

## KÖPEK SPERMASININ DONDURULMASI ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

Nafiz Yurdaydın<sup>1</sup>

Erich Kotzab<sup>2</sup>

### Untersuchungen über die Tiefgefrierung von Hundesperma

**Zusammenfassung:** Die Untersuchungen wurden von 4 verschiedenen Hunderassen insgesamt 20 Ejakulaten verwendet.

Die Ejakulate nach dem ersten Beurteilung, für die Tiefgefrierung wurden mit Tris-Zitronensäure-Glykos-Eidotter-Glycerin Verdünnermedium im Verhältnis 1/3 verdünnt. Die Ejakulate wurden jeweils nach der Verdünnung wurde neuerlich der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien durch Schätzung im Mikroskop beurteilt, die anschließende Portionierung erfolgte in Pailletten. Nach 2 stündiger Lagerung bei 4 Grad Celcius wurden die Pailletten über Stickstoffdampf 7 Minuten eingefroren, anschliessend erfolgte die Struzkühlung in flüssigen Stickstoff auf - 196 °C.

Für das Auftauen der Pailletten im Wasserbad wendeten wir 10 Sek. bei 40 Grad Celsius.

Nach dem Auftauen, der durchschnittliche Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien, der Anteil toter Spermien und morphologische abweichender Spermienformen wurden 46.25, 33.12 und 27.91 % festgestellt.

**Özet:** Bu araştırmada, değişik ırktan 4 köpekten alınan toplam 20 ejakulat sperma kullanıldı.

Alınan ejakulatlar ilk değerlendirmeden sonra, Tris-Sitrat-Glikoz-Yumurta sarısı-Gliserin sulandırıcısı ile 1/3 oranında sulandırıldı. Sulandırılan spermaların motilite oranları kontrol edildikten sonra payetlere çekildi. Payetlere doldurulan bu spermalar, + 4 °C de 2 saat süreyle bekletildikten sonra, sıvı azot buharında 7 dakikada dondurulup, - 196 °C de sıvı azot içinde depo edilmiştir.

<sup>1</sup> Yrd. Doç. Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Repradüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Dalı, Ankara.

<sup>2</sup> Dr. Med. Vet., Klinik für Geburtshilfe, Gynakologie und Andrologie der Veterinärmedizinische Universität Wien.

*Donmuş spermalar, su banyosunda 10 saniye süreyle 40 °C de çözülmüştür.*

*Çözülen spermaların, çözüm sonu ortalama spermatozoon motilite (Tek yönlü hareket eden spermatozoon yüzdesi), ölü spermatozoon ve anormal spermatozoon oranları sırasıyla % 46.25, % 33.12 ve % 27.91 olarak saptanmıştır.*

### Giriş

Spallanzani'nin 1780 de ilk kez köpeklerde uygulamasıyla başlayan sun'i tohumlama yöntemi, günümüzde önemli gelişmeler göstermiştir. Özellikle, vücut yapılarının farklılığı nedeniyle çiftleşemeyen köpeklerde ve donmuş spermanın tohumlamada kullanılabilmesinde de, büyük ölçüde sun'i tohumlama yönteminden yararlanılmaktadır (4, 5, 7, 8, 15, 17, 18, 21).

Brochart ve Coulomb (7), 1952 de, köpek spermasını Yumurta sarısı-Sitrat ve Yumurta sarısı-Fruktoz ile sulandırdıktan sonra, + 4 °C de saklayarak motilite kontrolü yapmışlardır. Araştırmacılar, sulandırılan bu spermaların motilite oranını 4 gün sonra % 50 olarak saptamışlardır. Harrop (12) ise, 1954 de yağsız süt ile 1/8 oranında sulandırdığı spermaları + 4 °C de saklayarak, bu spermaların 4-6 gün sonra motilite oranını % 60 olarak bulmuştur. Araştırmacı, süt ile sulandırılan bu spermalardan bir bölümünü + 4 °C de İngiltere'den Amerika'ya götürerek, 140 saat sonra tohumladığı köpeklerden 5 yavru elde etmiştir.

Bahlau (6) da, 1958 de değişik sulandırıcılar ile sulandırıp + 4 °C de saklanan spermaların, 8 gün sonra % 44.5 oranında motiliteye sahip olduklarını belirlemiştir. Foote ve Leonard (10) ise, 1964 de Natrium sitrat sulandırıcısı ile 1/20 oranında sulandırıp + 5 °C de 13 gün süreyle sakladıkları spermaların, bu süre sonunda % 40 oranında motil olduğunu saptamışlardır. Gill ve ark. (11) da, Tris sulandırıcısı ile sulandırılan spermaların uzun süre tohumlamada kullanılabileceğini bildirmektedirler.

Bu gelişmelerden sonra, Harrop (13) % 10 Gliserin içeren Yumurta sarısı-Sitrat sulandırıcısı ile 1/8 oranında sulandırıp + 4 °C de 2 saat beklettiği köpek spermalarını - 79 °C de ampuller içinde dondurmuştur. Araştırmacı, bu spermaları 12 ay sonra çözerek % 45 motilite oranı saptamıştır. Martin (19) de, % 8 Gliserinli ve % 9 Yağsız süt içeren Ringer-Fuktoz-Fosfat sulandırıcısı ile sulandırıp don-

durduğu spermallerden yüksek motilite oranları elde etmiştir. Foote (9) de, % 11 Gliserinli Sitrat-Yumurta sarısı-Tris sulandırıcısı ile sulandırdığı spermaları ampuller içinde dondurarak, çözüm sonu spermatozon motilite oranını % 41 olarak bulmuştur. Seager (20) ise, Laktoz-Yumurta sarısı-Gliserin ile 1/3 oranında sulandırıp, 3 saat + 4 °C de beklettiği spermaları pellet şeklinde dondurmıştır. Araştırmacı, donmuş spermaların 30 °C de % 3 lük Natrium sitrat içerisinde çözüldüğünde normal bir motilite oranı elde edilebileceğini kaydetmektedir.

Gill ve ark. (11), % 8 Gliserin içeren Tris sulandırıcısı ile sulandırıp dondurdukları spermaların, çözüm sonu spermatozoon motilite oranlarının % 40-50 arasında değiştiğini saptamışlardır. Andersen (2), 1972 de Laktoz ve Tris ile 1/3 ve 1/5 oranlarında sulandırıp dondurduğu spermalar ile intra-vaginal olarak tohumlanan köpeklerden normal bir dölverimi alındığını bildirmektedir. Yine, Andersen (3) 1975 de, Tris-Fruktoz-Sitrat ile sulandırıp dondurduğu spermaları, 6.5 saniye süreyle 75 °C de çözerek, % 40 oranında motilite saptamıştır. Araştırmacı, bu spermalar ile intra-uterin olarak tohumladığı köpeklerden de normal yavrular elde etmiştir.

Değişik sulandırıcılar ile köpek spermasını donduran Aamdal ve ark. (1), çözüm sonu spermatozoon motilite oranını ortalama % 60; Heidrich (14), % 50 ve Huwer (16) de, % 44.5 olarak saptamışlardır.

Bu çalışma, diğer türlerde olduğu gibi, köpek spermasının da dondurulup uzun süre saklanarak, istenildiğinde köpek yetiştiriciliğinde kullanılabilceğini ortaya koymak amacıyla yapılmıştır.

### Materyal ve Metot

Bu araştırmada, Viyana Veteriner Üniversitesi Doğum ve Andrologie Kliniğine gelen değişik ırktan 4 köpekten alınan toplam 20 ejakülat sperma kullanılmıştır. Masaj yöntemiyle alınan ejakülatların gerekli muayene ve değerlendirmeleri yapıldıktan sonra,

Tris .....	2.4 g
Sitrat .....	1.3 g
Glikoz .....	1.0 g
Bidistile Su .....	72.2 ml
Gliserin .....	8.8 ml

Yumurta Sarısı ..... 20.0 ml

Streptomisin ..... 100.0 mg

Penisillin ..... 100.000 I.E. sulandırıcısı ile 1/3 oranında sulandırılarak 0.25 sm<sup>3</sup> hacmindeki payetlere çekildi. Bu spermalar, 2 saat süreyle + 4 °C de beklettildikten sonra (Equilibration), - 79 °C de sıvı azot buharında 7 dakika süreyle dondurulup, sıvı azot içinde depo edildi. Donmuş spermalar, su banyosunda 10 saniyede 40 °C de çözülerek, çözüm sonu spermatolojik değerler saptandı.

### Bulgular

Değişik ırktan 4 köpekten alınan toplam 20 ejakülat a ait başlıca spermatolojik değerler Tablo 1 de gösterilmiştir. Tablodan izlenebileceği gibi, bu köpeklerin ortalama ejakülat miktarı (sm<sup>3</sup>), tek yönlü hareket eden spermatozoon oranı (%), ölü spermatozoon oranı (%), anormal spermatozoon oranı (%) ve spermatozoon yoğunluğu (milyon/sm<sup>3</sup>) sırasıyla, 2.2, 80.75, 17.04, 14.77 ve 308.950 olarak saptanmıştır.

Tablo 1. Değişik ırktan 4 köpekten alınan 20 ejakülatta saptanan spermatolojik değerler.

İrki	miktar* (sm <sup>3</sup> )	Motilite (%)			ölü spermatozoon oranı (%)	Anormal spermatozoon oranı (%)	Spermatozoon yoğunluğu (milyon/sm <sup>3</sup> )
		V	O	U			
Brandl-Bracke, Dogo Argentino, Bobtail, Franz. Bulldogge.	1.5	80	10	10	17.5	23.5	205.000
	1	80	5	15	13.5	12	406.000
	1	85	5	10	6	11.5	538.000
	1.5	90	5	5	13	11.5	418.000
	3	90	5	5	5.5	14.5	512.000
	2.5	90	5	5	8	9.5	449.000
	3	80	5	15	2.5	21.5	132.000
	1.5	90	5	5	5.5	6.5	579.000
	1	70	25	5	7.5	7	98.000
	1	80	10	10	7	18.5	181.000
	3	80	10	10	7	8	115.000
	2.5	70	20	10	9.5	14.5	146.000
	3	80	10	10	5	15	202.000
	3.5	90	5	5	6	6.5	434.000
	3	70	15	15	12	26	529.000
	2.5	80	5	15	16	24.5	420.000
2	60	20	20	8	7.5	183.000	
1.5	80	10	10	14.5	16.5	126.000	
3.5	85	5	10	5	18.5	312.000	
2.5	85	5	15	5	22.5	207.000	
ortalama	2.2	80.75	9.25	10	17.04	14.77	308.950

\* İlk ve son sekretin dışındaki ana ejakülat

Öteyandan, sperması dondurulan köpeklerin, donmuş spermanın çözüm sonu ortalama spermatozoon motilite oranı (Tek yönlü hareket eden spermatozoon oranı) % 46.25 olarak elde edilmiştir. Bu spermaların, çözüm sonu spermatozoon oranı en düşük % 30, en yüksek ise, % 60 olmuştur. Bu arada, ortalama % 33.12 olan çözüm sonu ölü spermatozoon oranı, en düşük % 7.5 ve en yüksek % 58.5 olarak bulunmuştur. Aynı köpeklerin, çözüm sonu ortalama anormal spermatozoon oranı da, % 27.91 olmuştur. En düşük ve en yüksek anormal spermatozoon oranları da, sırasıyla % 12.5 ve % 50.5 olarak saptanmıştır. Çözüm sonu, en az 54.000 milyon/sm<sup>3</sup>, en yüksek ise, 115.000 milyon/sm<sup>3</sup> olarak bulunan spermatozoon yoğunluğu ortalama 79.583 milyon/sm<sup>3</sup> olarak elde edilmiştir. (Tablo 2).

Tablo 2. Değişik ırktan 4 köpeğin donmuş spermalarından çözüm sonu ortalama olarak elde edilen ortalama, en az ve en çok spermatolojik değerler.

V	Motilite (%)*		Ölü spermatozoon oranı (%)	Anormal spermatozoon oranı (%)	spermatozoon yoğunluğu (milyon/sm <sup>3</sup> )
	O	U			
46.25 (30-60)	7.91 (5-15)	45.80 (25-65)	33.12 (7.5-58.5)	27.91 (12.5-50.5)	79.583 (54000-115000)

\* V = Tek yönlü hareket eden spermatozoon oranı

O = Kendi etrafında dönenen spermatozoon oranı

U = Hareketsiz spermatozoon oranı

### Tartışma ve Sonuç

Araştırmada kullanılan değişik ırktan 4 köpeğin donmuş spermalarının çözüm sonu ortalama spermatozoon motilite oranı (Tek yönlü hareket eden spermatozoon oranı) % 46.25 olarak bulunmuştur. Bu değer, Harrop (13) un % 45; Huwer (16) in % 44.5; Gill ve ark. (11) nin % 40-50 olarak elde ettikleri çözüm sonu motilite oranlarına benzerlik göstermektedir.

Öteyandan, aynı değer (% 46.25), Foote (9) in % 41; Andersen (3) in % 40 olarak buldukları çözüm sonu motilite oranlarından bir ölçüde yüksek; Heidrich (14) in % 50 ve Aamdal ve ark. (1) nin da, % 60 olarak saptadıkları çözüm sonu spermatozoon motilite oranların dan ise düşüktür.

Bu farklılıklar, araştırmada kullanılan köpeklerin değişik ırktan olmaları ayanında, sperma sulandırıcıları ile spermayı dondurma teknik ve yöntemlerinin de farklı olmasından kaynaklanmış olabilir.

Aynı şekilde, donmuş köpek spermasını çözme süre ve ısıları ile spermayı değerlendirme yöntemlerinin de farklı olması, sonuçların bir ölçüde değişik olmasında etkili olmuş olabilir.

Bu çalışma sonuçları da, çoğu araştırmacısında (2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 15, 17, 18, 19, 20, 21) kaydettiği gibi, köpek spermasının ya kısa süre saklanarak, yada dondurulup uzun süre sıvı azot içinde tutularak tohumlamada kullanılabileceğini ve normal bir dölverimi alabilmek için diğer hayvan türlerinde olduğu gibi, köpek yetiştiriciliğinde de istenildiğinde başarıyla kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

### Kaynaklar

1. **Aamdal, J., Andersen, K. and Fougner, J.A.** (1972). *Insemination with frozen semen in the blue fox*. 7. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem., München.
2. **Andersen, K.** (1972). *Fertility of frozen semen*. Acta vet. scand., 13: 128-130.
3. **Andersen, K.** (1975). *Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique*. Zuchthygiene., 10: 1-4.
4. **Arbeiter, K.** (1968). *Hormones for the treatment of bitches*. Wiener tierartzl. Mschr., 55: 587.
5. **Arbeiter, K.** (1987). *Die künstliche Besamung in der Hundezucht ihre Vorteile und Gefahren*. Europa-Kongress Der Kynologie, Dortmund.
6. **Bahlau, E.** (1958). *Untersuchungen über die Konservierung von Hundesperma*. München, Univ. Veterinarmed. Fak., Dissertation.
7. **Brochart, M., und Coulomb, J.** (1952). *Recherches sur la dilution et la conservation du sperma de chien*. Bull. Acad. Vet. Fr., 25: 59-62.
8. **Busch, W., Löhle, K. und Peter, W.** (1982). *Künstliche Besamung bei Nutztieren*. VEB Gustav Fischer Verlag Jena, DDR.
9. **Foote, R.H.** (1964a). *Extenders for freezing dog semen*. Am. J. vet. Res., 25: 37-40.
10. **Foote, R.H. und 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: 78-89.
11. **Gill, H.P., Kaufman, C.F., Foote, R.H. und Kirk, R.W.** (1970). *Artificial insemination of Beagle bitches with freshly collected, liquid-stored and frozen-stored semen*. Am. J. Vet. Res., 31: 1807-1813.
12. **Harrop, A.E.** (1954b). *Artificial insemination of a bitch with preserved semen*. Brit. Vet. j., 110: 424-425.
13. **Harrop, A.E.** (1962). *Artificial insemination in the dog*. (Asquoted in Maule, J.R.P The semen of animals and artificial insemination. Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham Royal, England, 304-315).

14. **Heidrich, S.** (1977). *Ein Beitrag zur Tiefgefrierung von Rüdensperma*. Berlin Freie Univ. Fachber. Veterinarmed., Dissertation.
15. **Herout, N.** (1986). *Eine Analyse der Befruchtungsergebnisse besamter Hundinnen*. Wiener Tierarztl. Hochschule., Dissertation.
16. **Huwer, M.** (1984). *Untersuchungen zur Tiefgefrierkonservierung von Hundesperma unter Besonderer Berücksichtigung der Samenzentrifugation*. Hannover Tierarztl. Hochschule., Dissertation.
17. **Knaus, E.** (1982). *Die künstliche Besamung von Hundinnen mit defizienter Fruchtbarkeit*. Zuchthygiene., 17: 126.
18. **Laiblin, C., Rohloff, D. und Heidrich, S.** (1978). *Untersuchungen zur spermatogenetischen leistung von Beagle-Rüden*. Berl. Münch. tierarztl. Wochenschr., 91: 9-11.
19. **Martin, I.C.A.** (1963a). *The freezing of dog spermatozoa to -79 °C*. Res. vet. Sci., 4: 304-314.
20. **Seager, S.W.J.** (1968). *Successful pregnancies utilizing frozen dog semen*. A.I. Digest., 12: 6.
21. **Seager, S.W.J., Platz, C.C. und Fletcher, W.S.** (1975?). *Conception rates and related data using frozen dog semen*. J. Reprod. Fertil., 45: 189-192.