

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUN'I TOHUMLAMA
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof.Dr.İ.KÂMURAN İLERİ

KÖPEK SPERMASININ FARKLI ORANLARDA
GLYCEROL İÇEREN SULANDIRICILARDA
DONDURULMASI

T 58865

DOKTORA TEZİ

Veteriner Hekim ALPER BARAN

İSTANBUL - 1997



Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından T-85/160695 sayılı proje ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam sırasında karşılaştığım her türlü zorlukta gerek bilimsel gerekse kişisel yardımlarına başvurduğum ve danışmanlığı altında sürdürdüğüm saygıdeğer hocam sayın Prof. Dr. İ. Kâmuran İleri'ye saygı ve şükranlarımı sunarım.

Doktora tezimin her aşamasında, bilimsel öneri ve eleştirileri ile özverili yardımlarını esirgemeyerek beni yetiştiren, değerli hocam sayın Doç. Dr. Kemal Ak'a, çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım hocalarım sayın Doç. Dr. Serhat Pabuççuoğlu'na, Yard. Doç. Dr. Sema Birler'e, engin tecrübesi ve bilgisinden yararladığım saygıdeğer emekli hocam Prof. Dr. Adnan Özkoca'ya ve emeği geçen tüm Anabilim Dalı elemanlarına teşekkürlerimi borç bilirim.

Doktora verilerimin istatistiksel değerlendirilmesindeki değerli yardımlarından dolayı sayın Doç. Dr. Halil Güneş'e teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmamın gerçekleşmesinde, kendi köpek üretim çiftliğinde çalışmama izin vererek her türlü imkanı sağlayan, hayvansever, sanayici sayın Atilla Boronkay'a ve Bora Çiftliği çalışanlarına, şükranlarımı ve saygılarımı sunarım.

Ayrıca, öğrenim yaşamım boyunca her türlü maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve bugünlere erişmemde en büyük payı olan aileme sonsuz şükranlarımı, sevgi ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	5
2. LİTERATÜR BİLGİSİ	7
2.1. Erkek Köpeklerde Reprodüksiyon Endokrinolojisi.	7
2.2. Erkek Köpeklerde Reprodüktif Organlar.	8
2.3. Erkek Köpeklerden Spermanın Alınması	11
2.3.1. Parmak Manipasyonları ile Spermanın Alınması	11
2.3.2. Sun'i Vajen ile Spermanın Alınması	13
2.3.3. Elektroejakülatör Yardımı ile Spermanın Alınması.	13
2.4. Erkek Köpeklerde Spermatolojik Özellikler	14
2.5. Köpek Sperma Sulandırıcıları	19
2.5.1. Köpek Spermasını Kısa Süreli Saklamak İçin Kullanılan Sulandırıcılar.	19
2.5.2. Köpek Spermasının Dondurulmasında Kullanılan Sulandırıcılar.	22
3. MATERYAL ve METOT	29
3.1. Hayvan Materyali	29
3.2. Spermanın Alınması	29
3.3. Spermatolojik Özelliklerin İncelenmesi	29
3.3.1. Sperma Hacmi	29
3.3.2. Spermatozoa Motilitesi	30
3.3.3. Spermatozoa Yoğunluğu	30
3.3.4. Ölü-Canlı Muayenesi	30
3.3.5. Morfolojik Muayene	31
3.3.6. Spermanın pH Değeri	32
3.4. Spermanın Sulandırılması ve Dondurulması	32
3.4.1. Süt ve Tris Sulandırıcılarının Hazırlanması	32

3.4.2. %4 ve %7 Gliserollü Sulandırıcıların Hazırlanması	33
3.4.3. Pelletlerin Eritilmesi	35
3.5. Sonuçların İstatistiksel Değerlendirilmesi	36
4. BULGULAR	37
4.1. Taze Spermada Saptanan Spermatolojik Özellikler	37
4.2. 26°C'da Süt ve Tris Sulandırıcıları ile Sulandırılan Köpek Spermasında Ekilibrasyon Aşamasına Kadar Saptanan Spermatolojik Özellikler	38
4.3. %4 ve %7 Gliserol İçeren Süt ve Tris Sulandırıcılarında Eritme Sonrası Saptanan Spermatolojik Özellikler	39
5. TABLOLAR	40
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	43
7. RESİMLER	48
8. KAYNAK LİSTESİ	55
9. ÖZET	64
10. SUMMARY	65
11. ÖZGEÇMİŞ	66

1.GİRİŞ:

Köpekler, insanlarla içiçe yaşayabilme ve insan hayatına uyum sağlayabilme özellikleri nedeni ile yüzyıllardır önemini korumuştur. Günümüzden, 12-14 bin yıl kadar önce Avrasya'da ortaya çıkan köpeğin, insanlarla ilişkisi en azından 10 bin yıl önce başlamıştır ve evcilleştirilen ilk hayvandır. Seleksiyona dayalı ıslah yöntemleri sonrası, tüm dünyada 100'ü aşkın köpek ırkı ortaya çıkarılmıştır (80).

Köpek, zeki, anlayışlı ve eğitilebilir bir hayvandır. İyi koku alma özellikleri ile iz sürmede, patlayıcı ve uyuşturucu maddelerin yerini tespit etmede, suçluların takibinde büyük faydalar sağlamaktadır. Ayrıca, insana olan duygusal yakınlığı nedeni ile, evlerde insanlarla içiçe yaşamaya başlaması, en önemli yetiştirme nedenlerinden birini oluşturmuştur.

Köpeklerle ilgili ilk sun'i tohumalama çalışmaları, 1780 yılında İtalyan fizyoloğu Abbe L. Spallanzani tarafından başlatılmış, erkek köpekten alınan spemanın, dişiye verilmesi ile üç adet yavru alınmıştır (14, 40, 53, 75). Ancak bu yöntem 1900 yıllarından itibaren gelişmeye başlamış ve son 30 yılda yapılan yoğun bilimsel çalışmalarla uygulama alanına sokulmuştur (82). 1968 yılında ABD'de Oregon Üniversitesi Tıp okulunda, köpek spermasının uzun süreli saklanabilmesi ve dondurulabilirliği üzerinde ilk çalışmalar başlatılmıştır (72, 74). Dondurulmuş köpek sperması ile ilk başarılı gebelik 1969 yılında, S.W.J Seager tarafından elde edilmiştir (14, 58, 67, 74, 75).

Köpek yetiştiriciliği, son yıllarda uluslararası önem taşıyan bir ilgi alanı olmuştur. 1981 yılında, ABD'de dondurulmuş köpek sperması ile tohumlanan dişilereden elde edilen yavruların, Amerikan Köpek Klübü'ne (American Kennel Club) şartlı olarak ilk kez kabul edilmesi, dondurulmuş spermanın önemini arttırmıştır (75). Bu çalışmaları takiben, sadece ABD'de 1985 yılında dokuz merkezde köpek sperma bankası kurulmuştur (15, 81).

Köpek spermasının dondurulup eritildikten sonra akrozom bozukluğu oranının arttığı yapılan birçok çalışmada ortaya konmuştur (12, 54, 59, 61, 69). Köpek spermasının dondurulması üzerine sulandırıcı komponentlerinin ve diğer değişken maddelerin etkisini araştıran çalışmalar, genellikle motilitenin eritmeden hemen sonra değerlendirilmesi üzerinde yoğunlaştırılmış, termorezistant ve akrozom morfolojisi üzerinde detaylı durulmamıştır (10). Bu amaçla köpek spermasının dondurulması için çeşitli sulandırıcı tipleri ve dondurma metodları üzerinde çalışılmıştır (10, 14, 43, 63). Eritme sonrası spermatozoon motilitesi ve morfolojisine etki eden en önemli kryoprotektif madde sulandırıcıya katılan gliserol'ün yoğunluğudur (42). Günümüzde araştırmacılar, köpek spermasını, genellikle %2-8 arasında gliserol içeren Tris sulandırıcısı ile payet metoduna göre dondurmışlardır. Köpek spermasının dondurulmasında kryoprotektif bir madde olan gliserol'ün optimal yoğunluğu henüz tam anlamı ile tespit edilememiştir. Yapılan bazı çalışmalarda, çok düşük gliserol oranları eritme sonrası yeterli koruyucu etkiyi sağlamada başarısızken, çok yüksek gliserol oranları ise özellikle akrozom üzerinde hasarlara neden olmaktadır (69).

Çalışmamızda, köpek spermasını dondurmada, spermatozoa motilitesi ve morfolojisi üzerinde olumlu etki yapabilecek, ideal sulandırıcı tipi ve gliserol oranını saptamak amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİSİ:

2.1. Erkek Köpeklerde Reprodüksiyon Endokrinolojisi:

Erkek köpeklerde testislerin endokrin kontrolü, hipotalomus, hipofiz ve gonadlardan salgılanan hormonların düzenli çalışması ile gerçekleşmektedir. Hipotalamustan salgılanan GnRH, portal sistem aracılığıyla hipofiz ön lobundan FSH ve LH'nın (gonadotropinler) salgılanmasına neden olmaktadır (2, 5, 56).

LH hormonu tubulus seminiferi contorti'lerin arasını dolduran bağ dokudaki Leydig hücrelerini uyararak, burada kolesterol'den pregnenolone üretimini sağlamakta, pregnenolone metabolize olarak testesteron ve östradiol'e dönüşmektedir (55). LH ve testesteron salınımı gün içerisinde belli bir ritim içermemekte ve mevsime bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. LH yoğunluğu 1.0 ng/ml ile 10 ng/ml arasında değişebilmektedir (5, 17). Testesteron'un serum konsantrasyon'u genellikle 1-5 ng/ml'dir (80). GnRH salınımından 10 ile 40 dakika sonra LH salgılanırken, FSH tedricen ve yavaş olarak salgılanır. Olgun bir erkek köpekte LH kan konsantrasyonundaki artışı takiben, 60 dakika içerisinde serum testesteron seviyesinde artış olmaktadır (5, 17, 80). Testesteron hormonu, sertoli hücrelerinde lokalize olmuş FSH reseptörlerinin duyarlılığını arttırmakta, prostat bezi, vas deferens ve epididimis'in gelişimi ile sekonder seks karakterlerinin ortaya çıkmasında rol oynamaktadır (2, 55, 61). Testesteron düzeyinin artması, hipotalamusdan GnRH'nın salgılanmasını inhibe etmekte ve bunun sonucunda hipofiz ön lobundan LH ve FSH salgılanması azalmaktadır (2, 18).

Tubulus seminiferus contortuslardaki sertoli hücreleri FSH için hedef hücrelerdir ve bu hücreler ABP(Androgen Binding Protein) ile estradiol salgılamaktadırlar. Köpeklerde FSH'nın etkisi çok iyi bilinmemekle birlikte hipofiz/hipotalamus üzerinde negatif feedback etkisiyle salgılama yada inhibin etki göstermektedir. Hipofiz ön lobundan FSH salınımını kontrol eden sertoli hücrelerince, inhibin ve aktivin hormonları üretilir. Glukoprotein yapısında olan inhibin FSH salınımını baskımlarken, aktivin ise FSH salınımını arttırıcı etki sağlar (55, 65).

Spermatogenezis, herbiri 13-14 gün süren 4-5 siklus olarak, yaklaşık 55-70 gün arasında sürmektedir (56, 60, 80). Spermatozoa'ların epididimal migrasyon süresi 14 gündür. Spermatozoa'lar korpus epididimis'e ulaştıklarında proksimal sitoplazmik damlacık spermatozoa'nın boyun kısmından, distal orta kısmına hareket eder (80). Epididimis'de hücre membranının protein katı, nüklear materyal'de kimyasal değişiklikler, akrozom'da ultrasutrüktürel değişiklikler gerçekleşir. Primer spermatosit 20.9 günde, sekonder spermatosit 0.5 günde, yuvarlak çekirdekli spermatidler 10.5 günde, uzun çekirdekli spermatidler 10.6 günde oluşup tubulus seminiferus lümenine salınırlar (17). Olgun spermatozoa'nın ilk olarak görüldüğü yaşı tespitinde testiküler biyopsi kullanılmış, Coli ırklarında spermatogonial aktivite 5 ve 6 aylıkken ve ilk spermatozoa ise 9-10 aylıkken görülmüştür (17, 56).

2.2. Erkek Köpeklerde Reprodüktif Organlar:

Erkek köpeklerde reprodüktif organlar, skrotum, testisler, epididimis, duktus deferens, prostat bezi, ürethra ve penis'den oluşmuştur. Skrotum, anüs ve inguinal bölgenin ortasında lokalize olmuş kıllı yapıya sahip, ter bezleri ile desteklenmiş bir oluşumdur. Median bir septum aracılığı ile iki kaviteye ayrılmakta ve her kavite içerisinde, testis, epididimis ve spermatik kordon'un distal kısmı yer almaktadır. Sağlıklı bir köpekte testisler ovoid ve sert kıvamda olup scrotum içerisine horizontal olarak uzanırlar (17, 28, 56, 80).

Erkek köpeklerde testisler genellikle doğum ile birlikte inmiş durumdadır (17, 28). Altı haftalık iken testisler el ile palpe edilebilir (55). Toplam skrotal genişlik ve testiküler parenşimin ağırlığı ile günlük üretilen spermatozoa arasında korrelasyon vardır (28). Bir gram testis parenşiminde bir günde yaklaşık olarak 14×10^6 spermatozoa üretilmektedir (62). Büyük ve küçük ırklar arasında testislerin ebatları yönünden geniş bir varyasyon söz konusu olmakla birlikte, bu değerler ortalama $3 \times 2 \times 1.5$ cm'dir. Köpek testislerinin ultrasonik ölçümlerinde vücut ağırlığı ile testis ağırlığı arasında yüksek bir korrelasyon'un olduğu bildirilmiştir ($r = 0.64$) (23).

Ağırlıkları 5 ile 48 kg olan 104 erkek köpek'te yapılan bir çalışmada ortalama toplam testis ağırlığı 27.66 gr., epididimis'in ağırlığı 3.13 gr., kauda

epididimis'in ağırlığı 0.83 gr., korpus ve kaput epididimis'in toplam ağırlığı 2.30 gr. olarak belirlenmiştir. İncelenen 55 örnekte tubulus seminiferus'un çapı 186 μm olarak saptanmıştır. Köpek spermatozoa'sının incelendiği 69 örnekte, ortalama baş uzunluğu 6.1 μm , baş genişliği 3.8 μm , orta kısmın uzunluğu 10.1 μm , kuyruğun uzunluğu 45.2 μm ve toplam uzunluk 61.4 μm bulunmuştur (89). Epididimis testisin dorso-lateral yüzüne irtibatlıdır ve kaput epididimis kranial'de, kauda epididimis ise kaudalde lokalize olmuştur. Epididimis'in devamı olan duktus deferens, spermatik kordon içerisinde seyrederek. Kauda epididimis'den kök alan ve dorsal olarak inguinal kanal'ı geçen spermatik kordon; duktus deferens, spermatik arter, pampiniform fleksus damarı, sinirler ve kremaster kasını içerir (28).

Skrotum altında bulunan gevşek bağ doku m.cremaster'i örter. M.cremaster ve skrotum, spermatogenezis için gerekli ısı ayarlamasını sağlar ve testisleri vücut ısısından 4-7°C aşağıda tutar (17). Kas tabakasının (m.cremaster) altında, seröz bir zar olan, periton'un iç (visceral) ve dış (pariyetal) yaprağından oluşan, tunica vaginalis testis yer alır. Fötal dönemde, karın boşluğunda bulunan testisler peritonun bu iki yaprağı arasındaki boşluktan, skrotum'a inerler (descensus testis). Tunica vaginalis testis altında, elastik ve kollagen ipliklerden meydana gelen, tunica albuginea bulunur. Tunica albuginea'dan organın içine uzanan bağdoku bölmeleri (septula testis), testis paranzimini piramit şeklinde lobçuklara ayırır (mediastinum testis). Mediastinum testis, epididimis'in caput epididimis bölümünde, tunica albuginea ile karışır. Septula testisler arasında yer alan her bir lobçuk (mediastinum testis) tubulus seminiferus kontortus denilen kanallar içerir ve spermatozoon'lar burada üretilirler. Tubulus seminiferus kontortuslar, organın derinliklerine doğru birçok kıvrımlar oluştururlar ve köpeklerde uzunlukları 150 metre kadardır. Bu kanalların duvarı çok sıralı epitel hücreleri ile dizilidir. Bazal membran üzerine oturan ilk sıradaki hücreler iki tip olup, sayıca çok olan spermatogoniumlar ve bunların arasında sertoli hücreleri yer almaktadır (56).

Penis iki ayrı korpora kavernoza'dan oluşmaktadır. Arka bölümü median septum penis ile ayrılmıştır. Ön kısım os penis'i ve bulbus glandis'i içerir. Büyük

ırk köpeklerde 10 cm ve daha fazla uzunlukta olabilen ve os penis'in ventralinde seyreden oluk içerisinde ürethral oluşum geçmektedir. Köpeklerde glans penis oldukça büyüktür. Glans'ın ön yüzünde bulunan kısma pars longa glandis, arka kısmında yumru şeklinde erektile yapıya sahip kısma pars bulbos glandis adı verilir (56). Ereksiyon sırasında bulbos glandis'in uzunluğu 6 cm'ye, kalınlığı ise 4 cm'ye ulaşabilir (17).

Prostat köpeklerdeki tek eklenti üreme bezidir (17, 28, 42, 80). Sidik kesesinin boyun kısmının yaklaşık 1 cm gerisinde, symphysis pelvis'in kranial kısmı üzerinde, pelvisin ortasında lokalize olmuştur. Dorso-median bir çukur ile iki parçaya ayrılmış olup globular biçimdedir. Prostat'ın elastik bir yapısı vardır ve ırka, yaşa, vücut ağırlığına bağlı olarak, yetişkin köpeklerde, ebatları 1.4 cm'den, 2.8 cm'e kadar değişmektedir (17, 28). Sodyum ve klor iyonlarınca zengin olan prostat sıvısında sitrat yoğunluğu ise düşüktür. Köpek prostat sıvısının pH'sı yaklaşık olarak 6.8'dir ve veziküler bezlerin olmayışından dolayı çok düşük fruktoz yoğunluğuna sahiptir. Bu organın fonksiyonları androjenler tarafından düzenlenmektedir (56).

Çoğu araştırmacı köpek ejakulatının ilk fraksiyonunun ürethral bez sekresyonu olduğunu bildirmiştir. Ancak England ve Allen (22), köpek spermasının ilk fraksiyonunun orijinini araştırdıkları çalışmalarında, histolojik ve biyokimyasal incelemeler yapmışlardır. Histolojik incelemelerde, köpeklerde ürethra içerisinde glanduler doku bulunmadığı ortaya konurken, yapılan biyokimyasal çalışmalar, ejakulat'ın ilk fraksiyonunun prostat kaynaklı olması ile tam olarak açıklanamamış, ürethra'da depolanıp salgılanabileceği görüşünü ortaya koymuşlardır.

Köpek ejakulatı fraksiyonlar halinde ejaküle edilir. Birinci fraksiyon prostat bezi kaynaklı 1-5 ml hacimde olup, su kıvamındadır ve 0.5 ile 1 dakika içerisinde ejaküle edilmektedir. İkinci fraksiyon süt kıvamındadır ve 1-3 ml hacimde olup, spermatozoa bakımından en yoğun kısımdır. 1-2 dakika içerisinde bu kısım tamamlanır. Üçüncü kısım da prostat kökenlidir ve ejakulatın en büyük kısmını oluşturur. Büyük ırk köpeklerde 30-40 ml hacimde olarak yaklaşık 15-20 dakika sürmektedir (2, 40, 42, 50, 51).

Erkek köpekler ortalama 9 aylık yaşta puberteye ulaşırlar. Bu, genelde olgun vücut ağırlığına ulaştığı dönemdir. Normalde erkekler, aynı ırkın dişilerinden daha geç puberteye ulaşırlar (17, 55, 80). Ayrıca büyük cüsseli köpek ırkları, küçük cüsseli olanlara oranla daha yavaş cinsel olgunluğa ulaşırlar (55).

2.3. Erkek Köpeklerden Spermanın Alınması:

Günümüzde yapılan çalışmalar sonucunda köpeklerden üç değişik yöntemle sperma alınabilmektedir. Bunlar; parmak maniplasyonları, sun'i vajen ve elektroejakülatör ile sperma alma yöntemleridir (2, 17, 40, 42, 82, 88, 92).

2.3.1. Parmak Maniplasyonları ile Spermanın Alınması:

Köpeklerden penis'in masajı ile sperma almada araştırmacılar iki ayrı teknik kullanmışlardır. Bunlardan ilki boğa sun'i vajen'inden adapte edilen kauçuk konik kılıf'ın penis üzerine geçirilmesi ile uygulanan el masajı tekniği (14, 28, 49, 50, 53, 57, 72), diğeri ise parmak maniplasyonları tekniğidir (3, 40, 42, 73, 88, 92).

İlk yöntemde, sun'i vajen ile dereceli toplama kadehi arasında irtibatı sağlayan konik kauçuk lastikten (irtibat hunisi) yararlanılabilir (14, 63, 73, 76, 79, 80). Ortamda östrusdaki bir dişi köpeğin bulunması (özellikle ilk kez sperma alınan deneyimsiz köpekler için) spermanın alınmasında kolaylık sağlamaktadır (75). Sperma kaygan olmayan bir zemin ve sessiz bir alanda alınmalıdır. Uygulayıcı, sol elinde konik sperma toplama aracı ile erkek köpeğin sol tarafında durur. Sağ eli prepusyum üzerine ileri geri kaydırma hareketleri yaparak ereksiyonu uyarmaya çalışır. Ereksiyonun ilk belirtisi olarak bulbus glandis şişmeye başlar. Penis'in kavernoze gövdesi kanla dolduğunda ereksiyon gerçekleşir. Penis'in kan basıncının artması ile ereksiyon sinirsel olarak uyarılır ve bu sırada venöz kanın geri dönmesi kısmen inhibe olur ve penis arterleri genişler (80). Ereksiyon tam olarak gerçekleşmeden önce, prepusyum geriye doğru çekilerek bulbus glandis açığa çıkarılır ve konik sperma toplama aracı penis üzerine geçirilir. Eğer bulbus glandis prepusyumdan dışarı çıkarılmadan önce tam bir ereksiyon gerçekleşir ise hayvan ağrı duyar ve hızla ereksiyon

kaybolur (28). Toplama hunisini tutan elin baş ve işaret parmakları bulbus üzerine hafif ve ritmik basınçlar uygulamaya başlar. Pelvik itmelerin pik seviyeye ulaşmasını takiben (yaklaşık 15-30 saniye) penis kauçuk toplama hunisi ile birlikte kaudale doğru çevrilir. Ejakulatın birinci ve ikinci fraksiyonları ilk 1-2 dakika içerisinde gelir. Spermatozoondan zengin olan 2. fraksiyon süt görünümünde ve 0.5 ile 5 ml ortalama hacimdedir. Sperma ejaküle edildikten yaklaşık 1-3 dakika sonra prostat kaynaklı berrak bir sıvı (3. fraksiyon) gelmeye başlar. Bu kısım son kısımdır ve 5-45 dakika içerisinde 5-40 ml hacimde olabilmektedir. Bu yöntemde spermatozoondan zengin kısmın geldiği zamanın takip edilmesi çok güçtür ve çoğu zaman ejakulat'ın kısımları istenmeden birbirine karışmaktadır. Yine bu yöntemle sperma alınırken prepusyumda toplanan smegma preputii, sperma numunesini kontamine edebilir (50, 79).

Cam huni ve dereceli toplama kadehi yardımıyla parmak manipulasyonları yöntemi kullanılarak sperma en rahat biçimde alınabilir (17, 28, 40, 42, 92). Çoğu erkek köpek parmak manipulasyonları ile sperma vermeye yatkındır. Hayvan yerde ve ayakta iken sperma alınabilir. Kızgınlıkta olan bir dişi köpeğin ortamda bulunması sperma alma işlemini kolaylaştırır, fakat her zaman gerekli değildir. Ortamda dişi köpeğin bulunması, alınan spermadaki toplam spermatozoa sayısını yükseltebilir (51).

Bir eline eldiven giymiş olan sperma alacak kişi, erkek köpeğin sol arka kısmından ve prepusyum üzerinden bulbus glandis'in kaudal kısmına hafifçe masaj yapar. Sperma alma esnasında kauçuk eldiven'in alınan ejakulat'a temas etmesi, motiliteye olumsuz etki yapabileceğinden sakınılmalıdır. Yarı ereksiyon meydana geldiğinde prepusyal kılıf geriye doğru çekilir (50). Bulbus glandis'in arka kısmına prepusyum'un geri çekilmesi ve basınç uygulamaları sonrası ereksiyon sağlanır (17). Pelvik itme hareketleri başladığında penis sperma toplama kadehine çarpabilir. Hemoraji ve travmaya sebep olmamak için sperma toplama kadehi uzakta tutulur. Erkek köpek sperma vermeye isteksizse, toplama kadehi elin başparmağı aracılığı ile tutularak, glans penis'deki üretral oluşuma (urethral orificium) değdirilmek sureti ile ejakulasyon uyarılabilir (50). Pelvik itme hareketlerinin bitmesini takiben penis köpeğin arka ayakları arasından geriye doğru çevrilir. Bu sırada bulbus glandis'in arka kısmına baş ve

işaret parmakları arasında ritmik basınçlar uygulanmalıdır (17). Sperma alma işlemi sona erdiğinde penis antibiyotikli bir solüsyon ile yıkanmalı ve prepusyum içerisine girmesi sağlanmalıdır (40, 92).

2.3.2. Sun'i Vajen ile Spermanın Alınması:

Sun'i vajen ile sperma alma yönteminde ortamda östrusda bir dişi köpeğin varlığı şarttır (40, 42, 44, 92). Sun'i vajen dış kılıf ile iç lastik arasına sıcak su konan musluğa, penise ritmik basınçlar uygulayabilmek amacı ile bir lastik pompa adapte edilmiştir. Sun'i vajen'in ısı 40 °C olmalıdır ve iç kısmına östrusdaki bir dişi köpekte vajinanın zaten kuru olmasından ötürü diğer hayvan türlerinde uygulandığı gibi herhangi bir kayganlaştırıcı sürülmesi zorunlu değildir (40).

Sperma alınırken erkeğin dişinin vulva bölgesi koklaması sağlanmalıdır. Bu şekilde erkek köpek daha rahat ve daha fazla sperma verebilir. Bir kişi erkek köpeğin sağ tarafında durur dişi köpeği koklamasına izin verir. Spermayı alacak kişi erkek köpeğin sol tarafında durarak sol elinde sun'i vajinayı tutar. Penise prepusyumun dış kısmından yavaşça masaj yapan uygulayıcı, ereksiyon şekillendiğinde penis'i sun'i vajinaya sokar. Pelvik itme hareketlerini takiben bir elle sun'i vajen tutulur iken diğer el ile penis bulbus glandis'in arka kısmından geriye çevrilir. Bu esnada bir yardımcı sun'i vajen ile irtibatlı olan hava pompasından ejakulat'ın geri kalan kısmını almak için basınç uygular (40, 42, 44, 79). Bu yöntemle sperma alınırken spermanın üç fraksiyonu birbirinden ayrı olarak toplanamaz ve sperma alınırken bir yardımcının olması şarttır (79). Ayrıca, sun'i vajen iç lastiği olan kauçuğun köpek spermatozoa'ları üzerinde toksik etkili olduğu tespit edilmiştir (3, 24).

2.3.3. Elektroejakulatör Yardımı ile Spermanın Alınması:

Köpeklerden elektroejakulatör ile spermanın alınması mümkündür (17, 24, 79, 42, 82, 92). Genel anestezi altında uygulanan bu yönteme zorunlu olmadıkça başvurulmamalıdır. Bu yöntemde bir rektal prob ve elektrostimülatör'e ihtiyaç vardır. Bipolar rektal prob, tekniğine uygun olarak yerleştirildikten sonra 140 - 180 mA akım ve 10 - 20 volt gerilimlerle ejakulasyon

merkezi uyarılır ve sperma alınır (42). Elektroejakulasyon yöntemi ile elde edilen spermanın hacmi, prostat bezinin fazla uyarılmasından dolayı tabii çiftleşmeden daha fazladır (79). Ancak elde edilen ejakulat'a idrar karışma olasılığından dolayı tercih edilen bir metod değildir. Çok kıymetli damızlık köpeklerden diğer yöntemlerle sperma alınamadığı zorunlu durumlarda kullanılabilir.

2.4. Erkek Köpeklerde Spermatolojik Özellikler:

Fertilitesi yeterli bir köpekten alınan ejakulatta ortalama spermatozoa motilitesini % 70-90, morfolojik bozukluk oranını % 20 den az olarak bildiren İleri ve ark. (42), değişken olmakla beraber ortalama 125×10^6 / ml olan spermatozoa konsantrasyonunun ırka ve yaşa bağlı olarak değişebileceğini (60×10^6 / ml - 300×10^6 / ml) açıklamışlardır. Yazarlar, sperma hacminin 2-25 ml (ortalama 5 ml), canlı spermatozoa oranının % 80-85 ve pH'nın genellikle nötre yakın asidik özellikte olduğunu bildirmişlerdir.

Köpek spermasında primer anomalilerin %10'dan, sekonder anomalilerin %20'den fazla olmaması gerektiğini bildiren Meyers-Wallen (52), çok sayıda primer anormal spermatozoa'nın görülmesinin; hormonal yada kemoteröpatik ajanlar, toksinlere maruz kalma, spermatogenezis'de kongenital bir bozukluk, orşitis yada skrotal ısının yükselmesine neden olan hastalıklardan kaynaklanabileceğini öne sürmüştür.

Yüksek fertiliteye sahip birçok köpek'te %80'in üzerinde motilite saptayan ve %70'in altındaki spermatozoa motilitesinin standart'ın altında değerlendirilmesi gerektiğini bildiren Soderberg (80), alınan spermanın motilitesinin hızla düşmesinin, düşük fertilitenin işareti olabileceğini, ejakule edilen prostat sıvısının miktarına bağlı olarak spermatozoa yoğunluğunun son derece değişken olduğunu, olgun bir köpekten alınan ejakulatta toplam spermatozoa sayısının 500×10^6 'dan fazla olduğunu, yada %20'den fazla morfolojik bozuklukların fertilitayı düşürebileceğini, dolanmış kuyruk ve kopmuş baş gibi anormal spermatozoa'ların çokça görülmesinin skrotumdaki yangısel bir reaksiyona bağlı olabileceğini açıklamıştır.

Değişik ırklara ait 102 köpekten aldığı ejakulatlarda, 1 ml - 80 ml hacim, %60-%100 motilite, $50 \times 10^6/\text{ml}$ - $610 \times 10^6/\text{ml}$ arasında yoğunluk saptayan Dubiel (19), anormal spermatozoa oranını iki kategoride incelemiş, sekonder bozuklukları %24-88, primer bozuklukları ise %6.8-8 arasında bulmuştur.

Normal bir köpek spermasında, 1-30 ml hacim, %70'den fazla motilite, 6.3-6.7 arasında pH bildiren Johnston (44), bir ejakulattaki toplam spermatozoa sayısının 300 milyon ile 1 milyar arasında değiştiğini bildirmiştir.

Thomas ve ark. (85), 7 karışık ırk erkek köpek'ten aldığı spermalarda, spermatolojik özellikler olarak; %70'in üzerinde motilite, %75 normal spermatozoa oranı ve bir ejakulat'ta da 500×10^6 'un üzerinde spermatozoa saptamışlardır.

Amann (5), ortalama 15-17 kg. ağırlığında bir köpek için, sperma hacimini 3.9 ± 0.5 ml, yoğunluğunu $359 \pm 72 \times 10^6/\text{ml}$, ejakulattaki toplam spermatozoa sayısını ise $1.12 \pm 0.13 \times 10^6$ olarak bildirmiştir.

Linde-Forsberg (51), taze sperma ile tohumlama yapılacak bir erkek köpeğin spermasının %70'den fazla motilite'ye sahip olması ve primer ve sekonder spermatozoa defekt'lerinin %30-40'ı geçmemesi gerektiğini bildirmiştir.

Morton ve ark. (54), fertil köpekler için canlı spermatozoa oranını ortalama %88, normal morfolojideki spermatozoa oranını %69.1, başa ait bozuklukları %5.62, orta kısma ait bozuklukları %13.4, kuyruk kısmına ait bozuklukları %4.7, ejakulattaki toplam spermatozoa sayısını 860×10^6 olarak bildirmişlerdir.

Johnstone (45), normal köpek spermasında ortalama %15 anormal spermatozoa olabileceğini, bu oranın %20'yi geçmemesi gerektiğini belirtmiştir. Araştırmacı, motilitenin %70'in üzerinde ve pH değerinin 6.3-6.7 arasında olması gerektiğini bildirmiştir.

İki-beş yaşlı 8 adet melez ve 17 adet saf ırk köpekten el masajı ile sperma alan Wong ve ark. (88), melez ırk köpeklerde sırasıyla, 1.6 ± 0.8 ml hacim, $303.6 \pm 138.2 \times 10^6/\text{ml}$ spermatozoa yoğunluğu, $\%91 \pm 5.6$ motilite,

%96±3.6 canlı spermatozoa, %9±4.3 anormal spermatozoa oranı tespit ederlerken, saf ırk köpeklerde sırasıyla, 3.8±1.9 ml hacim, 602.9±466.2 x 10⁶/ml spermatozoa yoğunluğu, %73±26.3 motilite, %85±13.6 canlı spermatozoa, %18±17.2 anormal spermatozoa oranı saptamışlardır.

Theret ve ark. (83), sperma hacminin 0.3 ml, yoğunluğunun 3 x 10⁸/ml'den az, ölü spermatozoa oranının %20'den, anormal spermatozoa oranının %10'dan fazla olmaması gerektiğini bildirmişlerdir.

Gill ve ark. (35), Beagle ırkı köpeklerden aldıkları 30 ejakulatta, hacimi 2.2 ml, motil spermatozoa oranını %79, spermatozoa yoğunluğunu ml'de 98x 10⁶ olarak bildirmişlerdir.

Altı adet Beagle ırkı köpek'ten el masajı ile aldığı spermalarda, England ve Allen (21), ortalama motilite oranını %90-%95, spermatozoa yoğunluğunu 380 x 10⁶/ml ile 890 x 10⁶/ml ve canlı spermatozoa oranını ise %80 ile % 94 arasında bulmuşlardır.

Günzel (37), parmak maniplasyonu ile aldığı 74 ejakulatta, hacim, motilite, yoğunluk, ölü spermatozoa oranı, anormal spermatozoa oranı ve pH değerlerini sırası ile, 2.3 ml, %71, 1024.4x10⁶/ml, %11.2, %17.6 ve 6.7 bulmuştur.

Köpek spermasının hacmini fraksiyonlarına göre değerlendiren Harrop (40), spermatolojik özelliklerin, ırka, cüsse'ye, aynı ırk içerisinde de bireysel faktörlere bağlı olarak değişebileceğini bildirmiştir. Birinci, ikinci ve üçüncü fraksiyonların ortalama hacimlerini sırası ile, 0.25-2 ml, 05-4 ml, 3-25 ml arasında bulan araştırmacı, ortamda dişi köpeğin bulunmasının sperma hacmini arttırabileceğini açıklamıştır. 100'ün üzerinde köpekten aldığı spermalarda ortalama 125x10⁶/ml spermatozoa yoğunluğu olduğunu ancak, belirtilen nedenlerden dolayı bu rakamın 4x10⁶/ml ile 540x10⁶/ml arasında değişebileceğini bildiren araştırmacı, anormal spermatozoa oranı ise %20'den fazla olmaması gerektiğini ve 5.8 ile 6.9 arasındaki pH değerinin normal sınırlar içerisinde yer aldığını ifade etmiştir.

Smith (79), spermatozoa motilitesinin 0 ile +5 arasında bir skala üzerinde de değerlendirilebileceğini, normal köpek spermasında motilite, yoğunluk, anormal spermatozoa oranının sırası ile, %80, $300-500 \times 10^6/\text{ml}$, %20 olduğunu açıklamıştır.

Ortalama 10 ml sperma hacmi, $125 \times 10^6/\text{ml}$ spermatozoa yoğunluğu, %85 motilite, %90 canlı spermatozoa oranı, %20 anormal spermatozoa oranı bulan Wright ve ark.(90), anormal baş oranının %10'dan az olması gerektiğini bildirmişlerdir.

Schubert ve Seager (70), 8 ay - 10 yaşları arasındaki 28 adet erkek Dalmaçyalı köpeğinden, konik sun'i vajen kullanarak aldığı 170 ejakulatta hacim, motilite, toplam spermatozoa sayısı ve normal morfolojiye sahip spermatozoa'ları değerlendirmişlerdir. 0.8 ile 6 yaş arasındaki köpeklerde bu değerler sırası ile, 3.9 ml, %84, 628×10^6 , %84 iken, 6 yaşındaki köpeklerle göre sırasıyla, 4.4 ml, %77, 498×10^6 , %71 bulmuştur. Araştırmacılar, 6 yaşın altındaki Dalmaçyalı köpeklerde, motilite, normal spermatozoa oranı ve toplam spermatozoa sayısını daha yüksek bulmuşlardır.

Seager ve Fletcher (72), 20 değişik ırk köpekten toplam 140 ejakulat'ı değerlendirmişler, ortalama %83.9 spermatozoa motilitesi saptamışlardır.

Köpek spermasının özelliklerini 0 ile 3 arasında değerlendiren Linde-Forsberg (50), 3 olarak en yüksek toplam spermatozoa sayısını, iyi morfolojik yapıdaki spermatozoa'ları ve %70'in üzerindeki motilitenin belirlendiğini, 2'nin ise, orta derecede spermatolojik özellikleri belirlediğini ve yoğunluğun $150 \times 10^6/\text{ml}$ 'den fazla, morfolojik bozuklukların %30'dan az, motilitenin %60-40 arasında ve 1'in ise $150 \times 10^6/\text{ml}$ 'den az spermatozoa yoğunluğunu, %40'dan fazla morfolojik bozukluk ve %20-30 motiliteyi gösterdiğini bildirmiştir. 0'da ise toplam spermatozoa sayısının son derece düşük, anormal spermatozoa'nın %80'den fazla ve motilitenin %0-10 arasında olduğunu bildirmiştir.

Feldman (28), köpek sperması için 1-40 ml hacim, 6.8 pH, %70 motilite, $200 - 1000 \times 10^6/\text{ml}$ yoğunluk ve %30 anormal spermatozoa oranı bildirmiştir.

Arthur ve ark. (8), köpek spermasının %70-90 motiliteye, $125 \times 10^6/\text{ml}$ yoğunluğa, %20 den az anormal spermatozoa'ya sahip olması gerektiğini açıklamışlardır.

Ejakulasyon sonrası toplam $860 \times 10^6/\text{ml}$ spermatozoa ve %88 motilite saptayan Morton ve Bruce (54), primer morfolojik bozukluklardan en çok proksimal damlacığın gözlemlendiğini, başa, orta kısma ve kuyruğa ait olmak üzere %5.62, %13.4 ve %4.7 bozukluk bulunduğunu bildirmişlerdir.

Tsutsui ve ark. (86), Beagle ırkından 11 adet erkek köpekten aldıkları spermalarda, ortalama olarak 1.4 ± 0.6 ml hacim, %95 motilite ve $4.1 \pm 1.8 \times 10^8/\text{ml}$ yoğunluk bulmuşlardır.

Mickelsen ve ark. (53), farklı ırklardan 22 adet erkek köpekten aldıkları spermalarda %67.5 motilite, %52 normal morfolojideki spermatozoa bulmuşlar, taze sperma ile yaptıkları tohumlamalardan %71 gebelik elde ettiklerini, ejakulattaki toplam ileri yönlü spermatozoa sayısı ile gebelik oranı arasında yakın ilişki olduğunu açıklamışlardır.

Johnston (44), normal köpek spermasının motilitesinin %70'den fazla, pH'sının 6.3-6.7, bir ejakulattaki spermatozoa sayısının 300 ile 2×10^9 arasında ve normal morfolojideki spermatozoa oranının %80'den fazla sahip olması gerektiğini bildirmiştir.

Köpekler üzerinde, Ülkemizde de bazı androlojik ve sun'i tohumlama çalışmaları yapılmıştır.

Beş Kangal ve 5 Alman Çoban köpekten penis masajı yöntemi ile aldıkları spermalarda Tekin ve ark. (82), ırklara göre sırasıyla 25.4-21.2 ml hacim, %62.6-%67.8 motilite, $524.0 \times 10^6/\text{ml}$ - $305.8 \times 10^6/\text{ml}$ yoğunluk, %6.7-%6.2 anormal spermatozoa oranı, 6.1-6.2 pH değeri saptamışlardır.

Kabasakal (46), farklı ırklardaki köpeklerden alınan ejakulatlarda başlıca spermatolojik özellikleri, 1.4 ± 0.21 ml hacim, 76 ± 1.63 motilite, 517.50 ± 93.06 yoğunluk, 15.9 ± 3.89 anormal spermatozoa oranı, 27.45 ± 4.11 ölü spermatozoa oranı ve 6.35 ± 0.08 pH değeri saptamıştır.

Gökçen ve ark. (36), 11 adet erkek köpekten aldıkları ejakulatlarda, ortalama 2.24 ml sperma hacmi, 6.16 pH, 0.68×10^6 /ml spermatozoa yoğunluğu, %60 spermatozoa motilitesi, %32.24 ölü spermatozoa oranı, %25.62 anormal spermatozoa oranı ve %0.24 akrozom defektli spermatozoa oranı bulmuşlardır.

Değişik ırktaki 4 köpekten alınan toplam 20 ejakulata ait spermatolojik özellikleri inceleyen Yurdaydın ve Kotzab (93), çalışmalarında ortalama, 2.2 ml hacim, %80.75 motilite, %17.04 anormal spermatozoa oranı, %14.77 ölü spermatozoa oranı ve 308.950×10^6 /ml spermatozoa yoğunluğu saptamışlardır.

Kangal ve Alman Çoban köpeklerinden aldığı beşer ejakulatta spermatolojik özellikleri inceleyen Büyükçoban (16), Kangal ırkı köpeklerde en düşük ve en yüksek ortalama değer olarak; 2.70-4.98 ml hacim, %28.50-89.50 motilite, $92-582 \times 10^6$ /ml spermatozoa yoğunluğu, 5.90-6.26 pH, %6.54-11.14 anormal spermatozoa oranı, %2.02-3.90 ölü spermatozoa oranı, %0.96-2.26 akrozom defektli spermatozoa oranı bulmuştur. Alman Çoban köpeklerinde ise; 2.34-4.34 ml hacim, %74.00-89.00 motilite, $158-670 \times 10^6$ /ml spermatozoa yoğunluğu, 6.20-6.48 pH %7.68-20.10, anormal spermatozoa oranı, %2.58-3.60 ölü spermatozoa oranı, %1.20-3.40 akrozom defektli spermatozoa oranı tespit etmiştir.

2.5. Köpek Sperma Sulandırıcıları:

2.5.1. Kısa Süreli Saklamada Kullanılan Sulandırıcılar:

Sperma soğutulurken yada nakledilirken daima sulandırılmalıdır. Sulandırıcı, pH'nın stabil kalmasını, enerjinin korunmasını, nakil sırasında sarsıntı ve ısı farklılıklarının oluşturduğu zararlara karşı spermatozoal membranı korumaya yardımcı olmaktadır (14, 50).

Dondurulmuş spermaya oranla, sulandırılıp soğutulmuş sperma ile yapılan tohumlamalardan daha yüksek gebelik elde edilmektedir. Sulandırılıp soğutulan köpek spermasının potansiyel fertilitesi üç faktöre bağlı olarak muhafaza edilmektedir. Bunlar; a) düşük ısıda spermatozoa'nın metabolizmasının azaltılması, b) sulandırıcı katılarak soğuk şokundan

korunması, c) soğuk şokuna köpek spermatozoon'larının direncinin yüksek olmasıdır (13).

Sperma sulandırıcılarında, uygun osmotik basınç, besî ortamı, metabolik artıkları absorbe edebilme ve spermatozoon'ları soğüğün zararlı etkisinden koruyabilme gibi özellikler aranmalıdır. Spermatolojik özellikleri saptanmış ve sulandırılmış spermanın 5°C'a soğutulması ayrı bir özeni gerektirir. Çünkü 17°C'nin altındaki ani ısı değişikliklerinde özellikle akrozomda olmak üzere irreversible bozukluklar meydana gelebilmektedir (42).

Kryoprotektant madde eklenmeksizin soğutulan spermatozoon'ların yaşam süresi kısadır. Soğuk şoku sırasında fosfolipidler, sperma hücrelerinin plazma membranının lipid yapısı ile karşılıklı etkileşime girerler ve korunmayı sağlarlar. Sperma hücresinin membranına bağlanan lipoproteinler, spermanın saklanması hücre bütünlüğünün sürekliliğini sağlamaktadır. Köpek, insan, horoz ve tavşan spermatozoon'ları diğer büyük evcil hayvanlardan daha fazla soğuk şokuna dirençlidir (13).

Araştırmacılar, köpek spermasının kısa süreli saklanması değişik sulandırıcılar geliştirmişlerdir. Köpek spermasının sulandırılmasında ilk olarak kullanılan sulandırıcı pastörize süt olmuştur (8, 15, 31, 50, 77). Bu amaçla en fazla kullanılan sulandırıcılardan birisi de yumurta sarısı-sodyum sitrat sulandırıcısıdır (75).

Günzel ve Ekrod (38), köpek spermasının +5°C'de Tris - yumurta sarısı sulandırıcısında kısa süreli muhafazasında, motilite, asid ve alkalın fosfataz değerlerini incelemişlerdir. Araştırmacılar, Tris sulandırıcısı ile sulandırıldıktan 24 saat sonra, %59.2 motilite oranı tespit ederlerken, asid ve alkalın fosfataz değerleri, Tris sulandırıcısı ile sulandırma sonrası azalmıştır.

Kangal ve Alman Çoban köpeklerinden aldığı spermaları Tris-Glukoz-Sitrik asit-Yumurta sarısı (T-YS) ve Sodyum dihidrojen fosfat-Glukoz-Glisin-Yumurta sarısı (SDHP-YS) sulandırıcıları ile sulandıran ve 4°C'de 12 saat aralıklarla motiliteleri inceleyen Büyükçoban (16), hem Alman hemde Kangal Çoban köpeklerine ait spermaların T-YS sulandırıcısında yaşam süresinin,

SDHP-YS sulandırıcısına göre daha uzun olduğunu tespit etmiştir. Araştırmacı, her iki ırk'ta da spermatozoa canlılığının, T-YS sulandırıcısında daha uzun süre korunduğunu saptamıştır.

Yumurta sarılı sulandırıcılarda pH, osmatik basınç, glisin ve gliserol ilavelerini inceleyen Foote ve Leonard (32), pH'sı 5.6 olan ve glukoz içeren %20 yumurta sarısı-sitrat-glisin sulandırıcısının spermatozoa canlılığını en iyi koruyan sulandırıcı tipi olduğunu bildirmişlerdir.

Günümüzde köpek spermasının kısa süreli saklanması için kullanılan sulandırıcıların en önemlileri, Illinois Variable Temperature (I.V.T) ve %20 yumurta sarılı Tris-Sitrat sulandırıcılarıdır (50). Araştırmacıların önerdikleri bir diğer sulandırıcı da, %80 homojenize süt , pastörize krema (%12 yağlı) ve %20 yumurta sarılı sulandırıcıdır. Sulandırıcıların her ml'sine 1 mg dihidrostreptomisin ve 1000 IU penisilin eklenmesi önerilmektedir (2, 50).

Harrop (40), spermatozoa'dan zengin 2. kısmını kullandığı çalışmada, spermayı eşit hacimde Yumurta sarısı - sodyum sitrat ile sulandırmış ve +4 °C'de 96 saat sonra %50 motilite elde etmiştir. Concannon'da (18), aynı sulandırıcıyı kullanmış ve +5°C'da 2-8 gün sonra dahi %50 motilite bulmuştur.

Yağsız süt tozu-glukoz veya yumurta sarısı-sitrat sulandırıcıları ile spermatozoa yoğunluğu 25×10^6 /ml olacak şekilde sulandırdıkları köpek spermasını ve 35°C, 22°C ve 4°C'de 120 saat inkübasyona bırakan Bouchard ve ark. (13), yağsız süt tozu - glukoz sulandırıcısında dakikada 0.3°C - 1.0°C hızla 4°C'ye soğutulan spermada en yüksek motilite oranını saptamışlardır.

köpek spermasının +5°C 'de muhafazasında 6 farklı sulandırıcı (Tris-yumurta sarısı, Yumurta sarısı-bikarbonat, Caprogen, Cornell University, Beltsville F3 ve yağsız süt sulandırıcıları) ve 3 değişik gliserol oranı (finalde %0, % 3, % 6) inceleyen Province ve ark. (68), köpek sperması için en başarılı motilite sonuçlarının Caprogen sulandırıcısında alındığını, spermanın +5°C 'de muhafazasında gliserol ilavesinin faydalı olmadığını bildirmişlerdir.

2.5.2.Köpek Spermasının Dondurulmasında Kullanılan Sulandırıcılar:

Köpek spermasının dondurulması çalışmalarında ilk olarak pellet metodu kullanılmış ve başarılı gebelik oranları elde edilmiştir (71, 72, 73). Günümüzde yapılan çalışmalarda ise köpek sperması 0.25 ml ve 0.5 ml'lik payetlerde dondurulmaktadır (7, 42, 57, 66, 69, 72, 75). Köpek spermasının dondurulduğu birçok merkezde, köpek spermasını 0.5 ml'lik payetlerde, bazı merkezlerde ise pelletler halinde dondurularak sıvı nitrojende muhafaza edilmektedir (14, 50, 75). Köpek sperması dondurulduktan sonra 12 yıldan fazla saklanabildiği ve bu sürenin spermatozoon'lar üzerinde çok az bir fertilite düşüklüğüne yol açtığı (75), donmuş köpek spermasının eritme sonrası in vivo şartlarda, yaşam ömrünün ortalama 12 saat kadar olduğu bildirilmektedir (9).

Günümüzde araştırmacılar köpek spermasının dondurulmasında genellikle %2-8 gliserol içeren Tris sulandırıcısını kullanarak pellet ve payet metodlarını denemişlerdir. Köpek spermasının dondurulmasında kryoprotektif bir madde olan gliserol'ün optimal yoğunluğu henüz tam anlamı ile saptanamamıştır. Yapılan bazı çalışmalarda çok düşük gliserol oranları eritme sonrası yeterli koruyucu etkiyi sağlamada başarısızken, çok yüksek gliserol oranları ise akrozom üzerinde hasarlara neden olmaktadır (11, 29, 69).

Köpek spermasının pellet formda dondurulması amacı ile laktoz-yumurta sarısı ve düşük gliserol seviyesi kullanılmaktadır (73). Plastik payetlerde dondurma yönteminde ise genellikle yumurta sarısı-Tris tamponlu %3-4 gliserollü sulandırıcılar tercih edilmektedir (9, 63, 69, 84, 85).

Köpek spermasının pellet olarak dondurulmasında değişik sulandırıcıların kullanılmasının kalitatif spermatolojik özellikleri etkilediği, sulandırıcıların içerdiği kompleks komponentlerin (şekerler, gliserol, yumurta sarısı, elektrolitler vb.) değişik miktarlarının bunun sebebi olduğu öne sürülmektedir (40).

Eritme sonrası motilitenin en az %40 ve daha fazla olması gerektiğini bildiren Brown (14), %20 gibi düşük oranlarda motiliteye sahip spermalardan

dahi gebelik alınabileceğini bildirmiştir. Araştırmacı ayrıca eritme sonrası sperm örneklerinde anormal spermatozoa oranının %30'dan fazla olmaması gerektiğini bildirmiştir.

PIPES, BES, TES, TRIS sulandırıcılarına üç değişik potasyumlu tampon ilavelerinin (KHCO_3 , K_3PO_4 , KOH) etkilerini inceleyen Smith (78), 1:2 oranında %50 PIPES/ KOH -%25 sodyum sitrat-%25 dekstroz (v/v)-%20 yumurta sarısına finalde %9 gliserol olacak şekilde hazırlanan sulandırıcı ile eritme sonrası en iyi motilite oranı elde etmiş, pellet ve payet şeklinde dondurduğu örneklerde eritme sonrası en ideal motilitenin 0.5 ml'lik payetlerde alındığını bildirmiştir.

Beş adet erkek köpek'ten parmak manipulasyonları tekniği ile aldıkları sperm'den zengin kısmı, %8 gliserol (v/v) ve %20 yumurta sarısı içeren Tris-fruktoz-sitrik asit sulandırıcısı ile 1:3 ve 1:5 oranında sulandıran Andersen (6), 0.5 ml'lik payetlerde dondurduğu spermaları, 75°C'lik su banyosunda 6.5 sn. içerisinde eritmiş ve motilite oranını yaklaşık %50-70 arasında bildirmiştir. Aynı sulandırıcı ve dondurma tekniğini kullanan Farstad (27) ise, eritme sonrası %30-70 arasında motilite oranı elde etmiştir.

Köpek spermasını, %8 gliserol (v/v) ve %20 yumurta sarısı (v/v) içeren Tris-fruktoz-sitrik asit sulandırıcısı ile sulandıran Theret ve ark. (83), 0.5 ml'lik payet'lerde dondurdukları spermaya, 37°C'deki su banyosunda 60 sn'de eritmişler ve ortalama, %60-80 arasında motilite elde etmişlerdir. Aynı sulandırıcı ve dondurma yöntemini kullanarak ml'de 100×10^6 spermatozoa olacak şekilde 0.5 yada 0.25 ml'lik payetlerde donduran Allen (2) ve Wilson (87), 70°C'de 8 sn. içinde erittikleri payetlerde yeterli motilite oranı (Allen; %50, Wilson; %60-70) elde etmişlerdir.

Olar ve ark. (63), yaptıkları ayrıntılı çalışmalarında, payetlerde dondurulan köpek spermasının eritme sonrası motilitesine, soğutma ve sulandırıcıların etkisini incelemişlerdir. Araştırmada 5 değişik deney yapılmıştır. 1. ve 2. deney: Sulandırıcı olarak, %20 yumurta sarısı (v/v) içeren, hem 0.2 M Tris hemde 0.21 M laktoz tamponu kullanılmıştır. Buradaki sulandırıcılara %0, 2, 4 (v/v) DMSO ile %0, 2, 4, 6 (v/v) gliserol birlikte yada tek başına katılmıştır. 3. deneyde iki sulandırıcıya altı farklı gliserol oranı denenmiştir (%0, 1, 2, 3, 4,

5). 4. ve 5. deneylerde soğutma ve eritme ısılarının motilite üzerine etkileri incelenmiştir. 4.deneyde, alınan sperma 37°C'den 5°C'ye 1, 2 ve 3 saatte soğutulmuş ve 0.5 ml payetlerde doldurulup 1 yada 2 saat 5°C'da ekilibrasyona bırakılmıştır. 5. deneyde, 5°C'dan -100°C'ye, dakikada -75°C hızlı soğutma, 5°C'den -15°C'ye dakikada -5°C, takiben -15°C'den -100°C'ye dakikada -20°C orta süratte soğutma, 5°C'dan -15°C'ye dakikada -2°C, takiben -15°C'den -100°C'ye dakikada -10°C olmak üzere üç ayrı soğutma hızı denenmiştir. Yine aynı deneyde, 1°C'da 2 dakika (yavaş), 35°C'da 30 saniye (orta), 75°C'da 12 saniye (hızlı) olmak üzere üç ayrı eritme ısısı denenmiştir. Eritme sonrası en iyi motiliteye %3-4 gliserol içeren Tris sulandırıcısında (ortalama %41) rastlanmıştır. Yumurta sarısı-laktoz sulandırıcısında ise %4 gliserolde en iyi motilite (ortalama %26) oranı elde edilmiştir.DMSO'nun tek başına yada gliserol ile birlikte kombine edilip sulandırıcıya eklenmesinin motilite üzerine faydalı etkisi olmamıştır. 1 saat soğutma, 1 saat ekilibrasyon süresinin eritme sonrası motiliteyi olumlu etkilediğini açıklamışlardır. Orta süratte dondurma hızı, hızlı ve yavaş süratte dondurmaya oranla en iyi motilite değerini vermiştir. En iyi eritme sonrası motilite, 75°C'da 12 saniyede olan ısıtmada elde edilmiştir.

%20 yumurta sarısı-%11 laktoz-%4 gliserin sulandırıcısı ile oda ısısında 1:1 oranında sulandırdığı köpek spermasını pellet metoduna göre donduran Seager (71), 2.5 ml serum fizyolojik içerisinde erittiği pelletlerle tohumladığı dişilerden, %65.8 oranında gebelik elde etmiştir.

Oettle (58), 0.16 M Tris tamponlu yumurta sarısı sulandırıcısını iki eşit kısma ayırmış, İlk kısım gliserol içermeyen, ikinci kısma %20 (v/v) gliserol katılmıştır. Sperma, gliserol içermeyen sulandırıcı ile 35°C'de 1:2 oranında sulandırılmış ve bu sperma 450 devirde 10 dakika santrifüje edilmiş ve üstteki kısım atılarak, orjinal hacim ne olursa olsun 1.8 ml sediment bırakılmıştır. Sediment'in ısısı +5°C'ye düşürüldükten sonra gliserollü sulandırıcı eklenmiş ve final gliserol yoğunluğu %10 olmuştur. +5°C'da 3 saat ekilibrasyon'u takiben 0.25 ml payetlerde dondurulmuştur. Eritme işlemi 30°C'da 30 sn'de yapılmış ve eritilen payet ısısı 30°C'ye ayarlı bir tüp içerisindeki gliserol içermeyen 4 ml'lik sulandırıcıda tekrar sulandırılmış ve böylece gliserol yoğunluğu (1:16)

düşürülmüştür. Elde edilen motilite oranı ortalama %60 olarak saptanmıştır. Oettle (59), Beagle ırkı köpeklerden aldığı 16 ejakulat spermada yaptığı bir diğer çalışmada spermayı Tris-sitrat-yumurta sarısı sulandırıcısı ile 1:3 oranında sulandırmış ve 0.25 ml'lik payetlerde dondurduğu sperma numunelerini 35°C'de 1 dakikada eritmiştir. Motilite ve sağlam akrozom değerleri, donma öncesi değerleri ile mukayese edildiği zaman en dikkat çekici düşüşler donma ve eritme işlemleri sırasında gözlenmiştir. Donma öncesi ve sonrası motilite değerleri için ortalama 35.13 ± 12.53 ve sağlam akrozom oranı için ortalama 31.75 ± 10.18 düşüş meydana gelmiştir.

Beagle ırkı köpeklerden aldıkları spermaları %9 gliserollü PIPES (Pipes asit-KOH-glukoz-sodyum sitrat-yumurta sarısı), %6.4 gliserollü TRIS (Tris-sitrik asit-fruktoz-yumurta sarısı), %6 gliserollü TEST (Tes-Tris-fruktoz-yumurta sarısı) ve %4 gliserollü laktoz (laktoz-yumurta sarısı), sulandırıcıları ile sulandıran Battista ve ark. (10), sulandırılan sperma örneklerini hem 100 µl'lik pelletlerde ve hemde 0.5 ml'lik payetlerde dondurmuşlardır. İki farklı eritme ısısının kullanıldığı çalışmada, 37°C'de erittiği örneklerde TRIS, TEST, laktoz ve PIPES sulandırıcıları için sırası ile ortalama, %62, %53, %46 ve %39, 70°C'de erittiği örneklerde ise aynı sulandırıcılar için sırası ile %56, %50, %40 ve %36 motilite bulmuşlardır. Pellet dondurma tekniğinin, Laktoz sulandırıcısı için PIPES'den daha kullanışlı olduğunu bildiren araştırmacılar, payet yöntemine göre dondurmada ise TRIS ve TEST sulandırıcılarının Laktoz ve PIPES sulandırıcısından daha iyi sonuçlar verdiğini belirlemişlerdir.

Thomas ve ark. (85), 7 köpek'ten aldıkları spermayı final gliserol yoğunluğu %4 olacak şekilde, Tris-sitrat ve BES-laktoz ile sulandırmışlar ve dondurmayı, 0.5 ml'lik pelletlerde ve 0.5 ml ile 2.5 ml'lik payetlerde gerçekleştirmişlerdir. Eritme sonrası motilite oranını Tris-sitrat sulandırıcısında, BES-laktoz sulandırıcısından daha yüksek bulmuşlardır. BES-laktoz sulandırıcısı ile sulandırılan sperma'da elde edilen motilite oranı pellet yönteminde daha yüksek olmuştur.

Değişik ırktan 4 erkek köpekten aldıkları spermaları %8.8 (v/v) gliserollü, Tris-sitrat-glikoz sulandırıcısı ile 1:3 oranında sulandırarak 0.25 ml'lik payetlerde

donduran Yurdaydın ve Kotzab (93), 40°C'de 10 saniyede erittikleri payetlerde motilite, ölü spermatozoa, anormal spermatozoa oranını sırası ile ortalama %46.25, %33.12, %27.91 olarak tespit etmişlerdir.

Tris-sitrat tamponlu sulandırıcıda sulandırdığı 120 ejakulat spermayı, hem 0.5 ml'lik payetlerde, hemde 1 ml'lik alüminyum tüplerde donduran Kosiniak ve ark. (47), eritme sonrası motilite oranını, payetlerde (%40-50), alüminyum tüplerden (%30-40) daha yüksek bulmuşlardır.

Farklı ırklardan 10 köpek üzerinde yaptığı çalışmada, %6 gliserollü Tris-sitrik asit-fruktoz ve %7 gliserollü yumurta sarısı-sodyum sitrat sulandırıcılarını karşılaştıran Kabasakal (46), spermayı 1:3 oranında hem Tris, hemde sodyum sitrat ile sulandırmış ve 0.25 ml'lik payetlerde dondurmıştır. 40°C'de 15 saniyede eritilen payetlerde, motilite, ölü spermatozoa ve anormal spermatozoa oranını tespit etmiştir. Araştırmacı bu değerleri, %6 gliserollü Tris sulandırıcısı için sırası ile ortalama, 55.00 ± 2.69 , 55.85 ± 4.48 ve 35.10 ± 5.03 , %7 gliserollü yumurta sarısı-sodyum sitrat sulandırıcısı için, 51.00 ± 2.33 , 56.55 ± 3.68 ve 43.55 ± 7.75 olarak belirlemiştir.

Köpek spermasının dondurulmasında, Tris-fruktoz-Yumurta sarısı, Tris-glukoz-yumurta sarısı, Laktoz-yumurta sarısı, GH₂₂L, Nagase-Niwa sulandırıcılarını kullanan Ivanova ve ark (43), bu amaçla 7 adet Alman Kurt köpeğinden 16 ejakulat almışlar ve herbirini 5 eşit kısma ayırarak yukarıdaki 5 değişik sulandırıcı ile sulandırmışlardır. Pelletler 39°C'de 0.5 ml NaCl içerisinde eritildikten 10 dakika sonra, motilite yüzdesi, üçlü boyama tekniği kullanılarak akrozomal morfoloji ve mikrokompüter sperm analiz aracı kullanılarak spermatozoon'ların hızı ölçülmüştür. Hem motilite, hemde sağlam akrozom oranı Tris-fruktoz-yumurta sarısı sulandırıcısı ile GH₂₂L sulandırıcısında daha yüksek bulunmuştur. Aynı sulandırıcılarda motilite eritme işleminden 10 dakika sonra %7.4-39.3 arasında, sağlam akrozom oranı %47-50 arasında tespit edilmiştir. Araştırmacılara (43) göre, köpek spermasının diğer özellikleri dikkate alındığında, GH₂₂L sulandırıcısının içerdiği lipoproteinler ile Tris-fruktoz-yumurta sarısı sulandırıcısının mevcut şeker ve diğer komponentlerinin biraz

değiştirilmesi ile spermatolojik özelliklerin yükseleceği, diğer sulandırıcılar ile yapılan karşılaştırmalarla ortaya çıkarılmıştır.

Değişik ırklardan 7 adet erkek köpekten aldıkları spermaları %3.2 (w/v) gliserollü Tris-sitrat-yumurta sarısı sulandırıcısı ile sulandırdıktan sonra 0.5 ml'lik payetlerde donduran Badinand ve ark. (9), erittikten sonra motiliteyi, ortalama %50'nin üzerinde bulmuşlardır.

%8.8 (v/v) gliserollü Tris-sitrik asit-fruktoz sulandırıcısı kullandıkları çalışmalarında, Beagle ırkı köpeklerden aldıkları spermaları payet yöntemine göre donduran Gill ve ark. (35), eritme sonrası motilite oranını %40-50 arasında bulmalarına rağmen donmuş sperma ile yaptıkları tohumlamalardan gebelik elde edememişlerdir.

Yedi adet Labrador Retriever'in her birinden 5'er ejakulat olmak üzere toplam 35 ejakulatının spermatolojik özelliklerini inceledikten sonra iki kısma ayıran Platz ve Seager (67), bir kısmı santrifüj edilmeden kontrol olarak, kalan diğer kısım 1470 devirde 5 dakika santrifüje ederek kullanmışlardır. Santrifüj sonrası üstteki seminal plazma aspire edilmiştir. Araştırmacılar hem santrifüje edilmiş kısmı, hemde kontrol olarak bırakılan kısmı, %4 gliserollü %11 laktoz-%20 yumurta sarısı sulandırıcısı ile sulandırmışlar ve pellet metoduna göre dondurmışlardır. Konsantre edilmemiş pellet'lerden eritme sonrası %44, konsantre edilen pelletlerden ise %46 motilite oranı saptamışlardır.

11 adet Alman Kurt köpeğinden aldıkları 47 ejakulatı %11 laktoz -%20 yumurta sarısı ve %4 gliserol içeren sulandırıcı ile sulandıran Lees ve Castleberry (48), spermaları pellet formda dondurmuş ve donma öncesi ortalama %73.4 olan motilitesi, eritme sonrası ortalama %50.2 olarak tespit etmişlerdir.

14 adet değişik ırk köpekten aldıkları spermaları, iki farklı sulandırıcı ile sulandırarak 0.5 ml'lik payetlerde donduran Yubi ve ark. (91), %8 (v/v) gliserollü Tris ve %4 (v/v) gliserollü yumurta sarısı-laktoz sulandırıcısı kullandıkları çalışmalarında, Tris sulandırıcısı ile motilite ve anormal spermatozoa oranlarını donma öncesi 58.75 ± 13.0 , 24.9 ± 20.9 ve donma sonrası 29.17 ± 17.8 , 39.0 ± 18.4 olarak bulmuşlardır. Laktoz sulandırıcısı için ise motilite ve anormal

spermatozoa oranlarını donma öncesi 57.9 ± 13.6 , 29.75 ± 23.9 ve donma sonrası 24.17 ± 17.0 , 34.41 ± 17.4 olarak saptamışlardır.

%8 (v/v) gliserollü, Tris tamponlu yumurta sarısı sulandırıcısı ile sulandırdıkları spermaları, ml'de 80×10^6 spermatozoa olacak şekilde 0.5 ml'lik payetlerde donduran Morton ve Bruce (54), eritme sonrası ortalama %61.2 motilite bulmuşlardır.

Köpek spermasını değişik oranlarda gliserol (%4, %6, %8) içeren Tris-sitrik asit-fruktoz-yumurta sarısı sulandırıcısı ile 0.5 ml'lik payetlerde donduran Ravaszova ve ark. (69), dondurma işleminin çeşitli aşamalarında, spermatozoa motilitesi ve akrozom bozukluklarını saptamışlardır. %4 ve %6 gliserol içeren Tris sulandırıcılarında ekilibasyon sonrası motilite oranları birbirine yakın değerler içerirken, %8 gliserol içeren örneklerde saptanan motilite değerleri düşük bulunmuştur. Eritme sonrası motilite yüzdesi gözönüne alındığında, %6 gliserollü sulandırıcı optimal gözüksede, %4 gliserolde en az akrozom hasarı saptanmıştır. Araştırmacılar, hem motilite hende akrozom değerlerini incelediklerinde, köpek spermasının dondurulmasında en uygun gliserol yoğunluğunun %4-6 olduğunu bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT:

3.1. Hayvan Materyali:

Çalışmada materyal olarak, özel bir köpek çiftliğinde barındırılan, damızlık, secereli, değişik ırklardan 2 yaşlı (Alman Kurt, Bulldog, Chowchow, Sibirya Husky, New Foundland) 5 adet erkek köpek kullanıldı.

3.2. Spermanın Alınması:

Araştırma süresince her bir köpekten haftada iki kez sperma alındı. Sperma alınmasında parmak manipasyonu tekniğinden yararlanıldı (81, 97, 101). Bu amaçla, erkek köpeğin cinsel olarak uyarılmasında östrusta bulunan bir dişi köpekten faydalanıldı (Resim 1). Sperma almadan önce, sağ el'e steril bir eldiven giyildi ve eldiven üzerine kayganlaştırıcı olarak antibiyotikli bir pomat sürüldü. Erkek köpeğin sol tarafında durularak yavaşça prepusyum üzerinden bulbus glandis'in üzerine masaj yapılarak ereksiyonun oluşması sağlandı (Resim 2). Ereksiyon sonrası hemen prepusyum geriye doğru çekilerek bulbus glandis tamamen ortaya çıkarıldı (Resim 3). Şişmeye başlayan bulbus glandis'in hemen arkasından baş ve işaret parmakları arasında penise ritmik basınçlar uygulandı (Resim 4). Sperma içermeyen birinci fraksiyon alınmayarak, erkek köpekte pelvik itmelerin pik seviyeye ulaşmasını takiben renk değişiminden kolayca ayırt edilebilen spermden zengin ikinci kısım, steril ve ısıtılmış toplama kadehine alındı. Bu aşamada, doğal çiftleşmeye benzer bir ortam sağlamak amacıyla penis kranio-kaudal yönde büküldü (Resim 5). Spermden zengin ikinci fraksiyonun tamamlanması ve artık sperma içermeyen berrak üçüncü fraksiyonun gelmesi sırasında, sperma toplama işlemine son verildi. Kazanılan sperma, laboratuvarında 26°C'daki ben-marey'de saklanarak öncelikle spermatolojik özellikleri incelendi.

3.3. Spermatolojik Özelliklerin İncelenmesi:

3.3.1. Sperma Hacmi: Parmak manipasyonları tekniği ile alınan ejakülatlar dereceli sperma alma kadehinde toplandı ve sperma hacmi "ml" olarak belirlendi.

3.3.2. Spermatozoa Motilitesi: Bir damla sperma, lam üzerinde lamel kapatılarak ısıtma tablalı (38°C) binoküler phase-contrast mikroskopunda 400 büyütmede incelendi. Motilite, ileri yönde hareket eden hücreler dikkate alınarak saptandı (%0-%100).

3.3.3. Spermatozoa Yoğunluğu: Birim hacimdeki spermatozoa sayısı, hemositometrik yöntemle saptandı. Bu amaçla, eritrosit pipetine 0.5 çizgisine kadar spermadan, 101 çizgisine kadar %3'lük NaCl solusyonundan çekildi. Böylece sperma 200 misli sulandırılmış oldu. Thoma lamında sayımı ve hesaplaması yapılan spermanın yoğunluğu, ml'de milyon ($\times 10^6/\text{ml}$) olarak belirlendi.

3.3.4. Ölü-canlı Muayenesi: Spermadaki ölü spermatozoa oranının değerlendirilmesi eosin-nigrosin vital boyama yöntemiyle yapıldı. Lam üzerine bir damla eosin ve iki damla nigrosin konduktan sonra, bir damla sperma eosin boyanın hemen yanına damlatılarak karıştırıldı. Daha sonra bu karışım nigrosin boya ile karıştırılıp sürme froti hazırlanarak havada kurutuldu. Nigrosin fon boyası üzerinde, eosin boyayı alan kırmızı renkteki hücreler ölü, boya almamış renksiz görülen spermatozoalar canlı olarak değerlendirildi. Hazırlanan frotiler binoküler ışık mikroskopunda 600 büyütmede 333 spermatozoa sayılarak değerlendirildi. Canlı spermatozoa oranı aşağıdaki formül esas alınarak saptandı ve % olarak kaydedildi.

$$\text{Canlı spermatozoa oranı (\%)} = (\text{Canlı spermatozoa sayısı} \times 3) / 100$$

Eosin-nigrosin vital boyanın hazırlanması (42):

%5 eosin solusyonunun hazırlanması:

Eosin B 5.0 gr.

Aqua bidest q.s.p. 100 ml.

%10 nigrosin solusyonunun hazırlanması:

Nigrosin 10.0 gr.

Aqua bidest q.s.p. 100 ml.

3.3.5. Morfolojik Muayene: Akrozom ve diğer morfolojik bozuklukların incelenmesinde Hancock'un Formol-Tuz solüsyonu kullanıldı. Tüp içindeki 0.5 ml Hancock solusyonuna 1-2 damla sperma numunesi konularak tespit edildi. Lam üzerine karışımdan bir damla damlatıldı ve üzeri lamel ile kapatılarak phase-contrast mikroskobunda immersiyon objektifinde (1500 büyütme) incelendi. Hazırlanan preparatlarda toplam 100 adet spermatozoa sayıldı ve bunlar arasında anormal formda olanların yüzdeleri alındı.

Hancock'un Formol-Tuz Solusyonunun Hazırlanması (39):

Formalin (%35)		62.5 ml.
NaCl Ana Solusyonu		150.0 ml.
Tampon Ana Solusyonu		150.0 ml.
Distile Su	q.s.p.	500.0 ml.

NaCl Ana Solusyonunun Hazırlanması:

NaCl		9.01 gr.
Distile Su	q.s.p.	500 ml.

Tampon Ana Solusyonunun Hazırlanması:

a)Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O		21.682 gr.
Distile Su	q.s.p.	500 ml.
b)K ₂ HPO ₄		22.254 gr.
Distile Su	q.s.p.	500 ml.

200 ml. (a) ve 80 ml. (b) solusyonu karıştırılarak tampon ana solusyon elde edildi.

Morfoljik muayeneler için aşağıdaki spermatozoa kısımlarına ait bozukluklar esas alındı (42):

- a)Akrozomal bozukluklar (AB)
- b)Başa ait diğer bozukluklar (BB)
- c)Orta kısma ait bozukluklar (OB)
- d)Kuyruğa ait bozukluklar (KB)
- e)Toplam morfolojik bozukluklar (TMB)

3.3.6. Spermanın pH değeri:

Spermanın pH değerini değerlendirmede pH indikatör kağıdı kullanıldı. Spermanın pH'sı renk skalasında verilen değerlere bakılarak ölçüldü.

3.4. Spermanın Sulandırılması ve Dondurulması:

Spermatolojik özellikler incelendikten sonra, sperma iki eşit hacime ayrıldı (split-sample). Herbir hacim, gliserol içermeyen modifiye yağsız sütlü sulandırıcı (A₁) ve Tris sulandırıcısı (B₁) ile oda ısısında (26°C) 1:1 oranında sulandırıldı.

3.4.1. Süt ve Tris sulandırıcılarının Hazırlanması:

Sulandırıcı A₁: Modifiye Sütlü Sulandırıcının Hazırlanması:

D (+) Glucose anhydrous	1 gr.
Peniciline	1000 IU/ml.
Streptomycine	1000 µg/ml.
Yumurta sarısı	10 ml.

Homojenize %0,1 yağlı süt q.s.p. 100 ml.

Sulandırıcı B₁:Tris Solüsyonunun Hazırlanması.

TRİS (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	3.02 gr.
(hydroxymethyl-aminomethane)	
D (-) Fructose (C ₆ H ₂ O ₆)	1.25 gr.
Citric acid	1.78 gr.
Peniciline	1000 IU/ml.
Streptomycine	1000 µg/ml.
Yumurta sarısı	20 ml.
<u>Bidistile su</u>	<u>q.s.p. 100 ml.</u>

Çalışmada modifiye Sütlü sulandırıcının hazırlanmasında özel bir firma tarafından üretilen homojenize edilmiş %0.1 yağlı inek sütü kullanıldı. Sulandırıcılarda kullanılan tavuk yumurtaları günlük olarak temin edildi. Yumurtalar etil alkol ile silindikten sonra kurutuldu. Kabuğu kırıldıktan sonra yumurta akı, steril kurutma kağıdında giderildi ve yumurta sarısı huni şekline getirilmiş kurutma kağıdının içinden dereceli mezüre akıtıldı.

Dereceli cam toplama kadehinde sulandırılmış (sulandırıcı A₁, B₁ ile) sperma, içinde +26°C'da su bulunan kaba aktarıldı ve buzdolabına yerleştirildi. Spermanın ısısı kademeli bir şekilde 2 saat içerisinde +5°C'a soğutuldu. Bu amaçla su kabına küçük buz parçaları atıldı ve buz parçalarının direkt olarak sulandırılmış spermaya değmemesine dikkat edilerek soğutma hızı bir termometre ile kontrol edildi.

3.4.2. %4 ve %7 Gliserollü Sulandırıcıların Hazırlanması:

Sütlü sulandırıcıda (Sulandırıcı A₁) işlem gören sperma 2 saat süre ile +5°C'a soğutuldu. Soğutma işlemi sonucunda sulandırılmış sperma yine iki eşit hacime ayrılarak her bir hacim %4 ve %7 gliserollü sütlü sulandırıcı ile işlem gördü.

Sulandırıcı A₂: %8 gliserollü sütlü sulandırıcının hazırlanması.

Gliserol 8 ml.

Sulandırıcı A₁ 92 ml.

100 ml.

Sulandırıcı A₃: %14 gliserollü sütlü sulandırıcının hazırlanması.

Gliserol 14 ml

Sulandırıcı A₁ 86 ml

100 ml

Sulandırıcı B₂: %8 gliserollü Tris sulandırıcısının hazırlanması.

Gliserol 8 ml.

Sulandırıcı B₁ 92 ml.

100 ml.

Sulandırıcı B₃: %14 gliserollü Tris sulandırıcısının hazırlanması.

Gliserol 14 ml.

Sulandırıcı B₁ 86 ml.

100 ml.

+5°C'da bulunan ve iki eşit hacime ayrılan sütlü ve Trisli sulandırıcı ile işlem görmüş spermalara, sulandırıcı A₂ , A₃ ve B₂ , B₃ ilave edildi (gliserollü sulandırıcılar). Bu amaçla, gliserolsüz sütlü sulandırıcı (A₁ , B₁) ile işlem görmüş spermanın hacimi kadar sulandırıcı A₂ , A₃ ve B₂ , B₃ ilave edildi. Gliserolizasyon işlemi 5'er dakika aralıklarla 10 eşit hacimde gerçekleştirildi. 50 dakikada tamamlanan bu işlemden sonra spermalar +5°C'da 2 saat süre ile ekilibrasyon'a bırakıldı.

Belirtilen işlemler tamamlandıktan sonra finalde:

- a) %4 gliserollü sütlü sulandırıcı ile işlem görmüş sperma,
- b) %7 gliserollü sütlü sulandırıcı ile işlem görmüş sperma,
- c) %4 gliserollü Tris sulandırıcısı ile işlem görmüş sperma,
- d) %7 gliserollü Tris sulandırıcısı ile işlem görmüş sperma,

olmak üzere dört farklı grup oluşturuldu. Bu farklı gliserol oranlarını içeren değişik sulandırıcılarla işlem görmüş, +5°C'daki ekilibrasyon'u tamamlanmış sulandırıcı + sperma numuneleri pellet yöntemine göre donduruldu. Bu amaçla, hazırlanan kuru (CO₂) buz diskine 0.2 ml sulandırılmış sperma damlatılarak 2-3 dakika süre ile (parlaklık kayboluncaya dek) -79 °C'da donduruldu.

Her bir gruptan en az 5 pellet hazırlandı. Etiketlemeden sonra donmuş pelletler sıvı azot konteynerinde bulunan her bir köpek için ayrı numaralanmış kanisterlere aktararak -196°C'da depolandı. Her bir köpek için 4 farklı sulandırıcı grubundan 5'er pellet olmak üzere toplam 20 pellet donduruldu. Çalışma 10 kez tekrarlandı ve sonuçta 5 adet köpeğe ait toplam 1000 pellet dondurulmuş oldu. Pelletler sıvı azot içerisinde -196°C'da en az bir hafta muhafaza edildi.

3.4.3. Pelletlerin Eritilmesi:

+37°C'a ayarlı ben-marey içerisine dizilmiş ependorf tüplerinde bulunan 0.5 ml. eritici solusyonda 30 saniyede bir pellet eritildi. Eritme sonrası spermaya motilite ve morfolojik muayenelerden oluşan testler uygulandı, sonuçta saptanan değerler kaydedildi.

Ayrıca çalışma süresince +26°C'da 1:1 sulandırma sonrası, +5°C'a soğutma sonrası ve ekilibrasyon sonrası sperma'ya motilite ve morfolojik muayenelerden oluşan testler yapıldı.

Eritici Solusyonun Hazırlanması:

Sodyum Clorur (NaCl) 0.9 gr.

Bidistile su q.s.p. 100 ml.

Çalışma süresince taze spermada; motilite, ölü canlı, yoğunluk, anormal spermatozoa oranı, pH değerleri incelendi.

3.5. Sonuçların İstatistiksel Değerlendirilmesi:

Spermatolojik bulguların istatistiksel değerlendirilmesinde, *Duncan Testi* kullanıldı (21, 26).



4. BULGULAR:

4.1. Taze Spermada Saptanan Spermatolojik Özellikler:

Çalışmada kullanılan değişik ırklardan 5 adet köpeğin herbirinden alınan 10'ar ejakulatta saptanan spermatolojik özellikler Tablo 1'de gösterildi. Sibirya kurdu'na ait taze spermada; 1.40 ± 0.39 ml hacim, $\%85.50 \pm 4.97$ motilite, $492.00 \pm 241.74 \times 10^6$ /ml spermatozoa yoğunluğu, $\%83.90 \pm 7.89$ canlı spermatozoa ve 6.60 ± 0.31 pH değeri saptandı. Morfolojik olarak $\%3.60 \pm 2.98$ akrozom (Resim 7, 8, 9, 12, 14), $\%2.90 \pm 2.46$ baş (Resim 10), $\%7.00 \pm 3.65$ orta (Resim 10, 11), $\%4.00 \pm 5.45$ kuyruk (Resim 9, 13) anomalileri olmak üzere toplam $\% 17.50 \pm 9.40$ bozukluk bulundu. Chow chow ırkında; 1.94 ± 0.64 ml hacim, $\%84.50 \pm 4.37$ motilite, $674.30 \pm 295.78 \times 10^6$ /ml spermatozoa yoğunluğu, $\%87.10 \pm 4.35$ canlı spermatozoa ve 6.70 ± 0.34 pH saptandı. Morfolojik olarak $\%2.30 \pm 1.41$ akrozom, $\%2.20 \pm 1.61$ baş, $\%8.90 \pm 4.20$ orta, $\%8.00 \pm 4.80$ kuyruk anomalileri olmak üzere toplam $\% 21.40 \pm 6.02$ bozukluk bulundu. İngiliz Bulldog köpeğine ait taze spermada saptanan spermatolojik özellikler, 1.87 ± 0.67 ml hacim, $\%87.50 \pm 4.85$ motilite, $327.00 \pm 125.61 \times 10^6$ /ml spermatozoa yoğunluğu, $\%91.00 \pm 3.49$ canlı spermatozoa ve 6.65 ± 0.33 pH değeri, $\%2.50 \pm 1.50$ akrozoma, $\%3.70 \pm 1.49$ başa, $\%4.80 \pm 1.75$ orta kısma, $\%5.60 \pm 5.12$ kuyruğa ait olmak üzere toplam $\% 16.60 \pm 6.41$ morfolojik bozukluk bulundu. Alman Kurdu'na ait taze spermada; 1.89 ± 0.80 ml hacim, $\%87.00 \pm 5.37$ motilite, $491.00 \pm 280.90 \times 10^6$ /ml spermatozoa yoğunluğu, $\%89.60 \pm 4.22$ canlı spermatozoa, 6.70 ± 0.34 pH değeri, $\%3.40 \pm 3.20$ akrozoma, $\%3.40 \pm 2.67$ başa, $\%2.20 \pm 1.39$ orta kısma, 4.40 ± 3.23 kuyruğa ait olmak üzere toplam $\% 13.40 \pm 7.21$ morfolojik bozukluk saptandı. Newfoundland ırkı'nda ise; 1.32 ± 0.39 ml hacim, $\%83.00 \pm 4.21$ motilite, $438.00 \pm 183.59 \times 10^6$ /ml spermatozoa yoğunluğu, $\%86.80 \pm 5.07$ canlı spermatozoa ve 6.70 ± 0.25 pH, $\%4.50 \pm 2.71$ akrozoma, $\%8.40 \pm 2.59$ başa, $\%4.30 \pm 3.33$ orta kısma, $\%3.80 \pm 1.47$ kuyruğa ait olmak üzere toplam $\% 21.00 \pm 3.46$ bozukluk saptandı.

4.2. +26°C'da Süt ve Tris Sulandırıcıları ile Sulandırılan Köpek Spermasında Ekilibrasyon Aşamasına Kadar Saptanan Spermatolojik Özellikler:

+26°C'da süt sulandırıcısı ile sulandırma sonrası tüm köpeklerde saptanan ortalama motilite, akrozom, baş, orta, kuyruk ve toplam morfolojik bozukluk oranları sırasıyla, $\%84.00 \pm 5.05$, $\%4.00 \pm 2.25$, $\%5.04 \pm 3.22$, $\%3.06 \pm 3.30$, $\%6.28 \pm 5.59$ ve $\%13.38 \pm 6.65$ olarak saptandı. Aynı değerler, Tris sulandırıcısında sırasıyla; $\%84.30 \pm 5.97$, $\%3.52 \pm 2.40$, $\%3.88 \pm 2.98$, $\%3.98 \pm 3.39$, $\%8.12 \pm 5.22$ ve $\%19.50 \pm 7.90$ olarak saptandı (Tablo2). Belirtilen özellikler +5°C'ye soğutma sonrası sütlü sulandırıcıda sırasıyla ortalama; $\%81.20 \pm 5.20$, $\%3.88 \pm 2.13$, $\%5.00 \pm 3.36$, $\%2.38 \pm 2.25$, $\%11.46 \pm 7.16$ ve $\%22.72 \pm 8.22$ iken, Tris sulandırıcısında; $\%82.20$, $\%4.04 \pm 2.46$, $\%4.16 \pm 3.12$, $\%2.08 \pm 2.01$, $\%14.16 \pm 7.00$ ve $\%24.44 \pm 7.89$ olarak saptandı (Tablo 3).

Finalde %4 ve %7 olmak üzere iki farklı gliserol oranı içeren süt ve Tris sulandırıcılarında gliserolizasyon aşaması sonrası saptanan spermatolojik özellikler Tablo 4'de gösterilmiştir. %4 gliserollü sütlü sulandırıcıda saptanan ortalama motilite, akrozom, baş, orta, kuyruk ve toplam morfolojik bozukluk oranları sırasıyla ortalama, $\%75.50 \pm 6.08$, $\%6.32 \pm 2.98$, 5.62 ± 3.83 , $\%2.02 \pm 2.05$, $\%8.66 \pm 3.86$ ve $\%22.62 \pm 6.60$ olarak saptandı. %7 gliserollü sütlü sulandırıcıda aynı özellikler sırasıyla, $\%59.70 \pm 9.65$, $\%8.08 \pm 3.03$, $\%6.00 \pm 4.72$, $\%2.00 \pm 1.80$, $\%10.00 \pm 4.26$ ve $\%26.08 \pm 7.11$ 'idi. %4 gliserollü Tris sulandırıcısında; $\%79.80 \pm 6.14$, $\%5.94 \pm 3.17$, $\%5.40 \pm 3.96$, $\%1.74 \pm 1.44$, $\%8.74 \pm 3.94$ ve $\%21.82 \pm 7.11$, %7 gliserollü Tris sulandırıcısında ise; $\%72.80 \pm 6.78$, $\%7.98 \pm 3.50$, $\%5.22 \pm 3.70$, $\%2.04 \pm 2.43$, $\%11.08 \pm 5.98$ ve $\%26.32 \pm 7.67$ olarak saptandı.

Ekilibrasyon sonrası için %4 gliserollü sütlü sulandırıcıda saptanan ortalama motilite, akrozom, baş, orta, kuyruk ve toplam morfolojik bozukluklar sırasıyla, $\%71.60 \pm 5.84$, $\%6.88 \pm 2.88$, $\%6.54 \pm 3.85$, $\%2.12 \pm 2.14$, $\%9.10 \pm 4.92$ ve $\%24.64 \pm 7.21$, %7 gliserollü süt sulandırıcısında sırasıyla, $\%53.40 \pm 8.94$, $\%10.28 \pm 3.52$, $\%6.78 \pm 3.18$, $\%1.62 \pm 1.57$, $\%9.10 \pm 4.50$ ve $\%27.78 \pm 6.89$, %4 gliserollü Tris sulandırıcısı için sırasıyla, $\%77.20 \pm 6.07$, $\%6.56 \pm 2.61$,

%6.14±3.62, %2.14±1.82, %8.70±4.94 ve %23.54±6.34 , %7 gliserollü Tris sulandırıcısı için sırasıyla, %70.20±5.79, %10.66±3.23, %6.08±3.39, %1.86±1.88, %9.32±4.36 ve %27.92±7.64 olarak saptandı (Tablo 5).

4.3. %4 ve %7 Gliserol İçeren Süt ve Tris Sulandırıcılarında Eritme Sonrası Saptanan Spermatolojik Özellikler:

Eritme sonrası motilite ve morfolojik muayenelerde saptanan ortalama spermatolojik değerler Tablo 6'da gösterilmiştir. %4 gliserollü süt sulandırıcısında eritme sonrası ortalama motilite, akrozom, baş, orta, kuyruk ve toplam morfolojik bozukluk oranları sırasıyla, %68.36±11.71, %31.36±11.43, %4.40±3.17, %1.34±1.70, %3.42±3.32 ve %40.52±11.51, %7 gliserollü süt sulandırıcısında; %32.38±18.35, %55.36±14.50, %4.38±3.45, %1.59±2.70, %3.20±2.76 ve %64.54±14.63, %4 gliserollü Tris sulandırıcısında; %60.02±13.21, %33.62±12.86, %4.68±3.79, %1.39±1.99, %4.33±3.31 ve %44.03±12.51, %7 gliserollü Tris sulandırıcısında; %30.74±17.06, %55.23±15.51, %4.69±3.54, %1.14±1.67, %3.78±3.03 ve %64.85±14.85 olarak saptandı.

5.TABLolar

Tablo 1.Köpeklerde Taze Spermada Saptanan Spermatozojik Özellikler (n=10)

Köpek İrki	Hacim (ml)	Motilite (%)	Sp. yoğun. (x10 ⁶ /ml)	CanlıSp. (%)	pH	MORFOLOJİK BOZUKLUKLAR				
						Akrozom (%)	Baş (%)	Orta (%)	Kuyruk (%)	Toplam (%)
Sibirya Kurdu	1.40±0.39 ^{ab}	85.50±4.97 ^a	492.00±241.74 ^{ab}	83.90±7.89 ^b	6.60±0.31 ^a	3.60±2.98 ^a	2.90±2.46 ^b	7.00±3.65 ^{ab}	4.00±5.45 ^a	17.50±9.40 ^{bc}
Chowchow	1.94±0.64 ^a	84.50±4.37 ^a	674.30±295.78 ^a	87.10±4.35 ^{ab}	6.70±0.34 ^a	2.30±1.41 ^a	2.20±1.61 ^b	8.90±4.20 ^a	8.00±4.80 ^a	21.40±6.02 ^a
İngiliz Buldog	1.87±0.67 ^{ab}	87.50±4.85 ^a	327.00±125.61 ^b	91.00±3.49 ^a	6.65±0.33 ^a	2.50±1.50 ^a	3.70±1.49 ^b	4.80±1.75 ^{bc}	5.60±5.12 ^a	16.60±6.41 ^{ab}
Alman Kurdu	1.89±0.80 ^{ab}	87.00±5.37 ^a	491.00±280.90 ^{ab}	89.60±4.22 ^a	6.70±0.34 ^a	3.40±3.20 ^a	3.40±2.67 ^b	2.20±1.39 ^c	4.40±3.23 ^a	13.40±7.21 ^b
N.found land	1.32±0.39 ^b	83.00±4.21 ^a	438.00±183.59 ^b	86.80±5.07 ^{ab}	6.70±0.25 ^a	4.50±2.71 ^a	8.40±2.59 ^a	4.30±3.33 ^{bc}	3.80±1.47 ^a	21.00±3.46 ^a
Genel Ort.	1.68±0.64	85.50±4.87	484.46±251.35	87.68±5.60	6.67±0.31	3.26±2.51	4.12±3.08	5.44±3.75	5.16±4.40	17.98±7.16

^{a,b,c} dikey kolonlarda farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir (p<0.05).

Tablo 2.+26°C'da 2 farklı sulandırıcı ile sulandırılan spermadaki spermatolojik özellikler (n=50).

Sulandırıcı	Motilite (%)	Morfolojik Bozukluklar (%)				
		Akrozom	Baş	Orta	Kuyruk	Toplam
Süt Sulandırıcısı	84.00±5.05 ^a	4.00±2.25 ^a	5.04±3.22 ^a	3.06±3.30 ^a	6.28±5.59 ^a	13.38±6.65 ^a
Tris Sulandırıcısı	84.30±5.97 ^a	3.52±2.40 ^a	3.88±2.98 ^a	3.98±3.39 ^a	8.12±5.22 ^a	19.50±7.90 ^a

^{a,b} dikey kolanlarda farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir (p<0.05).

Tablo 3.+5°C'da 2 farklı sulandırıcı ile sulandırılan spermadaki spermatolojik özellikler (n=50).

Sulandırıcı	Motilite (%)	Morfolojik Bozukluklar (%)				
		Akrozom	Baş	Orta	Kuyruk	Toplam
Süt sulandırıcısı	81.20±5.20 ^a	3.88±2.13 ^a	5.00±3.36 ^a	2.38±2.25 ^a	11.46±7.16 ^a	22.72±8.22 ^a
Tris sulandırıcısı	82.20±6.15 ^a	4.04±2.46 ^a	4.16±3.12 ^a	2.08±2.01 ^a	14.16±7.00 ^a	24.44±7.89 ^a

^{a,b} dikey kolanlarda farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir (p<0.05).

Tablo 4. Köpekler arasında 4 farklı sulandırıcıda gliserolizasyon sonrası saptanan spermatolojik özellikler (n=50).

Sulandırıcı	Motilite (%)	Morfolojik Bozukluklar (%)				
		Akrozom	Baş	Orta	Kuyruk	Toplam
%4gliserol. Süt sul.	75.50±6.08 ^b	6.32±2.98 ^b	5.62±3.83 ^a	2.02±2.05 ^a	8.66±3.86 ^b	22.62±6.60 ^b
%7gliserol. Süt sul.	59.70±9.65 ^c	8.08±3.03 ^a	6.00±4.72 ^a	2.00±1.80 ^a	10.00±4.26 ^{ab}	26.08±7.11 ^a
%4gliserol. Tris sul.	79.80±6.14 ^a	5.94±3.17 ^b	5.40±3.96 ^a	1.74±1.44 ^a	8.74±3.94 ^b	21.82±7.11 ^b
%7glisrol. Tris sul.	72.80±6.78 ^b	7.98±3.50 ^a	5.22±3.70 ^a	2.04±2.43 ^a	11.08±5.98 ^a	26.32±7.67 ^a

^{a,b} dikey kolanlarda farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir (p<0.05).

Tablo 5. 4 farklı sulandırıcıda ekilibrasyon sonrası saptanan spermatolojik özellikler (n=50).

Sulandırıcı	Motilite (%)	Morfolojik Bozukluklar (%)				
		Akrozom	Baş	Orta	Kuyruk	Toplam
%4gliserol. Süt. sul.	71.60±5.84 ^b	6.88±2.88 ^b	6.54±3.85 ^a	2.12±2.14 ^a	9.10±4.92 ^a	24.64±7.21 ^b
%7gliserol. Süt. sul.	53.40±8.94 ^c	10.28±3.52 ^a	6.78±3.18 ^a	1.62±1.57 ^a	9.10±4.50 ^a	27.78±6.89 ^a
%4gliserol. Tris sul.	77.20±6.07 ^a	6.56±2.61 ^b	6.14±3.62 ^a	2.14±1.82 ^a	8.70±4.94 ^a	23.54±6.34 ^b
%7gliserol. Tris sul.	70.20±5.79 ^b	10.66±3.23 ^a	6.08±3.39 ^a	1.86±1.88 ^a	9.32±4.36 ^a	27.92±7.64 ^a

^{a,b,c} dikey kolanlarda farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir (p<0.05).

Tablo 6. 5 köpekte farklı sperma sulandırıcılarında eritme sonrası saptanan spermatolojik özellikler (n=250).

Sulandırıcı	Motilite (%)	Morfolojik Bozukluklar (%)				
		Akrozom	Baş	Orta	Kuyruk	Toplam
%4gliserollü Süt. sul.	68.36±11.71 ^a	31.36±11.43 ^b	4.40±3.17 ^a	1.34±1.70 ^{ab}	3.42±3.32 ^b	40.52±11.51 ^c
%7gliserollü Süt. sul.	32.38±18.35 ^c	55.36±14.50 ^a	4.38±3.45 ^a	1.59±2.70 ^a	3.20±2.76 ^b	64.54±14.63 ^a
%4gliserollü Tris sul.	60.02±13.21 ^b	33.62±12.86 ^b	4.68±3.79 ^a	1.39±1.99 ^{ab}	4.33±3.31 ^a	44.03±12.51 ^b
%7gliserollü Tris sul.	30.74±17.06 ^c	55.23±15.51 ^a	4.69±3.54 ^a	1.14±1.67 ^b	3.78±3.03 ^{ab}	64.85±14.85 ^a

^{a,b,c} dikey kolanlarda farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir (p<0.05).

6. TARTIŞMA VE SONUÇ:

Çalışmada 5 farklı köpek ırkından alınan taze spermada; en düşük ve en yüksek spermatolojik özellikler olarak, 1.32 ± 0.39 - 1.94 ± 0.64 ml hacim, $\%83.00 \pm 4.21$ - $\%87.50 \pm 4.85$ motilite, $327.00 \pm 125.61 \times 10^6 / \text{ml}$ - $674.30 \pm 295.78 \times 10^6 / \text{ml}$ spermatozoa yoğunluğu, $\%83.90 \pm 7.89$ - $\%91.00 \pm 3.49$ canlı spermatozoa oranı, 6.60 ± 0.31 - 6.70 ± 0.34 pH ve $\%2.30 \pm 1.41$ - $\%4.50 \pm 2.71$ akrozom'a, $\%2.20 \pm 1.61$ - $\%8.40 \pm 2.59$ baş'a, $\%2.20 \pm 1.39$ - $\%8.90 \pm 4.20$ orta kısım'a, $\%3.80 \pm 1.47$ - $\%8.00 \pm 4.80$ kuyruğa ait olmak üzere $\%13.40 \pm 7.21$ - $\%21.40 \pm 6.02$ toplam morfolojik bozukluk elde edilmiştir. Değişik ırklardan oluşan erkek köpeklerin bireysel spermatolojik özellikleri arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıklar saptanmıştır ($p < 0.05$) (Tablo 1). Erkek köpeklerde saptanan spermatolojik özellikler, ırk, çevre ve uygulanan sperma alma tekniğine bağlı olarak oldukça değişkenlik göstermektedir (40, 70, 88). 5 köpeğin genel ortalama spermatolojik özellikleri ise, 1.68 ± 0.64 ml hacim, $\%85.50 \pm 4.87$ motilite, $484.46 \pm 251.35 \times 10^6 / \text{ml}$ spermatozoa yoğunluğu, $\%87.68 \pm 5.60$ canlı spermatozoa oranı, 6.67 ± 0.31 pH ve $\%3.26 \pm 2.51$ akrozom'a, $\%4.12 \pm 3.08$ baş'a, $\%5.44 \pm 3.75$ orta kısım'a, $\%5.16 \pm 4.40$ kuyruğa ait olmak üzere toplam $\%17.98 \pm 7.16$ morfolojik bozukluk olarak bulunmuştur. Çalışmada taze spermada saptanan bu spermatolojik değerlerin genel olarak, birçok araştırmacının elde ettiği spermatolojik özelliklere benzer ve donma çalışmalarında kullanılabilir olduğu söylenebilir (19, 44, 45, 46, 93).

Erkek köpeklerden alınan spermalar süt ve Tris sulandırıcısı ile 26°C 'de sulandırılmış ve 5 köpeğe ait 50 örnek ortalamasını içeren değerler Tablo 2'de gösterilmiştir. Motilite ve morfolojik bozukluklar her iki sulandırıcıda da istatistiksel açıdan benzer bulunmuştur. 5°C 'ye soğutulan sulandırılmış spermalarda yine belirtilen spermatolojik özellikler sulandırıcılara göre değişmemiştir (Tablo 3). Elde edilen değerler, her iki sulandırıcının da, gerek 26°C 'de ve gerekse 5°C 'de depolamada, köpek sperma sulandırıcısı olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Çoğu araştırmacıda, süt ve Tris

sulandırıcılarının oda ısısında veya 5°C'de depolamada başarıyla kullanılabileceğini bildirmiş ve çalışmada saptadığımız bulgulara benzer değerler saptamıştır (8, 13, 14, 16, 38, 50).

5°C'de gliserolizasyon sonrası en yüksek motilite 79.80 ± 6.14 ile %4 gliserollü Tris sulandırıcısında saptanırken, en düşük değerler 59.70 ± 9.65 ile %7 gliserollü sütlü sulandırıcıda saptanmıştır ($p < 0.05$). %4 gliserollü sütlü sulandırıcıda 75.50 ± 6.08 , %7 gliserollü Tris sulandırıcısında ise 72.80 ± 6.78 motilite saptanmış ve aralarındaki fark önemsiz bulunmuştur. 5°C'e soğutma sonrası motilite bulguları genel olarak değerlendirildiğinde, Tris'li sulandırıcıların sütlü sulandırıcılara göre spermatozoa canlılığını daha iyi koruduğu görülmektedir (Tablo 4). Ekilibrasyon sonrasında da yine benzer sonuçlar alınmış ve Tris'li sulandırıcılar sütlü sulandırıcılara göre daha yüksek motilite oranları vermiştir. Her iki sulandırıcıda da %4 gliserol oranı optimal bulunmasına rağmen %4 Tris'li sulandırıcılar spermatozoa canlılığını korumada daha iyi sonuçlar vermiştir.

Baş'a, orta kısma ve genel olarak kuyruğa ait morfolojik bozukluklar 5°C'ye soğutma ve gliserolizasyon sonrası sulandırıcılara ve gliserol oranlarına göre farklılıklar göstermiştir ($p < 0.05$). %7 gliserol oranı her iki sulandırıcıda da, akrozomal bozukluklar ve toplam morfolojik bozuklukları önemli oranda arttırmıştır. Aynı gliserol oranları dikkate alındığında akrozomal ve toplam morfolojik bozukluklar her iki sulandırıcıda da benzer bulunmuştur. Yüksek gliserol oranlarının spermatozoa motilitesi ve morfolojisine zarar verdiği, Tris'li sulandırıcıların sütlü sulandırıcılara göre spermatozoa motilitesini korumada daha etkili olduğu saptanmıştır. Çoğu araştırmacının elde ettiği bulgular çalışmamızı destekler niteliktedir ve 5°C'de depolamada süt ile Tris sulandırıcıları için optimal gliserol oranlarının %4 olduğunu bildirilmişlerdir (48, 54, 69, 91).

250 örnek ortalamasında eritme sonrası en yüksek motilite 68.36 ± 11.71 motilite ile %4 gliserollü sütlü sulandırıcılarda saptanmıştır ($p < 0.05$). En düşük sonuçlar ise 30.74 ± 17.06 ile %7 gliserollü Tris

sulandırıcısında ve 32.38 ± 18.35 ile %7 gliserollü sütlü sulandırıcıda elde edilmiştir. Her iki sulandırıcıda da %7 gliserollü sulandırıcılarda saptanan düşük motilite bulguları beklenen bir sonuç olarak karşımıza çıkmıştır. Ancak, donma öncesi en yüksek motilitenin %4 gliserollü Tris sulandırıcısında saptamamıza rağmen, eritme sonrasında bu sulandırıcıda 60.02 ± 13.21 motilite bulunması ve bu değerin %4 gliserollü sütlü sulandırıcıda saptanan motilite değerinden önemli oranda düşük olması şaşırtıcıdır. Köpek spermasının dondurulmasında sütlü sulandırıcıların kullanılmasına ilişkin detaylı bilgiler edinilmemesine karşın, boğa ve koç gibi diğer türlerde sütlü sulandırıcıların başarı ile kullanıldığı, eritme ve donma işlemlerinde spermatozoa canlılığını ve morfolojisini korumada başarılı olduğu ve inek sütünün mükemmel bir sperma sulandırıcısı olduğu çoğu araştırmacının ortak görüşüdür (1, 4, 30, 33, 34, 42, 64). Pellet yöntemine göre köpek spermasını dondurmada %4 gliserollü sütlü sulandırıcıların oldukça başarılı olduğu, Tris'li sulandırıcılara göre özellikle donma ve eritme işlemlerinde üstün olduğu saptanmıştır. Bunun nedeni, sütteki süt proteinleri, kazein gibi albumin ve globulinler ile kalsiyum iyonları gibi kryoprotektif ajanlar ve ayrıca süt ile yumurta sarısının sinerjik etkisine bağlanabilir (1, 4, 30).

Süt ve Tris sulandırıcılarında, akrozomal bozukluklar %4 gliserol ilavelerinde %7 gliserol oranlarına göre önemli derecede düşük bulunmuştur ($p < 0.05$). %4 gliserollü süt ve Tris sulandırıcılarında saptanan akrozomal bozukluklar benzerdir. Ancak, en düşük toplam morfolojik bozukluklar 40.52 ± 11.51 ile %4 gliserollü sütlü sulandırıcılarda saptanmıştır. Donma ve eritme işlemleri esnasında soğuk şoklarına karşı, %4 gliserollü sütlü sulandırıcıların köpek spermatozoa canlılığı ve morfolojik bütünlüğünü korumada daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Bununla beraber Tris'li sulandırıcılar için optimal gliserol oranının %4 olduğu ve bu sulandırıcının da köpek spermasının dondurulmasında kullanılabilir özellikte olduğu söylenebilir. Her iki sulandırıcıda da %7 gliserol oranı gerek spermatozoa canlılığına ve gerekse morfolojik bütünlüğe zarar vermiştir.

Köpek spermasının dondurulmasında yaygın olarak kullanılan Tris'li sulandırıcılara ilave edilen gliserol oranları araştırmacılara göre farklılıklar göstermektedir. Badinand ve ark. (9), %3.2 gliserollü Tris sitrik asit-fruktoz sulandırıcısı ile spermayı dondurmuşlar ve eritme sonrası %50 motilite bulmuşlardır. Thomas ve ark. (85) Tris-sitrat sulandırıcısına final yoğunluğu %4 olan gliserol eklemişler ve eritme sonrası ortalama %35 motilite elde etmişlerdir. Olar ve ark.(63), Tris sulandırıcısında %4 (v/v) gliserol oranını optimal bulduklarını ve ortalama %41 motilite saptadıklarını bildirmişlerdir. Ravaszova ve ark. (69), %4 (v/v) gliserollü Tris-sitrik asit-fruktoz sulandırıcısında 0.5 ml'lik payetlerde dondurduğu spermalarda, eritme sonrası ortalama %60 motilite ve %65 normal akrozom oranı saptamışlardır. Thomas ve ark. (84), %6 gliserollü Tris-fruktoz-sitrik asit sulandırıcısında, 0.5 ml'lik payetlerde eritme sonrası %55 motilite bulmuşlardır. Kabasakal (46), Tris-sitrik asit-fruktoz sulandırıcısına %6 gliserol (v/v) eklemiş ve 0.25 ml'lik payetlerde dondurmuş ve eritme sonrası Tris sulandırıcısında %55 motilite ve %35 anormal spermatozoa oranı saptamıştır. Battista ve ark. (10), %6.4 (v/v) gliserollü Tris-sitrik asit-fruktoz sulandırıcısı ile 0.5 ml'lik payetlerde dondurduğu spermalardan, eritme sonrası ortalama %60 motilite elde etmiştir. Görüldüğü üzere, eritme sonrası %4 gliserollü Tris sulandırıcısında elde ettiğimiz motilite değerlerinin oldukça başarılı olduğu görülmektedir. Keza, araştırmada edilen sonuçların, bazı araştırmacıların eritme sonrası saptadıkları motilite ve morfolojik bozuklukları ile karşılaştırıldıklarında, üstün olduğu söylenebilir (9, 63, 85).

Pek çok araştırmacı, payet yöntemine göre dondurdukları spermalarda, Tris sulandırıcılarında yüksek gliserol oranlarını önermişlerdir. Bunlardan benzer şekilde %8 (v/v) gliserollü Tris-sitrik asit-fruktoz sulandırıcısında 0.5 ml'lik payetlerde dondurdukları spermalardan, Theret ve ark. (83) eritme sonrası ortalama %60-80, Andersen (6) %50-70, Wilson (87) %60-70, Yubi ve ark. (91) %30 motilite ve % 40 anormal spermatozoa oranı, Morton ve ark. (54) %61 motilite oranları elde etmişlerdir.

Bunlara karşın, Yurdaydın ve Kotzab (93), %8.8 gliserollü (v/v) Tris-sitrat-glukoz sulandırıcısında 0.25 ml'lik payetlerde dondurduğu spermalarda

eritme sonrası ortalama %46 motilite ve %27 anormal spermatozoa oranı saptarlarken, Gill ve ark. (35), %8.8 (v/v) gliserol içeren Tris-sitrik asit-fruktoz sulandırıcısında 0.5 ml'lik payetlerde dondurdukları spermalarda, eritme sonrası %40-50 motilite belirlemişlerdir.

Bu çalışmalarda sonuçlar dikkatle incelendiğinde eritme sonrası motilite oranlarının %30 ila %80 arasında, morfolojik bozuklukların ise %27-50 arasında değiştiği görülmektedir. Sunulan çalışmada, %7 gliserollü Tris'li sulandırıcılarda saptanan eritme sonrası motilite bulguları yukarıdaki araştırmacıların bulduğu sonuçlar ile benzerlik gösterirken, saptanan morfolojik bozuklukların diğer bazı araştırmacıların bildirdiği değerlerden daha yüksek olduğu söylenebilir (35, 46, 83, 93). Aradaki farklılıklar, büyük ölçüde sperma dondurma tekniğine bağlanabilir. Keza, Tris'li sulandırıcıların pellet yöntemine göre dondurulmasında %4 gliserol oranı da başarıyla kullanılmıştır. Thomas ve ark. (85), %4 gliserollü (v/v) Tris sulandırıcısında payet ile pellet yöntemini karşılaştırmışlar, bu gliserol oranında pellet yönteminin üstün olduğunu ve motilite oranını önemli oranlarda yüksek bulduklarını bildirmişlerdir.

Sonuç olarak; 1) Köpek spermasının pellet yöntemine göre dondurulmasında süt'lü sulandırıcıların başarı ile kullanılabileceği, 2) Donma ve eritme işlemlerinde süt'lü sulandırıcılarda %4 gliserol oranının optimal olduğu, 3) Süt'lü ve Tris'li sulandırıcılarda pellet yöntemine göre dondurmada %7 gliserol oranının spermatozoa motilitesi ve morfolojisine önemli oranda zarar verdiği, 4) %4 gliserollü Tris sulandırıcısının da pellet yöntemine göre dondurmada kullanılabileceği, 5) +5°C'de ekilibrasyonda, %4 gliserollü Tris sulandırıcısının süt'lü sulandırıcılara göre daha üstün bulunmasına rağmen, donma ve eritme işlemlerinde spermatozoa canlılığı ve morfolojisini süt'lü sulandırıcı kadar koruyamadığı elde edilen sonuçlardan anlaşılmaktadır, 6) Ayrıca, köpek spermasının dondurulmasında süt'lü sulandırıcı kullanılmasına ilişkin çalışmaların sınırlı sayıda olduğu dikkate alınmalı ve araştırmalara fertilité sonuçlarını da içerecek çalışmalarla devam edilmelidir.

7. RESİMLER



Resim 1. Dişi köpek varlığında, erkek köpekte libidonun uyarılması.



Resim 2. Prepusyum üzerinden, bulbus glandis'e masaj uygulanarak ereksiyon'un sağlanması.



Resim 3. Glans penis'in prepusyumdan dışarıya çıkartılması ve bulbus glandis'in, baş ve işaret parmakları aracılığı ile tespit edilmesi.



Resim 4. Birinci fraksiyon'un pelvik itme hareketleri ile birlikte dışarıya akıtılması.



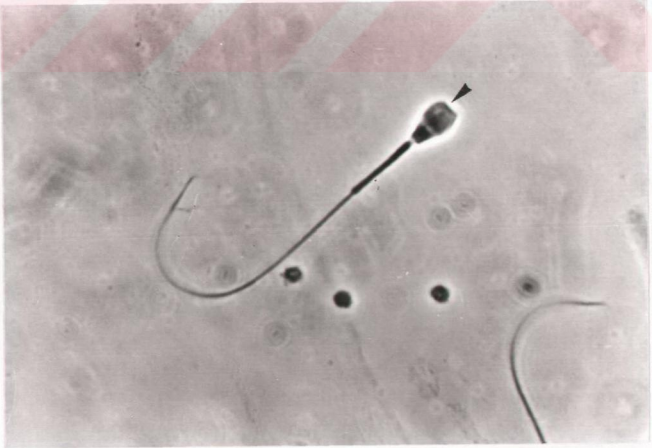
Resim 5. Pelvik itme hareketlerinin tamamlanmasını takiben, penis'in arka bacakların arasından geriye doğru bükülmesi ve spermatozoon'lardan zengin ikinci fraksiyon'un toplanması.



Resim 6. Normal bir köpek spermatozoon'nunun phase-contrast mikroskopta görünümü (x1000 büyütme).



Resim 7. Akrozom'u çözülmüş bir spermatozoon (x1000 büyütme).



Resim 8. Akrozom'u deforme bir spermatozoon (x1000 büyütme).



Resim 9. Eritme sonrası phase-contrast mikroskopta gözlemlenen diğer morfolojik bozukluklar (x1000 büyütme).

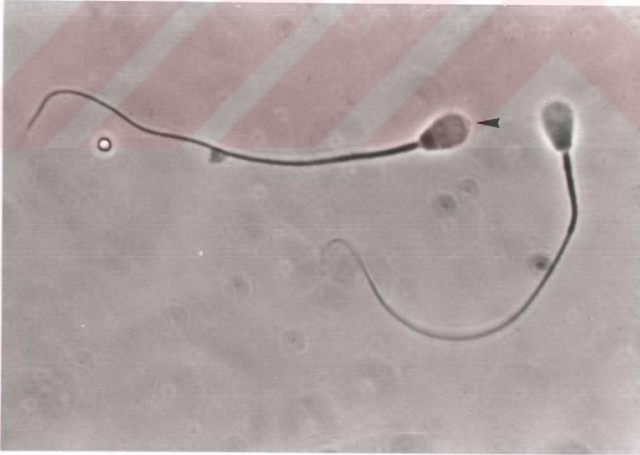
- a) Akrozomda meydana gelen defektler.
- b) Kuyruk kısmının birbiri üzerine dolanması.



Resim 10. Anormal baş (a), orta kısmın baş'tan ayrılması (b) ve distal protoplazmik damlacıklı (c) bir spermatozoon (x1000 büyütme).



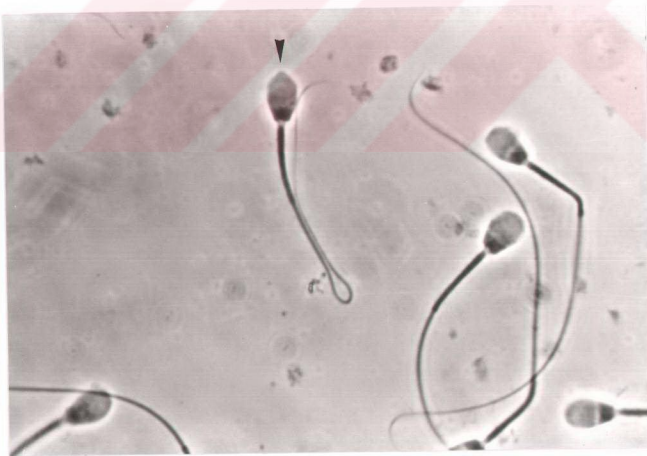
Resim 11. Orta kısmı çift olan bir spermatozoon (x 1000 büyütme).



Resim 12. Çözülmekte olan bir akrozom (x 1000 büyütme).



Resim 13. Değişik kuyruk bozuklukları (x 1000 büyütme).



Resim 14. Kısmen akrozom'u dışarı çıkmış bir spermatozoon (x1000 büyütme).

8. KAYNAK LİSTESİ:

1. Ak, K. (1990): Süt tozu ile hazırlanan sulandırıcılar ile dondurulan boğa spermasının ülkemizde kullanılabilirliği üzerinde araştırmalar. İstanbul Üniv. Sağlık Bil. Enst. (Doktora Tezi), İstanbul.
2. Allen, W.E. (1992): Fertility and Obstetrics in the Dog, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
3. Althouse, G.C., Ko, J.C.H., Hopkins, S.M., Evans, L.E. (1991): Effect of latex and vinyl examination gloves on canine spermatozoal motility. J. of Am. Vet. Med. Assoc., 199, (2), 227-229.
4. Amann, R.P., Almquist, J.O. (1957): Freezing of bovine semen. II. Effect of milk solids level, glycerol level, and fructose on freezability of bull spermatozoa in reconstituted and fresh skim milk diluents. J. Dairy Sci. 40 (12): 1542-1549.
5. Amann, R.P. (1986): Reproductive physiology and endocrinology of the dog. İn: Current Therapy in Theriogenology. Ed: D.A. Morrow, 532-538, W.B. Saunders Company, Philadelphia.
6. Andersen, K. (1975): Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. Zuchthyg, 10:1-4.
7. Andersen, K. (1976): Artificial uterine insemination in dogs. VIIIth. Int. Congr. on Anim. Reprod. and Artif. Insem. July 12-16, Volume 4, pp 960-963, Cracow.
8. Arthur, H.G., Noakes, D.E., Pearson, H. (1989): Artificial insemination of dogs. İn: Veterinary Reproduction and Obstetrics, Ed: Bailliere Tindall, Sixth edition, 579-580, W.B. Saunders, London.
9. Badinand, F., Fontbonne, A., Maurel, M.C., Siliart, B. (1992): Determination of the period of fertilization in bitches using hormonal assays and A.I. with frozen semen. XIIIth. Int. Congr. on Anim. Reprod., August 23rd-27th, Vol.4, 1755-1757, The Hague,

10. Battista, M., Parks, J., Concannon, P. (1988): Canine sperm post-thaw survival following freezing in straws or pellets using PIPES, lactose, TRIS or TEST extenders. XIth. Int. Congr. on Anim. Reprod. and Artif. Insem., University College Dublin, June:26-30, Vol.3, pp. 229-230, Ireland.
11. Belluzi, S., Zambelli, D., Mari, G. (1991): About the freezing dog semen. Atti Della Societa Italiana Delle Scienze Veterinarie, Volume XLV, pp 477-481, Altavilla Milicia.
12. Belluzi, S., Zambelli, D. (1992): Morphological evaluation of the acrosomal and nucleus in canine spermatozoa which underwent to many different methods of freezing. Atti Della Societa Italiana Delle Scienze Veterinarie, Volume, XLVI, 289-292, Venezia-S. Giuliano.
13. Bouchard, G.F., Morris, J.K., Sikes, J.D., Youngquist, R.S. (1990): Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. Theriogenology. 34, (1), 147-157.
14. Brown, R.M. (1992): An update of artificial insemination with fresh, chilled, and frozen semen. Prob. in Vet. Med. 4, (3), 445-452.
15. Buckrell, B. (1986): The use of frozen semen from dogs in Canada. Can. Vet. J., 27, (4), 161-163.
16. Büyükçoban, M. (1996): Kurt ve Kangal ırkı köpeklerin taze ve sulandırılmış spermalarının spermatolojik özellikleri ve viabilitesi üzerinde araştırmalar. Uludağ Üniv. Sağlık Bil. Enst. (Doktora Tezi), Bursa.
17. Christiansen, IbJ. (1984): Reproduction in the Dog and Cat. Bailliere Tindall, London.
18. Concannon, P.W. (1991): Reproduction in the dog and cat. In: Reproduction in domestic Animals, Ed: Perry T. Cupps, 554-550, California,
19. Dubiel, A. (1976): Evaluation of semen properties in dogs with reference to fertility. VIIIth. Int. Congr. on Anim. Reprod. and Artif. Insem., pp. 1253, Cracow.
20. Duncan, D.B. (1995): Multiple range, multiple F tests. Biometrics, 11: 1-42.

- 21.England, G.C.W., Allen, W.E. (1989): Seminal characteristics and fertility in dogs. *Vet. Rec.*, 125 (1), 399, (Abstr).
- 22.England, G.C.W., Allen, W.E. (1990): An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculate. *Res. in Vet. Sci.*, 49, (1), 66-70.
- 23.England, G.C.W. (1991): Relationship between ultrasonographic appearance, testicular size, spermatozoal output and testicular lesions in the dog. *J. of Small Anim. Prac.*, 32, (6), 306-311.
- 24.England, G.C.W., Allen, W.E. (1992): Factors affecting the viability of canine spermatozoa. 1. Potential influences during processing for artificial insemination. *Theriogenology*, 37, (2), 363-371.
- 25.England, G.C.W., Allen, W.E. (1992): Factors affecting the viability of canine spermatozoa. 2. Effects of seminal plazma and blood. *Theriogenology*, 37, (2), 373-381.
- 26.Evrin, M., Güneş, H. (1994): Biyometri Ders Notları, İ.Ü.Vet. Fak. Yayını, No:41.
- 27.Farstad, W. (1984): Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen. *J. of Small Anim. Prac.*, 25:561-565.
- 28.Feldman, E.C., Nelson, R.W. (1987): *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- 29.Ferguson, J.M., Renton, J.P., Farstad, W., Douglas, T.A. (1989): Insemination of Beagle bitches with frozen semen. *J. of Reprod. and Fertil. (Suppl)* . 39: 293-298.
- 30.Fiser, P.S., Fairfull, R.W. (1986): Combined effects of glycerol concentration cooling velocity and osmolality of skim milk diluents on cryopreservation of ram spermatozoa. *Theriogenology*, 25 (3), 473-484.
- 31.Foote, R.H. (1964): The influence of frequency of semen collection, fractionation of ejaculate, and dilution rate on the survival of dog sperm. *Cornell Vet.* 54:89-97.

- 32.Foote, R.H., Leonard, E.P. (1964): The influence of pH, osmotic pressure, glycine, and glycerol on the survival of dog sperm in buffered - yolk extenders. *Cornell Vet.* 54:78-88,
- 33.Foote, R.H., Arriola, J. (1987): Motility and fertility of bull sperm frozen-thawed differently in egg yolk and milk extenders containing detergent. *J. Dairy Sci.* 70 (12): 2642-2647, (Abst).
- 34.Garcia, M.A., Graham, E.F. (1987): Effects of Low-Molecular-Weight-Fractions (LMWF) from milk, egg yolk, and seminal plazma on freezability of bovine spermatozoa. *Cryobiology*, 24, 429-436.
- 35.Gill, H.P., Kaufman, C.F., Foote, R.H., Kirk, R.W. (1970): Artificial insemination of Beagle bitches with freshly collected, liquid-stored, and frozen-stored semen. *Am. J. of Vet. Res.* 31, (10), 1807-1813.
- 36.Gökçen, H., Soyulu, M.K., Tümen, H. (1991): Erkek köpeklerin kimi spermatolojik özellikleri üzerinde araştırmalar. *U.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 10, (1,2,3), 67-73.
- 37.Günzel, A.R. (1986): Zur Spermagewinnung, -beurteilung und -konservierung sowie Samenübertragung beim Hund. *Tierärztl. Prax.*, 14:275-282.
- 38.Günzel, A.R. Ekrod, B. (1991): Einflüsse von Prostatasekret und Verdünner auf die Spermienmotilität und ATP-Konzentration sowie die Aktivität der sauren und alkalischen Phosphatase von Beagle-Samen. *Reprod. Dom. Anim.*, 26: 31-41.
- 39.Hancock, J.L. (1957): The morphology of boar spermatozoa. *J. Of the Royal Micros. Socie.* 76(3), 84-97.
- 40.Harrop, A.E. (1962): Artificial insemination in the dog. In: *The Semen of Animals and Artificial İnsemination*. Ed: J.P. Maule, 304-315, Commonwealth Agricultural Bureaux, England.
- 41.Hopkins, S.M., Evans, L.E. (1989): Artificial insemination. In: *Veterinary Endocrinology and Reproduction*, Ed: L.E. McDonald, 373, Lea and Febiger, Philadelphia.

42. İleri, İ.K., Ak, K., Pabuçcuoğlu, S., Usta, S. (1996): Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Ders Notları, İ.Ü. Vet.Fak. Yayını, No: 59.
43. Ivanova, M.G., Nikolov, I.I., Dacheva, D.P., Ivanov, I.H., Ivanova, N.B. (1992): Testing of different media for cryopreservation of dog semen. XIIth. Int. Congr. on Anim. Reprod., August 23rd-27th, Vol. 4, pp 1776-1778, The Hague,
44. Johnston, S.D. (1991): Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. Vet. Clin. of N. Am.: Small Anim. Prac., 21, (3), 545-551.
45. Johnstone, I. (1985): Breeding difficulties with stud dog. Australian Vet. J. 62, (2), 65.
46. Kabasakal, G. (1995): Değişik sulandırıcılar ile dondurulan köpek spermalarından elde edilen dölverimi üzerinde çalışmalar. Ankara Üniv. Sağlık Bil.Enst. (Doktora Tezi), Ankara.
47. Kosiniak, K., Bittmar, A., Sallwerk, K. (1992): Relationship between biochemical components of dog seminal plasma and semen freezability. XIIth. Int. Congr. on Anim. Reprod., August 23rd-27th, Vol.4, pp 1791-1792, The Hague,
48. Lees, G.K. Castleberry, M.W. (1977): The use of frozen semen for artificial insemination of German Shepherd dogs. J. of Anim. Hospit. Assoc. 13:382-385.
49. Linde-Forsberg, C., Forsberg, M. (1989): Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. J. of Reprod. and Fertil., (Suppl). 39: 299-310.
50. Linde-Forsberg, C. (1991): Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. Vet. Clinics of N. Am.: Small Anim. Prac., 21, (3), 467-485.
51. Linde-Forsberg, C. (1994): Artificial insemination in the dog. W.S.A.V.A. XIXth. World Congress, pp 606-611, Durban.

52. Meyers-Wallen, V.N. (1991): Clinical approach to infertile male dogs with sperm in the ejaculate. *Vet. Clinics of N. Am.: Small Anim. Pract.*, 21, (3), 609-633.
53. Mickelsen, W.D., Memon, M.A., Anderson, P.B., Freeman, D.A. (1993): The relationship of semen quality to pregnancy rate and litter size following artificial insemination in the bitch. *Theriogenology*, 39, (2), 553-560.
54. Morton, D.B., Bruce, S.G. (1989): Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to use of frozen semen in dogs. *J. of Reprod. and fertil. (Suppl)*. 39:311-316.
55. Nelson, R.W., Couto, C.G. (1992): Disorders of male fertility. In: *Essentials of Small Animal Internal Medicine*. Ed: R.W. Reinhardt, 684-698, Mosby - Year Book, St. Louis.
56. Nett, T.M., Patricia, N.S. (1983): Reproductive physiology of dog and cats. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Ed: Stephen J. Ettinger, 1698-1700, W.B. Saunders Company, Philadelphia.
57. Nöthling, J.O. (1994): Success with intravaginal insemination of frozen-thawed canine semen. *W.S.A.V.A. XIXth. World Congress*, 612-614, Durban.
58. Oettle, E.E. (1982): Preliminary report: A pregnancy from frozen centrifuged dog semen. *J. of the South African Vet. Assoc.*, 53, (4), 269-270.
59. Olar, T.T. (1985): Cryopreservation of dog spermatozoa. *Diss. Abst. Int., B-Sci. and Engin.*, 45, (9), 2831.
60. Olar, T.T. (1985): Using frozen canine semen: a guide for practitioners. *Vet. Med.* 80:22-30.
61. Oettle, E.E. (1986): Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 12:145-150.
62. Oettle, E.E., Soley, J.T. (1988): Sperm abnormalities in the dog: A light and electron microscopic study. *Vet. Med. Rev.* 59, 28-70.

- 63.Olar, T.T., Bowen, R.A., Pickett, B.W. (1989): Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on posthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology*, 31, (2), 451-461.
- 64.Öztürkler, Y. (1996): Koç spermasının yoğun gliserollü sulandırıcılarla dondurulması ve eritme sonrası fertilite üzerine etkileri. İstanbul Üniv. Sağlık Bil. Enst. (Doktora Tezi). İstanbul.
- 65.Pineda, M.H. (1989): Reproductive patterns of dogs. In: *Veterinary Endocrinology and Reproduction*, Ed: L.E. McDonald, Lea and Febiger, Philadelphia.
- 66.Pirlot, A., Henroteaux, M., Ectors, F. (1988): Insemination artificielle canine et conservation du sperme. *Ann. de Med. Vet.*, 132, (7), 607-610.
- 67.Platz, C.C., Seager, S.W.J. (1977): Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. *Lab. Anim. Sci.*, 27, (6), 1013-1016.
- 68.Province, C.A., Amann, R.P., Pickett, B.W., Squires, E.L. (1984): Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. *Theriogenology*, 22, (4), 409-415.
- 69.Ravaszová, O., Mesáros, P., Cigánkova, V., Lukacinová, M. (1996): A study of the properties of dog ejaculate during long-term storage. *Folia Veterinaria*, 40, 3-4: 95-99.
- 70.Schubert, C.L., Seager, S.W.J. (1991): Semen collection and evaluation for the assessment of fertility parameters in the male Dalmatian. *Canine Pract.*, 16, (5), 17-21.
- 71.Seager, S.W.J. (1969): Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *Artif. Insem. Dig.*, 17, (12), 6-16.
- 72.Seager, S.W.J., Fletcher, W.S. (1973): Progress on the use of frozen semen in the dog. *Vet. Rec.* 92:6-10.
- 73.Seager, S.W.J., Platz, C.C., Fletcher, W.S. (1975): Conception rates and related data using frozen dog semen. *J. of Reprod. and Fertil.*, 45:189-192.

74. Seager, S.W.J. (1976): Freezing and transportation of dog semen. VIIIth. Int. Congr. on Anim. Reprod. and Artif. Insem., July 12-16, pp 233, Cracow.
75. Seager, S.W.J., Platz, C.C. (1981): 1,143 Puppies from frozen semen. Purebred dog: A.K.C. Gazette. 98, (6) : 48-54.
76. Seager, S.W.J. (1986): Semen collection and evaluation in the dog. In: Current Therapy in Theriogenology. Ed: D.A. Morrow, 539-541, W.B. Saunders Company, Philadelphia.
77. Settergren, I. (1971): Examination of the canine genital system. Vet. Clinics of N. Am., 1, (1), 103-118.
78. Smith, F.O. (1985): Cryopreservation of canine semen: Technique and performance. Diss. Abstr. Int., B-Sci. and Engin., 45, (11), 3441.
79. Smith, F.O. (1989): Examining male dogs and cats for breeding soundness. Vet. Med., 84, (6), 594-603.
80. Soderberg, S.F. (1986): Canine breeding management. Vet. Clin. of North Am.: Small Anim. Pract., 16, (3), 419-433.
81. Stockner, P.K. (1985): Status of canine frozen semen industry. Mod. Vet. Pract., 66, (2), 98-100.
82. Tekin, N., İzgür, H., Özyurt, M. (1987): Köpeklerde penis masajı yöntemiyle sperma alma ve başlıca spermatolojik özellikler üzerinde araştırmalar. S. Ü. Vet. Fak. Derg., 3, (1), 83-95.
83. Theret, M., Treize, G., Dumon, C. (1987): Artificial insemination of the bitch, using the osiris gun. Mod. Vet. Pract., 4: 229-230.
84. Thomas, P.G.A., Surman, V., Meyers-Wallen, V.N., Concannon, P.W., Ball, B.A. (1992): Addition of sodium dodecyl sulphate to Tris-citrate extender improves motility and longevity of frozen-thawed canine spermatozoa. XIIth. Int. Congr. on Anim. Reprod., August 23rd-27th, Vol.4, pp 1823-1825, The Hague,

- 85.Thomas, P.G.A., Larsen, R.E., Burns, J.M., Hahn, C.N. (1993): A comparison of the packaging techniques using two extenders for the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*, 40, (6), 1199-1205.
- 86.Tsutsui, T., Tezuka, T., Shimizu, T., Murao, I., Kawakami, E., Ogasa, A. (1988): Artificial insemination with fresh semen in Beagle bitches. *Jap. J. of Vet. Sci.*, 50, (1), 193-198.
- 87.Wilson, M.S. (1993): Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. *J. of Reprod. and Fertil.*, (Suppl), 47:307-311.
- 88.Wong, W.T., Dhaliwal, G.K. (1985): Observations on semen quality of dogs in the tropics. *Vet. Rec.*, 116, (12), 313-314.
- 89.Woodall, P.F., Johnstone, I.P. (1988): Dimensions and allometry of testes, epididymides and spermatozoa in the domestic dog (*canis familiaris*). *J. of Reprod. and Fertil.*, 82, (2), 603-609.
- 90.Wright, P.J., Parry, B.W. (1989): Cytology of the canine reproductive system. *Vet. Clin. of N. Am.:Small Anim. Pract.*, 19, (5), 851-874.
- 91.Yubi, A.C., Ferguson, J.M., Renton, J.P., Harker, S., Harvey, M.J.A., Bagyenji, B., Douglas, T.A. (1987): Some observations on dilution, cooling and freezing of canine semen. *J. of the Small Anim. Pract.*, 28, (8), 753-761.
- 92.Yurdaydın, N. (1987): Köpeklerde suni tohumlama. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 34, (3), 486-493.
- 93.Yurdaydın, N., Kotzab, E. (1987): Köpek spermasının dondurulması üzerinde araştırmalar. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 34, (3), 534-540.

9. ÖZET:

Çalışmada canlı materyal olarak, saf ırk, damızlık, 2 yaşlı 5 adet (Alman Kurt, Buldog, Chow chow, Sibiry Husky, New Foundland) erkek köpek kullanıldı. Araştırma süresince, parmak manipulasyonları tekniği uygulanarak haftada iki kez olmak üzere toplam 50 ejakülat alındı. Hacim, motilite, yoğunluk, canlı spermatozoa, pH ve morfolojik muayenelerden oluşan spermatolojik özellikler saptandı.

Alınan sperma 2 eşit hacime ayrılarak %1 glikoz, %10 yumurta sarılı yağsız sütlü sulandırıcı ve %1.78 sitrik asit, %1.25 fruktoz'lu Tris (%3.2) sulandırıcısı ile oda ısısında 1:1 oranında sulandırıldı. 2 saatte 5°C'ye soğutulan süt ve Tris sulandırıcıları ile sulandırılmış spermalar yine iki eşit hacime ayrıldılar. Finalde, Tris sulandırıcısı %4 - %7 gliserollü ve sütlü sulandırıcı %4 - %7 gliserollü olacak şekilde gliserolizasyon işlemi uygulanarak 4 grup oluşturuldu.

Beş farklı ırk köpeğe ait spermaların motilite ve anormal spermatozoa oranları her aşamada değerlendirildi. Sperma oda ısısında sulandırıldıktan sonra ve 5°C'ye soğutulduktan sonra yapılan incelemelerde sulandırıcılar arasında önemli bir fark saptanmadı. Gliserolizasyon sonrası en yüksek motilite 79.80 ± 6.14 ile %4 gliserollü Tris sulandırıcısında bulunurken, en düşük motilite 59.70 ± 9.65 ile %7 gliserollü süt sulandırıcısında elde edildi ($n=50$). En yüksek akrozomal ve toplam morfolojik bozukluklar, %7 gliserollü süt ve Tris sulandırıcılarında saptandı. 2 saatlik ekilibasyon sonrasında da belirtilen spermatolojik özellikler aynı doğrultuda elde edildi. 0.2 ml pelletlerde dondurma ve eritme sonrası ise en yüksek motilite 68.36 ± 11.71 ile %4 gliserollü sütlü sulandırıcıda elde edildi ($p<0.05$). Buna en yakın bulgular, 60.02 ± 13.21 ile %4 gliserollü Tris'li sulandırıcıda saptandı. %7 gliserollü süt ve Tris sulandırıcısında motilite değerleri önemli oranlarda düşük bulundu. Toplam morfolojik bozukluklar ele alındığında ise en düşük bozukluklar yine 40.52 ± 11.51 ile %4 gliserollü süt sulandırıcısında bulundu. %7 gliserollü süt ve Tris sulandırıcılarında saptanan morfolojik bozukluklar istatistiksel açıdan önemli oranda yüksek bulundu. Sonuç olarak köpek spermasının dondurulmasında gerek spermatozoa canlılığını ve gerekse morfolojik bütünlüğünü korumada %4 gliserollü sütlü sulandırıcıların pratikte başarıyla kullanılabileceği, süt ve Tris sulandırıcıları için %7 gliserol oranının optimal olmadığı sonucuna varıldı.

10. SUMMARY

Five male dogs of various breeds at 2 years of age were used in the study. During the study, two ejaculates per week and total 50 ejaculates were collected from each male by digital manipulation technique. Spermatological evaluations as volume, motility, spermatozoa concentration, live spermatozoa rate, pH and morphologic examinations were carried out.

Semen was divided into two equal parts. One part was diluted with skimmed milk extender containing 1% glucose and 10% egg yolk, and the other part with Tris (3.2%) extender containing 1.78% citric acid, 1.25% fructose at rate 1:1 at room temperature. Semen extended with milk and Tris extenders and cooled to +5°C in two hours were divided again into two equal parts. Both samples were undergone to glycerolisation in such a manner to have Tris extender with a final 4-7% glycerol and milk extender with a final 4-7% glycerol.

Motility and abnormal spermatozoa rates of the semen of 5 different dog breeds were evaluated at every stage. No significant difference between the extenders was observed during the examinations after the dilution of semen at room temperature and cooled to +5°C. Highest motility after glycerolisation was obtained from the 4% glycerol containing Tris extender as $79.80 \pm 6.14\%$ and lowest motility was obtained from the 7% glycerol containing milk extender as $59.70 \pm 9.65\%$ ($n=50$). Highest acrosomal and total morphological defects were observed in 7% glycerol containing extenders. After 2 hours equilibration period same spermatological results were taken. After freezing in 0.2 ml paillettes and thawing, highest motility was $68.36 \pm 11.71\%$ in 4% glycerol containing milk extender ($p < 0.05$). Most similar findings were $60.02 \pm 13.21\%$ in the 4% glycerol containing Tris extender. Motility results of 7% glycerol containing milk and Tris extenders were significantly low. When total morphological defects were considered lowest defect rate was $40.52 \pm 11.51\%$ in the 4% glycerol containing milk extender. The morphological defect rates of 7% glycerol containing milk and Tris extenders were importantly high. At the end of the study, we concluded that 4% glycerol containing milk extender can be used successfully to prevent spermatozoa morphology and live-spermatozoa rate, and 7% glycerol is not an optimal rate for milk and Tris extenders.

11. ÖZGEÇMİŞ

16.09.1969 tarihinde İstanbul'da doğdum. 1976-80 yılları arasında ilkokul'u, 1980-83 yılları arasında ortaokul'u, 1983-86 yılları arasında ise lise öğrenimimi tamamladım. 1987 yılında girdiğim İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 1992 yılında mezun oldum. 1993 yılının Mart ayında, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün açtığı doktora sınavını kazandım. 04.10.1993 tarihinde İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak göreve başladım. Halen aynı Anabilim Dalı'nda görevimi sürdürmekteyim.