



## Kangal Irkı Köpeklerin Spermalarının Kriyoprezervasyonunda Sığır Serum Albüminin Etkisi\*

Alper KOÇYİĞİT<sup>1</sup> Barış Atalay USLU<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Sivas

Geliş Tarihi / Received	Kabul Tarihi / Accepted	Yayın Tarihi / Published
08.11.2016	28.12.2016	31.12.2016

**Özet:** Ülkemizin zenginliklerinden biri olan ve üstün özellikler barındıran Türk Çoban Köpeği Kangal (Karabaş), dünyanın en eski ve en yaygın doğal çoban köpeği ırkıdır. Fakat gerek evcilleştirmenin etkisi gerekse bilinçsiz, kontrolsüz çiftleştirmeler sebebiyle kangal köpekleri sahip olduğu üstün özellikler açısından risk altındadır. Ayrıca venereal (çiftleşme ile bulaşan) hastalıklar, damızlık köpekler için sürekli tehdit oluşturmaktadır. Bu gibi özel türler gamet, embriyo, hücre ya da DNA'ları dondurularak koruma altına alınabilmek ve kontrollü olarak yavru almak mümkündür. Köpek spermalarının dondurularak saklanması çeşitli yöntemler ve protokoller üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Çalışmada Kangal ırkı köpeklerden alınan spermalar iki farklı sulandırıcı ile sulandırılmış ve dondurulmuştur. Çözüm sonu motilite oranları açısından BSA ile desteklenen sulandırıcı ile daha yüksek değerler tespit edilmiştir (%45 ve %55). Sonuç olarak Kangal Köpeği spermasının dondurulmasında Tris-yumurta sarısı bazlı sulandırıcılara BSA ilavesi yapılmasının suni tohumlama uygulamaları sonrası fertilitte oranlarına olumlu etki edebileceği değerlendirilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Kangal Köpeği, Kriyoprezervasyon, Sulandırıcı, Motilite

### The Effect of Bovine Serum Albumin in the Cryopreservation of Kangal Dogs Sperm

**Abstract:** The Kangal dog significant richness of our country within region of Sivas is under risk at venereal diseases and unconscious mating. Animal genetic resources in-situ and ex-situ methods can be protected using. Ex-situ methods; animals outside the environment in which they live, to keep these animals or gametes, embryos, is to protect the cells or DNA. The protection of specific species such as stud Kangal dogs, possible by cryopreservation. The sperms from Kangal dogs were diluted and frozen with two different diluents in the study. Higher values were determined by the diluent supplemented with BSA in terms of the post-thawing sperm motility (%45 and %55). As a result, it is evaluated that the addition of BSA to Tris-egg yolk-based extenders in freezing of Kangal dog semen can positively affect the fertility rates after artificial insemination.

**Key words:** Kangal dog, Cryopreservation, Extender, Motility

Sorumlu yazar Alper KOÇYİĞİT,  
Cumhuriyet Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi  
Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Sivas  
e-mail: vhalper@gmail.com

\*Bu çalışma, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) tarafından V-027 proje numarası ile desteklenmiştir.

## 1. GİRİŞ

Ülkemizin zenginliklerinden biri olan ve üstün özellikler barındıran Türk çoban köpeği Kangal (Karabaş), dünyanın en eski ve en yaygın doğal çoban köpeği ırkıdır. Fakat gerek evcilleştirmenin etkisi gerekse bilinçsiz, kontrolsüz çiftleştirmeler sebebiyle kangal köpekleri sahip olduğu üstün özellikler açısından risk altındadır. Ayrıca venereal hastalıklar, damızlık köpekler için sürekli tehdit oluşturmaktadır (11). Köpek yetiştiriciliğinde venereal hastalıklarının önlenmesi, genetik yapılarının iyileştirilmesi, üstün damızlık niteliklere sahip köpeklerden en yüksek ölçüde yararlanılabilmesi ve gen kaynaklarının korunması büyük önem taşır. Bu noktada biyoteknolojik bir yöntem olan suni tohumlama uygulaması ön plana çıkmaktadır (8). Köpeklerde dondurulmuş sperma ile yapılan suni tohumlama sonrası ilk canlı yavru 1954 yılında elde edilmiştir (5). Bu tarihten günümüze kadar pek çok araştırmacı suni tohumlama uygulamalarında başarılı sonuçlar kaydetmiştir (2,22,23,24). Günümüzde başta Amerika Birleşik Devletleri olmak üzere Kanada ve pek çok Avrupa ülkesinde köpek spermasının dondurulması endüstri haline gelmiştir. Bu ülkelerde çeşitli sperm bankaları kurulmuştur.

Köpeklerde suni tohumlama amacıyla taze sperma ya da dondurulmuş sperma kullanılabilir. Dondurulmuş sperma suni tohumlama uygulamalarında yaygın olarak kullanılmasına rağmen, taze sperma ile yapılan tohumlamadaki başarı şansı daha yüksektir. Bu sebeple fertilité oranlarının yükseltilmesi yönünde çalışmalar devam etmektedir (10).

Köpeklerde suni tohumlama uygulamasının başarılı olabilmesi için uygun şekilde dondurulmuş spermanın kullanılması şarttır. Spermanın dondurulması işleminde ise pek çok faktör başarıyı etkilemektedir. Bu faktörleri sulandırıcı seçimi, spermatozoon yoğunluğu, kryoprotektif ajanlar,

dondurma ve çözme yöntemi olarak sıralamak mümkündür (9, 16).

Günümüzde köpek spermasının kısa süreli ya da dondurularak uzun süreli saklanması amacıyla sperma sulandırıcısı olarak çeşitli solüsyonlar kullanılmaktadır. Bunlar arasında Tes (N-Tris [hydroxymethyl] methyl-2 aminomethene sulfonic acid), Hepes (N-2 [hydroxymethyl] piperazine-n-2-ethane sulfonic acid) ve Pipes (piperazine-N, N-bis-2-ethane sulfonic acid) gibi tristen daha iyi buffer kapasitesine sahip solüsyonlar kullanılmakla beraber, son yıllarda köpek spermasının dondurulmasında daha çok hazır ticari preparatlar (Laiciphos, Biociphos, Biladyl, Triladyl, CaniplusFreeze) tercih edilmektedir (16). Köpek spermasının sulandırılmasının yanı sıra dondurma işlemindeki soğuk şoku hasarlarından da korunması gerekmektedir. Bu amaçla sulandırıcıya çeşitli kryoprotektif ajanlar ilave edilmektedir (12). Kryoprotektif ajan olarak yumurta sarısı dondurma işlemlerinin zararlı etkilerinden spermatozoayı koruması amacıyla köpek spermasının saklanmasında %1-20 oranları arasında yaygın olarak kullanılmaktadır (4). Son yıllarda ise seminal plazma komponentlerinden biri olan Bovine Serum Albumine (BSA) membran stabilizatörü olarak sulandırıcılara ilave edilmektedir (4,21).

Bu çalışma ile kangal köpeği spermasının dondurulmasında farklı sulandırıcı kompozisyonlarının etkinliğinin değerlendirilmesi ve çözme sonrası spermatolojik parametrelere etkisinin ortaya koyulması amaçlanmıştır.

## 2. MATERYAL VE METOT

Çalışmadaki hayvan muayene ve denemeleri Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu'nun 19.02.2015 tarihli ve 8 sayılı kararı doğrultusunda yürütülmüştür. Çalışmanın hayvan materyali Cumhuriyet Üniversitesi Kangal Köpeği Araştırma ve Yetiştirme Merkezi'nde

bulunan Kangal ırkı erkek köpekler arasından seçilmiştir. Merkezde bulunan köpekler damızlık özellikler açısından incelenerek sağlıklı, ırka ait fenotipik özellikleri taşıyan ve damızlık nitelikte olan iki adet köpek deneye dâhil edilmiştir. Çalışma için seçilen köpekler aynı bakım besleme şartlarına tabi tutulmuştur.

### **Sperma Alma Uygulaması**

Çalışmada kullanılan hayvanlardan sperma elde edilmesi için penis masajı (onanı) yöntemi uygulanmıştır (18). Bu yöntemle alıştırma için köpeklerden hayvan hastanesinde özel olarak ayrılan muayene salonunda östrus periyodunda bulunan dişi köpek ile seksüel stimülasyon sağlanarak üç gün ara ile haftada iki kez sperma alınmıştır. Bu şekilde en az bir ay süreyle yöntemle alıştırılan köpeklerden daha sonra çalışma için aynı sıklıkta sperma alınmaya devam edilmiştir. Çalışmada beş hafta süreyle her köpektan 10'ar olmak üzere toplamda 20 ejakulat kullanılmıştır.

### **Spermatolojik Muayene**

Çalışmada spermalar hem dondurma öncesinde hem çözdüme sonrasında muayene edilmiştir. Nativ sperma, sperma miktarı (ml), spermatozoa motilitesi (%), spermatozoa yoğunluğu ( $\times 10^6$ ), anormal spermatozoa oranı (%), ölü spermatozoa oranı (%), spermanın pH değeri ve yönüyle muayene edilmiştir (Tekin 1994). Çözdüme sonrası muayenesinde ise; spermatozoa motilitesi (%), spermatozoa yoğunluğu ( $\times 10^6$ ), anormal spermatozoa oranı (%), ölü spermatozoa oranı (%) belirlenmiştir.

### **Spermaların Dondurulması**

Elde edilen spermalardan motilitesi %80 ve üzerinde olan, anormal oranı %10'u geçmeyen nitelikte olanlar dondurulma işlemine alınmıştır. Dondurma işlemi için her köpeğin sperması iki eşit kısma bölünerek birinci kısım her payette  $200 \times 10^6$  motil spermatozoa bulanacak şekilde Tris-Yumurta sarısı solüsyonu ile ikinci kısım ise Tris-

Yumurta Sarısı-BSA sulandırıcısı ile sulandırılmıştır.

Kontrol grubunda sulandırıcı olarak Tris sulandırıcısı %20 oranında yumurta sarısı ile kombine edilmiştir. Deneme grubunda ise %20 yumurta sarısı yerine %10 yumurta sarısı + 10 mg/ml BSA bileşimi kullanılmıştır (Tablo 1).

**Tablo 1.** Tris – Yumurta sarısı bazlı sulandırıcının içeriği

İçerik	Miktar
Tris	2,9 g
Fruktoz	1,25 g
Sitrik asit	1,32 g
Gliserol	8,0 ml
Yumurta sarısı	%20
Distile su	100,0 ml

Spermalar sulandırıldıktan hemen sonra 0,5 ml'lik payetlere çekilip açık olan uçları ısı yardımıyla kapatılmıştır. Sonrasında buzdolabına (+4 °C) yerleştirilmiş ve 1,5 saat ekilibrasyona bırakılmıştır. Ekilibrasyon süresi sonunda payetler, sıvı azot seviyesinden 4 cm yükseklikte (-120 °C) 10 dakikada dondurulmuş ve -196 °C'deki sıvı azotta saklanmıştır. Spermaların bulunduğu payetler 37 °C'deki su banyosunda 30 saniyede çözdümlenerek spermatolojik muayeneye tabi tutulmuştur. Çalışmada elde edilen bulguların istatistiksel analizi için Student-T test yöntemi kullanılmıştır.

### **3. BULGULAR**

Çalışma sonunda fenotipik olarak ırk özelliklerini yansıtan 2 Kangal köpeğine ait 40 doz (0,5ml'lik) sperma dondurulmuştur. Köpeklerden alınan nativ spermaların motilite oranları sırasıyla %70 ve %75 olarak bulunmuştur. Nativ spermadaki anormal spermatozoon oranı ise sırasıyla %9,2 ve %8,9 olarak tespit edilmiştir. Taze spermada belirlenen spermatolojik parametreler istatistiksel farklılık göstermemekle birlikte Tablo 2'de sunulmuştur ( $P>0.05$ ).

**Tablo 2.** Taze spermada belirlenen spermatolojik özellikler

Köpek	Hacim (ml)	Motilite (%)	Yoğunluk ( $\times 10^6$ )	Anormal oranı (%)	ph
1	2,2	75	317,2	9,2	6,6
2	1,9	70	265,5	8,9	6,5

Çalışmada çözüm sonu motilite oranları sırasıyla %45 ve %55 olarak belirlenmiştir. Çözüm sonu anormal spermatozoon oranı ise sırasıyla %18,8 ve %13,4 olarak tespit edilmiştir. Çözüm sonrası motilite ve anormal spermatozoon oranı açısından kontrol grubuna oranla deneme grubunda önemli derecede yüksek sonuçlar tespit edilmiştir ( $P < 0.05$ ). Çalışmada sulandırma sonrası ve çözdürme sonrası belirlenen spermatolojik parametreler Tablo 3'te sunulmuştur.

**Tablo 3.** Çözüm sonu spermatolojik değerler (%)

Sulandırıcı	Motilite	Anormal spermatozoa oranı	Ölü spermatozoa oranı
Kontrol	45	18,8	35,1
Deneme grubu	55	13,4	22,3

#### 4. TARTIŞMA

Köpek spermasının dondurulmasında bugüne kadar krebs-ringer, sodyum sitrat, laktoz, süt gibi solüsyonlar kullanılmış olmakla beraber, son yıllarda yoğun olarak Tris, Tes, Bes, Hepes, Mes, Pipes, Mops gibi zwitterionic bufferlar dışında köpek sperması, Laiciphos, Biociphos, Biladyl ve CaniplusFreeze gibi ticari preparatlarla da uzun süreli saklanabilmektedir (7,13). Dondurma işlemi spermatozoonlar üzerinde birçok olumsuz etkiye yol açabilmektedir. Bunlardan biri de membran bütünlüğünün bozulmasıdır. Spermatozoa motilitesi spermatozoanın buldukları ortamda madde alışverişleri, yani membranlarından madde transportuyla yakından ilişkilidir. Dolayısıyla

membranları sağlam spermatozoanın motil olduğundan söz edilebilir. Çalışmada, Tris-yumurta sarısı ile dondurulmuş spermalardan elde edilen çözüm sonu spermatozoa motilitesi (%45) Tris-Yumurta sarısı-BSA ile dondurulanlardan (%55) önemli ölçüde düşük bulunmuştur ( $P < 0.05$ ). Bu çalışmada, dondurulmuş spermalardan elde edilen çözdürme sonrası spermatozoa motilitesi, Daşkın ve ark.'larının bulduğu değerden (%62,5) düşük bulunmuştur (3).

Köpek spermasının dondurulması üzerine çalışan bir diğer araştırmacı ise laiciphos, biociphos ve tes/tris'ten oluşan üç farklı sulandırıcı ile dondurdukları köpek spermalarının çözdürme sonrası spermatozoa motilitesini laiciphos, biociphos ve tes/tris için sırasıyla %65, 70 ve 50 canlı spermatozoa oranını ise %78, 80 ve 65 saptadıklarını bildirmiştir (16).

Pipes, bes, tes, tris sulandırıcılarına üç değişik potasyumlu tampon ilavelerinin köpek spermasının dondurulması üzerine etkilerini inceleyen araştırmacılar, 1/2 oranında %50 Pipes/KOH + %25 sodyum sitrat + %25 dekstroz + %20 yumurta sarısı + %9 gliserol ile çözdürme sonrası en iyi spermatozoa motilitesi elde etmişlerdir (17).

Yumurta sarısı ve BSA spermayı soğuk şokuna karşı koruyarak kriyoprotektan etki göstermektedir (14,20). Bir çalışmada sulandırıcıya membran stabilizatörü olarak BSA eklenmesinin spermatozoa üzerine olumlu etkisi olduğunu bildirilmiştir (1). Ayrıca BSA'nın en önemli özelliklerinden biri de spermanın dondurulması işlemi sırasında antioksidan özelliği ile oksidatif reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan serbest radikalleri elimine etmesi yanında soğuk şokunun zararlı etkilerinden spermatozoayı korumasıdır (6,15).

Kimi araştırmacılar kriyoprotektif etkisinden faydalanmak için %6 (w/v) gibi yüksek miktarda

BSA'yı köpek spermasının sulandırılmasında kullanırken, kimileri de (2, 10) %5 (w/v) oranında protein desteği olarak faydalanmışlardır (4,20).

Köpek spermasının dondurulması üzerine BSA'nın etkilerinin incelendiği bir diğer çalışmada, BSA'nın ve yumurta sarısının sulandırıcıda tek başına kullanılmalarıyla ulaşılan sonuçlarla karşılaştırıldığında, %10 yumurta sarısı + 10 mg/ml BSA içeren Tris sulandırıcısıyla, çözdürme sonrası en yüksek spermatozoa motilitesi (%50,5) elde ettiklerini, yumurta sarısı BSA kombinasyonunun sinerjik etki oluşturduğu ve soğuk şokundan spermatozoayı daha iyi koruduğunu ifade edilmiştir (19,21).

Yapılan çalışmada literatür verilerine paralel olarak BSA ile kombine edilen Tris-yumurta sarısı sulandırıcısı ile daha iyi çözüm sonu spermatozoa değerlere ulaşılabileceği belirlenmiştir. Bununla birlikte her iki sulandırıcıyla elde edilen çözdürme sonrası anormal spermatozoa oranlarının fertilitiyi olumsuz etkileyecek düzeylere (%20) ulaşmadığı gözlenmiştir.

Yapılan araştırmalarla sunulan çalışmada elde edilen sonuçlar arasındaki farklılıklar çeşitli etmenlere bağlı olarak şekillenmiş olabilir. Özellikle kullanılan hayvanların bakım besleme ve ırk farklılıkları, sulandırıcı kompozisyonları ve dondurma çözdürme prosedürlerindeki farklılıklar spermatozoa parametrelerine etki etmektedir.

Çalışmadan elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, kangal köpeği spermasının dondurulmasında tris-yumurta sarısı-BSA bazlı sulandırıcı ile BSA içermeyen gruba oranla daha yüksek çözüm sonu spermatozoa değerler elde edildiği, BSA'nın yumurta sarısı ile kombine edilmesi durumunda, spermatozoa motilitesini geliştirdiği ve spermatozoa anormal oranını azalttığı tespit edilmiştir.

#### KAYNAKLAR

- 1. Blesbois E, Caffin JP. (1992):** Serum like albumin of fowl seminal plasma and effects of albumin on fowl spermatozoa stored at 4 °C. *British Poultry Science*, 33, 663-670.
- 2. Concannon PW, Battista M. (1989):** Canine semen freezing and artificial insemination. *Current Veterinary Therapy*. 1247-1259.
- 3. Daşkın A, Tekin N, Akçay E. (2003):** Köpeklerde transservikal - intrauterin ve intravaginal tohumlama yön-temlerinin dölverimine etkisi. *Turkish Journal of Veterinary And Animal Sciences*, 27, 235-239.
- 4. De Leeuw FE, De Leeuw AM, Den Das JH, Colenbrander B, Verkleij AJ. (1993):** Effect of various cryoprotective agents and membranstabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, 30, 32-44
- 5. England GC. (1992):** Cryopreservation of dog semen: a review. *Journal of reproduction and fertility. Supp.* 47: 243-255.
- 6. Funahashi H, Cantley TC, Stumpf TT, Terlouw SI, Day BN. (1994):** Use of low salt culture medium for in vitro maturation of porcine oocytes is associated with elevated oocytes glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after in vitro fertilization. *Biology of Reproduction*, 51, 633-639.
- 7. Hermansson U, Forsberg CL. (2006):** Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology*. 65(3): 584-593.
- 8. Hiemstra SJ. (2003):** Guidelines for the constiution of national cryopreservation programmes for farm animals (FAO).
- 9. Hunter RHF. (1980):** Physiology and technology of reproduction in female domestic animals. Academic Press, Edinburgh, UK.
- 10. Linde-Forsberg C, Forsberg M. (1989):** Fertility in dogs in relation to semen quality and

the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, 299-310.

**11.Mamak N. (2002):** Sivas yöresindeki kangal köpeği üretim çiftliklerinde bulunan köpeklerde bazı enfeksiyöz ve paraziter hastalıkların (leptospirozis, listeriozis, dirofilariasis, barsak parazitleri) araştırılması ve sağaltımı. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

**12.Moce E, Vicente JS, Lavara R. (2003):** Effect of freezing-thawing protocols on the performance of semen from three rabbit lines after artificial insemination. *Theriogenology*, 60, 115-123.

**13.Morton DB, Bruce SG. (1989):** Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *Journal of Reproduction Fertility*, 39, 311-316.

**14.Müller B, Kircher C. (1978):** Influence of seminal plasma proteins on motility of rabbit spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 54, 167-172

**15.Risopatron J, Catalan S, Miska W, Schell WB, Sanchez, R. (2002):** Effect of albumine and polyvinly alcohol on the vitality, motility and acrosomal integrity of canine spermatozoa incubated in vitro. *Reproduction Domestic Animals*, 37, 347-351.

**16.Silva LDM, Verstegen JP. (1995):** Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, 44(4), 571-579.

**17.Smith FO, Graham, EF. (1984):** Cryopreservation of canine semen: technique and performance. In 10. international congress on animal reproduction and artificial insemination, University of Illinois USA.

**18.Tekin N, İzgür H, Özyurt M. (1987):** Köpeklerde penis masajı yöntemiyle sperma alma

ve başlıca spermatolojik özellikler üzerinde araştırmalar. *Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1: 83-95.

**19.Tosun H. Uysal O. (2007):** Köpek spermasının dondurulmasında farklı sulandırıcıların ve bireylerin etkisi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 54:23-28.

**20.Trimeche A, Anton M, Renard P, Gabdemer, G, Tainturier D. (1997):** Quail egg yolk: A novel cryoprotectant for the freeze preservation of poitou jackass sperm. *Cryobiology*, 34, 385-393.

**21.Uysal O, Korkmaz T, Tosun H. (2005):** Effect of bovine serum albumine on freezing of canine semen. *Indian Veterinary Journal*, 82, 97-98.

**22.Uysal O, Varish O, Tosun H, Yavas I, Gurcan I. (2007):** Cryopreservation of canine semen at different freezing and thawing programmes. *Indian veterinary journal*, 84(1): 57-59.

**23.Watson PF.** Artificial insemination and the preservation of semen. *Marshall's Physiology of Reproduction*, 2, 747-869, 1990.

**24.Yurdaydın N, Kotzab E. (1987):** Köpek spermasının dondurulması üzerinde araştırmalar. *Ankara Üniveersitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 34 (3): 534-540.