin N (1990). Erkek üreme organlarının muayenesi (Androlojik muayene). Evcil Hayvanlarda Suni Tohumlama, Obstetrik ve İnfertilite, *Theriogenology*, 53-67, Nürol Matbaacılık AŞ, Ankara.

Tekin N (1994). Spermanın muayenesi ve değerlendirilmesi. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Suni Tohumlama, Doğum ve İnfertilite. Birinci Baskı, 69-79, Dizgievi, Konya,

Thomas J, Burke I (1986). A clinical approach to diagnosis and treatment. Small Animal Reproduction and Infertility. Lea&Febiger, 13-22, Philadelphia.

Tsutsui T, Wada M, Anzai M, Hori T (2003). Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. *J Vet Med Sci*, 65, 397-399.

Tsutsui T, Kuwabara S, Kuwabara K, Kugota Y, Kinjo T, Hori T (2004b). Development of spermatogenic function in the sex maturation process in male cats. *J Vet Med Sci*, 66, 1125-1127.

Tsutsui T, Makagawa K, Hirano T, Nagakubo K, Shinomiya M, Yamamoto K, Hori T (2004a). Breeding season in female cats acclimated under a natural photoperiod and interval until puberty. *J Vet Med Sci*, 66, 1129-1132.

Tsutsui T, Tanaka A, Takagi Y, Nakagawa K, Fujimoto Y, Murai M, Anzai M, Hori T (2000a). Unilateral uterine horn insemination of frozen semen in cats. *J Vet Med Sci*, 62, (12), 1247-1251.

Tsutsui T, Tanaka A, Takagi Y, Nakagawa K, Fujimoto Y, Murai M, Anzai M, Hori T (2000b). Unilateral intrauterine horn insemination of fresh semen in cats. *J Vet Med Sci*, 62 (12), 1241-1245.

Ünal EF, Özfiliz N, Konuş R (1997). Kedilerde seksüel siklus evrelerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar. *YYÜ Sağ Bil Derg*, 2, 87-96.

Wildt DE, Bush M, Howard JG, OÖBrien SJ, Meltzer D, Vandyk A, Ebedes H, Brand DJ (1983). Unique seminal quality in the South African cheetah and comparative evaluation in the domestic cat. *Biol Reprod*, 29, 1019-1025.

Yılmaz B (1999). Hormonlar ve Üreme Fizyolojisi. Feryal Matbaacılık, Ankara.

Yur F (1994). Van Kedilerinde klinik açıdan önemli bazı kan parametrelerinin normal değerlerinin araştırılması. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Van.

Yurdaydın N (1990). Spermanın alınması, saklanması ve suni tohumlama. Evcil Hayvanlarda Suni Tohumlama, Obstetrik ve İnfertilite. *Theriogenology*, 77-89, Nurol Matbaacılık AŞ, Ankara.

Yurdaydın N (1994). Spermanın alınması, saklanması ve suni tohumlama. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Suni Tohumlama, Doğum ve İnfertilite. Birinci Baskı, 89-101, Dizgievi, Konya.

Zambelli D, Caneppele B, Castagnetti C, Belluzzi S (2002). Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. *Reprod Domest Anim*, 37, 310-313.

Zambelli D, Cunto M (2006). Semen collection in cats: techniques and analysis. *Theriogenology*, 66, 159-65.

## ÖZGEÇMİŞ

Saadet BELHAN, 1975 yılında Elazığ'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Elazığ'da tamamladı. 1993 yılında girdiği Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 1998 yılında mezun oldu. 2000 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitime başladı ve 2003 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladı. Aynı yıl Tarım Bakanlığı'nda Veteriner Hekim olarak göreve başladı. 2005 yılında Y.Y.Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nda Doktora eğitime başladı. 2003-2007 yılları arasında Van Tarım İl Müdürlüğünde çalıştı. Teknik koordinatör olarak görev aldığı bir Avrupa Birliği Projesini yürütmek üzere 2008 yılında 14 aylığına Van İl Özel İdaresine görevlendirildi. 2009 yılı Ekim ayı itibariyle Elazığ Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne geçti. Halen Elazığ Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nde görev yapmakta olup evli ve bir çocuk annesidir.