

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

Ülgen GÜNAY\*\*

### ÖZET

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

*Araştırmada materyal olarak 10 adet Kurt Köpeği (Alman Çoban Köpeği) kullanıldı. Spermatozadan zengin ikinci fraksiyon, köpeklerden penis masajı yöntemi ile iki günde bir ve kızgın bir dişi köpeğin varlığında, alışıık oldukları ortamda alındı. Her köpekten 5'er olmak üzere toplam 50 ejakulat alındı. Alınan taze spermaların hacim, renk, pH, motilite, ölü spermatozoa ve morfolojik bozukluk oranlarından oluşan spermatojik özellikleri incelendi. Köpeklerden alınan her bir sperma örneği iki eşit hacme ayrıldı ve bu sperma örnekleri Tris-yumurta sarısı (T-YS) ile Sodyum-sitrat yumurta sarısı (SS-YS) sulandırıcıları ile 1:1 oranında sulandırıldı. Spermanın ısısı buzdolabında 2 saatte +5°C'ye düşürüldü. Isısı +5°C'de olan T-YS ve SS-YS ile sulandırılmış sperma örnekleri kendi hacimleri kadar %8 gliserol içeren T-YS ve SS-YS sulandırıcıları ile finalde %4 gliserol içerecek şekilde sulandırıldılar. Gliserolizasyon işlemi 50 dak.'da tamamlandı. Daha sonra spermalar +5°C'de 2 saat ekilibrasyona bırakıldılar. Ekilibrasyonunu tamamlamış sulandırılmış sperma örnekleri payet yöntemine göre donduruldu. 0.5 ml.lik payetlerde dondurulan spermalar 37°C'lik su banyosunda 30 sn'de çözüldüler. Çalışmada sulandırma, +5°C'ye soğutma, gliserolizasyon, ekilibrasyon sonrası yapılan spermatojik muayenelerde en yüksek motilite Tris sulandırıcısında saptandı (P < 0.05). Sulandırma ve +5°C'ye soğutma aşamalarında akrozomal ve toplam morfolojik bozukluklar incelendiğinde Tris ve Sodyum*

\* Aynı isimli Doktora tezinden özetlenmiştir.

\*\* Araş. Gör. Dr.; U.Ü. Vet. Fak. Döleirme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Bursa-Türkiye.

sitrat sulandırıcıları arasında istatistiksel açıdan fark saptanmamış, gliserolizasyon, ekilibrasyon ve çözüm sonrası aşamalarda ise fark saptanmıştır ( $P<0.05$ ). Araştırmanın sonucunda çözüm sonrasında Tris sulandırıcısında %  $53\pm1.59$ , Sodyum sitrat sulandırıcısında ise %  $48\pm1.46$  motilite değeri saptandı ve aralarındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulundu ( $P<0.05$ ).

Anahtar Kelimeler: Köpek, sperma, sulandırma, dondurma.

## SUMMARY

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

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

*In the present study, 10 German Shepherd Dogs were used as materials. Second sperm-rich fraction of the semen was collected by manual massage every other day in the place where the male dogs were accustomed to be in the presence of a bitch in heat. Five ejaculates per dog were collected and the total ejaculate number used for the study was 50. The semen was examined for volume, colour, pH, motility, dead spermatozoa and morphologically defected ones. Each sperm collected from each dog was divided into two equal parts and one of the parts was diluted with Tris-egg yolk (T-EY) and the other part was diluted with Sodium citrate-egg yolk (SC-EY) extenders by 1:1 ratio. The diluted semen samples were put into a glass cup including 37°C water and then they were fit in refrigerator at 5°C. Meanwhile, T-EY and SC-EY with 8 % glycerol were put into the same cup. The semen samples diluted with T-EY and SC-EY at 5°C were mixed with the same amount of T-EY and SC-EY including 8% glycerol. Thus final glycerol concentration became 4 %. Glycerolisation was completed within 50 minutes. After this manipulation, the semen was incubated for equilibration at 5°C for 2 hours. Following equilibration the diluted semen samples were frozen according to the straw method. The freezing semen in 0.5 ml straws was thawed in water bath at 37°C for 30 seconds. In the study, the highest motility was determined with Tris extender ( $P<0.05$ ) according to spermatological examinations which were done after dilution, cooling to 5°C, glycerolisation and equilibration. There was no statistical difference between Tris and Sodium citrate extenders on the acrosomal and total morphological defects at the steps of dilution and cooling at 5°C. However,*



there was statistical difference after glycerolisation, equilibration and thawing ( $P<0.05$ ).

In conclusion, motility values were determined as  $53\pm1.59$  for Tris and  $48\pm1.46$  for Sodium citrate after thawing and the difference between them was found statistically important ( $P<0.05$ ).

Key Words: Dog, semen, dilution, freezing.

## GİRİŞ

Köpek yetiştiriciliği son yıllarda uluslararası bir hobi olarak güncellik kazanmaktadır. Önemli parasal değerlere ulaşan köpek ırklarının üretilmeleri karlı bir yetiştiricilik haline gelmekte ve bu konuya yönelik talepler günden güne artmaktadır<sup>1</sup>. Bu talepler doğrultusunda gerek doğal çiftleşme, gerekse sun'i tohumlamada kullanılacak erkek köpeklerin ırkının gerektirdiği özelliklere sahip olması ve bu özellikleri bir sonraki nesillere aktarabilmesi gerekir. Bu nedenle köpek spermasının tüm yönleri ile incelenmesi önem taşımaktadır. Üstün verim özelliklerine sahip köpeklerin spermalarının düşük ısı derecelerinde dondurulup uzun süre saklanması ve gereksinim duyulan bölgelere ulaştırılabilmesi ile bu köpeklerden daha geniş ölçüde yararlanılma olanağı sağlanmış olacaktır<sup>2</sup>.

### Erkek Köpeklerden Sperma Alma Yöntemleri ve Spermanın Değerlendirilmesi:

Köpeklerden sperma penis masajı, sun'i vajen ve elektroejakulasyon yöntemleri ile alınabilmektedir<sup>3-5</sup>. Klinik pratikte verimli, uygulanması kolay ve kalitesi yüksek sperma alınması nedeni ile penis masajı yöntemi öncelik kazanmaktadır<sup>6,7</sup>. Penis masajı ve sun'i vajen yöntemi ile sperma alınırken ortamda kızgın bir dişi köpeğin bulunmasının uygulamayı kolaylaştıracağı bildirilmiştir<sup>8,9</sup>. Köpek sperması, ayrılması her zaman kolay olmayan üç fraksiyondan oluşur<sup>5,10-12</sup>. Birinci fraksiyon, berrak sulu kıvamda ve spermatozoa içermezken ikinci fraksiyon beyaz renkli, az visköz ve çok sayıda spermatozoa içerir. Üçüncü fraksiyon ise berrak, sulu kıvamda olup ya çok az sayıda spermatozoa içerir ya da hiç spermatozoa içermez<sup>11,13,14</sup>. Birinci, ikinci ve üçüncü fraksiyonların hacimlerini sırası ile, Settergren<sup>6</sup>, 0.25-3 ml, 0.5-4 ml, 1-25 ml, Linde-Forsberg<sup>4</sup>, 1-5ml, 1-3 ml, 30-40 ml (büyük cüsseli ırklarda) olarak bildirmişlerdir.

Motilitenin köpek spermasının kalitesini belirleyen en önemli parametrelerden biri olduğunu vurgulayan Linde-Forsberg<sup>15</sup>, normal sperma örneklerinde motilitenin % 70'ten az olmaması ve primer ve sekonder defektli spermatozoa oranının % 30-40'ı aşmaması gerektiğini bildirmektedir. Kangal

ırkı beş köpekten penis masajı yöntemi ile aldıkları 25 ejakulatta hacim, motilite, yoğunluk, anormal ve ölü spermatozoon oranları ile pH değerlerini ortalama olarak sırası ile, 25.4 ml, % 62.6,  $524 \times 10^6 / \text{cm}^3$ , % 7.9, % 6.7 ve 6.1 olarak saptayan Tekin ve ark.<sup>16</sup>, beş adet Alman Çoban köpeğinden aldıkları 25 ejakulatta ise aynı spermatozojik özellikleri sırası ile, 21.2 ml, % 68,  $305 \times 10^6 / \text{ml}$ , % 6.2, % 6.1, 6.2 olarak saptamışlardır. Mickelsen ve ark.<sup>17</sup>, Alman Çoban Köpeklerinden el masajı ile aldıkları taze spermalarda, motiliteyi % 80, normal spermatozoa oranını % 70 olarak bulduklarını belirtmişlerdir.

### **Köpek Spermasının Sulandırılması ve Kısa Süreli Saklanması ve Dondurulması:**

Sulandırılmış sperma eğer hemen kullanılmıyacaksa 5°C'de 24 saat saklanabilir<sup>3,18</sup>. Kimi-Diaka ve Badtram<sup>19</sup>, 5°C'de 24 saat bekleyen köpek spermasının fiziksel ve fonksiyonel karakterinde önemli bir değişiklik olmadığını saptamışlardır. Gill ve ark.<sup>20</sup>, 25 dişi köpeği Tris-yumurta sarısı ile sulandırılmış sperma ile hemen veya +5°C'de 24 saat depolamadan sonra yaptıkları tohumlamalardan % 75 oranında gebelik elde etmişlerdir. Pastörize süt, köpek spermasının kısa süreli saklanması için kullanılmış ve 48 saat depolamadan sonra sperma fertil bulunmuştur<sup>6,21</sup>. Linde-Forsberg<sup>4</sup> Illinois Variable Temperature (I.V.T.), pastörize süt, sodyum sitrat dihidrat ve % 0.75 glisin gibi sulandırıcıların köpek spermasının sulandırılması amacı ile kullanıldığını, yaygın olarak kullanılan sulandırıcılardan birisinin de % 20 yumurta sarısı içeren Tris-sitrat sulandırıcısı olduğunu belirtmiştir. Spermayı yumurta sarısı-fruktoz ve yumurta sarısı-sitratla sulandırıp +4°C'de 4 gün saklayan Brochard ve Coulomb<sup>22</sup>, bu süre sonunda % 50 oranında motilite elde etmişlerdir.

Yapılan çalışmalarda, köpek sperması yaklaşık 1ml.lik ampullerde, pellet şeklinde ya da payetlerde dondurulmuştur<sup>13,23,24</sup>. Günümüzde ise pellet şeklinde veya payetlerde dondurulmaktadır<sup>13,14</sup>. Köpek spermasının dondurulması amacıyla kullanılan sulandırıcılar genellikle bir kriyoprotektan olan gliserolü içermekte, payetlerde dondurma amacıyla ise genellikle % 2-8 gliserol içeren Tris-yumurta sarısı sulandırıcısı kullanılmaktadır<sup>25,26,27</sup>.

Değişik ırktan 4 köpekten aldıkları 20 ejakulatu Tris-yumurta sarısı ile 1/3 oranında sulandıran Yurdaydın ve Kotzab<sup>28</sup>, 0.25 ml.lik payetlerde dondurdukları spermaları 40°C'de 10 sn'de çözmüşlerdir. Çözüm sonrası ortalama motilite, ölü ve anormal spermatozoa oranlarını sırası ile, % 46.5, % 33.12 ve % 27.91 olarak saptamışlardır. Oettle<sup>29</sup>, Tris-yumurta sarısı sulandırıcısını iki eşit hacme ayırmış, ilk kısma gliserol katmamış, ikinci kısma ise % 20 (v/v) gliserol eklemiştir. Sperma ilk kısım sulandırıcı ile 1/2 oranında sulandırılıp 450 devirde 10 dak. santrifüj edilmiş ve üstte kalan



kısım atılarak orijinal hacmine bakılmaksızın 1.8 ml.lik sediment bırakılmıştır. Sediment, 1°C/dak soğutma hızıyla +5°C'ye ulaşınca 0.6 ml ikinci kısım sulandırıcı ile sulandırılmış ve son gliserol yoğunluğu % 5 olmuştur. Örnek, +5°C'de 3 saat ekilibrasyona bırakılmış. 0.25 ml.lik payetlerde dondurulan sperma, 30°C'de 30 sn'de çözülmüş ve % 60'ın üzerinde motilite tespit edilmiştir

### **Donmuş Köpek Spermasının Çözülmesi:**

Araştırmacılar tarafından donmuş köpek sperması için çeşitli çözme yöntemleri bildirilmiştir.<sup>30,31</sup> Linde-Forsberg<sup>15</sup>, 0.5 ml.lik payetlerin 37°C'de 15 sn'de veya 6 sn'de, 35°C'de 30 sn'de veya 2 dakikada, 75°C'de 6.5 sn'de çözülebileceğini bildirirken, 0.25 ml.lik payetlerin ise 75°C'lik su banyosunda 5 sn'de çözülebileceğini ifade etmiştir. Pek çok araştırmacı<sup>20,29</sup> çözüm sonrası motilite oranlarını % 50-65 arasında bulmuşlardır. Linde-Forsberg ve Forsberg<sup>32</sup>, çözüm sonrası % 20-30 arası motiliteye sahip donmuş-çözülmüş sperma ile gebelik elde ettiklerini belirtmişlerdir. Gill ve ark.<sup>20</sup>, Tris-yumurta sarısı sulandırıcısına gliserol katmadan yaptıkları dondurma işleminden sonra çözüm sonrası ortalama % 28 oranında motilite elde ederlerken, gliserol kattıklarında % 40-50'den fazla çözüm sonrası motilite saptadıklarını belirtmişlerdir. Nothling ve Volkman<sup>27</sup>, payetleri 37°C'de 2 dak.'da çözdüklerini ve % 35'ten fazla motiliteye sahip donmuş spermaları tohumlamada kullandıklarını ifade etmişlerdir.

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

## **MATERYAL ve METOT**

Araştırmada materyal olarak, Gemlik Askeri Veteriner Okulu ve Eğitim Merkez Komutanlığı Köpek Üretim Bölüğünde bulunan 10 adet Kurt Köpeği (Alman Çoban Köpeği; German Shepherd Dog) kullanıldı. Araştırmada kullanılan spermalar el masajı (Onani) yöntemi ile alındı. Sperma alınırken o gün östrusta olan dişi köpekler kullanıldı. Sperma alma işlemi iki günde bir ve köpeklerin çiftleşmeye alışık oldukları ortamda yapıldı.

Her köpekten 5'er olmak üzere 50 ejakulat alındı. Spermatozoadan zengin olan ikinci fraksiyon, renk ve kıvam değişimleri gözlenerek diğer elde bulunan ısıtılmış sperma toplama kadehine toplandı. Spermaların hacim, motilite, renk, yoğunluk, pH değeri, ölü-canlı ve anormal spermatozoa oranı ile akrozom defektli spermatozoa oranlarından oluşan spermatolojik muayeneleri yapıldı. Ölü-canlı ve anormal spermatozoa oranını belirlemede Eosin-nigrosin, akrozom defektli spermatozoa oranı için Giemsa boyama yöntemi kullanıldı.

## 1. Spermının Sulandırılması ve Dondurulması:

### 1.1. Tris-Yumurta sarısı (T-YS) ve Sodyum sitrat-Yumurta sarısı (SS-YS) Sulandırıcılarının Hazırlanması:

T-YS Sulandırıcısının Hazırlanması<sup>33</sup>: SS-YS Sulandırıcısının Hazırlanması<sup>11</sup>:

|   |                             |            |
|---|-----------------------------|------------|
| TRİS (hidroksimetil aminometan). 3.025g | Sodyum sitrat dihidrat..... | 1.45 g     |
| Sitrik asit..... 1.70 g                 | Glukoz.....                 | 1.25 g     |
| Fruktoz..... 1.25 g                     | Glisin.....                 | 0.93 g     |
| Penisilin ..... 1000 IU/ ml             | Penisilin.....              | 1000 IU/ml |
| Streptomisin ..... 1 mg/ml              | Streptomisin.....           | 1 mg/ml    |
| Yumurta sarısı ..... 20 ml              | Yumurta sarısı .....        | 20 ml      |
| Bidistile su.....q.s.p 100 ml           | Bidistile su .....          | 100 ml     |

Çalışmada kullanılan köpeklerden sperma örnekleri alınıp spermatolojik özellikleri incelendikten sonra sperma iki eşit hacme ayrıldı. Her bir hacim sperma aynı su banyosunda bulunan gliserol içermeyen T-YS ve SS-YS sulandırıcıları ile 1:1 oranda sulandırıldı. Dereceli cam tüpte bulunan T-YS ve SS-YS ile sulandırılmış sperma içerisinde 37°C su bulunan cam bir behere konularak ısı +5°C olan buzdolabına yerleştirildi. Gliserol içeren T-YS ve SS-YS sulandırıcıları da aynı behere konuldu. Spermının ısı, kademeli olarak spermaya değmeyecek şekilde beherdeki suya küçük buz parçaları atmak sureti ile 2 saatte +5°C'ye soğutuldu. Isısı +5°C'de bulunan T-YS sulandırıcısı ile işlem görmüş sperma kendi hacmi kadar % 8 gliserol içeren T-YS sulandırıcısı ile, SS-YS ile işlem görmüş sperma da kendi hacmi kadar % 8 gliserollü SS-YS sulandırıcısı ile finalde % 4 gliserol içerecek



şekilde sulandırıldı. Gliserolizasyon olarak adlandırılan bu işlem 5'er dak. aralıklarla 10 eşit hacimde tamamlandı. Bu süre sonunda spermalar +5°C'de 2 saat süre ile ekilibrasyona bırakıldı. Ekilibrasyon sonunda spermalar payet yöntemine göre donduruldu. Dondurma işlemine başlamadan önce strafor bir kutunun içine sıvı azot dolduruldu ve azot yüzeyinin yaklaşık 4 cm üzerine tel bir ızgara yerleştirildi. Sıvı azotun ısısını ölçen digital termometrenin probu da tel ızgaranın üzerine konularak straforun üzeri cam bir kapakla kapatıldı. Payetlerin açık olan uçları, spermaya daldırılarak 0.5 ml sperma çekildi ve uçları polivinil pirolidon tozuna batırılarak kapatıldı. Payetler ısısı +5°C'de olan soğuk suya daldırılarak kapama tozunun katılması sağlandı. Sonra payetler sudan çıkarılarak dikkatlice kurulandı. Azot buharının ısısı -120°C'ye ulaştığında azot buharının geçmesine izin veren tel ızgara üzerine payetler bir pens aracılığı ile üst üste gelmeyecek şekilde aralıklı olarak dizildiler. Payetler -120°C'deki sıvı azot buharında 7 dak. süre ile bekletilip donduruldular. Bu süre sonunda payetler bir pensle straforun içinde bulunan -196°C'deki sıvı azotun içine daldırılarak 30 dak. bekletildiler ve sonra sıvı azot içine daldırılıp saklandılar. 0.5 ml.lik payetlerde dondurulan spermalar 37°C'lik su banyosunda 30sn'de çözüldüler. Spermatolojik bulguların istatistiksel değerlendirilmesinde t-testi kullanıldı<sup>34</sup>.

## BULGULAR

### 1. Taze Spermada Saptanan Spermatolojik Özellikler:

Çalışmada kullanılan 10 adet Kurt Köpeğinin her birinden spermatolojik özelliklerini değerlendirmek amacıyla alınan 5'er ejakulatta saptanan spermatolojik bulgular Tablo I'de gösterilmiştir.

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

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

**Tablo: I**  
**10 Adet Alman Çoban Köpeğinin Taze Spermasında Saptanan Spermatolojik Bulgular (n=5)**

| Köpek no | Hacim<br>(ml)<br>$x \pm Sx$ | Motilite<br>(%)<br>$x \pm Sx$ | Spermatozoa<br>Yoğunluğu<br>( $\times 10^6$ /ml)<br>$x \pm Sx$ | Ölü<br>(%)<br>$x \pm Sx$ | PH<br>$x \pm Sx$ | Akrozom<br>(%)<br>$x \pm Sx$ | Baş<br>(%)<br>$x \pm Sx$ | Orta<br>(%)<br>$x \pm Sx$ | Kuyruk<br>(%)<br>$x \pm Sx$ | Toplam<br>morfolojik<br>bozukluk (%)<br>$x \pm Sx$ |
|----------|-----------------------------|-------------------------------|--|--------------------------|------------------|------------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------------|--|
| 1        | 1.9±0.08                    | 83.0±1.22                     | 312.0±12.40  | 7.5±0.16                 | 6.4±0.00         | 0.3±0.09                     | 1.6±0.17                 | 0.5±0.18                  | 2.5±0.15                    | 4.9±0.48   |
| 2        | 1.5±0.16                    | 89.0±1.00                     | 424.0±38.00  | 4.7±0.28                 | 6.4±0.00         | 0.5±0.15                     | 2.2±0.28                 | 0.5±0.15                  | 0.9±0.26                    | 4.2±0.30   |
| 3        | 1.4±0.17                    | 82.0±1.22                     | 371.0±19.90  | 3.4±0.17                 | 6.4±0.00         | 0.8±0.11                     | 2.5±0.22                 | 1.9±0.15                  | 3.2±0.20                    | 8.6±0.39   |
| 4        | 1.9±0.12                    | 90.0±0.0                      | 590.0±11.40  | 2.7±0.21                 | 6.4±0.00         | 1.9±0.22                     | 1.7±0.11                 | 0.5±0.15                  | 5.3±0.31                    | 8.7±0.65   |
| 5        | 0.9±0.10                    | 83.0±1.22                     | 272.4±18.00  | 5.0±0.16                 | 6.4±0.00         | 1.9±0.26                     | 2.5±0.68                 | 1.4±0.39                  | 2.2±0.20                    | 7.9±0.47   |
| 6        | 1.5±0.13                    | 86.0±1.00                     | 430.0±22.40  | 8.2±0.29                 | 6.4±0.00         | 0.5±0.11                     | 0.9±0.16                 | 0.3±0.09                  | 4.6±0.17                    | 6.3±0.41   |
| 7        | 1.8±0.18                    | 91.0±1.00                     | 483.6±18.90  | 11.5±0.28                | 6.4±0.00         | 0.2±0.07                     | 2.2±0.17                 | 1.0±0.12                  | 4.9±0.31                    | 8.8±0.59   |
| 8        | 1.9±0.09                    | 81.0±1.00                     | 450.0±23.00  | 7.9±0.31                 | 6.4±0.00         | 0.2±0.11                     | 2.5±0.15                 | 0.4±0.07                  | 1.7±0.79                    | 5.0±0.99   |
| 9        | 1.1±0.12                    | 86.0±1.00                     | 377.2±19.40  | 9.0±0.16                 | 6.4±0.00         | 1.7±0.07                     | 0.4±0.11                 | 0.3±0.16                  | 1.6±0.15                    | 3.9±0.29   |
| 10       | 2.2±0.09                    | 89.0±1.00                     | 608.8±7.58   | 1.3±0.11                 | 6.4±0.00         | 0.5±0.17                     | 1.0±0.12                 | 0.6±0.19                  | 0.9±0.27                    | 3.1±0.46   |
| Gen.ort  | 1.6±0.06                    | 85.7±0.55                     | 431.9±15.80  | 6.1±0.44                 | 6.4±0.00         | 0.8±0.09                     | 1.7±0.13                 | 0.7±0.09                  | 2.8±0.24                    | 6.1±0.34   |



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

| Sulandırıcı   | Motilite (%)<br>x±Sx   | Ölü Spermatozoa (%)<br>x±Sx | Morfolojik Bozukluklar (%) |                       |                       |                       |                       |
|---------------|------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|               |                        |                             | Akrozom<br>x±Sx            | Baş<br>x±Sx           | Orta<br>x±Sx          | Kuyruk<br>x±Sx        | Toplam<br>x±Sx        |
| Tris          | 82.7±0.87 <sup>a</sup> | 8.4±0.60 <sup>a</sup>       | 1.4±0.14 <sup>a</sup>      | 2.2±0.13 <sup>a</sup> | 1.2±0.10 <sup>a</sup> | 4.2±0.32 <sup>a</sup> | 9.1±0.44 <sup>a</sup> |
| Sodyum Sitrat | 78.1±0.71 <sup>b</sup> | 10.1±0.62 <sup>a</sup>      | 1.5±0.16 <sup>a</sup>      | 2.5±0.15 <sup>a</sup> | 1.2±0.11 <sup>a</sup> | 4.5±0.33 <sup>a</sup> | 9.7±0.42 <sup>a</sup> |

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

Tris ve Sodyum sitrat sulandırıcıları ile sulandırılan spermaların ısı +5°C'ye düşürüldüğünde saptanan spermatojik özellikler Tablo III'de sunulmuştur.

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

| Sulandırıcı   | Motilite (%)<br>x±Sx   | Ölü Spermatozoa (%)<br>x±Sx | Morfolojik Bozukluklar (%) |                       |                       |                       |                        |
|---------------|------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
|               |                        |                             | Akrozom<br>x±Sx            | Baş<br>x±Sx           | Orta<br>x±Sx          | Kuyruk<br>x±Sx        | Toplam<br>x±Sx         |
| Tris          | 77.3±0.88 <sup>a</sup> | 10.7±0.58 <sup>a</sup>      | 5.8±0.29 <sup>a</sup>      | 2.4±0.15 <sup>a</sup> | 1.3±0.09 <sup>a</sup> | 5.2±0.30 <sup>a</sup> | 16.4±1.82 <sup>a</sup> |
| Sodyum Sitrat | 73.6±0.90 <sup>b</sup> | 12.9±0.72 <sup>b</sup>      | 6.3±0.32 <sup>a</sup>      | 3.1±0.15 <sup>b</sup> | 1.6±0.09 <sup>b</sup> | 5.6±0.32 <sup>a</sup> | 16.5±0.57 <sup>a</sup> |

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

Tris ve Sodyum sitrat sulandırıcılarında gliserolizasyon sonrası saptanan spermatojik özellikler Tablo IV'te gösterilmiştir.

**Tablo: IV****Gliserolizasyon Sonrası Saptanan Spermatojik Bulgular (n=50).**

| Sulandırıcı   | Motilite (%)<br>x±Sx   | Ölü Spermatozoa (%)<br>x±Sx | Morfolojik Bozukluklar (%) |                       |                       |                       |                        |
|---------------|------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
|               |                        |                             | Akrozom<br>x±Sx            | Baş<br>x±Sx           | Orta<br>x±Sx          | Kuyruk<br>x±Sx        | Toplam<br>x±Sx         |
| Tris          | 69.8±1.03 <sup>a</sup> | 15.9±0.88 <sup>a</sup>      | 8.5±0.35 <sup>a</sup>      | 2.9±0.18 <sup>a</sup> | 2.0±0.10 <sup>a</sup> | 6.7±0.34 <sup>a</sup> | 20.3±0.67 <sup>a</sup> |
| Sodyum Sitrat | 65.3±0.97 <sup>b</sup> | 17.4±0.94 <sup>a</sup>      | 9.3±0.38 <sup>a</sup>      | 3.5±0.19 <sup>b</sup> | 2.4±0.11 <sup>b</sup> | 7.6±0.34 <sup>a</sup> | 22.7±0.6 <sup>b</sup>  |

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

Ekilibasyon sonrası Tris ve Sodyum sitrat sulandırıcısında saptanan ortalama motilite, ölü spermatozoa, akrozom, baş, orta, kuyruk ve toplam morfolojik bozukluk oranları sırası ile Tablo V'te sunulmuştur.

**Tablo: V**  
**Ekilibrasyon Sonrası Saptanan Spermatozojik Bulgular (n=50).**

| Sulandırıcı   | Motilite (%)<br>x ± Sx   | Ölü Spermatozoa (%)<br>x ± Sx | Morfolojik Bozukluklar (%) |                         |                         |                         |                          |
|---------------|--------------------------|-------------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
|               |                          |                               | Akrozom<br>x ± Sx          | Baş<br>x ± Sx           | Orta<br>x ± Sx          | Kuyruk<br>x ± Sx        | Toplam<br>x ± Sx         |
| Tris          | 63.6 ± 1.09 <sup>a</sup> | 19.1 ± 0.95 <sup>a</sup>      | 10.8 ± 0.31 <sup>a</sup>   | 3.8 ± 0.25 <sup>a</sup> | 2.0 ± 0.07 <sup>a</sup> | 7.1 ± 0.33 <sup>a</sup> | 23.8 ± 0.60 <sup>a</sup> |
| Sodyum Sitrat | 59.6 ± 0.99 <sup>b</sup> | 21.4 ± 1.11 <sup>a</sup>      | 11.9 ± 0.34 <sup>b</sup>   | 4.3 ± 0.25 <sup>a</sup> | 2.4 ± 0.08 <sup>b</sup> | 8.1 ± 0.35 <sup>b</sup> | 26.9 ± 0.62 <sup>b</sup> |

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

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

Çözüm sonrası motilite ve morfolojik muayenelerde elde edilen ortalama değerler Tablo VI'da sunulmuştur.

**Tablo:VI**  
**Çözüm Sonrası Saptanan Spermatozojik Bulgular (n=250).**

| Sulandırıcı   | Motilite (%)<br>x ± Sx   | Ölü Spermatozoa (%)<br>x ± Sx | Morfolojik Bozukluklar (%) |                         |                         |                         |                          |
|---------------|--------------------------|-------------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
|               |                          |                               | Akrozom<br>x ± Sx          | Baş<br>x ± Sx           | Orta<br>x ± Sx          | Kuyruk<br>x ± Sx        | Toplam<br>x ± Sx         |
| Tris          | 53.8 ± 1.59 <sup>a</sup> | 27.6 ± 1.42 <sup>a</sup>      | 23.6 ± 1.12 <sup>a</sup>   | 5.4 ± 0.28 <sup>a</sup> | 2.4 ± 0.08 <sup>a</sup> | 8.8 ± 0.34 <sup>a</sup> | 40.6 ± 1.35 <sup>a</sup> |
| Sodyum Sitrat | 48.0 ± 1.46 <sup>b</sup> | 30.7 ± 1.47 <sup>a</sup>      | 26.9 ± 1.18 <sup>b</sup>   | 5.9 ± 0.28 <sup>a</sup> | 2.8 ± 0.09 <sup>b</sup> | 9.7 ± 0.34 <sup>a</sup> | 45.4 ± 1.39 <sup>b</sup> |

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

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

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Araştırmada kullanılan 10 adet Kurt Köpeğinden 5'er ejakulat alınmış ve bireysel spermatozojik özellikleri saptanmıştır (Tablo I). 10 köpeğin genel ortalama spermatozojik özellikleri ise 1.6±0.06 ml hacim, % 85.7±0.55 motilite, 431.9±15.80x10<sup>6</sup>/ml spermatozoa yoğunluğu, % 6.1±0.44 ölü spermatozoa, 6.4±0.00 pH, % 0.8±0.09 akrozoma, % 1.7±0.13 başa, % 0.7±0.09 orta kısma ve % 2.8±0.24 kuyruğa ait olmak üzere toplam % 6.1±0.34 toplam morfolojik bozukluk elde edilmiştir.



Sunulan çalışmada taze spermada saptanan spermatolojik özelliklerin normal sınırlar içerisinde bulunduğu, çoğu araştırmacının<sup>5,7,32,35,36-38</sup> buldukları değerlerle benzerlik gösterdiği ve alınan spermaların dondurmaya elverişli olduğu tespit edilmiştir. Taze spermada saptanan başlangıç motilitesi spermanın dondurulmasında en önemli kriterlerdendir<sup>15,39</sup>. Çok sayıda araştırmacı köpeklerde taze spermanın % 70-90 oranında motiliteye sahip olması gerektiğini vurgulamışlardır<sup>4,17</sup>. Erkek köpeklerden elde edilen spermatolojik özellikler arasında saptanan farklılıklar sperma alma yöntemine, çevresel faktörlere, ırka hatta bireye bağlı olarak değişkenlik gösterebilir<sup>5,40</sup>. Çalışmada taze spermada saptanan ölü ve anormal spermatozoa oranı bazı araştırmacıların<sup>1,18,28</sup> değerlerinden daha düşük bulunmuştur. Akrozom defektli spermatozoa oranı da yine bazı araştırmacıların<sup>1,33,41,42</sup> sonuçlarından daha düşük saptanmıştır.

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

+5°C'ye soğutma sonrası elde edilen motilite ve morfolojik bozukluklar Tablo III'te sunulmuştur. Bu aşamada Tris ve Sodyum sitrat sulandırıcıları arasında motilite, ölü spermatozoa, baş ve orta kısma ait morfolojik bozukluklar açısından istatistiksel olarak fark saptanmıştır ( $P<0.05$ ). Pek çok araştırmacı köpek spermasının sulandırılması ve +5°C'de depolanmasında gerek Tris sulandırıcısının<sup>14,33</sup>, gerekse Sodyum sitrat sulandırıcısının<sup>4,21</sup> başarılı sonuç verdiğini belirtmişlerdir. Soğutma sırasında spermatozoa viabilitesinin ve fonksiyonunun korunması soğutma hızına, depolama ısısına ve kullanılan sulandırıcının çeşidine bağlı olarak değişmektedir<sup>25</sup>. Sunulan çalışmada +5°C'de elde edilen spermatolojik bulguların genel olarak literatürlerde bildirilenlerle uyum içerisinde olduğu gözlenmektedir<sup>14,41,43,44</sup>. Gliserolizasyon sonrası Tris ve Sodyum sitrat sulandırıcılarından elde edilen motilite ve morfolojik değerler Tablo IV'te gösterilmiştir. Her iki sulandırıcıda da % 4 gliserol oranı kullanılmış olup en yüksek motilite Tris sulandırıcısında saptanmıştır ( $P<0.05$ ). Yüksek gliserol oranlarının özellikle akrozom başta olmak üzere spermatozoada önemli hasarlara neden olduğu bildirilmektedir<sup>45</sup>.

Ekilibrasyon sonrasında da yine Tris sulandırıcısında elde edilen motilite değeri daha yüksek bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Ölü spermatozoa oranı ile akrozom, baş, orta kısım ve kuyruğa ait morfolojik bozukluklar incelendiğinde, gliserolizasyon sonrasında her iki sulandırıcıda baş ve orta kısım, ekilibrasyon sonrasında ise akrozom, orta kısım ve kuyruğa ait morfolojik bozukluklar arasında farklılıklar gözlenmiştir ( $P<0.05$ ). Dondurma işleminin gliserolizasyon ve ekilibrasyon evrelerinde saptanan spermatolojik özelliklerle ilgili literatür verileri elde edilemediğinden tartışma olanağı

bulunamamıştır. Ancak bu evrelerde elde edilen değerlerin normal sınırlar içerisinde olduğu söylenebilir. Özellikle +5°C'de ve gliserolizasyondan sonraki spermatolojik özelliklerde bir kötüleşmenin olduğu dikkati çekmektedir. Nitekim bu sonucun şaşırtıcı olmadığı çünkü spermatozoanın soğuk şokuna karşı duyarlı olduğu ve sperma sulandırıcılarına katılan gliserolün kristal buz oluşumuna ve dondurma sırasında elektrolitlerin konsantrasyonundaki azalmaya engel olduğu ancak az da olsa spermatozoa üzerine zararlı etkisinin olduğu bilinmektedir<sup>23,46</sup>.

Sunulan çalışmada çözüm sonrası saptanan spermatolojik bulgular (Tablo VI) incelendiğinde en yüksek motilite % 53.8±1.59 ile Tris sulandırıcısında elde edilmiştir. Motilite, akrozom, baş ve toplam morfolojik bozukluklar arasında istatistiksel açıdan fark saptanmıştır (P<0.05). Pek çok araştırmacı Tris sulandırıcısının köpek spermasının dondurulmasında en iyi sonucu verdiğini bildirmiştir<sup>46,47,48</sup>. Bunun yanında dondurma amacıyla Sodyum sitrat sulandırıcısının da kullanılabileceğini belirten çalışmalarda bulunmaktadır<sup>3,49</sup>.

Oettle<sup>50</sup>, akrozomda meydana gelen hasarın sulandırma, soğutma ve ekilibasyon periyotları boyunca arttığını ancak bu hasarın önemli derecede dondurma ve çözme safhalarından sonra oluştuğunu bildirmiştir. Sunulan çalışmada da akrozomal bozukluk oranı sulandırma, +5°C'ye soğutma, gliserolizasyon ve ekilibasyon periyotları boyunca artmış ve en önemli artışın çözüm sonrasında olduğu dikkati çekmiştir. Çözüm sonrası akrozomal bütünlük çözüm sonrası fertilitiyi önceden belirlemede güvenilir kriterlerden biri olabilmektedir<sup>50</sup>. Köpek spermasında dondurma metotlarını karşılaştırmada akrozom morfolojisini araştıran yayınların yokluğu talihsizlik olarak değerlendirilmiştir<sup>27</sup>.

England ve Ponzio<sup>51</sup> taze spermada % 88-95 normal akrozom oranı saptarlarken, bu oranın çözüm sonrasında % 52-84'e düştüğünü bildirmişlerdir. England ve Verstegen<sup>38</sup> ise spermatozoanın en fazla dondurma ve çözme safhalarında zarar gördüğünü vurgulamışlardır. İki farklı metotla köpek spermasını Tris-fruktoz-sitrik asit sulandırıcısı ile payetlerde donduran Strom ve ark.<sup>46</sup>, % 49.6±7.1 ile % 49.8±10.1 çözüm sonrası normal akrozom oranı olarak tespit etmişlerdir. Sunulan çalışmada saptanan akrozomal bozukluk oranı yukarıda bildirilen araştırmacıların<sup>46</sup> saptadıkları değerden düşük, England ve Verstegen'in<sup>38</sup> saptadıkları değerle benzer bulunmuştur. Bu çalışmada akrozomal bütünlüğün Tris sulandırıcısında Sodyum sitrat sulandırıcısından daha iyi korunduğu gözlenmiştir (P<0.05).

Köpek spermasını payet yöntemi ile donduran araştırmacılar<sup>48,52</sup> çözüm sonrası farklı motilite ve morfolojik bozukluk oranı saptamışlardır. Bu araştırmacılar çözümleri Tris sulandırıcısını kullanmış olup Gill ve ark.<sup>20</sup>, 0.5ml.lik payetlerde Tris-sitrik asit-fruktoz sulandırıcısı ile dondurdıkları



spermalardan çözüm sonrası % 40-50 oranında, Morton<sup>8</sup> % 70-80, Dumon<sup>48</sup> ise % 50'den fazla motilite elde etmişlerdir. Aynı yöntemle spermayı donduran Oettle<sup>29</sup> % 60, Takeishi ve ark.<sup>53</sup> % 35-50, Farstad<sup>54</sup> ise % 30-70 oranında motilite saptadıklarını bildirmişlerdir.

Dondurdukları spermalardan elde ettikleri çözüm sonrası motilite değerleri yanında ölü ve anormal spermatozoa oranını bildiren araştırmacılar Yurdaydın ve Kotzab<sup>28</sup>, % 46.25 motilite, % 33.12 ölü ve % 27.91 anormal spermatozoa, Yubi ve ark.<sup>18</sup>, % 30 motilite, % 60 ölü, % 39.0 anormal spermatozoa oranı, England ve Ponzio<sup>51</sup>, % 20-32 canlı spermatozoa oranı saptadıklarını bildirmişlerdir. Sunulan araştırmada ölü spermatozoa oranı araştırmacıların<sup>18,28,51</sup> belirttikleri değerlerden daha düşük, anormal spermatozoa oranı ise daha yüksek bulunmuştur.

Yapılan araştırmalardan çözüm sonrası elde edilen motilite oranlarının % 30-80 arasında olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Sunulan araştırmada, çözüm sonrası saptanan motilite değerleri bazı araştırmacıların<sup>6,29,30</sup> buldukları değerlerden düşük, bazı araştırmacıların<sup>18,47,49</sup> değerlerinden yüksek, bazı araştırmacılarınki<sup>20,28,46,51,53,54</sup> ile de benzer bulunmuştur.

Yapılan araştırmalarla sunulan çalışmadan elde edilen sonuçlar arasındaki farklılıklar çeşitli etmenlerden kaynaklanmış olabilir. Özellikle bu durumun ırka, sulandırıcı çeşidine ve dondurma tekniğindeki farklılıklara bağlı olarak şekillendiği düşünülebilir. Ayrıca yapılan araştırmalarda spermanın değişik ısı ve sürelerde çözülmesi sonuçlarda bir ölçüde ayrıcalık yaratmış olabilir. Nitekim, Olar ve ark.<sup>25</sup>, payetlerde donmuş köpek spermasında çözüm sonrası motilite ile çözme hızı ve ısıları arasında korelasyon bulunduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmalarda kullanılan damızlık köpekler arasında sperma kalitesi açısından farklılıklar bulunması ve buna bağlı olarak çözüm sonrası canlı spermatozoa yüzdesinde değişiklikler olabileceği düşünülebilir.

Sonuç olarak sunulan araştırmada, köpek spermasının payet yöntemi ile dondurulmasında Tris sulandırıcısının Sodyum sitrat sulandırıcısına oranla daha üstün özellikte olduğu, köpek spermatozoasının motilite ve morfolojik bütünlüğünü daha iyi koruduğu ve pratikte de rahatlıkla kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır. Bunun yanında sunulan bu araştırmada köpek spermasının dondurulması ile belli ırktan köpeklerden genetik materyalin elde edilip depolanabileceği sonucuna varılmış ve bir ölçüde köpek yetiştiriciliğine katkıda bulunabilmeye çalışılmıştır.

## KAYNAKLAR

1. GÖKÇEN, H., SOYLU, M.K., TÜMEN, H.: Erkek köpeklerin kimi spermatolojik özellikleri üzerinde araştırmalar, U.Ü.Vet. Fak. Derg., 10:1-2-3, 67-73 (1991).

2. NOTHLING, J.O.: Success with intravaginal insemination of frozen-thawed canine semen, W.S.A.V.A. X.I.X. World Congress, Durban, 612-613 (1994).
3. KAWAKAMI, E., TSUTSUI, T., YAMADA, Y., YAMAUCHI, M.: Cryptorchidism in the dog: Occurrence of cryptorchidism and semen quality in the cryptorchid dog, *Jpn. J. Vet. Sci.*, 46:3, 303-308 (1984).
4. LINDE-FORSBERG, C.: Artificial insemination in the dog, W.S.A.V.A. XIX th. World Congress, Durban, 606-611 (1994).
5. ENGLAND, G.C.W., ALLEN, W.E.: The lack of effect of parvovirus vaccination on the seminal characteristics of dogs, *Vet. Res.*, 128: 611-612 (1991).
6. SETTERGREN, I.: Examination of the canine genital system, *Vet. Clinics of N. Am.*, 1:1, 103-118 (1971).
7. PINEDA, M.H.: Reproductive patterns of dogs, *Veterinary Endocrinology and Reproduction*, Fourth edition, Ed. McDONALD, L.E., PINEDA, M.H., Lea & Febiger, Philadelphia, 460-481 (1989).
8. MORTON, D.B.: Artificial insemination with frozen semen in the dog: Principles of DNA Fingerprinting, *Reproductive Clinical Problem in the Dog*, Ed. JONES, D.E., JOSHUA, J.O., London, 169-179 (1988).
9. OLSON, P.N.: Collection and evaluation of canine semen, *Current Veterinary Therapy Small Anim. Prac.*, Ed. KIRK, R.W., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 938-943(1992).
10. HOPKINS, S.M., EVANS, L.E.: Artificial insemination, *Veterinary Endocrinology and Reproduction*, Fourth edition, Ed. McDONALD, L.E., Lea & Febiger, Philadelphia, 355-388 (1989).
11. KIRK, R.W.: Dogs, *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals*, Ed. HAFEZ, E.S.E., Lea & Febiger, Philadelphia, 224-236 (1970).
12. STABENFELDT, G.H., SHILLE, V.M.: Reproduction in the dog and cat, *Reproduction in Domestic Animals*, Third edition, Ed. COLE, H.H., CUPPS, P.T., Academic Press, London, 257-284 (1977).
13. CONCANNON, P.W., BATTISTA, D.W.H.: Canine semen freezing and artificial insemination, *Current Veterinary Therapy*, Ed. KIRK, R.W., Small Animal Practice, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1247-1259 (1989).
14. LINDE-FORSBERG, C.: Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen, *Small Animal Practice*, 21:3, 467-485 (1991).



15. LINDE-FORSBERG, C.: Artificial insemination with fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog, *Sem. Vet. Med. Surg. (Small Anim.)*, 10:1, 48-58 (1995).
16. TEKİN, N., İZGÜR, H., ÖZYURT, M.: Köpeklerde penis masajı yöntemiyle sperma alma ve başlıca spermatolojik özellikler üzerinde araştırmalar, *S.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 3:1, 83-95 (1987).
17. MICKELSEN, W.D., MEMON, M.A., ANDERSON, P.B., FREEMAN, D.A.: The relationship on semen quality to pregnancy rate and litter size following artificial insemination in the bitch, *Theriogenology*, 39: 553-560 (1993).
18. YUBI, A.C., FERGUSON, J.M., RENTON, J.P., HARKER, S., HARVEY, M.J.A., BAGYENJI, B., DOUGLAS, T.A.: Some observations on the dilutions, cooling and freezing of canine semen, *J. Small Anim Prac.*, 28:8, 753-761 (1987).
19. KIMI-DIAKA, J., BADTRAM, G.: Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro bioassay for canine semen, *Theriogenology*, 41:7, 1355-1366 (1996).
20. GILL, H.P., KAUFMAN, C.F., FOOTE, R.H., KIRK, R.W.: Artificial insemination of Beagle bitches with freshly collected, liquid-stored and frozen-stored semen, *Am. J. Vet. Res.*, 31:10, 1807-1813 (1970).
21. ANDERSEN, K.: Artificial insemination and storage of canine semen, *Current Therapy in Theriogenology*, Ed. MORROW, D.A., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 661-663 (1980).
22. BROCHART, M., COULOMB, J.: Recherches sur la dilution et la conservation du sperma de chien, *Bull. Acad. Vet. Fr.*, 25: 59-62, 1952, Alınmıştır YURDAYDIN, N., KOTZAB, E., Köpek spermasının dondurulması üzerinde araştırmalar, *A.Ü. Vet. Fak. Der.*, 34:3, 534-540 (1987).
23. HUNTER, R.H.F.: *Physiology and Technology of Reproduction in Female Domestic Animals*, Academic Press, London, 250-253 (1980).
24. FELDMAN, E.C., NELSON, R.W.: Disorders of canine male reproductive tract, *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*, Ed. Feldman, E.C., Nelson, R.W., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 481-524 (1987).
25. OLAR, T.T., BOWEN, R.A., PICKETT, B.W.: Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws, *Theriogenology*, 31:2, 451-461 (1989).
26. BATTISTA, M., PARKS, J., CONCANNON, P.: Canine sperm post-thaw survival following freezing in straws or pellets using pipes, lactose,

- tris or test extenders, 11<sup>th</sup>. Int. Congr. on Anim. Reprod. and Artif. Insem., Dublin, Vol.3, 229-231 (1988).
27. NOTHLING, J.O., VOLKMANN, D.H.: Effect of addition of autologous prostatic fluid on the fertility of frozen-thawed dog semen after intravaginal insemination, *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 47: 329-333 (1993).
  28. YURDAYDIN, N., KOTZAB, E.: Köpek spermasının dondurulması üzerinde araştırmalar, *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 34:3, 534-540 (1987).
  29. OETTL, E.E.: Preliminary Report: A pregnancy from frozen centrifuged dog semen, *Journal of the South African Veterinary Association*, 53:4, 269-270 (1982).
  30. THERET, M., TREIZE, G., DUMON, C.: Artificial insemination of the bitch using the osiris gun, *Modern Veterinary Practice*, 68:4, 229-230 (1987).
  31. ANDERSEN, K.: Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique, *Zuchthygiene*, 10:1, 1-4 (1975).
  32. PROVINCE, C.A., AMANN, R.P., PICKETT, B.W., SQUIRES, E.L.: Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C, *Theriogenology*, 22:4, 409-415 (1984).
  33. ROTA, A., STROM, B., LINDE-FORSBERG, C.: Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C, *Theriogenology*, 44:6, 885-900 (1995).
  34. SÜMBÜLOĞLU, K., SÜMBÜLOĞLU, V.: Biyoistatistik, 6. baskı, Özdemir yayım, 59-67 (1995).
  35. JOHNSTON, S.D.: Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital, *Vet. Clin. of N. Am. Small Anim. Pract.*, 21:3, 545-550 (1991).
  36. SEAGER, S.W.J.: Semen collection and evaluation in the dog, *Current Therapy in Theriogenology 2*, Ed. MORROW, D.A., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 539-541 (1986).
  37. BUCKRELL, B.: The use of frozen semen from dogs in Canada, *Can. Vet. J.*, 27: 161-163 (1986).
  38. ENGLAND, G.C.W., VERSTEGEN, J.P.: Radiographic contrast medium for uterine insemination in the bitch and its effect upon the quality and fertility of fresh dog semen, *Theriogenology*, 46: 1241-1243 (1996).
  39. GARNER, D.L.: Artificial insemination, *Reproduction in Domestic Animals*, Fourth edition, Academic Press, London, 260-266 (1991).
  40. MEYERS-WALLEN, V.N.: Clinical approach to infertile male dog with sperm in the ejaculate, *Vet. Clinics of N. Am.: Small Anim. Pract.*, 21:3, 609-633 (1991).



41. BÜYÜKÇOBAN, M.: Kurt ve Kangal Irkı Köpeklerin Taze ve Sulandırılmış Spermalarının Spermatolojik Özellikleri ve Viabilitesi Üzerinde Araştırmalar, Doktora Tezi, Bursa (1996).
42. KAWAKAMI, E., TSUTSUI, T., OGASA, A.: Two cases of acrosome and folded tail abnormality in dog spermatozoa, *Jpn. J. Vet. Sci.*, 50:6, 1274-1276 (1988).
43. GUNZEL-APEL, A.R., EKROD, B.: 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.*, 26:1, 31-41 (1991).
44. BOUCHARD, G.F., MORRIS, J.K., SIKES, J.D., YOUNGQUIST, R.S.: Effect of storage temperature cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility, *Theriogenology*, 34:1, 147-157 (1990).
45. RAVASZOVÁ, O., MESÁROS, P., ČIGÁNKOVÁ, V., LUKACINOVÁ, M.: A study of the properties of dog ejaculate during long-term storage, *Folia Veterinaria*, 40:3-4, 95-99 (1996).
46. STROM, B., ROTA, A., LINDE-FORSBERG, C.: In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected two methods of cryopreservation, *Theriogenology*, 48:2, 247-256 (1997).
47. THOMAS, P.G.A., LARSEN, R.E., BURNS, J.M., HAHN, C.N.: Comparison of three packaging techniques using two extenders for the cryopreservation of canine semen, *Theriogenology*, 40:6, 1199-1205 (1993).
48. DUMON, C.: Artificial insemination: Interest and performance in canine practice, XVII. W.S.A.V.A. World Congress, Durban, 1411-1417 (1994).
49. FOOTE, R.H.: Extenders for freezing dog semen, *Am. J. Vet. Res.*, 25:104, 37-40, 1964.
50. OETTLE, E.E.: Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen, *Animal Reproduction Science*, 12:2, 145-150 (1986).
51. ENGLAND, G.C.W., PONZIO, P.: Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen, *Theriogenology*, 46: 165-171 (1996).
52. SILVA, L.D.M., VERSTEGEN, J.P.: Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa, *Theriogenology*, 44:4, 571-579 (1995).

53. TAKEISHI, M., MIKAMI, T., KODAMA, Y., TSUNEKANDE, T., IWAKI, T.: Studies on reproduction in the dog. Artificial insemination using frozen semen, Japanese Journal of Animal Reproduction, 22:1, 28-33 (1976).
54. FARSTAD, W.: Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen, J. Small Anim. Pract., 25: 561-565 (1984).

---

**Yazının Geliş Tarihi: 29.06.1999**