

DONDURULMUŞ SPERMALAR İLE TOHURLANAN KÖPEKLERDEN ELDE EDİLEN DÖLVERİMİ

Gülay KABASAKAL* Ongun KESKİN* Nafiz YURDAYDIN** Necmettin TEKİN***

Fertility Which Was Obtained From Bitches Inseminated By Frozen Semen.

Summary: *The aim of this research was to investigate freezing of ejaculates diluted with two different diluents and the relation to fertility and post-thawing sperm motility, percentage of dead sperm, percentage of abnormal sperm.*

In this experiment 10 male and 30 female (total 40) dogs were treated.

Ejaculates which were evaluated with regard to principal spermatological characteristics were frozen with Tris and Sodium citrate diluents in liquid nitrogen vapour.

Post-thawing sperm motility, percentage of dead sperm and percentage of abnormal sperm with Tris were recorded 55.0 2.7 %, 55.8 4.5% and 35.1 5.0% and the same characteristics with Sodium citrate 51.0 2.3%, 56.5 3.7% and 43.5 7.7% respectively.

The conception rate and litter size following inseminations with frozen semen were found 41.6% and 3.1 for Tris diluent 40.9% and 2.8 for Sodium citrate respectively.

Özet: *Bu çalışmanın amacı iki farklı sperma sulandırıcısı ile sulandırılan ejakülatların dondurulması ve çözüm sonu spermatozoa motilitesi, ölü spermatozoa oranı, anormal spermatozoa oranının fertilité ile ilişkisini araştırmaktır.*

Araştırmada 10'u erkek, 30'u dişi toplam 40 köpek kullanılmıştır.

Başlıca spermatolojik özellikler yönüyle değerlendirilen ejakülatlar Tris ve Sodyum sitrat sulandırıcılarıyla sıvı azot buharında dondurulmuştur.

Tris ile dondurulan spermalarda çözüm sonu spermatozoa motilitesi, ölü spermatozoa oranı ve anormal spermatozoa oranı sırasıyla %55.0 2.7, %55.8 4.5 ve %35.1 5.0 ve aynı özellikler Sodyum sitratla %51.0 2.3, %56.5 3.7 ve %43.5 7.7 kaydedilmiştir.

Dondurulmuş spermalarla tohumlamaları izleyerek gebelik oranı ve yavru oranı, Tris sulandırıcısı için %41.6 ve 3.1, Sodyum sitrat için %40.9 ve 2.8 bulunmuştur.

Giriş

Günümüzde biyoteknolojik bir yöntem ola-

rak kullanılan sun'i tohumlama, ilk kez 1780'de Spallanzani tarafından köpekler üzerinde gerçekleştirilmiştir (2, 3, 5).

* Dr. A.Ü. Vet. Fak., Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim D., Ankara.

** Doç. Dr. A.Ü. Vet. Fak., Dölerme ve Sun'i Tohumlama ABD, Ankara.

*** Prof. Dr. A.Ü. Vet. Fak., Dölerme ve Sun'i Tohumlama ABD, Ankara.

Özellikle vücut yapılarının farklılığı nedeniyle çiftleşemeyen köpeklerde sun'i tohumlama yönteminden büyük ölçüde yararlanılmaktadır (1, 7, 11, 13, 14).

Bu konuda çalışmalar yapan Brochart ve Coulomb (4), köpek spermasını sulandırıp +4°C'da saklayarak yaşama süresini incelemiştir. Harrop (9) ise, aynı yöntemle 140 saat sakladığı spermalar ile tohumladığı köpeklerden normal bir dölverimi elde etmiştir.

Bu gelişmelerden sonra, Harrop (9), %10 gliserol bulunduran sulandırıcılar kullanarak spermaları ampuller içerisinde dondurmuştur. Gill ve ark. (8), %8 gliserol içeren Tris sulandırıcısı ile sulandırıp dondurdukları spermalarda çözüm sonu spermatozoa motilitesinin %40-50 arasında değiştiğini saptamışlardır.

Değişik sulandırıcılar ile köpek spermasını donduran Reidrich (10) çözüm sonu spermatozoa motilitesini %50, Huwer (12) %44.5 olarak bildirmişlerdir.

Öte yandan, Farstad (6), yaptığı bir çalışmada taze sperma ile tohumladığı köpeklerde %84, dondurulmuş spermalarla tohumladığı köpeklerde ise %67, Olar ve ark. (15) dondurulmuş spermalarla tohumladıkları köpeklerden %25 oranında dölverimi elde etmişlerdir.

Seager ve ark. (16) ise, taze sperma ile tohumladıkları köpeklerden %64.5 dondurulmuş spermalarla tohumladıkları köpeklerden ise %65.8 oranında dölverimi almışlardır. Smith (17) intrauterin olarak tohumladığı 11 köpekten 5'inin, intravaginal tohumladığı 9 köpekten ise sadece birinin yavruladığını tespit etmiştir.

Bu çalışma, köpek spermasının dondurulması yanında, dondurulmuş spermalarla yapılan tohumlamalardan normal bir dölverimi alınıp alınamayacağını ortaya koymak amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metod

Bu çalışmada, 10'u erkek, 30'u dişi olmak üzere değişik ırktan toplam 40 köpek kullanılmıştır. Masaj yöntemiyle alınan ejakülatların, spermatozojik değerlendirmeleri yapıldıktan sonra, %7 Gliserol içeren Tris ve Sodyum sitratla sulandırılarak, 0.25 cm³ hacmindeki payetlere çekilmiştir. Bu spermalar, 2 saat süreyle +4°C da bekletilip (Equilibration) sıvı azot buharında dondurularak sıvı azot içerisinde saklanmıştır. Dondurulmuş spermalar su banyosunda 40°C'da 15 saniyede çözülerek çözüm sonu spermatozoa motilitesi, ölü spermatozoa oranı ve anormal spermatozoa oranı yönüyle değerlendirilmiştir.

Köpeklerin tohumlanması için, östrusun görsel beldeklerini gösterenlerden vaginal smear örnekleri alınarak optimal tohumlama zamanı tespit edilmiştir. Tohumlama zamanı belirlenen köpekler, taze (kontrol) ve dondurulmuş spermalarla intravaginal olarak iki kez tohumlanmıştır.

Bulgular

Tris ve Sodyum sitrat sulandırıcısı ile dondurulan toplam 60 ejakülatla belirlenen çözüm sonu spermatozojik değerlerin genel ortalamaları Tablo 1'de sunulmuştur.

Çalışma süresince, Tris sulandırıcısı ile dondurulan köpek ejakülatlarında çözüm sonrası spermatozojik özelliklerden spermatozoa motilitesi, ölü spermatozoa oranı ve anormal spermatozoa oranı yönünden en yüksek değerler sırasıyla %70.0 (6 nolu köpek), %67.0 (5 ve 6 nolu köpekler), %59.0 (2 nolu köpek) olurken, en düşük değerler %40.0 (2 nolu köpek), %20.0 (f nolu köpek), %15.0 (1 ve 3 nolu köpekler) bulunmuştur.

Sodyum sitratla sulandırılıp dondurulan ejakülatlarda aynı özellikler sırasıyla en yüksek %60.0 (1 ve 6 nolu köpekler), %72.0 (2 nolu köpek), %87.0 (3 nolu köpek) ve en düşük %40.0 (4 nolu köpek), %30.0 (1 nolu köpek) ve %15.0 (1 nolu köpek) olarak kaydedilmiştir.

Tris ile sulandırılan spermalarda sırasıyla genel ortalama spermatozoa motilitesi %55.0 2.7, ölü spermatozoa oranı %55.8 4.5 ve anormal spermatozoa oranı %35.1 5.0 olarak saptanmıştır (Tablo 1). Sodyum sitratla dondurulan spermalarda ise, aynı spermatozojik özelliklerin genel ortalamaları sırasıyla %51.0 2.3, %56.5 3.7 ve %43.5 7.7 olarak belirlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 1. Değişik ırktan köpek spermalarında saptanan çözüm sonu spermatozojik değerlerin genel ortalamaları (%).

Schedule 1. The general averages of post-thawing spermatozoological values which was determined in dog's semen from various breed (%).

Köpek ejakülatı	Sulandırıcı	n	\bar{x}	$s\bar{x}$
Spermatozoa motilitesi %	Tris	10	55.0	2.7
	Sodyum sitrat	10	51.0	2.3
Ölü spermatozoa oranı %	Tris	10	55.8	4.5
	Sodyum sitrat	10	56.5	3.7
Anormal spermatozoa oranı %	Tris	10	35.1	5.0
	Sodyum sitrat	10	43.5	7.7

Tablo 2. Değişik ırktan köpeklerde taze ve dondurulmuş spermalarla tohumlama ve dölverimi sonuçları (%).
Schedule 2. The fertility and insemination results with fresh and frozen semen in bitches from various breed (%).

Sperma	Köpek No										Toplam	Ortalama doğum oranı (%)	Ortalama yavru oranı			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10						
Sulandırıcılar	(Tris)															
	Tohumlama s.	3	2	3	3	2	2	3	2	3	1	24				
	Doğum sayısı	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	41.6	3.1		
	Yavru sayısı	2	4	4	3	3	3	3	3	3	4	2	31			
	(Sodyum sitrat)															
	Tohumlama s.	2	2	3	4	1	2	2	2	2	2	22				
Doğum sayısı	1	-	1	1	1	-	1	1	2	1	9	40.9	2.8			
Yavru sayısı	5	-	5	2	3	-	3	3	5	2	28					
Taze sperma	Tohumlama s.	3	1	1	1	4	2	2	2	3	2	21				
	Doğum sayısı	2	1	1	1	3	2	2	2	2	1	17	80.9	5.1		
	Yavru sayısı	5	6	4	2	10	7	5	4	5	3	51				

Değişik ırktan köpeklerden alınan spermalar dondurulduktan sonra tohumlamada kullanılmış ve dölverimleri değerlendirilmiştir. Tablo 2'de taze ve dondurulmuş spermaya ilişkin tohumlama, doğum ve yavru sayıları ile oranları verilmiştir.

Tablodan da görülebileceği gibi, genel ortalama doğum oranı ve ortalama yavru oranı Tris sulandırıcısı ile 24 tohumlamada %41.6 ve 3.1 olurken, sodyum sitrat ile 22 tohumlamada %40.9 ve 2.8 olarak saptanmıştır.

Tartışma ve Sonuç

Araştırmada kullanılan değişik ırktan köpeklerin dondurulmuş spermalarında belirlenen çözüm sonu ortalama spermatozoa motilitesi Tris sulandırıcısı ile dondurulan ejakülatlarda %55.0 ve Sodyum sitratla %51.0 olarak bulunmuştur. Bu değerler, Harrop (9)'un %45, Gill ve ark. (8)'nin %40-50 ve Heidrich (10)'in %50 olarak bildirdikleri değerlere benzerlik göstermektedir.

Aynı değerler Farstad (6)'nin %41, Andersen (2)'nin %40, Huwer (12)'in %44 olarak buldukları çözüm sonu motilitelerinden yüksek bulunmuştur.

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

Araştırmada, Tris ve Sodyum sitrat ile sulandırılarak dondurulan değişik ırktan köpeklerin spermaları ile toplam 30 dişi tohumlanmıştır.

Tris sulandırıcısı ile dondurulan spermalarla tohumlanan köpeklerden %41.6, Sodyum sitrat ile %40.9 doğum oranı elde edilirken, taze spermalarla tohumlanan 21 dişi köpekte ise doğum oranı %80.9 olarak gerçekleşmiştir.

Taze spermalarla, dondurulmuş spermalarla elde edilen ortalama doğum oranları yönüyle gözlenen farklılıklar önemli ($P < 0.05$) bulunmuştur. Taze (5.1) ve dondurulmuş spermalarla (3.1 ve 2.8) sağlanan yavru oranları arasında da önemli ölçüde ($P < 0.05$) farklılıklar saptanmıştır.

Bu konuda araştırmalar yapan Farstad (6), taze spermalarla tohumladığı köpeklerde %84, dondurulmuş spermalarla ise %67 gebelik oranı saptamıştır. Seager ve ark. (16) taze spermalarla tohumladıkları köpeklerde %64.5, dondurulmuş spermalarla %65.8 gebelik oranı belirlemiştir.

Aynı konuda araştırmalar yapan Olar ve ark. (15), dondurulmuş spermalarla tohumladıkları köpeklerde %25, Forsberg (7) ise, normal bir gebelik oranı elde ettiklerini bildirmişlerdir. Oysa 470 tohumlama gerçekleştiren Smith (17) dondurulmuş spermalarla %69.3 oranında gebelik sağlamıştır.

Köpeklerde genellikle dondurulmuş spermalarla yapılan tohumlamalardan, taze spermalarla tohumlama ve doğal çiftleşmeye göre daha düşük dölverimi elde edilmektedir. Bu çalışma sonuçları ile diğer araştırmacıların sonuçları arasında gözlenen farklılıklar, tohumlamada kullanılan ejakülatların spermatolojik özelliklerinden ileri gelebileceği gibi, dişi köpeklerde östrus ve evreleriyle, optimum tohumlama zamanının tam saptanamamış olması ve tohumlama teknik ve yöntemlerinden de kaynaklanmış olabilir.

Sonuç olarak, bu çalışma köpek spermasının da dondurularak uzun süre saklanıp, bu spermalarla yapılan tohumlamalardan normal bir dölverimi alınabileceği ortaya konmuştur.

Ayrıca, son yıllarda hızla gelişen köpek yetiştiriciliği sektöründe biyoteknolojik bir yöntem olan sun'i tohumlamanın pratikliği ve ucuzluğu yanında, doğal çiftleşmeyle geçebilecek kimi hastalıkları da önlemede etkin bir yöntem olduğu gözlenmiştir.

Kaynaklar

1. Aamdal, J., Andersen, K. and Fouger, J.A. (1972): *Insemination with frozen semen in the blue fox*. 7. Int Congr Anim Reprod Artif Insem, München.
2. Andersen, K. (1975). *Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique*. Zuchthyg, 10: 1-4.
3. Arbeiter, K. (1987). *Die künstliche Besamung in der Runderzucht: Vorteile und Gefahren*. Europe-Kongress Der Gynologie, Dortmund.
4. Brochart, M., Coulomb, J. (1958). *Recherches sur la dilution et la conservation du sperma de chien*. Bull Acad Vet Fr, 25: 59-62.
5. Busch, W., Löhle, K. und Peter, W. (1982). *Künstliche Besamung bei Nutztieren*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, DDR.
6. Farstad, W. (1984): *Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen*. 3. Sm Anim Proc, 25: 561-565.
7. Forsberg, C.L. (1991). *Veterinary Clinics of North America*. Sm Anim Prac, 21: 11-15.
8. 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.
9. Harrop, A.E. (1954). *Artificial insemination of a bitch with preserved semen*. Brit Vet J, 110: 424-425.
10. Heidrich, S. (1977). *Ein Beitrag zur Tiefgefrierung von Rüdensperma*. Berlin Freie Univ, Fachber, Veterinarmed, Diss.
11. Herout, N. (1986). *Eine Analyse der Befruchtungsergebnisse besamter Hündinnen*. Wiener Tierarztl, Hochschule, Diss.
12. Huwer, M. (1984). *Untersuchungen zur Tiefgefrierkonservierung von Hundesperma unter Besonderer Berücksichtigung dersamenzentrifugation*. Hannover Tierarztl Houshshule, Diss.
13. Knaus, E. (1982). *Die künstliche Besamung von Hündinnen mit defizienter Fruchtbarkeit*. Zuchthyg, 17: 126.
14. Laiblin, C., Rohloff, D. und Hedrich, S. (1978): *Untersuchungen zur spermatogeneitischen leistung von Beagle-Rüden*. Berlin Tierarztl Wochenshr, 91: 9-11.
15. Olar, T.T., Bowin, R.A. and Pickett, B.W. (1987). *Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws*. J Reprod Fertil, 45: 461.
16. Seager, S.W.J., Platz, C.C. and Fletcher, W.S. (1975). *Conception rates and related data using frozen dog semen*. J Reprod Fertil, 45: 189-192.
17. Smith, O.F. (1985). *Cryopreservation of canine semen technique and performance*. Diss Abstr Int, 45: 92.