

## Köpek spermasının dondurulması üzerine bireysel özelliklerin ve farklı sulandırıcıların etkisi

Ergun AKÇAY, Necmettin TEKİN

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Ankara

**Özet:** Bu çalışmada, 4 Kangal çoban köpeğinden alınan spermalar Tris ve laktöz sulandırıcıları ile dondurularak, dondurma öncesi ve çözüm sonrası başlıca spermatolojik özellikler belirlenmiş, bireysel özelliklerin ve farklı sulandırıcıların sperma dondurulması üzerine etkileri incelenmiştir. Spermanın dondurulmasında, 4 köpekten alınan toplam 20 ejakulat kullanılmıştır. Alınan ejakulatlar %20 yumurta sarısı ve %4 gliserol içeren iki farklı sulandırıcı (Tris ve laktöz) ile sulandırılarak 0.5 ml'lik payetlere çekilmiş ve 2 saat ekilibrasyona bırakılmıştır. Spermalar ekilibrasyon sonrası spermatolojik muayeneler yapılarak sıvı azot buharında (-120°C) 7 dakikada dondurulmuş ve sıvı azot içinde depolanmıştır. Daha sonra payetler 40°C'deki su banyosunda 10 saniyede çözülürerek çözüm sonrası spermatolojik muayeneler yapılmıştır. Yapılan muayeneler sonucunda Tris sulandırıcısında ekilibrasyon sonrası ve çözüm sonrası spermatozoa motilitesi sırasıyla %65.6 ve %49.0; laktöz sulandırıcısında ise aynı değerler %59.8 ve %33.8 olarak saptanmıştır. Tris sulandırıcısında çözüm sonrası anormal ve ölü spermatozoa oranları %26.6 ve %31.9; laktöz sulandırıcısında %37.6 ve %46.0 olarak saptanmıştır. Buna ek olarak, laktöz sulandırıcısı ile dondurulan spermalarda anormal kuyruk oranları büyük artış göstermiştir. Sonuç olarak, spermanın dondurulmasında aynı yetiştirme şartlarında tutulan ve aynı yaşta olan köpeklerde bireysel özellikler önemli bulunmamıştır. Ancak, sulandırıcılar yönünden değerlendirildiğinde Tris sulandırıcısının laktöz sulandırıcısına göre daha üstün olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Köpek sperması, sperma sulandırıcıları, spermanın dondurulması, spermatolojik özellikler

### The effect of individual properties and various extenders on dog semen cryopreservation

**Summary:** In this study, semens which were collected from 4 Kangal sheepdogs were cryopreserved in two different diluents (Tris and lactose). The primary spermatological properties after equilibration and after thawing were determined, and the effects of the diluents and individual properties of dogs on spermatozoa viability were examined. In semen cryopreservation, 20 ejaculates collected from 4 dogs were treated. The collected ejaculates were diluted in Tris and lactose including 20% egg yolk and 4% glycerol, packaged 0.5 ml straws and were left to equilibration for 2 hours. After equilibration, spermatological examinations were performed and semens were frozen in liquid nitrogen vapour (-120°C) for 7 minutes, then stored in liquid nitrogen. Later on, the straws were thawed in a water bath at 40°C for 10 seconds, and post-thaw spermatological properties were determined. Following the examinations were performed, the spermatozoal motility in the semen which was diluted with Tris diluent, after equilibration and after thawing was 65.6% and 49.0%, respectively; in lactose diluent the same values were 59.8% and 33.8%. The percentage of abnormal and dead spermatozoa after thawing in Tris diluent were 26.6% and 31.9%, in lactose diluent 37.6% and 46.0%. In addition, abnormal tail rates in lactose diluent were significantly raised. Consequently, individual properties of the dogs which were same ages and were kept same breeding conditions were not found significant in semen cryopreservation. However, in regard to diluents, Tris diluent was found to be better than lactose.

Key words: Dog semen, semen cryopreservation, semen diluents, spermatological properties

### Giriş

Spermanın muayenesi ve değerlendirilmesi, erkek hayvanların döleme yeteneklerini (*potentia generandi*) ortaya koyması nedeniyle yetiştiricilikte ve damızlık seçiminde oldukça önemlidir. Diğer androlojik muayenelerde normal değerler elde edilse bile, spermatolojik özelliklerden birinde meydana gelen olumsuzluk fertilizasyonu doğrudan etkiler ve bu durum ekonomik kayıplara yol açar (27).

Buna ek olarak, aynı ırk içerisinde farklı bireylerin döleme yetenekleri de bakımı, besleme, çevre koşulları ve genetik faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir (11,21,27).

Tekin ve ark. (29) Kangal ve Alman çoban köpekleri üzerine yaptıkları bir çalışmada spermatozoa motilitesini %62.6 ve %67.8, yoğunluğu ( $\times 10^6/ml$ ) 524 ve 305.8, anormal spermatozoa yüzdesini 7.9 ve 6.2, ölü spermatozoa yüzdesini 6.7 ve 6.1, sperma pH'sını ise 6.1 ve 6.2 olarak saptadıklarını bildirmişlerdir. Hendrikse ve Antonisse (12) 1-9 yaşları arasındaki 121 değişik ırk erkek köpekten topladığı 2024 ejakulatu değerlendirmişler ve motilite, anormal ve total spermatozoa sayısını sırasıyla %71, %14 ve  $853 \times 10^6$  olarak saptamıştır. Aynı araştırmacılar, yaşın ilerlemesi ile birlikte motilitenin düştüğünü, anormal spermatozoa oranının arttığını ve yoğunluğun azaldığını gözlemlemişlerdir.

Çiftleşme sorunu yaşayan köpeklerde, dondurulmuş sperma ile sun'i tohumlama son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Köpek sperması üzerinde yapılan çalışmalara bağlı olarak Amerika Birleşik Devletleri, Kanada ve bazı Avrupa ülkelerinde köpek spermasının dondurulması büyük bir endüstri haline gelmiş ve bu alanda ticari faaliyet gösteren birçok sperma bankası (Canine Cryobank, Canine Breeder Service, Cryo-Genetic Laboratories, International Canine Semen Bank ve Spermco) kurulmuştur. Bu amaçla, hem değerli köpek ırklarının saf yetiştirilmesi yapılabilmekte hem de maddi yönden büyük kazançlar sağlanmaktadır (26).

Başarılı bir cryopreservasyon işlemi için uygun sulandırıcı ve soğuktan koruyucu maddelerin kullanılması gereklidir. Spermatozoanın metabolik aktivitesi hidrojen iyonlarının açığa çıkmasına neden olur. Açığa çıkan bu iyonların taşınması için bir mekanizmanın olmaması sulandırıcı pH'sının düşmesine ve dolayısıyla motilite ve fertilité gücünün azalmasına yol açmaktadır. Bu nedenle, tampon solüsyonların sperma sulandırıcılarında kullanılması zorunludur (5). İlk yapılan çalışmalarda krebs-ringer fosfat tampon solüsyonları kullanılmış, daha sonra Seager ve ark. (24) %11 laktoz içeren sulandırıcı ile başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Günümüzde dipolar iyon (zwitterionic) tampon solüsyonları sperma sulandırılmasında kullanılmaktadır. Bunlardan en önemlisi Tris-sitrat-yumurta sarısı sulandırıcısıdır.

Köpek spermasının dondurulması ile ilgili ilk çalışmalarda (22,23) katı CO<sub>2</sub> (kuru buz, -79°C) üzerinde pelet şeklinde dondurma yöntemi kullanılmıştır. Ancak, daha sonra yapılan çalışmalarda (3) pelet yöntemi ile payet yöntemi arasında fark olmadığı bildirilmiş, buna karşın kuru buz-pelet yönteminin laktoz sulandırıcısında daha başarılı olduğu, sıvı azot buharında payetlerde yapılan dondurmada ise Tris sulandırıcısının daha iyi sonuçlar verdiği saptanmıştır (20,31,33). Ayrıca, Olar ve ark. (20) payetlerde sperma dondurmanın pelet ve ampul yöntemlerine göre bir takım avantajlara sahip olduğunu özellikle de identifikasyon, saklama ve çözüm kolaylığı sağladığını bildirmişlerdir.

Oettle (17) her bir dondurma tekniğinin başarısı için nihai testin gebelik oranı olduğunu, ancak dişi köpeğin östrus siklusları arasındaki sürenin uzun olması nedeniyle bunun çok uzun zaman alacağını, buna karşılık spermanın fertilité gücünün belirlenmesi gerektiğini, bu nedenle spermatozoanın morfolojik olarak özellikle de akrozomun muayenesinin gerekli olduğunu bildirmiştir.

Bu çalışmada, aynı ırktan köpeklerde bireysel özelliklerin ve değişik sulandırıcıların ekilibrasyon son-

rası ve çözüm sonrası spermatolojik özellikler üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

### Materyal ve Metot

Bu çalışmada, 4 yaşlarında 4 Kangal çoban köpeği kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan köpekler damızlık nitelikli, fertil ve aynı koşullarda yetiştirilen köpekler arasından seçilmiş, köpeklerden üç gün ara ile 5'er ejakulat alınarak toplam 20 ejakulat değerlendirmeye alınmıştır.

Köpeklerden sperma, penis masajı yöntemiyle (dijital manipülasyon) alınmıştır.

### Spermanın muayenesi

Köpeklerden sperma alındıktan sonra başlıca spermatolojik özelliklerden miktar (ml), motilite (%), yoğunluk (x10<sup>6</sup>/ml), anormal spermatozoa (%), ölü spermatozoa (%) ve pH değerleri saptanmıştır. Yoğunluk tayini için spermatozoonların dengeli dağılımlarını sağlayan Hayem solüsyonu, anormal spermatozoa tespiti için Hancock tespit solüsyonu, ölü spermatozoa tayini için %3'lük sodyum sitrat solüsyonu içinde %2'lik olarak hazırlanmış eosin boyası kullanılmıştır (29).

### Spermanın sulandırılması ve dondurulması

Spermatolojik muayeneleri yapılan sperma aşağıda bileşimleri verilen Tris ve laktoz sulandırıcıları ile (33) 1 kısım sperma, 4 kısım sulandırıcı olmak üzere sulandırılmıştır.

Sulandırma işleminden sonra sperma 0.5 ml'lik payetlere çekilerek, payetler polivinil alkol ile kapatılmıştır. Daha sonra sperma 4°C'deki buzdolabına transfer edilerek 2 saat alışma (ekilibrasyon) bırakılmıştır. Dondurma işleminden önce, payetlerden birer numune alınarak her bir köpek için ekilibrasyon sonrası spermatolojik özellikler saptanmıştır. Spermanın ekilibrasyon işlemi tamamlandıktan sonra payetler sıvı azot buharında -120°C'de 7 dakikada dondurularak, -196°C'de sıvı azot içinde saklanmıştır.

Spermanın çözüm işlemi 40°C'deki su banyosunda 10 saniyede gerçekleştirilmiş ve çözüm sonrası spermatolojik özellikler yeniden değerlendirilmiştir.

#### Tris ana solüsyonu

Tris	2,90 g
Fruktoz	1,25 g
Sitrik asit	1,32 g
Distile su (add)	100 ml

#### Laktoz ana solüsyonu

Laktoz	7,56 g
Distile su (add)	100 ml

Ana solüsyon	76 ml	Ana solüsyon	76 ml
Gliserol	4 ml	Gliserol	4 ml
Yumurta sarısı	20 ml	Yumurta sarısı	20 ml
Streptomisin	100 mg	Streptomisin	100 mg
Kristal penisilin	100.000 IU	Kristal penisilin	100.000 IU

**Bulguların değerlendirilmesi**

Gruplar arasındaki farklılıklar tek yönlü varyans analizi ile, farklılığı önemli bulunan gruplar ise Duncan testi ile belirlenmiştir. Köpekler arasındaki farklar ise Mann-Whitney U testi ile saptanmıştır (28).

**Bulgular**

Taze spermadan elde edilen spermatojik özelliklere ait veriler Tablo 1'de verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucu 4. köpek ile diğer köpekler arasında, pH değeri yönünden ortalamalar arasındaki fark önemli bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Diğer spermatojik özel-

likler yönünden köpek ortalamaları arasındaki fark önemli değildir ( $p>0.05$ ).

Dondurulan spermalarda ekilibrasyon sonrası ve çözüm sonrası elde edilen spermatojik özellikler Tablo 2 ve 3'de verilmiştir.

Buna göre ekilibrasyon sonrası Tris sulandırıcısı için elde edilen spermatojik bulgularda köpekler arasında farklılık saptanamamıştır (Tablo 2). Ancak, laktoz sulandırıcısı için ölü spermatozoa oranı 2. köpekte yüksek saptanmış ( $17\pm1.7$ ) ve bu fark  $p<0.05$  düzeyinde önemli bulunmuştur (Tablo 3). Ayrıca, Tris ve laktoz sulandırıcılarının her ikisinde de ekilibrasyon sonrası en

Tablo 1. Köpeklerden elde edilen ejakülatlarda spermatojik bulgular.  
Table 1. Spermatojik findings in dog ejaculates.

	1. köpek	2. köpek	3. köpek	4. köpek	ÖD	Genel $\bar{x}\pm s_x$ n=20
	$\bar{x}\pm s_x$	$\bar{x}\pm s_x$	$\bar{x}\pm s_x$	$\bar{x}\pm s_x$		
	n=5					
Miktar	1.8±0.1	1.7±0.3	2.6±0.7	1.5±0.2	-	1.9±0.2
Motilite	74.0±4.0	71.0±1.0	74.0±3.0	72.0±3.0	-	72.7±1.4
Yoğunluk	382.0±91.1	269.5±39.5	275.0±92.0	262.5±78.0	-	297.2±37.5
Anormal						
Akrozom	0.2±0.0	1.2±0.2	1.2±1.0	1.2±0.2	-	0.9±0.2
Baş	0.6±0.0	1.0±0.3	1.0±0.6	0.6±0.0	-	0.8±0.2
Orta	6.0±1.5	5.6±1.4	7.0±1.0	5.6±1.4	-	6.0±0.6
Kuyruk	3.0±1.2	2.6±0.9	3.2±1.0	2.8±0.6	-	2.9±0.4
Toplam	9.8±2.2	10.4±1.7	12.4±1.8	10.2±2.3	-	10.7±0.9
Ölü	11.0±1.4	11.8±1.1	9.8±1.4	10.2±1.1	-	10.7±0.6
pH	6.1±0.1 <sup>a</sup>	6.3±0.1 <sup>a</sup>	6.3±0.1 <sup>a</sup>	6.6±0.1 <sup>b</sup>	*	6.3±0.01

\* $p<0.05$  (grup ortalamaları arası fark önemlidir)

- $p>0.05$  (grup ortalamaları arası fark önemli değildir)

a,b,c: Farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki fark önemlidir

ÖD: Önemlilik derecesi

Tablo 2. Köpeklerde Tris sulandırıcısı için ekilibrasyon sonrası ve çözüm sonrası elde edilen bulgular.  
Table 2. Determinated findings after equilibration and after thawing in Tris diluent in dogs.

	Ekilibrasyon sonrası				ÖD	Çözüm sonrası				Ö.D
	1. köpek	2. köpek	3. köpek	4. köpek		1. köpek	2. köpek	3. köpek	4. köpek	
	n=5					n=5				
Motilite	63.0±2.0	61.0±4.0	66.0±2.4	70.0±3.5	-	45.0±5.0	42.0±9.0	61.0±4.0	50.0±8.5	-
Anormal										
Akrozom	1.0±0.0	1.2±0.2	1.2±0.4	2.2±0.7	-	5.8±1.3	5.0±0.7	5.0±0.7	5.4±0.7	-
Baş	1.0±0.2	1.2±0.4	2.6±1.6	1.2±0.2	-	1.8±0.3	0.4±0.0	2.2±0.2	0.4±0.0	-
Orta	8.2±2.2	15.0±2.7	11.2±0.9	10.0±1.9	-	8.2±1.8 <sup>a</sup>	9.6±1.5 <sup>a</sup>	16±3.3 <sup>b</sup>	15.8±1.6 <sup>b</sup>	*
Kuyruk	3.0±0.7	5.0±1.0	6.4±0.7	5.2±1.6	-	8.2±1.1	9.8±2.7	6.4±1.7	7.0±1.0	-
Toplam	13.2±2.7	22.6±3.0	21.6±2.2	18.6±3.6	-	24.0±3.1	24.8±3.9	29.6±4.6	27.8±1.4	-
Ölü	14.6±1.9	17.8±4.1	15.2±1.6	15.4±1.6	-	35.6±3.9	42.8±8.7	23.2±2.8	30.6±9.7	-
pH	6.2±0.2	6.2±0.1	6.5±0.2	6.7±0.1	-	6.4±0.01 <sup>a</sup>	6.2±0.1 <sup>a</sup>	6.8±0.1 <sup>b</sup>	6.8±0.2 <sup>b</sup>	*

\* $p<0.05$  (grup ortalamaları arası fark önemlidir)

- $p>0.05$  (grup ortalamaları arası fark önemli değildir)

a,b,c,d: Farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki fark önemlidir

ÖD: Önemlilik derecesi

Tablo 3. Köpeklerde laktöz sulandırıcısı için ekilibrasyon sonrası ve çözüm sonrası elde edilen bulgular.  
Table 3. Determinated findings after equilibration and after thawing in lactose diluent in dogs.

	Ekilibrasyon sonrası				ÖD	Çözüm sonrası				Ö.D
	1. köpek x±sx	2. köpek x±sx	3. köpek x±sx	4. köpek x±sx		1. köpek x±sx	2. köpek x±sx	3. köpek x±sx	4. köpek x±sx	
	n=5					n=5				
Motilite	53.0±3.0	53.0±4.3	62.0±3.7	66.0±5.0	-	27.0±6.6	36.0±5.7	28.0±6.6	38.0±8.7	-
Anormal										
Akrozom	0.4±0.0	0.8±1.0	1.2±0.2	0.8±0.6	-	8.4±1.9	5.2±1.7	8.8±0.9	8.2±1.3	-
Baş	1.0±0.3	1.8±0.5	2.6±1.3	0.4±0.0	-	1.6±1.0 <sup>b</sup>	1.2±0.5 <sup>b</sup>	2.4±0.6 <sup>a</sup>	0.8±0.6 <sup>a</sup>	*
Orta	10.2±2.4	12.8±1.7	8.8±1.3	6.2±0.6	-	12.2±0.9	14.2±2.0	10.0±1.9	8.6±0.9	-
Kuyruk	9.6±1.0	10.0±3.0	12.4±2.1	9.8±2.4	-	10.0±1.0 <sup>a</sup>	16.4±2.9 <sup>bc</sup>	20.0±1.5 <sup>c</sup>	11.6±2.4 <sup>ab</sup>	*
Toplam	21.2±2.6	25.4±4.0	25.0±3.3	16.6±2.2	-	32.2±1.7	37.0±5.2	39.2±3.2	29.4±3.5	-
Ölü	17.4±1.4 <sup>a</sup>	24.0±3.0 <sup>a</sup>	17.0±1.7 <sup>b</sup>	15.2±2.1 <sup>b</sup>	*	50.6±10.6	41.0±8.5	55.2±7.7	45.2±8.6	-
pH	5.8±0.1	6.1±0.1	6.0±0.1	6.0±0.1	-	6.0±0.1	5.6±0.01	5.7±0.1	5.7±0.1	-

\*p<0.05 (grup ortalamaları arası fark önemlidir)

-p>0.05 (grup ortalamaları arası fark önemli değildir)

a,b,c,d: Farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki fark önemlidir

ÖD: Önemlilik derecesi

yüksek motilite 4. köpekte (%70±3.5, %66±5.0) saptanmıştır. Ancak, bu fark istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır. Her iki sulandırıcının ekilibrasyon sonrası spermatozoa morfolojisi üzerine etkilerini araştırmak amacıyla yapılan değerlendirmede toplam anormal spermatozoa oranı içinde, anormal akrozom, baş, orta kısım ve kuyruk oranları da saptanmış ve köpekler arasında farklılık gözlenmemiştir (Tablo 2 ve 3).

Köpekler arasında çözüm sonrası elde edilen veriler değerlendirildiğinde ise, Tris sulandırıcısında diğer anormal spermatozoa oranları arasında fark olmamasına rağmen orta kısım anomalileri dikkate alındığında 3. ve 4. köpek ile 1. ve 2. köpekler arasında farklılık gözlenmiştir (p<0.05). Aynı köpeklerde elde edilen pH değerleri arasında da farklılık saptanmıştır. Tris sulandırıcısında istatistiksel olarak önemsiz olsa da, en yüksek spermatozoa motilitesi ise %61 ile 3. köpekte elde edilmiştir (Tablo 2). Benzer durum laktöz sulandırıcısında da gözlenmiştir. Anormal spermatozoa oranları arasında fark olmamasına rağmen baş ve kuyruk anomalileri arasındaki farklar önemli bulunmuştur (p<0.05). Laktöz sulandırıcısında çözümü sonrası en yüksek spermatozoa motilitesi ise %38 ile 4. köpekte elde edilmiştir (Tablo 3).

Ekilibrasyon sonrası ve çözüm sonrası elde edilen veriler sulandırıcılar yönünden değerlendirildiğinde ise, sulandırıcılar arasında farklılıklar oluşmuştur. Her iki sulandırıcı ekilibrasyon sonrası elde edilen bulgular yönünden birbirleri ile karşılaştırıldığında spermatozoa motilitesi ve pH ortalamaları arasındaki fark önemli (p<0.05), ölü ve anormal spermatozoa ortalamaları arasındaki fark önemsiz (p>0.05) olarak saptanmıştır. Buna

ek olarak, laktöz sulandırıcısında elde edilen anormal kuyruk oranları p<0.001 düzeyinde önemlilik göstermiştir (Tablo 4).

Tris ve laktöz sulandırıcılarında çözüm sonrası elde edilen bulguların istatistiksel karşılaştırmasında bütün spermatojenik özellikler arasındaki farkın önemli (p<0.001, p<0.05) olduğu saptanmıştır (Tablo 5). Her iki sulandırıcıda toplam anormal spermatozoa oranları arasındaki farklar önemli (p<0.001) olmasına rağmen, anormal baş ve orta kısım oranları arasındaki fark önemsiz (p>0.05) bulunmuştur. Buna karşılık, anormal akrozom ve kuyruk oranları arasındaki fark önemli (p<0.001, p<0.01) bulunmuştur.

Tablo 4. Tris ve laktöz sulandırıcılarında ekilibrasyon sonrası spermatojenik bulgular.

Table 4. Spermatological findings after equilibration in Tris and lactose diluents.

	Tris n=20 x±sx	Laktöz n=20 x±sx	ÖD
Motilite (%)	65.0±1.6	58.5±2.2	*
Anormal (%)			
Akrozom	1.61±0.2	1.54±0.2	
Baş	1.9±0.4	2.0±0.4	-
Orta	11.1±1.1	9.5±0.9	-
Kuyruk	4.9±0.5	10.4±1.0	***
Toplam	19.0±1.6	22.0±1.6	-
Ölü (%)	15.7±1.2	18.4±1.2	-
pH	6.4±0.01	5.9±0.01	*

\*p<0.05 (grup ortalamaları arası fark önemlidir)

\*\*\*p<0.001 (grup ortalamaları arası fark önemlidir)

-p>0.05 (grup ortalamaları arası fark önemli değildir)

ÖD: Önemlilik derecesi

Tablo 5. Tris ve laktoz sulandırıcılarında çözüm sonrası spermatolojik bulgular.

Table 5. Spermatological findings after thawing in Tris and lactose diluents.

	Tris n=20 $\bar{x}\pm s_x$	Laktoz n=20 $\bar{x}\pm s_x$	ÖD
Motilite (%)	49.5 $\pm$ 3.6	32.2 $\pm$ 3.4	***
Anormal (%)			
Akrozom	5.3 $\pm$ 0.4	7.6 $\pm$ 0.7	**
Baş	2.0 $\pm$ 0.2	2.0 $\pm$ 0.3	-
Orta	12.4 $\pm$ 1.2	11.25 $\pm$ 0.8	-
Kuyruk	7.8 $\pm$ 0.8	14.5 $\pm$ 1.3	***
Toplam	26.5 $\pm$ 1.6	34.4 $\pm$ 1.8	**
Ölü (%)	33.0 $\pm$ 3.5	48.0 $\pm$ 4.2	**
pH	6.5 $\pm$ 0.01	5.7 $\pm$ 0.01	***

\*\*p&lt;0.01 (Grup ortalamaları arası fark önemlidir)

\*\*\*p&lt;0.001 (Grup ortalamaları arası fark önemlidir)

-p&gt;0.05 (Grup ortalamaları arası fark önemli değildir)

ÖD: Önemlilik derecesi

### Tartışma ve Sonuç

Spermatolojik muayenelerde saptanan değerler normal sınırlar içinde kalmış ve köpekler arasında pH değeri dışında farklılık saptanmamıştır. Spermatolojik muayeneler sonucu elde edilen veriler kimi araştırmacıların (6,9,13,15) bulguları ile benzerlik göstermekle birlikte kimi araştırmacıların (12,18,27,30,32) bulguları ile farklılık göstermiştir. Oluşan bu farklılıkların özellikle köpek ırklarındaki farklılıktan ve kullanılan yöntemden ileri geldiği düşünülmektedir. Özellikle bazı araştırmacıların (21, 27,32) sperma miktarı belirlenmesinde ön sekret ve spermayı birlikte değerlendirmeleri sonucu sperma miktarında farklılıklar oluşmuştur.

Araştırmacılar (8,17) dişi köpeklerdeki östrus siklusu aralıklarının çok uzun olması nedeniyle dondurulmuş sperma ile fertilite denemelerinin son derece pahalı ve zaman alıcı olduğunu, bu nedenle dondurulmuş spermanın fertilite gücünün tespitinin yapılan çalışmaya benzer olarak dondurma öncesi ve çözüm sonrası spermatolojik muayeneler ile mümkün olabileceğini bildirmişlerdir.

Bu araştırmada köpekler arasında ekilibrasyon sonrası ve çözüm sonrası elde edilen değerler arasında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. Buna bağlı olarak, aynı çevre ve bakım besleme koşulları altında kalan bireylerde genetik bir olumsuzluk olmaması koşuluyla farklılık oluşmaması diğer araştırmaları destekler niteliktedir.

Bununla birlikte, ekilibrasyon sonrası ve çözüm sonrası anormal ve ölü spermatozoa oranlarının belirgin bir şekilde arttığı, buna karşın Tris sulandırıcısının laktoz sulandırıcısına oranla daha iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar bir çok araştırmacının

(17,19,20,31,33) bildirdiği sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. Buna karşılık, bazı araştırmalarda (1,4,14,16, 25) ise farklı sulandırıcıların (PIPES, BES, TES, Triladyl, IMV Universal) ve cryoprotektan oranlarının kullanılması, dondurma (kuru buz, sıvı azot) ve paketleme (payet, pelet, ampul) yöntemlerinin değişik olması saptanan sonuçlar arasında farklılıklar oluşturmuştur.

Özellikle farklı gliserol oranlarının çözüm sonu motilite üzerine etkisinin önemli olduğu bazı araştırmacılar (2,7,10) tarafından bildirilmiştir. Günzel ve ark. (10) Tris ile sulandırılan spermada %93 olan motilitenin, %4 gliserol katıldıktan 10 dakika sonra %88'e, %6 gliserol ile %83'e, %8 gliserol ilavesi ile %78'e düştüğünü saptamıştır.

Yapılan araştırmada, her iki sulandırıcıda da çözüm sonrası anormal akrozom oranının önemli ölçüde artması dikkat çekicidir. Bu durum diğer araştırmalarla (2,17) benzerlik göstermektedir. Bunun yanında, özellikle laktoz sulandırıcısında dondurulan spermada ekilibrasyon sonrası ve çözüm sonrası anormal kuyruk oranlarında gözlemlenen artışlar, aynı sulandırıcının kullanıldığı diğer araştırmalarda (20,31,33) bildirilmemiştir.

Tris sulandırıcısı için çözüm sonrası elde edilen motilite (%49.5), anormal spermatozoa (%26.5) ve ölü spermatozoa (%33.0) oranları Yurdaydın ve Kotzap (34)'ün saptadığı değerlerle (%46.25, %27.91, %33.12) büyük benzerlik göstermektedir. Buna karşılık Yubi ve ark. (33)'ün yapmış oldukları çalışmada Tris sulandırıcısı için ekilibrasyon sonrası %90.0, %19.0, %17.5 olarak saptanan aynı değerler, çözüm sonrası %45.0, %20.5, %45.0 olarak saptanmıştır. Laktoz sulandırıcısı için ise ekilibrasyon sonrası %57.9, %29.7, %8; çözüm sonrası %24.2, %34.4, %46.0 olarak bildirilmiştir. Laktoz sulandırıcısı için bildirilen bu değerler araştırmada elde edilen bulgularla (%32.2, %34.4, %48.0) benzerlik göstermektedir.

Literatür bulguları ile bu araştırmada saptanan bulgular arasında gözlenen farklılıklar kullanılan materyalin farklı genotip ve yaşta olmasından, çevre şartlarından kaynaklanabileceği gibi kullanılan sperma sulandırıcıları ile sulandırıcıların içerdiği komponentlerin miktar ve oranlarının, özellikle yumurta sarısı ve gliserin oranlarının farklı olmasından kaynaklanmış olabilir. Ayrıca, spermanın sulandırılmasında ve dondurulmasında kullanılan yöntemlerin de bu farklılıkların ortaya çıkmasında etken olduğu, bunun yanında spermanın dondurulması aşamasında ekilibrasyon süreleri, donmuş spermanın çözüm ısı ve süreleri ile ejakulat sayılarının farklı olmasının da sonuçlar üzerinde etkili olabileceği düşünülmelidir.

Sonuç olarak, köpek spermasının dondurulmasında aynı yaşta olan ve aynı çevre koşullarında barındırılan köpeklerde bireysel özelliklerin sperma dondurulması üzerine etkisinin olmadığı, buna karşın sulandırıcıların sperma dondurulmasında önemli derecede etkili olduğu ve Tris sulandırıcısının laktoz sulandırıcısına göre daha iyi sonuçlar verdiği saptanmıştır.

### Kaynaklar

- Battista M, Parks J, Concannon P (1988): *Canine sperm postthaw survival following freezing in straws or pellets using PIPES, lactose, Tris or TEST extenders*. 11<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, University of Dublin, June 26-30, Ireland.
- Baran A, Ak K, İleri K (2000): *Köpek spermasının farklı oranlarda gliserol içeren sulandırıcılarda dondurulması*. İstanbul Üniv Vet Fak Derg, **26**, 265-279.
- Davies PR (1982): *A study of spermatogenesis, rates of sperm production and methods of preserving the semen of dogs*. PhD Thesis, University of Sidney.
- Dobinski I, Lulai C, Barth AD, Post K (1993): *Effects of four different extenders and three different freezing rates on postthaw viability of dog semen*. J Reprod Fertil, **47**, 291-296.
- England GCW (1993): *Cryopreservation of dog semen*. J Reprod Fert, **47**, 243-255.
- England GCW, Allen WE (1990): *Evaluation cellulose acetate/nitrate filters for measuring the motility of dog spermatozoa*. J Reprod Fert, **88**, 369-374.
- Farstad W, Andersen K (1989): *Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog*. J Reprod Fertil, **39**, 289-292.
- Froman DP, Amann RP, Riek PM, Olar TT (1984): *Acrosome activity of canine spermatozoa as an index of cellular damage*. J Reprod Fertil, **70**, 301-308.
- Günzel AR (1986): *Semen collection, evaluation and artificial insemination in the dog*. Tierarztl Prax, **14**, 275-282.
- Günzel AR, Gunther C, Terhaer P, Bader H (1993): *Computer assisted analysis of motility, velocity and linearity of dog spermatozoa*. J Reprod Fertil, **47**, 271-278.
- Günzel AR, Syvari K, Krause D (1985): *Morphological examination of dog semen*. Dtsch Tierarztl Wochenschr, **92**, 13-15.
- Hendrikse J, Antonisse HW (1984): *Evaluation of canine semen*. Tijdschr Diergeneeskd, **109**, 171-174.
- Johnstone SD (1991): *Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital*. Small Anim Pract, **21**, 545-551.
- Kabasakal G, Keskin O, Yurdaydın N, Tekin N (1995): *Dondurulmuş spermalar ile tohumlanan köpeklerden elde edilen dölerimi*. Ankara Üniv Vet Fak Derg, **42**, 487-490.
- Mickelsen WD, Memon MA, Anderson PB, Freeman DA (1993): *The relationship of semen quality to pregnancy rate and litter size following artificial insemination in the bitch*. Theriogenology, **39**, 553-560.
- Morton DB, Bruce SG (1989): *Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs*. J Reprod Fertil, **39**, 311-316.
- Oettle EE (1986): *Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen*. Anim Reprod Sci, **12**, 145-150.
- Ohl DA, Denil J, Cummins C, Menge AC, Seager SW (1994): *EE does not impair sperm motility in the beagle dog: a comparative study of electroejaculation and collection by artificial vagina*. J Urol, **152**, 1034-1037.
- Olar TT (1984): *Cryopreservation of dog spermatozoa*. PhD Thesis, Colorado State University.
- Olar TT, Bowen RA, Pickett BW (1989): *Influence of extender cryopreservative and seminal processing procedures on postthaw motility of spermatozoa*. Theriogenology, **31**, 451-461.
- Schubert CL, Seager SWJ (1991): *Semen collection and evaluation for the assessment of fertility parameters in the male Dalmatian*. Canine Pract, **16**, 17-21.
- Seager SWJ (1969): *Successful pregnancies utilizing frozen dog semen*. AI Digest, **17**, 6-7.
- Seager SWJ, Platz CC (1977): *Artificial insemination and frozen semen in the dog*. Canine Reprod, **7**, 757-764.
- Seager SWJ, Platz C, Fletcher WS (1975): *Conception rates and related data using frozen dog semen*. J Reprod Fertil, **45**, 189-192.
- Smith FO (1985): *Cryopreservation of canine semen: technique and performance*. PhD Thesis, University of Minnesota.
- Stockner PK (1985): *Status of the canine frozen semen industry*. Modern Vet Pract, **66**, 98-100.
- Stockner PK (1991): *The relationship of semen parameters to fertility in the dog*. Canine Pract, **16**, 15-23.
- Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V (2000): *Biyoistatistik*. 9. baskı, Şahin Matbaası, Ankara.
- Tekin N (1994): *Spermanın Muayenesi ve Değerlendirilmesi*. 69-79. In: E. Alaçam (Ed). Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Sun'i Tohumlama, Doğum ve Infertilite. Dizginevi, Konya.
- Tekin N, İzgür H, Özyurt M (1987): *Köpeklerde penis masajı yöntemiyle sperma alma ve başlıca spermatozojik özellikler üzerine araştırmalar*. SÜ Vet Fak Derg, **3**, 83-95.
- Thomas PG, Larsen RE, Burns JM, Hahn CN (1993): *A comparison of three packaging techniques using two extenders for the cryopreservation of canine semen*. Theriogenology, **39**, 255-264.
- Wong WT, Dhaliwal GK (1985): *Observations on semen quality of dogs in the tropics*. Vet Rec, **116**, 313-314.
- Yubi CA, Ferguson JM, Renton JP, Harker S, Harvey MJ, Bagyenji B, Douglas TA (1987): *Some observations on the dilution, cooling and freezing of canine semen*. J Small Anim Pract, **28**, 753-761.
- Yurdaydın N, Kotzab E (1987): *Studies on the deep freezing of dog semen*. Ankara Üniv Vet Fak Derg, **34**, 534-540.

Geliş tarihi: 16.11.2001 / Kabul tarihi: 14.1.2002

### Yazışma adresi:

Araş. Gör. Dr. Ergun Akçay  
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı  
06110 Ankara  
E-mail: akcay@veterinary.ankara.edu.tr