

Köpeklerde Transservikal-İntrauterin ve İntravaginal Tohumlama Yöntemlerinin Dölverimine Etkisi

Ali DAŞKIN, Necmettin TEKİN, Ergun AKÇAY

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, 06110, Ankara - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 08.03.2002

Özet: Bu çalışma, transservikal ve intravaginal tohumlama yöntemlerinin köpeklerde gebelik üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan spermalar, kliniğe getirilen köpeklerden masaj yöntemiyle alınmıştır. Alınan spermalar laboratuvar incelemeleri yapıldıktan sonra Tris ile sulandırılarak dondurulmuştur. Bu spermalar, oluşturulan sperma bankasında depolanmıştır.

Kliniğe getirilen 31 adet dişi köpek bu spermalarla tohumlanmıştır. Bunlardan bir tanesi değerlendirmeye alınmamıştır. Östrus, östrus davranışları ve vaginal sitoloji ile belirlenmiş ve köpekler östrus periyodunda iki kez tohumlanmıştır. Toplam 30 köpeğin 15'i transservikal yöntem ile diğer 15'i ise intravaginal yöntemle tohumlanmıştır.

Transservikal yöntemle yapılan tohumlamalardan % 60,00 ve intravaginal yöntemle yapılan tohumlamalardan da % 26,66 gebelik oranı elde edilmiştir ($p < 0,05$).

Sonuç olarak, dondurulmuş sperma ile transservikal yöntemle yapılan tohumlamaların köpeklerde fertilité üzerine, intravaginal yöntemle yapılan tohumlamalara göre daha fazla etkili olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Köpek, transservikal-intrauterin tohumlama, intravaginal tohumlama, dondurulmuş sperma, gebelik oranı

The Effect of Transcervical Intrauterine and Intravaginal Insemination Methods on Fertility in Dogs

Abstract: This study was carried out to determine the effect of transcervical and intravaginal artificial insemination on the pregnancy rate in dogs.

Semen was collected by the massage method from dogs brought to our department. Collected semen was examined in the laboratory and stored in liquid nitrogen after dilution with Tris extender.

During the study 31 bitches brought to our department for artificial insemination were used. One of the bitches was not evaluated. Oestrus was detected by vaginal cytology and the bitches were inseminated twice during the oestrus period. Fifteen of the 30 bitches were inseminated transcervically and the other 15 intravaginally.

The pregnancy rate was 60.00% with the transcervical insemination method and 26.66% with the intravaginal insemination method ($p < 0.05$).

In conclusion, we have detected that transcervical insemination with frozen dog semen is more effective than intravaginal insemination in terms of fertility.

Key Words: Dogs, transcervical-intrauterine insemination, intravaginal insemination, frozen semen, pregnancy rate

Giriş

Köpeklerde, dondurulmuş sperma ile sun'i tohumlama son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Köpek spermasının dondurulmasında ilk başarı 1954 yılında

Rowson tarafından bildirilmiş, 1969'da Seager dondurulmuş sperma ile ilk gebeliği elde etmiştir (1). Bu gelişmelere bağlı olarak Amerika, Kanada ve bazı Avrupa ülkelerinde köpek spermasının dondurulması büyük bir

*Bu çalışma TÜBİTAK (VHAG-1341 nolu proje) tarafından desteklenmiştir.

endüstri haline gelmiş ve bu alanda ticari faaliyet gösteren birçok sperma bankası kurulmuştur. Bu amaçla, hem değerli köpek ırklarının saf yetiştirilmesi yapılabilmekte hem de maddi yönden büyük kazançlar sağlanmaktadır (2).

Köpek spermasının dondurulmasında, bir çok farklı dondurma yöntemleri kullanılmıştır. İlk yapılan çalışmalarda Krebs-Ringer-Fosfat tampon solusyonları kullanılmış, daha sonra Seager ve ark. (3), % 11 laktöz içeren sulandırıcı ile başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Günümüzde dipolar iyon (zwitterionic) tampon solusyonları sperma sulandırılmasında kullanılmaktadır. Bunlardan en önemlisi Tris-Sitrat-Yumurta Sarısı sulandırıcısı olup, modifiye edilmiş değişik formülasyonlarla birçok araştırmada başarıyla kullanılmıştır (1,4,5,6).

Köpeklerde dondurulmuş spermanın tohumlamada kullanımının yaygınlığına karşın, taze sperma ile tohumlamalardan elde edilen fertilité oranları daha yüksektir (7,8). Çünkü dondurulmuş-çözülmüş spermatozoonların yaşam süresi, taze sperma ile karşılaştırıldığında daha kısadır. Bu durum araştırmacıların dikkatini spermanın sulandırılması ve dondurulması teknikleri üzerine olduğu kadar, tohumlama yöntemleri üzerine de çekmektedir (9,10).

Köpeklerde tohumlama yöntemleri, vaginanın herhangi bir yerine depolanmak üzere vaginal, operatif ve operatif olmayan yöntemlerle transservikal-intrauterin olmak üzere iki yöntemle yapılmaktadır (3,11,12,13). Norveçli araştırmacıların geliştirdikleri transservikal tohumlama kateteri ve tekniği ile operatif bir işleme gerek kalmadan, bazı köpeklerde belki bir sedasyon ile spermayı transservikal olarak bırakmak mümkün olmaktadır (4).

Gerek taze, gerekse dondurulmuş sperma ile transservikal ve vaginal yapılan tohumlamalar arasında transservikal tohumlamaların vaginal tohumlamalardan daha iyi fertilité sonuçları sağladığı kaydedilmektedir (9). Taze sperma ile vaginal tohumlamalarda elde edilen fertilité oranlarının yüksekliği gözönüne alındığında taze sperma ile vaginal tohumlamanın kullanılabileceği ve fakat dondurulmuş spermanın mutlaka uterusu bırakılmasının gerektiği önerilmektedir (14,15). Doğal çiftleşmeye en yakın dölveriminin taze spermanın transservikal olarak tohumlanması durumunda elde edilebileceği, hatta dondurulmuş sperma ile transservikal tohumlamaların taze sperma ile intravaginal tohumlamaya oranla daha yüksek dölverimi oranları sağladığı bildirilmiştir (9).

Fontbonne ve Badinand (16) ve Silva ve ark. (17) da dondurulmuş sperma ile transservikal tohumlamaların intravaginal tohumlamalara göre daha iyi sonuçlar sağladığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada köpeklerde yaygın olarak kullanılmakta olan intravaginal tohumlama ile yeni bir yöntem olan transservikal intrauterin tohumlamanın gebelik ve fertilité üzerine etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı Kliniği'ne getirilen ve fenotipik olarak ırk özelliklerini yansıtan 16 değişik ırka ait 29 köpekten alınan spermalar ile sperma bankası oluşturulmuş; 0,25 ml'lik 418 doz sperma dondurulmuş ve bu spermalarla, kliniğe getirilen 31 dişi köpek, iki farklı suni tohumlama yöntemi ile (transservikal-intrauterin ve intravaginal) tohumlanmışlardır. Araştırmada dişi köpek materyalini evde bakılan ve farklı beslenme ve bakım şartları altında, değişik ırk ve yaşlarda köpek materyali oluşturmuştur. Erkek köpek materyali ise aynı şekilde farklı bakım ve beslenme şartları altında değişik ırk ve yaşlarda köpeklerden oluşturulmuştur.

Spermanın alınması, değerlendirilmesi ve dondurulması : Sperma, önünde kızgın bir dişi bulunduran erkek köpeklerden masaj (digital maniplasyon) yöntemiyle alınmıştır. Üç fraksiyon halinde toplanan spermanın 1. ve 3. fraksiyonları değerlendirmeye alınmamış, 2. fraksiyon değerlendirilmiştir. Spermaların spermatolojik özellikleri, sun'i tohumlama laboratuvarında belirlenmiş, motilitesi % 80 ve üzeri olan spermalar dondurma işlemine tabi tutulmuş, düşük kalitedeki spermalar ise değerlendirilmemiştir.

Sperma sulandırıcısı olarak modifiye Tris + yumurta sarısı kombinasyonu kullanılmıştır (5).

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

Sulandırılan spermalar 0,25 ml'lik payetlerde 100x10⁶/0,25 ml spermatozoon olacak şekilde dondurulmuş ve % 50 ve üstünde çözümü motilite gösteren spermalar depolanmıştır. Çalışma boyunca fenotipik özelliklerine göre: Kangal (Karabaş), White Terrier, Great Dane (Danua), Alman Kurt (German Shepherd), Doberman Pinscher, Amerikan Cocker, French Bulldog, Rotweiller, Pomeranian, Pekingese, Boxer, St. Bernard, Border Collie, Dalmatian, English Setter, Poodle olmak üzere 16 ırka ait sperma dondurulmuş ve depolanmıştır.

Östrus takibi ve en uygun tohumlama zamanının belirlenmesi : Çalışma boyunca tohumlanma isteği ile kliniğe getirilen köpeklerden toplam 31 dişi çalışmada kullanılmıştır. Bir köpektan tohumlama sonrası bilgi edinilememiş ve çalışmadan çıkarılmıştır. Çalışmaya alınan köpeklerin kayıt bilgileri, özellikleri, reproduktif geçmişleri ve kliniğe başvurdıkları andaki anamnezleri alınmış ve kaydedilmiştir.

Östrus belirtileri gösteren köpekler anamnez bilgileri doğrultusunda muayene edilmiş ve vaginal smear örnekleri alınarak östrus ve en uygun tohumlama zamanları tespit edilmiştir. Vaginal smear örneklerinde % 90 ve üzerinde kornifiye süperfisiyal epitel hücresi saptanan köpekler tohumlama için uygun zamanda kabul edilmişlerdir.

Sun'i Tohumlama : Vaginal smear bulgularında % 90 üzerinde kornifiye epitel hücresine sahip köpeklere ilk tohumlama uygulanmış, dişiler ilk tohumlamadan sonraki 2. günde tekrar tohumlanarak her dişide iki tohumlama gerçekleştirilmiştir. Her iki yöntemle tohumlamalarda da, tohumlama dozu olarak 4 doz (payet) dondurulmuş sperma kullanılmıştır. Dişi köpekler kendi ırklarından köpeklerin dondurulmuş spermaları ile tohumlanmışlardır. Çözüm sonu motilite değerleri % 50 ve üzerindeki spermalar tohumlamada kullanılmışlardır. Köpeklerden 15'i transservikal intrauterin ve 15'i ise intravaginal yöntemle tohumlanmışlardır.

Transservikal-intrauterin Tohumlama : Bu tohumlama yönteminde sert plastik kılıflı metal tohumlama kateterleri kullanılmıştır (18).

Vaginaya sokulan kateterin plastik kılıfı, pseudo-serviks geçilerek serviks ağzına kadar ilerletilmiş ve abdominal palpasyonla tespit edilen serviksten metal kateter geçirilerek sperma uterusu bırakılmıştır.

Bu yöntemde sert karakterli kimi dişiler 2,3 mg/kg i.m. xylazin ile sedatize edilmişlerdir.

İntravaginal Tohumlama : Bu yöntemde plastik enjektöre adapte edilmiş plastik kateterler kullanılmıştır. Vaginadan sokulan tohumlama kateteri, pseudoserviks yakınında iken sperma vaginaya bırakılmıştır.

Çalışmada elde edilen bulguların istatistiksel analizi için Student-T test yöntemi kullanılmıştır.

Bulgular

Çalışma sonunda fenotipik olarak ırk özelliklerini yansıtan 16 değişik ırka ait toplam 29 köpeğin spermaları dondurulmuş, ve oluşturulan "köpek sperma bankası"nda depolanmıştır. Çalışma süresince toplam 0,25 ml'lik 418 doz sperma dondurulmuştur.

Tablo 1. Köpek Sperma Bankasında spermaları depolanan ırklar, payet sayıları ve çözümü motilite oranları.

Köpek Irkı	Dondurulan Payet Sayısı (Doz)	Çözüm Sonu Motilite (%)
Alman Kurt	48	62.50
Amerikan Cocker	74	61.66
Bearded Collie	32	63.33
Boxer	38	62.50
Dalmaçyalı	16	62.50
Doberman Pinscher	16	60.00
English Spaniel	13	65.00
French Bulldog	19	60.00
Great Dane	23	60.00
Kangal	39	59.16
Pekingese	14	61.25
Pomeranian	21	63.33
Poodle	10	52.50
Rotweiller	22	66.66
St. Bernard	23	60.00
White Terrier	10	60.00
Toplam/Ortalama	418	61.27

Dondurulmuş sperma ile toplam 30 dişi köpek tohumlanmıştır.

Dondurulmuş sperma ile intravaginal tohumlama yöntemi kullanılarak tohumlanan 15 dişiden 4'ünde gebelik elde edilmiş, bu yöntemle gebelik oranı % 26,66 olarak gerçekleşmiştir.

Dondurulmuş sperma ile transservikal-intrauterin tohumlama yöntemi kullanılarak tohumlanan 15 dişiden ise 9 gebelik elde edilmiş, gebelik oranı % 60,00 olarak gerçekleşmiştir. İki değişik yöntemle elde edilen gebelik

oranları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$).

Tablo 2. İki Farklı Yöntemle Tohumlanan Köpeklerde Gebelik Oranları.

Tohumlama Yöntemi	Tohumlanan Köpek Sayısı (n)	Gebelik Sayısı (n)	Gebelik Oranı* (%)
Intravaginal	15	4	26.66
Transservikal-intrauterin	15	9	60.00

* $p < 0.05$

Tartışma

Spermanın genital kanalda bırakıldığı yerin dölverimine etkisini araştıran kimi çalışmalar göstermektedir ki, taze sperma ile yapılan çalışmalarda bile vaginaya bırakılan sperma daha düşük dölverimi oranları oluşturmaktadır (9). Kimi çalışmalar ise intravaginal tohumlamaların yavru sayısının azlığına da neden olduğunu göstermektedir (16). Vajinanın mikroorganizma popülasyonu dolayısı ile de spermanın uterusu bırakılmasının tercih edilmesi gerektiği vurgulanmaktadır (19). Bir çok araştırmacı, özellikle dondurulmuş spermanın kullanımı söz konusu olduğunda, spermanın direkt olarak uterus içine bırakılması gerektiğini bildirmektedirler (9,11,14,20).

Dondurma prosedürünün, spermatozoonların çözüm sonu yaşam sürelerini önemli ölçüde azalttığı, dolayısı ile uterus içi tohumlamaların daha iyi gebelik sonucu verdiği kaydedilmektedir (21). Bununla birlikte transservikal tohumlama, vaginanın anterior bölümünün (pseudo-cervix) cervix önünde oluşturduğu dorsal kat (kıvrım) dolayısı ile kolay olmamaktadır (15,21). Vajinanın bu bölümü herhangi bir tohumlama kateterinin geçişine izin vermediği gibi serviksin inspeksiyonunu dahi engellemektedir (18,21).

Kaynaklar

1. England, G.C.W.: Cryopreservation of dog semen. J. Reprod. Fertil. Suppl., 1993; 47: 243-255.
2. Stockner, P.K.: Status of canine frozen semen industry. Modern Vet. Pract., 1985; 66 (2): 98-100.
3. Seager S.W.J., Platz, C.C., Fletcher, W.S.: Conception rates and related data using frozen dog semen. J. Reprod. Fertil., 1975; 45: 189-192.
4. Morton, D.B., Bruce, S.G.: Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. J. Small Anim. Pract. 1989; 39: 311-316.
5. Yubi, C.A., Ferguson, J.M., Renton, J.P., Harker, S., Harvey, M.J., Bagyenji, B., Douglas, T.A.: Some observations on the dilution, cooling and freezing of canine semen. J. Small Anim. Pract. 1987; 28: 753-761.

Dondurulmuş sperma kullanılarak spermanın bırakıldığı yerlerin dölverimine etkisinin araştırıldığı bu çalışmada elde edilen sonuçlar da transservikal tohumlamanın vaginal tohumlamaya oranla oldukça yüksek dölverimi sağladığını ortaya koymaktadır (Tablo 2). İki grup arasında elde edilen gebelik oranları açısından fark istatistik olarak da önemli bulunmuştur. Gerek intravaginal gerekse transservikal tohumlama sonucu alınan gebelik oranları bu konuda çalışan diğer araştırmacıların sonuçlarına benzerlik göstermektedir (7,8,9,14,20). Değişik bir tohumlama kateteri kullanılarak spermanın uterusu bırakılması ile tohumlamada kullanılan payet sayısının azaltılabileceği ve tatmin edici dölverimi oranına ulaşılabileceği bildirilmiştir (22).

Dondurulmuş sperma ile tohumlamada fertilité oranlarını etkileyen diğer faktörler de, kullanılan dondurulmuş spermanın kalitesi ile tohumlama zamanının doğru tespiti ve tohumlama sayılarıdır. Kullanılan denek sayılarının farklılığı da düşünüldüğünde, araştırmalar arasındaki kimi sayısal farklılıklar önemsiz görünmektedir.

Transservikal-intrauterin tohumlama yöntemi, operatif intrauterin tohumlama yöntemi ile karşılaştırıldığında da, elde edilen sonuçlar açısından fark bildirilmemiştir (23).

Sonuç olarak, transservikal tohumlama kateteri ile operatif bir işleme gerek kalmadan gerçekleştirilebilen transservikal tohumlama tekniği donmuş sperma ile yapılan tohumlamalarda gebelik oranlarını arttıran önemli bir faktördür. Bu yöntemin kullanımının pratik yapılmasını gerektiriyor olmasına karşın, özellikle dondurulmuş sperma kullanımı söz konusu olduğunda dölverimini önemli ölçüde arttırıcı etkisi göz önünde bulundurulmalıdır. Yine de elde edilen sonuçlara ırk, yaş, bakım, beslenme ve çevre gibi faktörlerin etki edebileceği gözden uzak tutulmamalıdır.

6. Oettle, E.E.: Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Anim. Reprod. Sci.* 1986; 12: 145-150.
7. Linde-Forsberg, C., Forsberg, M.: Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1989; 39: 299-310.
8. Linde-Forsberg, C., Forsberg, M.: Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1993; 47: 313-323.
9. Farstad, W.: Bitch fertility after natural mating and artificial insemination with fresh or frozen semen. *J. Small Anim. Pract.* 1984; 25: 561-565.
10. Ferguson, J.M., Renton, J.P., Farstad W., Douglas, T.A.: Insemination of beagle bitches with frozen semen. *J. Small Anim. Pract.* 1989; 39: 293-298.
11. Smith, F.O.: Update in freezing canine semen. In: *Proceedings Society for Theriogenology*, 1984; 61-73.
12. Lfes, G.E., Casteberry, MW.: The use of frozen semen for artificial insemination of German shepherd dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 1977; 25: 382-385.
13. Pickett, B.W., Amann, R.P., Squires, F.L., Voss, J.L.: Current status of frozen semen. In: *Proceedings Society for Theriogenology*. 1984; 81-86.
14. Linde-Forsberg, C.: Achieving canine pregnancy by using frozen semen or chilled extended semen. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* 1991; 21 (3): 467-485.
15. Pineda, M.H., Kainer, R.A., Faulkner, L.C.: Dorsal median postcervical fold in the canine vagina. *Am. J. Vet. Res.* 1973; 34: 1487-1491.
16. Fontbonne, A., Badinand, F.: Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and transcervical deposition of semen. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1993; 47: 325-327.
17. Silva, L.D., Onclin, K., Lejeune, B., Versteegen, J.P. Comparisons of intravaginal and transservical insemination of bitches with fresh or frozen semen. *Vet. Rec.* 1996; 138 (7): 154-157.
18. Andersen, K.: Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. *Zuchthygiene*, 1975; 10: 1-4.
19. Knaus, E.: Die künstliche Besamung des Hundes bei bestehenden Deckhindernissen. *Wien. Tierarztl. Monatsschr.* 1975; 62: 353-354.
20. Farstad, W., Andersen, B.K.: Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 1989; 39: 289-292.
21. Andersen, K.: Artificial uterine insemination in dogs. 8th *Int. Congr. Anim. Reprod.*, Krakow, 1976; 960-963.
22. Theret, M., Treize, G., Dumon, C.: Artificial insemination of the bitch, using the osiris gun. *Modern Vet. Pract.*, 1987; April 229-230.
23. Wilson, M.S.: Non-surgical transcervical artificial insemination in bitches using frozen semen. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 1993; 47: 307-311.