



## Köpeklerde Spermanın Alınması, Saklanması ve Suni Tohumlamada Kullanılmasına Kısa Bir Bakış

Oğuzhan KALKAN<sup>1</sup> Ömer UÇAR<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Kalkan Veteriner Hekim Muayenehanesi, Merzifon/Amasya-TÜRKİYE

<sup>2</sup>Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Erzurum-TÜRKİYE

Geliş Tarihi / Received  
10.10.2016

Kabul Tarihi / Accepted  
25.12.2016

Yayın Tarihi / Published  
31.12.2016

**Özet:** Günümüzde biyoteknolojik bir olgu haline gelen suni tohumlama yönteminden, özellikle vücut yapılarının farklılığı nedeniyle çiftleşemeyen köpeklerde büyük ölçüde yararlanılmaktadır. Suni tohumlama; alınan spermanın, ortam şartlarından korunması amacıyla sulandırılması, bazı kısa ve uzun süreli yöntemler kullanılarak saklanması ve uygun tekniklerle dişiye aktarılması ile olasıdır. Dolayısıyla, bu kısa derlemede, köpeklerde sperma alma sırasında erkeğe yaklaşım, spermanın alınması (parmak manipülasyonu, koni kauçuk lastik ve el masajı ile elektrik uyarımları (elektroejekülatör)), sulandırılması (Tes, Bes, Hapes, Pipes, Tris, Tes/Tris ve ticari sulandırıcılar ile 1:1-1:5 sulandırma oranında), kısa (+4 °C'de) - uzun süreli (ampul, pellet ve payet ile) dondurarak saklanması (sıvı azot içinde, -196 °C'de) ve suni tohumlama yöntemleri (kateterle intravaginal, Norveç kateteri ile intrauterin, endoskopik yöntemle intrauterin ve cerrahi teknikle intrauterin) hakkında kısa bilgiler verilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** köpek, sperma alımı, dondurma-eritme, suni tohumlama

### A Brief Overview of Semen Collection, Cryopreservation and its Usage in Artificial Insemination in Dogs

**Summary:** Today, the methods of artificial insemination, that have recently become a biotechnological phenomenon, have being used in dogs especially for those partners that are largely unable to mate because of differences in their body sizes. Artificial insemination is likely only by diluting the semen collected in order to protect it from the environmental conditions, by using some short- and long-term preservation methods and by transferring it into the females with proper techniques. Therefore, in this brief review, some data about the approach to the male at the time of semen collection, as well as the collection itself (digital manipulation, conic plastic rubber along with hand massage, and electrical stimulations (the electroejeculator)), dilution (Tes, Bes, Hapes, Pipes, Tris, Tes/Tris and commercial extenders, at 1:1-1:5 dilution rate), short (at +4 °C) - and long-term (in ampoule, pellet and straw) frozen storage (within liquid nitrogen, at -196 °C) of semen and artificial insemination methods (intravaginal catheter, Norwegian intrauterine catheter, endoscopic intrauterine and surgical intrauterine technique)) are given in dogs.

**Key Words:** dog, semen collection, freezing-thawing, artificial insemination

Sorumlu yazar: Ömer UÇAR  
Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı  
25240-Yakutiye  
Erzurum-TÜRKİYE  
e-mail: [oucar6975@hotmail.com](mailto:oucar6975@hotmail.com)

## 1. GİRİŞ

### 1.1. Kısa Tanım ve Tarihçe

Suni tohumlama, uygun teknik ve yöntemlerle erkekten alınan spermanın yine uygun teknik ve yöntemlerle aynı türden dişilere nakledilmesidir. Bu uygulamanın gerçekleştirilebilmesi, erkeklerden spermanın bol miktarda, kaliteli ve tekniğine uygun olarak alınması ile olasıdır. Bu bakımdan, hayvan türlerine özgü farklı sperma alma ve değerlendirme yöntemlerinin yeterince bilinmesi ve uygulanması gerekmektedir. Son yıllarda büyük gelişme gösteren ve günümüzde biyoteknolojik bir olgu haline gelen suni tohumlama yöntemi, kapsadığı konularda başlıca bir endüstrinin doğmasına yol açmıştır. Bu amaçla, kullanılan alet ve malzemelerin üretimi ve donmuş sperma ticareti bakımından uluslararası ilişkileri bulunan bir sanayi ve ticaret dalı haline almıştır. Suni tohumlama ile erkek genotipinin en uygun ve yaygın şekilde değerlendirilebilme şansının bulunduğu gibi, bulaşıcı genital organ hastalıklarının yayılmasını önlemek ve yavru verimi oranını artırmak yönünden de bu yöntem en seçkin ve kolay bir yaklaşım olmaktadır. Son yıllardaki suni tohumlama faaliyetleri, hayvanların ıslah çalışmalarından ziyade özellikle sağlıklarının korunması amacıyla öne çıkmıştır.

Dünyada ilk suni tohumlama, 13. yüzyılda Arap aşiretlerince kısıraklarda uygulanmıştır. Birinci Dünya Savaşı'nın bitimiyle suni tohumlamanın Sovyet Rusya'da yaygın olarak kullanılmasından sonra, ilerleyen zamanlarda Avrupa ülkeleri ve ABD'de önemli uygulama alanı bulmuştur. Bilimsel olarak ilk suni tohumlama çalışmaları, 1780 yılında İtalyan fizyolog Abbe L. Spallanzani tarafından başlatılmıştır (8). Türkiye'de ise bu çalışmalar ilk olarak koyunlarda 1936'da, kısıraklarda 1939'da, ineklerde ise 1949 yıllarında başlamıştır.

Bu bağlamda, spermanın özelliklerini yitirmeden hacmini ve yaşama süresini artırarak saklama

olanakları üzerinde araştırmalar yoğunlaşmıştır. Yapılan bu yoğun bilimsel çalışmalar sonucunda, hem kısa- hem de uzun süreli olarak, spermanın dölleme gücünü kaybetmeden saklanabileceği ile ilgili bilgiler zaman içerisinde ortaya konulmuştur. Köpeklere bakıldığında, suni tohumlamanın kullanılabilmesi birçok durum mevcuttur. Köpeklerde suni tohumlamanın yapılmasının asıl nedeni dişi ve erkeğin çeşitli nedenler ile çiftleşmemesidir (1) ve hayvan sahiplerinin isteğidir (8). Dişilerde; bunun en sık nedenleri; Vajinal darlık, konformasyonel kusur, arka bacaklarda zayıflık, psikolojik sorunlar ve ağrı gibi problemlerdir. Yine, sebebi bilinmeyen infertilite sorunlarında da suni tohumlama denenebilir. Erkeklerde; halsizlik, artrit gibi iskelet sistemi sorunları, erken ejakulasyon ve konformasyonel defektler doğal çiftleşmenin olmamasının nedenlerinden bazılarıdır. Deneyim yokluğu/eksikliği, yetiştirilme tarzı olumsuzlukları gibi psikolojik sorunlar da suni tohumlamanın endikasyonları arasındadır.

Bazı hayvan sahipleri bulaşıcı hastalıkların kontrolü ve bunların önüne geçilmesi için suni tohumlama istemektedir. Doğal çiftleşme ile erkek köpeklerden dişilere bulaşabilecek enfeksiyöz ajanlar suni tohumlama ile de geçebilecek özelliğe sahiptir.

Ancak, suni tohumlama ile dişi köpeklerden erkeklerge geçebilecek enfeksiyonlar engellenmiş olur. Suni tohumlamada kullanılacak tüm dişi ve erkek köpekler başta Brucella olmak üzere cinsel yolla aktarılabilecek enfeksiyonlardan arı olmalıdır.

Bazı ırk erkek köpeklerde çiftleşmeden sonra prostat kanaması ve hemospermi görülebilir. Bu kanama Von Willebrand hastalığı ile ilişkili olabilir, ama bu hastalık olmayanlarda da görülmüştür. Suni tohumlama böyle bir sorun riski olan

köpeklerde kullanılabilir. Herhangi bir temas olmadığından kanama ihtimali de çok azalacaktır. Köpeklerde suni tohumlama yetiştiricinin veya köpek sahibinin isteği doğrultusunda da herhangi bir sorun olmadan da yapılabilir. Yine saf ırkların ve değerli damızlık erkek köpeklerin daha verimli bir şekilde kullanılması ve sperma nakline olanak sağlanması için de suni tohumlama yapılabilir (1).

### 1.2. Sperma Alma Sırasında Erkek Köpeğe Yaklaşım

Erkek köpekten ilk kez sperma alınacaksa, ortamda östrustaki bir dişi köpeğin bulundurulması zorunludur (Erkek çok istekliyse bazen buna gerek olmayabilir). Ortamda östrustaki bir dişi köpeğin bulunması, elde edilecek spermanın kalitesini (özellikle sperm yoğunluğunu) arttırabilir. Bu amaçla, kızgınlıktaki bir dişi köpek bulunamazsa kısırlandırılmış bir dişiye düşük doz östrojen uygulanarak östrusa getirilebilir. Ayrıca, köpek feromonları da kullanılabilir. Bunlar; hydroxy benzoik asit ya da dondurulmuş halde saklanan östrustaki dişi köpeklere ait vajinal svablardır (1).



**Şekil 1.** Vajinal Svab Almada Kullanılan Pamuk Çubuklar (1).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, spermanın alınmasından 15 dakika önce erkek köpeğe 0.1 mg/kg PGF<sub>2</sub> $\alpha$  uygulanması ile alınan sperm sayısında önemli derecede artışlar kaydedilmiştir. Erkek köpekler vajinal svablara, sentetik kimyasal maddelerden daha iyi yanıt vermektedir. Spermayı

alan kişinin tecrübesi de bu uygulama sırasında sperma almayı etkileyebilmektedir.

Erkek köpek; bulunduğu ortamın yaşadığı yerden farklı olması sebebiyle çevresel faktörlerden etkilenmekte, yaşadığı stres ve özellikle klinik ortamında almış olduğu koku ve farklı türden hayvanların sesleri (klinikte bulunan kedi ve diğer köpeklerden) sperma alma sırasında konsantrasyonu olumsuz etkilemektedir. Sperma alma sırasında erkek köpeğin yanında sahibinin de bulunması yararlı olacaktır (Hem hayvanın güven duymasına ve rahat zapt edilmesini sağlar). Sperma alma işlemi sırasında erkek köpeğin ağrı duymasına neden olabilecek her türlü rahatsızlıklar (orşitis, prostatitis, ayak, bel ve kalçadan köken alan ağrılar) sperma alınırken dikkat edilmesi gereken diğer durumlardır (1).

## 2. ERKEK KÖPEKLERDEN SPERMA ALMA TEKNİKLERİ

Günümüzde köpeklerden üç değişik yöntemle sperma alınabilmektedir; a) parmak manipölasyonları, b) suni vajen ve c) elektroejakülatör ile sperma alma (1).

### 2.1. Parmak Manipölasyonu ile Spermanın Alınması

Köpeklerden penis masajı ile sperma almada araştırmacılar iki ayrı teknik kullanmışlardır. Bunlardan ilki; boğa suni vajeninden adapte edilen kauçuk koni kılıfın penis üzerine geçirilmesi ile uygulanan el masajı tekniği, diğeri ise parmak manipölasyonları tekniğidir.

İlk yöntemde, suni vajen ile dereceli toplama kadehi arasında irtibatı sağlayan konik kauçuk lastikten (irtibat hunisi) yararlanılabilir. Ortamda östrustaki bir dişi köpeğin bulunması (özellikle ilk kez sperma alınan deneyimsiz köpekler için) sperma alımında kolaylık sağlar. Sperma, kaygan olmayan bir zeminde ve sessiz bir alanda alınmalıdır. Uygulayıcı, sol elinde konik sperma toplama aracı olduğu halde erkek köpeğin sağında

durur. Sağ eli prepusyum üzerine ileri geri kaydırma hareketleri yaparak ereksiyonu uyardırmaya çalışır. Ereksiyonun ilk belirtisi olarak bulbus glandis şişmeye başlar. Penisin kavernoöz gövdesi kanla dolduğunda ereksiyon gerçekleşir. Peniste kan basıncının artmasıyla ereksiyon sinirsel olarak uyarılır ve bu sırada venöz kanın geri dönmesi kısmen inhibe olur ve penis arterleri genişler. Ereksiyon tam olarak gerçekleşmeden önce, prepusyum geriye doğru çekilerek bulbus glandis açığa çıkartılır ve konik sperma toplama aracı penis üzerine geçirilir.

Eğer bulbus glandis prepusyumdan dışarı çıkarılmadan önce tam bir ereksiyon gerçekleşirse, hayvan ağrı duyar ve hızla ereksiyon kaybolur.

Toplama hunisini tutan elin baş ve işaret parmakları, bulbusun gerisine hafif ve ritmik basınçlar uygulamaya başlar. Pelvik itmelerin pik seviyeye ulaşmasını takiben (yaklaşık 15-30 saniye), penis kauçuk toplama hunisiyle birlikte kaudale doğru çevrilir. Ejakulatın birinci ve ikinci fraksiyonları ilk 1-2 dakika içinde gelir. Toplamda üç fraksiyonlu olan spermanın sperm yönünden zengin 2. fraksiyonu süt görünümünde ve 0.5-5 ml ortalama hacimdedir (1, 8).



Şekil 2. Köpekten El Masajı ile Spermanın Alınması.

Sperma ejaküle edildikten yaklaşık 1-3 dakika sonra prostat kaynaklı berrak bir sıvı (3. fraksiyon) gelmeye başlar. Bu kısım, son kısım ve 5-45 dakika içerisinde 5-40 ml hacimde olabilir.



Şekil 3. Spermatozoondan Zengin 2. Kısım (1).

Bu yöntemde, sperm yönünden zengin kısmın geldiği zamanın takip edilmesi çok güçtür ve çoğu zaman ejakulatın kısımları istenmeden birbirine karışmaktadır. Yine bu yöntemle, sperma alınırken prepusyumda toplanan *smegma preputi*, sperma numunesini kontamine edebilir.

Cam huni ve dereceli toplama kadehi yardımıyla, parmak manipülasyonları yöntemiyle sperma en rahat tarzda alınabilir. Çoğu köpek, parmak manipülasyonlarıyla sperma vermeye yatkındır. Hayvan yerde ve ayaktaiken sperma alınabilir.

Kızgınlıkta olan bir dişi köpeğin ortamda bulunması sperma alma işlemini kolaylaştırır, fakat her zaman gerekli değildir. Bu yöntemde de ortamda dişi köpek varlığı, alınan spermadaki sperm sayısını yükseltebilir.

Bir eline eldiven giymiş sperma alacak kişi, erkek köpeğin sol arka kısmından ve prepusyum üzerinden bulbus glandis'in kaudal kısmına hafifçe masaj yapar. Sperma alma esnasında, kauçuk eldivenin alınan ejakulata temas etmesi, motiliteye olumsuz etki yapabileceğinden, temastan sakınılmalıdır.

Yarı ereksiyon meydana geldiğinde, prepusyal kılıf geriye doğru çekilir. Bulbus glandisin arka kısmına prepusyumun geri çekilmesi ve basınç uygulamaları sonrası ereksiyon sağlanır. Pelvik itme hareketleri başladığında, penis sperma toplama kadehine çarpabilir. Hemoraji ve travmaya

sebepe olmamak için, sperma toplama kadehi uzakta tutulur. Erkek köpek sperma vermeye isteksizse, toplama kadehi elin başparmağı aracılığı ile tutularak, glans penisteki ürethral oluşuma (*urethral orificium*) değdirilmek suretiyle ejakulasyon uyarılabilir. Pelvik itme hareketlerinin bitmesinden sonra, penis köpeğin arka ayakları arasından geriye doğru çevrilir. Bu sırada, bulbus glandis'in arka kısmına baş ve işaret parmakları arasında ritmik basınçlar uygulanmalıdır. Sperma alma işlemi sona erdiğinde, penis antibiyotikli bir solüsyon ile yıkanmalı ve prepusyum içerisine girmesi sağlanmalıdır (1).

## 2.2. Koni Kauçuk Lastik ve El Masajı ile Spermanın Alınması

Konik kauçuk lastik ucuna toplama kadehi yerleştirilir ve lastik içine vazelin ya da benzeri bir kayganlaştırıcı sürülür. Ortamda östrustaki bir diş köpeğin varlığı yararlı olmaktadır.



Şekil 4: Koni Kauçuk Lastik, Kayganlaştırıcı Pomat ve Toplama Tüpü (1).

Sperma alınırken, erkeğin dişinin vulva bölgesini koklaması sağlanmalıdır. Bu şekilde, erkek köpek daha rahat ve daha fazla sperma verebilir. Bir kişi erkek köpeğin sağ tarafında durarak, diş köpeği koklamasına izin verir.

Spermayı alacak kişi, erkek köpeğin sağ tarafında durarak sağ elinde konik kauçuk lastiği tutar.



Şekil 5: Koni Kauçuk Lastik ve El Masajı ile Sperma Alınması (1).

Penise prepusyumun dış kısmından yavaşça masaj yapan uygulayıcı, ereksiyon şekillenmesi sonrası penisi konik kauçuk lastiğin içine sokar. Pelvik itme hareketleri sonrası, lastik avuç içinde tutulur ve bulbus glandis'in arka kısmına basınç uygulanarak penis geriye döndürülür. Bu yöntem, sperma alınırken spermanın üç fraksiyonu birbirinden ayrı toplanamadığı için dezavantaj içerir (1).

## 2.3. Elektrik Uyarımları ile Spermanın Alınması (Elektroejakülatör)

Köpeklerden elektroejakülatör ile spermanın alınması mümkündür. Ancak, genel anestezi altında uygulanan bu yöntem zorunlu olmadıkça başvurulmamalıdır.



Şekil 6. Elektroejakülatör Cihazı (1).



Bu yöntemde, bir rektal prob ve elektrostimülatör'e ihtiyaç vardır. Bipolar rektal prob, tekniğine uygun olarak rektuma yerleştirildikten sonra, elektriksel açıdan 140-180 mA akım ve 10-20 Volt gerilimlerle belirli aralıklarla ejakulasyon merkezi uyarılır ve sperma alınır. Elektroejakulasyon yönteminde, elde edilen sperma hacmi, prostat bezinin fazla uyarılmasından dolayı doğal çiftleşmeden daha fazladır. Ancak, elde edilen ejakulata idrar karışma olasılığından dolayı tercih edilen bir metot değildir. Çok kıymetli damızlık köpeklerden, diğer yöntemlerle sperma alınamadığı zorunlu hallerde kullanılabilir (1).

### 3. KÖPEK SPERMASININ SAKLANMASI

#### 3.1. Köpek Spermasının Kısa Süreli Saklanması

Sperma soğutulurken ya da nakledilirken daima sulandırılmalıdır. Sulandırıcı; pH'nın stabil kalmasını, enerjinin korunmasını, nakil sırasında sarsıntı ve ısı farklılıklarının oluşturduğu zararlara karşı spermatozoal membranı korumaya yardımcı olmaktadır.

Dondurulmuş spermaya kıyasla, sulandırılıp soğutulmuş sperma ile yapılan tohumlama sonucu daha yüksek gebelik elde edilmektedir. Sulandırılıp soğutulan köpek spermasının potansiyel fertilitesi üç faktöre bağlı olarak korunmaktadır. Bunlar;

- Düşük ısıda sperm metabolizmasının azaltılması,
- Sulandırıcı katılarak soğuk şokundan korunması,
- Soğuk şokuna karşı köpek sperm hücrelerinin direncinin yüksek olmasıdır.

Sperma sulandırıcıları; uygun osmotik basınç, besi ortamı, metabolik artıkları absorbe edebilme ve spermatozoonları soğüğün zararlı etkisinden koruyabilme gibi genel özelliklere sahip olmalıdır. Spermatolojik özellikleri saptanmış ve sulandırılmış spermanın +5 °C'ye soğutulması ayrı bir özen gerektirir. Çünkü, 17 °C'nin altındaki ani ısı değişikliklerinde özellikle akrozomda geri-

dönüşümsüz (*irreversible*) bozukluklar oluşabilmektedir (8, 9).

Kryoprotektant madde ilave edilmeksizin alınan spermanın soğutulması sonucu sperm hücrelerinin yaşam süresi çok kısa sürer. Soğuk şoku sırasında, sulandırıcıdaki fosfolipidler, sperm hücrelerinin plazma membranının lipid yapısı ile karşılıklı etkileşime girer ve korunmayı sağlarlar. Sperm hücresinin membranına bağlanan lipoproteinler, sperma saklamada hücresel bütünlüğün (14) korunmasına yardımcı olur (1, 8).

#### 3.2. Köpek Spermasının Uzun Süreli Saklanması

##### 3.2.1. Köpek Spermasının Dondurulmasında

##### Kullanılan Sulandırıcılar

Köpek yetiştiriciliğinde, diğer hayvan türlerinde olduğu gibi, dölerme hastalıklarının önlenmesi, genetik yapılarının iyileştirilmesi, üstün bireylerden en yüksek ölçüde yararlanılabilmesi, seçkin damızlık elde edilmesi ve gen kaynaklarının korunması haliyle büyük önem taşır.



Şekil 7: Spermanın Su Kabında Soğutulması (1).

Bu kapsamda, birçok köpek ırkında spermatolojik özelliklerin ortaya konulmasının yanı sıra, spermanın uygun solüsyonlarla sulandırılarak dondurulması, kısa ve uzun süreli saklanması, gerektiğinde suni tohumlama için kullanılması ve bunu takiben yüksek dölverimi elde edilmesi

hedefine yönelik araştırmalar uzun yıllardan beri sürdürölmektedir.

Günümüzde köpek spermasının kısa süreli ya da uzun süreli (dondurularak) saklanması amacıyla sperma sulandırıcısı olarak çeşitli solüsyonlar kullanılmaktadır.

Bunlar arasında; Tes (N-Tris [hydroxymethyl] methyl-2 amino-methene sulfonic acid), Hepes (N-2 [hydroxymethyl] piperazine-N-2-ethane sulfonic acid) ve Pipes (piperazine-N, N-bis-2-ethane sulfonic acid) gibi Tris'e kıyasla daha iyi buffer kapasitesine sahip *zwitterionic* (çift kutuplu) solüsyonlar kullanılmakla birlikte, son yıllarda köpek spermasının dondurulmasında daha çok hazır ticari preparatlar (Laiciphos, Biociphos, Biladyl, Triladyl, Andromed, vs) tercih edilmektedir (5).

Gerçektende, Laiciphos, Biociphos ve Tes/Tris'ten oluşan üç farklı sulandırıcı ile dondurulan köpek spermasında çözdüme sonrası sperm motilitesi Laiciphos, Biociphos ve Tes/Tris için sırasıyla %65, %70 ve %50, canlı sperm oranı ise %78, %80 ve %65 olarak bildirilmektedir. Pipes, Bes, Tes, Tris sulandırıcılarına üç değişik potasyumlu tampon ilavesinin (KHCO<sub>3</sub>, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, KOH) sperma dondurulması üzerine etkileri incelendiğinde; 1:2 oranında %50 Pipes/KOH + %25 sodyum sitrat + %25 dekstroz + %20 yumurta sarısı + %9 gliserol ile çözdüme sonrası en iyi sperm motilitesi elde edilmiştir (5).

Spermanın sıvı azot buharında dondurulmasında, sperm hücrelerinin soğuk şokundan olumsuz etkilenmeleri nedeniyle spermatolojik özelliklere ait değerler değişebilmektedir (8,10). Hücre membranlarında oluşan perforasyonların, özellikle akrozomda bulunan ve fertilizasyonda görev alan enzimlerin (14) kaybına yol açtığı ve bu durumdaki sperm hücrelerinin dölleme yeteneğini kaybettiği bildirilmektedir (4,8,9,12).

Değişik ve çeşitli oranlarda kryoprotektanları içeren sperma sulandırıcılarının, anılan dondurma aşamalarında sperm hücrelerini soğuk etkisinden korumaları, buldukları ortamdaki madde alışverişini ayarlamaları ve membranların çevresinde oluşan buz kristalizasyonlarının olumsuz etkilerinin en aza indirilmesiyle olduğu bilinmektedir (3).

Seminal plazma, spermatozoon için koruyucu faktörleri içerdiiği gibi, hücre duyarlılığını artırıcı faktörleri de bulundurduğundan, ejaküle edilmiş spermadaki sperm hücreleri epididimal spermaya göre soğuk şokuna daha duyarlıdır ve daha fazla olumsuz yönde etkilenmektedir (13).

Köpek spermasının saklanmasında yumurta sarısı, dondurma işlemlerinin zararlı etkilerinden sperm hücrelerini korumak amacıyla bugüne kadar %1-20 oranlarında kullanılmıştır.

Son yıllarda spermanın dondurulması çalışmalarında (6,11) birçok araştırmacı seminal plazma kompanentlerinden biri olan BSA'dan yararlanmış ve membran stabilizatörü olan BSA'nın yumurta sarısının sperm membranları üzerine koruyucu etkisini geliştirdiğini (2), hatta BSA ile kombinasyonu durumunda yumurta sarısı konsantrasyonunun düşürölebileceğini bildirmişlerdir.

Kimi araştırmacılar (7), BSA'yı köpeklerde sperma sulandırmada kryoprotektan etkisinden faydalanmak için %6 (w/v) gibi yüksek oranda kullanırken, kimileri de %5 (w/v) oranında protein desteği olarak faydalanmışlardır. Uysal ve ark. (10) köpek spermasının dondurulması üzerine BSA'nın etkilerini inceledikleri çalışmalarında; BSA ve yumurta sarısının sulandırıcıda tek başına kullanılmalarıyla alınan sonuçlarla karşılaştırıldığında, %10 yumurta sarısı + 10 mg/ml BSA içeren M-Tris sulandırıcısıyla, çözdüme sonrası en yüksek spermatozoa motilitesi (%50,5) ve HOS-test değerleri (%58,5)

bulmuşlardır. Dolayısıyla, yumurta sarısı ile BSA kombinasyonunun sinerjik etki oluşturması dolayısıyla spermatozoonları soğuk şokundan daha iyi koruduğunu ifade etmişlerdir. Köpek spermasının dondurulmasında farklı sulandırıcıların etkinliğinin değerlendirilmesinin yanı sıra, dondurma/çözdürme işlemleri esnasında soğuk şokunun sperm hücrelerine verdiği hasarı azaltmak üzere membran stabilizatörü olarak kullanılan BSA'nın (4), çözdürme sonrası kimi spermatolojik parametrelere etkisinin ortaya konulması da amaçlanmıştır.

### 3.2.2. Köpek Spermasının Dondurulması ve Eritilmesi

Köpek spermasının dondurulması çalışmalarında, başlangıçta ampul yöntemine kıyasla daha çok pellet metodu benimsenmiş ve başarılı gebelik oranları elde edilmiştir. Günümüzde yapılan çalışmalarda ise, sperma 0.25 ml ve 0.5 ml'lik payetler içerisinde dondurulabilmektedir. Köpek spermasının dondurulduktan sonra, 12 yıldan fazla bir süre saklanabildiği ve bu sürenin spermatozoa üzerinde çok az bir fertilitite düşüklüğüne yol açtığı, ayrıca donmuş köpek spermasının eritme sonrası *in vivo* şartlarda, yaşam ömrünün ise ortalama 12 saat kadar olduğu bildirilmektedir (1, 8).

Köpek spermasının dondurulmasında; en sık kullanılan kryoprotektif madde olan gliserolün optimal yoğunluğu %3-4 arasında değişmekle birlikte, kullanılan sulandırıcının tipine göre bu oran farklılık göstermektedir (8, 9). Genelde, çoğu çiftlik hayvanına ait dondurmaya hazır payetler sıvı azot seviyesinin 4 cm yukarısında 5 dakika süreyle bekletilir ve hemen sıvı azot içine daldırılır (7,9).

Köpeklerde spermanın yarı-programlanabilir bir biyolojik dondururucu yardımıyla dondurularak yapılan bir tez çalışmasında, %2 gliserol (v/v) ve %20 yumurta sarısı içeren Tris-fruktoz-sitrik asit sulandırıcısıyla, +4 °C'den -9 °C'ye -0.5 °C/dak., -9

°C'den -20 °C'ye -40 °C/dak., -20 °C'den -120 °C'ye -100 °C/dak. ön soğutma sonrası, spermanın direkt sıvı azot içine daldırılmasıyla başarılı olunmuştur. Bu yolla, az sayıda bireylerle yapılmış olsa da %40-70 arası (çoğunlukla %40-45) bir eritme-sonrası motilite elde edilmiştir (8).

Yapılan bazı çalışmalarda, çok düşük gliserol oranları eritme sonrası yeterli koruyucu etkiyi sağlamada başarısız olurken, çok yüksek gliserol oranları ise akrozom üzerinde hasarlara neden olmaktadır. Ancak, sulandırılmış spermadaki düşük gliserol oranları (%2'ye kadar, v/v) +4 °C'de saklamada *in vitro* akrozom reaksiyonu (AR) yönünden non-fizyolojik bir hasar (14) oluşturmazken, daha yüksek oranlar (%6'ya kadar) fizyolojik AR'yi olumsuz yönde etkilemektedir (8,9). Köpek spermasının pellet formda dondurulması amacıyla, genellikle "%4 gliserollü %11 laktoz ve %20 yumurta sarısı" ya da "%4 gliserollü yağsız süt - glukoz" sulandırıcısı kullanılmaktadır (1, 8). Köpek spermasını payetlerde dondurmada ise genellikle "yumurta sarısı- Tris - fruktoz - sitrik asit tamponlu %3 gliserollü" sulandırıcılar tercih edilmektedir (1). Genel anlamda, eritme sonrası sperm motilitesinin  $\geq$ %40, anormal spermatozoa oranının ise  $\leq$ %30 olması gerekir (2,9).

Köpek spermasını sulandırmada sıklıkla 1:1- 1:8 oranları (ağırlıkla 1:4 oranı) kullanılmaktadır (8). Bu oranlar, alınan spermadaki spermatozoon yoğunluğuna bağlı olarak değişebilmektedir. Pellet yöntemine göre dondurulan spermanın eritilmesi için ise, ayrıca, dondurma protokolünde kullanılan sulandırıcı ya da serum fizyolojik içeren bir tüpte 37 °C'de 30 saniyede eritilmesi gereklidir (1, 8). Payet yöntemine göre ise; dondurulan köpek spermasının eritilmesi için sıklıkla üç farklı derece ve ısıda su banyosu kullanılmaktadır. Bunlardan ilki 0,25'lik payetler için 37 °C'de 30 saniye (veya 35 °C'de 60 saniye; 8) iken, ikincisi 0,5 ml'lik



payetler için 75 °C'de 6,5 saniye ve 70 °C'de 8 saniyedir (8, 11).

Köpeklerde sperma ml'de 100 milyon doz olacak şekilde sulandırılırken, bir payet başına düşen sperm yoğunluğu ise 25-50 milyon arasındadır (2).

#### 4. KÖPEKLERDE SUNI TOHURLAMA TEKNİKLERİ

Köpeklerde başlıca dört farklı tohumlama tekniği kullanılır (1, 8):

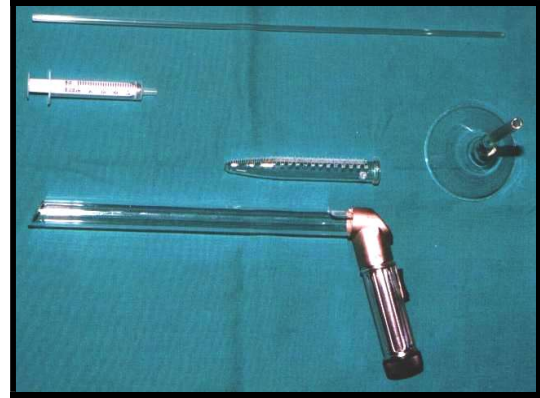
1. Kateterle İnvavaginal,
2. Norveç Kateteriyle İnvavuterin,
3. Endoskopik Yöntemle İnvavuterin,
4. Cerrahi Teknikle İnvavuterin.

##### 4.1. Kateterle İnvavaginal Tohumlama

Uygulanmasının kolay olması ve özel bir alet-ekipman gerektirmemesinden dolayı tercih edilen bir yöntemdir. Köpekler için vaginal tohumlama, plastik bir katater ile vaginal boşluktan bir dirençle karşılaşılıncaya kadar kataterin ilerletilmesi ve spermanın vaginanın cranialine bırakılması şeklinde yapılan bir yöntemdir.

**Uygulanışı:** Köpek uygun bir yere alınır. Kuyruk yana çekilir ve vulva açığa çıkarılır. Vulva fizyolojik tuzlu su vb. bir sıvı ile dikkatle yıkanır ve güzelce kurulur. Dezenfektanların spermatozoa üzerine toksik etkisinden dolayı, vulvanın yıkanması işlemi için dezenfektan kullanılmamalıdır. Hayvanın arka ayakları hafif ayrılarak yukarı kaldırılır. Yer ile yaklaşık 45-60 derece açı yapması sağlanır. Vagina aralanır ve katater vaginanın dorso-cranial yönünde ilerletilir. Biraz ilerledikten sonra katater yatay hale getirilir. Vaginal bir direnç ile karşılaşılıncaya kadar, yani cervix'in önüne kadar katater ilerletilir ve sperma oraya bırakılır. Spermanın geri akışını engellemek için dişi köpek 15-20 dakika aynı pozisyonda arka ayakları havada olacak şekilde tutulur ve vulva (clitoris) bölgesine masaj yapılır. Tohumlanan köpek yaklaşık 1 saat sakin tutulmalı ve abdomene basınç uygulamamaya da dikkat edilmelidir.

Dişi köpeklerde vajinanın uzun olması, paraservikal bölgede daralma, serviksin ventral açılı olması gibi anatomik nedenlere bağlı olarak serviksi geçerek intrauterin tohumlama yapmak biraz güçtür. Taze ve donmuş sperma ile kolay uygulanabilir olması sebebiyle, invavaginal tohumlama birçok araştırmacı tarafından önerilmiş ve bu konuda çalışmalar yapılmıştır (8). Yapılan araştırmaların çoğunda, taze sperma ile yapılan invavaginal tohumlamalardaki gebelik oranları oldukça yüksektir. Bu yöntemle (özellikle taze sperma ile) yapılan tohumlamalarda %80 başarı sağlanmaktadır (1).



Şekil 8. İnvavaginal Tohumlama Seti (1).

##### 4.2. Norveç Kateteri ile İnvavuterin Tohumlama

Anılan yöntem, Norveç'li Dr. John Fougner tarafından 1970 yılında tilkilerin intrauterin tohumlanmalarında kullanılan bir kateter olarak geliştirilmiştir. Daha sonra, köpeklerde de ilk olarak İskandinav ülkelerinde başarıyla kullanım alanı bulmaya başlamıştır (8). Bu yüzden, bazı kitaplarda İskandinav kateteri olarak anılmaktadır (*Scandinavian stainless steel catheter*).



Şekil 9. İskandinav Çelik Kateterlerin Uçları (1).



Şekil 10: Üç Farklı Boyda Norveç Kateterleri (1).

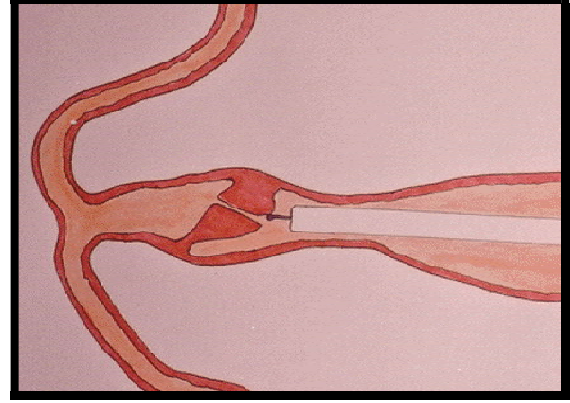
**Uygulanışı:** Öncelikle, sert plastikten yapılmış ince borucuk vajen içerisine yavaşça sokularak serviksın önüne kadar getirilir.



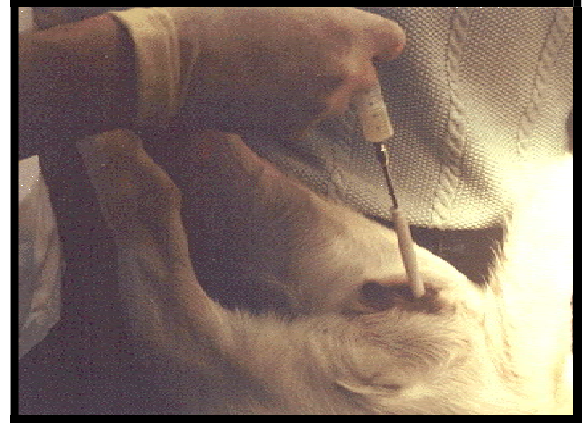
Şekil 11. Sert Plastik Borucuğun Vajenden Serviksın Önüne Kadar İlerletilmesi (1).

Sol el ile abdomenden öncelikle sert plastik çubuğun yeri saptanarak uterusun konumu saptanmaya çalışılır. Ardından, çelik kateter bu kılıfın içerisinden yine yavaşça geçirilir ve kateterin ucu tespit edilerek, serviksın ucu ile karşı

karşıya getirilmesine çalışılır ve yavaşça içeriye sokularak trans-servikal giriş sağlanır. İntrauterin tohumlama sırasında dişi köpeğin arka kısmı havaya kaldırılmalıdır.



Şekil 12: Norveç Kateteri İle Trans-Servikal Suni Tohumlama (1).



Şekil 13. Çelik Kateterin Plastik Borucuğun İçerisinden Geçirilişı ve Spermın Verilmesi (1).

Sperma yavaşça serviksın içerisine geçirilmiş kateterden aktarılır. Norveç kateteri ile trans-servikal tohumlamada, iki adet 0,5 ml'lik payet (her birinde 75 milyon sperm) kullanılmaktadır.

Anılan teknik uzmanlık gerektirmektedir. Buna dişi köpeklerde serviksın hayli dar-kısa oluşu ve duruş-açısının neden olduğu öne sürülmektedir (1).

#### 4.3. Endoskopik Yöntemle İntrauterin Tohumlama

Bu yöntemle tohumlama için tecrübe, zaman ve sabır gerekmektedir. Endoskop cihazına kamera bağlantısı yapılarak, endoskoptan geçirilen kateter

için oldukça kolaylık sağlamaktadır. Bu amaçla, boyu uzatılmış cystourethroscope kullanılmaktadır.

Bu alet, 30 derecelik oblik görüş açısında bir teleskop ve soğuk bir ışık kaynağından oluşmaktadır. Endoskopun çalışma uzunluğu 29 cm'dir. Tohumlama 6 ile 8 numara Fransız idrar kateteri ile gerçekleştirilir.

Bu yöntemin uygulanmasında, hayvanın hareketsizleştirilmesi son derece önem taşımaktadır. Bu amaçla, özel bir hidrolik platform üzerinde bulunan dişi köpeğin, tasmaından bağlandıktan sonra, sağa sola hareketinin ve oturmasının engellenmesi için karın bölgesinden bir bant ile bağlanması da gerekir.

**Uygulanışı:** Endoskop vajinanın içerisine yerleştirilir ve vajinal duvarın arasından içeriye bakılır. Erken östrus ve proöstrusta; dişi köpeğin vajina duvarı ödemli ve vajina lumenini dolduran durumdadır. Östrusun başlamasıyla birlikte, bu duvar dehidrasyona uğrayarak daha iyi gözlemlenmeye olanak verir. Dorso-median duvarın kaudal çıkıntısı oldukça dardır. Serviksin vajene bakan yüzü, kaudo-ventral ya da ventral yönde olduğundan gözlenemeyebilir.

Anestezi ve sedasyon olmaksızın östrustaki birçok dişi köpek trans-servikal tohumlama sırasında rahatsızlık duymaz. Kateter endoskopun dikkatli manipülasyonu ile servikal kanaldan içeriye ilerletilmelidir. Operatör, spermayı verirken gözleme yaparak spermanın geriye akması halinde durur ve kateterin pozisyonunu değiştirerek yeniden dener. Bazı küçük ırk köpeklerde, serviksin çok dar olması nedeniyle daha küçük çaplı endoskoplar kullanılmalıdır. Doğru zamanda, dişi ve erkek köpeğin fertilitésinin iyi olduğu ve spermanın uterus içerisine verildiği durumlarda gebelik oranı %80'nin üzerindedir (1).

#### 4.4. Cerrahi Teknikle İntrauterin Tohumlama

Bu teknikte, operasyon öncesi hayvan aç bırakılır ve genel anestezi uygulanır. Operasyon bu konuda deneyimli bir Veteriner Hekim tarafından kornu uterilere uygun yerden (median ya da lateral) açılarak yapılır. Tohumlama dozu olarak, donmuş-eritilmiş sperma için 5-10 milyon, taze sperma için ise 2-5 milyon spermatozoa yeterlidir.



**Şekil 14.** İntrauterin Tohumlamalarda Kullanılan Endoskopi Cihazı (3).

**Uygulanışı:** Öncelikle, ovaryumlar folliküler ve luteal gelişim yönünden incelenir ve kaydedilir. Operasyonla açığa çıkarılan kornu uterinin orta hattından ve damarsız bir yerinden enjektöre çekilmiş taze ya da donmuş-eritilmiş sperma içeriye verilir. Bu işlem sonrası, hayvana ovulasyonu uyarmak için GnRH'nın yeterli dozda uygulanması gereklidir (1).

#### 5. SONUÇ

Diğer tüm hayvanlarda olduğu gibi, köpeklerde de başarılı bir sperma alma, ön değerlendirme, işleme, dondurma-eritme ve suni tohumlama sonucu elde etmek için; spermanın alınmasından başlayarak suni tohumlama işleminin gerçekleştirilmesi ve sonucunun takibine kadar tüm protokol basamaklarının büyük bir dikkat ve titizlikle yürütülmesi gerekir. Elde edilecek sonuçlarının güvenilirliği için, suni tohumlama sürecinde baştan-sona kadar hem erkek (libido, sperma, genetik, sağlık, vs.) hem de dişi bireyin (östrus, vücut yapısı, sağlık, beslenme-barınma, vs.) kolektif

katkılarının bir 'bütünlük' içerisinde ele alınması zorunludur (9).

#### **Teşekkür**

İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Alper BARAN'a, zengin kaynak temini ve nazik kullanım izni dolayısıyla içten teşekkürü bir borç biliriz.

#### **KAYNAKLAR**

**1. Baran A. (2015):** Köpeklerde Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama. Ders Notu, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, İstanbul.

**2. De Leeuw FE, De Leeuw AM, Den Das JH, Colenbrander B, Verkleij AJ (1993):** Effect of various cryoprotective agents and membranes-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, 30, 32-44.

**3. 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.

**4. Müller B, Kircher C (1978):** Influence of seminal plasma proteins on motility of rabbit spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 54, 167-172.

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

**6. Smith FO (1985):** Cryopreservation of canine semen. Technique and performance. *Diss Abstr Int B-Sci and Engin*, 11, 3441.

**7. 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.

**8. Uçar Ö. (2000).** Acrosome Reaction and Cryopreservation of Dog Spermatozoa. PhD thesis. Bristol University, Bristol, UK.

**9. Uçar, Ö. (2004):** Akrozom reaksiyonunun sperma kalitesi, muhafazası ve suni tohumlama başarısındaki rolü. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 10: 117-124 (Derleme).

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

**11. Uysal O, Varışlı Ö, Yavaş İ. Bucak M N, Tosun H (2007):** Cryopreservation of canine semen at different freezing/thawing programs. *Indian Vet J*, 84, 54-57.

**12. Weitze KF (1981):** Tiefgefrierkonservierung von kaninchensperma. 1. bedetung der anzahl intakter spermien für den besamungserflog. *Zuchthygiene*, 16, 212- 218.

**13. Weitze KF, Petzoldt R (1992):** Preservation of gamets. *Anim Reprod. Sci*, 28, 229-235.

**14. Yanagimachi R (1988):** Mammalian fertilization. Chapter 5, In: *The Physiology of Reproduction*. 2<sup>nd</sup> Ed. Knobil E., Neill J. (Eds). pp.189-317. Raven Press Ltd, New York, USA.