



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2018; 32 (1): 17 - 21
<http://www.fusabil.org>

Alper KOÇYİĞİT

Cumhuriyet Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Dölerme ve Suni
Tohumlama Anabilim Dalı,
Sivas, TÜRKİYE

ORCID: 0000-0001-9639-5497

Kangal Köpeği Spermasının Ticari Sulandırıcı (CaniPlus Freeze) Kullanılarak Dondurulması

Günümüzde köpek spermasının kısa süreli ya da dondurularak uzun süreli saklanması amacıyla sperma sulandırıcısı olarak çeşitli solüsyonlar kullanılmaktadır. Bu çalışmada Kangal köpeği spermasının CaniPlus Freeze sulandırıcısı kullanılarak dondurulabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla ırka ait fenotipik özellikleri taşıyan iki adet Kangal köpeğinden masaj yöntemi ile alınan toplam 32 ejakülat sperma kullanılmıştır. Dondurma işlemi için birleştirme (pooling) sonrası sperma iki eşit kısma bölünerek birinci kısım Tris solüsyonu ile ikinci kısım ise CaniPlus Freeze sulandırıcısı ile sulandırılmıştır. Payetlere çekilen spermalar buzdolabına (+4 °C) yerleştirilmiş ve 1.5 saat ekilibrasyona bırakılmıştır. Ekilibrasyon süresi sonunda payetler, sıvı azot seviyesinden 4 cm yükseklikte (-120 °C) 20 dakikada dondurulmuş ve buradan sıvı azota daldırılarak saklanmıştır. Dondurma işleminden sonra spermaların bulunduğu payetler 38 °C'deki su banyosunda 30 saniyede çözündürülmüş ve spermatolojik muayeneye tabi tutulmuştur. Çalışmada çözüm sonu motilite oranları kontrol ve CaniPlus Freeze grubunda sırasıyla %45 ve %50 olarak belirlenmiştir (P>0.05). Anormal spermatozoon oranı ise kontrol grubunda %18.8 iken CaniPlus Freeze grubunda %16.4 olarak tespit edilmiştir (P>0.05). Sonuç olarak araştırmacıların yanı sıra özellikle klinisyen veteriner hekimlerin köpeklerde ticari sulandırıcıları kullanmasının sperma saklama çalışmalarında pratik fayda sağlayacağı kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kangal köpeği, sperma, kriyoprezervasyon, caniplus freeze

Cryopreservation of Kangal Dog Semen in Commercial Extender (CaniPlus Freeze)

Various solutions are used as sperm extenders in order to keep dog spermatozoa for a short time or for freezing for a long time. In our study, it was aimed to determine the effect of commercial diluent on freezing-thawing spermatological parameters in freezing of Kangal dog sperm. For this purpose, a total of 32 ejaculates were taken from two Kangal dogs by massage method. After freezing, the semen was divided into two equal portions and the first portion was diluted with Tris solution and the second portion was diluted with CaniPlus Freeze diluent. spermatozoa were placed in the refrigerator (+4 °C) and left for 1.5 hours. At the end of the equilibration period, the straws were frozen for 20 minutes at a height of 4 cm (-120 °C) from the level of liquid nitrogen and stored therein by immersion into liquid nitrogen. After freezing, the semens were thawed at 38 °C for 30 seconds and subjected to spermatological examination. In the study, the resulting motility ratios were 45% and 50%, respectively in the control and CaniPlus Freeze groups (P>0.05). Abnormal spermatozoon ratio was found to be 18.8% in control group and 16.4% in CaniPlus Freeze group (P>0.05). As a result, in addition to researchers, we are particularly considering that the use of commercial diluents by clinician veterinarians in dogs will be of practical benefit in semen storage studies.

Key Words: Kangal dog, semen, cryopreservation, caniplus freeze

Geliş Tarihi : 24.11.2017
Kabul Tarihi : 22.01.2018

Giriş

Türk çoban köpeği Kangal (Karabaş), dünyanın en eski ve en yaygın doğal çoban köpeği ırkıdır. Fakat gerek evcilleştirmenin etkisi gerekse bilinçsiz, kontrolsüz çiftleşmeler sebebiyle sahip olduğu üstün özellikler açısından risk altındadır. Ayrıca venereal hastalıklar, damızlık köpekler için sürekli tehdit oluşturmaktadır (1). 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 (2). Suni tohumlama ile kontrolsüz çiftleşmelerin önüne geçilmesinin yanı sıra erkek ya da dişi köpeklerdeki fizyolojik ve psikolojik kaynaklı çiftleşme sorunlarına çözüm sağlanabilmektedir (3-5). Fakat bu uygulamanın ön şartı dişiye transfere hazır spermanın bulundurulmasıdır. Köpek sperması, alınmasını takiben hemen kullanılacaksa herhangi bir işleme gerek duymamaktadır. Ancak kısa ya da uzun süreli saklanması ve nakledilmesi gerekli ise canlılığını koruyabilmesi için bazı işlemlere tabi tutulmak zorundadır. Spermanın uzun süre canlılığını koruyabilmesi dondurulması (kriyoprezervasyon) ile mümkündür. Başarılı bir kriyoprezervasyon, doğru vericinin seçilmesi, spermanın uygun yöntemle alınması, fertilizasyon yeteneğini kaybetmeden korunabilmesi için uygun sulandırıcılarla

Yazışma Adresi Correspondence

Alper KOÇYİĞİT
Cumhuriyet Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Dölerme ve Suni
Tohumlama Anabilim Dalı,
Sivas – TÜRKİYE

vhkalper@gmail.com

işlenmesi ve doğru metotla dondurulmasına bağlıdır (6, 7). Köpeklerde dondurulmuş sperma ile yapılan suni tohumlama sonrası ilk canlı yavru 1954 yılında elde edilmiştir (8). Bu tarihten günümüze kadar pek çok araştırmacı (4, 9, 10) suni tohumlama uygulamalarında başarılı sonuçlar kaydetmiştir. Günümüzde başta Amerika Birleşik Devletleri olmak üzere Kanada ve pek çok Avrupa ülkesinde köpek spermasının dondurulması endüstri haline gelmiştir.

Köpeklerde suni tohumlama amacıyla taze sperma ya da dondurulmuş sperma kullanılabilmektedir. Dondurulmuş sperma suni tohumlama uygulamalarında yaygın olarak kullanılmasına rağmen, taze sperma ile yapılan tohumlamalardaki başarı şansı daha yüksektir. Bu sebeple fertilité oranlarının yükseltilmesi yönünde çalışmalar devam etmektedir (11).

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, kriyoprotektif ajanlar, dondurma ve çözme yöntemi olarak sıralamak mümkündür (12).

Günümüzde köpek spermasının kısa süreli ya da dondurularak uzun süreli saklanması amacıyla sperma sulandırıcısı olarak çeşitli solüsyonlar kullanılmaktadır. Bunlar 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 tampon solüsyonlar olarak sıralanabilir. Son yıllarda hazır ticari preparatlar da (Laiciphos, Biociphos, Biladyl, Triladyl, CaniPlus Freeze) köpek spermasının dondurulmasında ön plana çıkmaktadır (12). Ancak Kangal köpeği spermasının, Tris bazlı sulandırıcı ile dondurulma verileri literatürde yer almasına rağmen, ticari sulandırıcı kullanımı verilerine rastlanılmamıştır (13).

Bu çalışma ile kangal köpeği spermasının dondurulmasında ticari sulandırıcılardan olan CaniPlus Freeze kullanımının dondurma-çözdürme sonrası spermatolojik parametrelere etkisinin ortaya koyulması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmadaki hayvan muayene ve denemeleri Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 19.02.2015 tarihli ve 8 sayılı kararı doğrultusunda yürütülmüştür. Çalışmanın hayvan materyali 3-5 yaş arası Kangal ırkı erkek köpekler arasından seçilmiştir. Sağlıklı ve ırka ait fenotipik özellikleri taşıyan iki adet köpek deneye dâhil edilmiştir. Çalışma için seçilen köpekler aynı bakım besleme şartlarına tabi tutulmuştur.

Spermanın Alınması: Çalışmada kullanılan hayvanlardan sperma elde edilmesi için penis masajı (onani) yöntemi uygulanmıştır (14). Bu yöntemle alıştırma için köpeklerden hayvan hastanesinde özel

olarak ayrılan muayene salonunda, östrus periyodunda bulunan dişi köpek ile seksüel stimülasyon sağlanarak, Eylül-Ekim ayları arasında, üç gün ara ile haftada iki kez sperma alınmıştır. Ejakulatin sadece spermatozoadan zengin olan ikinci fraksiyonu renk ve kıvam değişiklikleri gözlenip diğer fraksiyonlardan ayrılarak toplama kadehine alınmıştır. Bu şekilde en az bir ay süreyle yöntemle alıştırılan köpeklerden daha sonra çalışma için aynı sıklıkta sperma alınmaya devam edilmiştir. Çalışmada sekiz hafta süreyle her köpekten 16'şar olmak üzere toplamda 32 ejakulat kullanılmıştır.

Spermatolojik Muayene: Çalışmada spermalar hem dondurma öncesinde hem çözdürme sonrasında muayene edilmiştir. Nativ sperma miktarı dereceli toplama kadehinden okunarak saptandı. Spermatozoa motilitesi ısıtma tablası üzerindeki lama 1 damla damlatılan sperma üzerine lamel kapatılması ve 40x büyütmede 3 farklı alanda gözlenen motil spermatozoonların ortalama yüzdeleri alınarak hesaplanmıştır. Spermatozoa yoğunluğu ise hemositometrik yöntemle thoma lamında sayım yapılarak tespit edilmiştir. Anormal spermatozoa oranı giemsa boyama yöntemi ile, ölü spermatozoa oranı ise eosin-nigrosin boyama yöntemi ile tespit edilmiştir. Spermanın pH değeri indikatör kağıda damlatılan spermanın renk skalasındaki karşılığı okunarak belirlenmiştir. Çözdürme sonrası muayenesinde ise miktar dışındaki parametreler yukarıda belirtilen metotlarla değerlendirilmiştir.

Spermaların Dondurulması: Elde edilen spermalardan en az %80 motilite ve en fazla %10 anormal oranına sahip olanlar dondurulma işlemine alınmıştır. Dondurma işlemi için birleştirme (pooling) sonrası sperma iki eşit kısma bölünerek birinci kısım Tris (T-1378 Sigma) solüsyonu ile ikinci kısım ise CaniPlus Freeze (13700 Minitube) sulandırıcısı ile sulandırılmıştır. Her iki gruba ait örnekler bir payette 200x10⁶ motil spermatozoa bulunacak şekilde dozlanarak payetlere çekilmiştir.

Kontrol grubunda sulandırıcı olarak Tris sulandırıcısı %20 oranında yumurta sarısı, %3 gliserol ile kombine edilmiştir. Deneme grubunda ise CaniPlus Freeze solüsyonuna üretici firma talimatları doğrultusunda yalnızca %25 oranında yumurta sarısı ilave edilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Çalışmada kullanılan sulandırıcıların içerikleri

Kontrol Grubu		Caniplus Freeze Grubu*
Tris	2.9 g	Tris
Fruktoz	1.25 g	Şeker
Sitrik asit	1.32 g	Sitrik asit
Gliserol	3.0 m	Gliserol
Yumurta sarısı	%20	Yumurta sarısı %20
Penisilin Streptomisin	%0.1	Gentamisin
Distile su	100.0 mL	Saf Su
		Antioksidanlar ve özel bileşenler

* İçerik miktarı, üretici firma paylaşmadığı için belirtilmemiştir.

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) 20 dakikada dondurulmuş ve buradan sıvı azota daldırılarak saklanmıştır. Dondurma işleminden 1 hafta sonra spermaların bulunduğu payetler 38 °C'deki su banyosunda 30 saniyede çözündürülmüş ve spermatolojik muayeneye tabi tutulmuştur.

Çalışmada elde edilen bulguların istatistiksel analizi için SPSS paket programı (SPSS for Windows v. 11.5) kullanılmıştır. Bağımsız değişkenlerde sonuçlar ortalama \pm standart sapma kullanılarak Student t-test yöntemi ile değerlendirildi.

Bulgular

Nativ Sperma Bulguları: Köpeklerden sekiz hafta boyunca masaj yöntemiyle sperma alınmış uygulama başına ortalama 2.91 mL ejakulat (ikinci fraksiyon) hacmi elde edilmiştir. Köpeklerden alınan nativ spermaların ortalama motilite oranı %87.5 olarak saptanmıştır. Köpekler arasında önemli fark olmamakla birlikte spermatozoon konsantrasyonu ortalama 291.35×10^6 /mL olarak tespit edilmiştir. Nativ spermada tespit edilen spermatolojik parametreler Tablo 2'de sunulmuştur.

Kriyoprezervasyon Bulguları: Çalışmada fenotipik olarak ırk özelliklerini yansıtan 2 adet Kangal köpeğine ait toplam 128 doz (0.5 mL'lik) sperma dondurulmuştur. Çalışmada çözüm sonu motilite oranları kontrol ve CaniPlus Freeze grubunda sırasıyla %45 ve %50 olarak belirlenmiştir. Çözüm sonu anormal spermatozoon oranı ise kontrol grubunda %18.8 iken CaniPlus Freeze grubunda %16.4 olarak tespit edilmiştir. Çözüm sonrası motilite ve anormal spermatozoon oranı açısından gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark ortaya çıkmamıştır ($P > 0.05$). Çalışmada sulandırma sonrası ve çözündürme sonu belirlenen spermatolojik parametreler Tablo 3'te sunulmuştur.

Tartışma

Köpeklerde spermanın uygun solüsyonlarla sulandırılarak dondurulması ve gerektiğinde suni tohumlama için kullanılmasına yönelik araştırmalar uzun yıllardan beri sürdürülmektedir. Dondurma işlemi spermatozoonlar üzerinde birçok olumsuz etkiye yol açabilmektedir. Bunlardan biri de membran bütünlüğünün bozulmasıdır. Spermatozondaki membran yapıları, donma/çözünme işlemine karşı son derece duyarlıdır. Membran yapıları akıcı mozaik tarzında düzenlenmiş protein, glikoprotein ve glikolipitlerle bezeli iki sıralı fosfolipit katmanından oluşmuştur. Bu yapıların soğutulup-çözündürülmeleri irreverzibil faz değişimine, sıvı fazdan jel fazına geçmesine neden olmaktadır (16, 17). Gelişen faz değişimi membran içi enzimlerinin kinetiğinde değişime yol açarak spermanın çözüm sonu canlılığını azaltmaktadır. Bu değişimler sebebiyle hücrede soğuk şoku gelişmekte, bu durum terminolojide soğutma zararı (cryoinjury) olarak adlandırılmaktadır. Kriyoprezervasyonda soğuk şoku hasarının yanı sıra spermatozoayı pH değişimleri ve oksidatif strese karşı koruyacak, metabolit ve enerji ihtiyacını karşılayabilecek niteliklerde çeşitli sulandırıcılar kullanılmaktadır (18). Köpek spermasının dondurulmasında Tris bazlı klasik sulandırıcıların yanı sıra son yıllarda hazır ticari solüsyonlar (Laiciphos, Biociphos, CaniFreeze, CaniPlus Freeze) ön plana çıkmaktadır (8, 12, 19). Silva ve Verstege (12), laiciphos, biociphos ve tes / tris'ten oluşan üç farklı sulandırıcı ile dondurdukları köpek spermalarının çözündürme sonrası spermatozoa motilitesini laiciphos, biociphos ve Tes/Tris için sırasıyla %65, 70 ve 50 canlı spermatozoa oranını ise %78, 80 ve 65 saptadıklarını bildirmişlerdir. Pipes, Bes, Tes ve Tris sulandırıcılarının köpek spermasının dondurulması üzerine etkilerini inceleyen Smith (20) ise, 1:2 oranında %50 Pipes/KOH + %25 sodyum sitrat + %25 dekstroz + %20 yumurta sarısı + %9 gliserol ile çözündürme sonrası en iyi spermatozoa motilitesi elde etmiştir. Blesbois ve Caffin (21), sulandırıcıya membran stabilizatörü olarak bovine serum albumini (BSA) eklenmesinin spermatozoa üzerine olumlu etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Yu (22), köpek spermasının dondurulmasında glucose-TRIS ile gliserol-TRIS sulandırıcılarını karşılaştırmış ve sırasıyla (%42 ve %41) çözüm sonu motilite oranlarına ulaşmıştır.

Tablo 2. Nativ spermada ortalama spermatolojik bulgular

Köpek	n	Hacim mL	Motilite (% \pm SEM)	Yoğunluk ($\times 10^6$)	Anormal oranı (% \pm SEM)	Ölü/canlı oranı (% \pm SEM)	pH
1	16	3.20 \pm 0.11	85 \pm 1.75	317.2 \pm 22.12	9.3 \pm 3.83	22.3 \pm 5.42	6.61 \pm 0.81
2	16	2.62 \pm 0.48	90 \pm 2.42	265.5 \pm 49.73	8.9 \pm 3.46	18.6 \pm 3.85	6.54 \pm 0.76
Ortalama		2.91 \pm 0.24	87.5 \pm 2.42	291.35 \pm 38.54	9.1 \pm 2.21	20.3 \pm 6.97	6.57 \pm 0.41

Tablo 3. Tespit edilen spermatolojik parametrelerin deneme gruplarına dağılımı

Grup	Spermatolojik bulgular (% \pm SEM)					
	Motilite		Anormal spermatozoa		Ölü spermatozoa	
	Sulandırma sonrası	Çözüm sonu	Sulandırma sonrası	Çözüm sonu	Sulandırma sonrası	Çözüm sonu
Kontrol	65 \pm 0.55	45 \pm 0.84	11.6 \pm 0.84	18.8 \pm 0.13	23.4 \pm 0.52	38.7 \pm 0.17
CaniPlus Freeze	70 \pm 0.61	50 \pm 0.35	10.5 \pm 0.22	16.4 \pm 0.19	22.7 \pm 0.29	36.3 \pm 0.54

Literatür (23) verileri incelendiğinde kangal köpekleri için nativ sperma bulguları çalışmamızla benzerlik göstermektedir. Dondurma çözümü sonrası spermatolojik bulgular açısından kangal köpekleri için ticari sulandırıcı verisi bulunmamakla birlikte Alman çoban köpeği için laiciphos sulandırıcısı ile 34.0 ± 9.8 çözüm sonu motilite oranı elde edilmiştir (9). Diğer bir çalışmada (12) ise Beagle ırkı köpeklerde laiciphos sulandırıcısı ile %65 çözüm sonu motilite oranına ulaşmıştır.

Yapılan araştırmalarla (9, 12, 23) sunulan çalışmada elde edilen sonuçlar arasındaki farklılıklar çeşitli etmenlere bağlı olarak şekillenmiş olabilir. Özellikle kullanılan hayvanların bakım besleme ve özellikle ırk farklılıkları, sulandırıcı kompozisyonları ve dondurma çözümü prosedürlerindeki farklılıklar spermatolojik parametrelere etki etmektedir. Aynı ırka ait köpeklerde de bireysel olarak spermanın sulandırıcılara farklı tepkiler verebileceği bildirilmektedir (9).

Literatür verilerinde görüldüğü üzere yürütülen çalışmalara rağmen köpek spermasının dondurulmasında %60'lara varan çözüm sonu motilite oranlarına ulaşılabilmemiş fakat standart bir dondurma protokolü henüz oluşturulamamıştır. Bu noktada köpek türünün fazla sayıda ırk barındırması ve yöntemlere farklı yanıtlar alınması da standardizasyon

Kaynaklar

1. Mamak N. Sivas Yöresindeki Kangal Köpeği Üretim Çiftliklerinde Bulunan Köpeklerde Bazı Enfeksiyöz ve Paraziter Hastalıkların (Leptospirozis, Listeriozis, Dirofilariazis, Barsak Parazitleri) Araştırılması ve Sağaltımı. Doktora Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2002.
2. Hiemstra SJ. "Guidelines for the constitution of national cryopreservation programmes for farm animals". <http://www.agris.fao.org/05.01.2018>.
3. Stockner PK. Status of the canine frozen semen industry. *Modern Veterinary Practice* 1985; 66: 98-100.
4. Concannon PW, Battista M. *Current Veterinary Therapy*. 1st Edition, Philadelphia: WB Saunders, 1989.
5. Tekin N. Hayvan yetiştiriciliğinde reproduktif biyotekniklerin önemi ve yeri. *Veteriner Hekimliği Dergisi* 2007; 78: 15-17.
6. Hunter FRH. *Physiology and Technology of Reproduction in Female Domestic Animals*. 1st Edition, Edinburgh: Academic Press, 1980.
7. Linde-Forsberg C. Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. *Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)*. 1995; 10: 48-58.
8. England GC. Cryopreservation of dog semen: A review. *J Reprod Fertil Supp* 1992; 47: 243-255.
9. Uysal O, Varış O, Tosun H, Yavas I, Gurcan I. Cryopreservation of canine semen at different freezing and thawing programmes. *Indian Vet J* 2007; 84: 57-59.
10. Watson PF. Artificial insemination and the preservation of semen. *Marshall's Physiology of Reproduction* 1990; 2: 747-869.

çalışmalarının önünde engel teşkil etmektedir. Bu sebeple gerek dondurma tekniği ve ekipmanlarının, gerekse sulandırıcıların geliştirilmesine yönelik çalışmalar devam etmektedir (9, 19, 24, 25).

Spermanın dondurulması için farklı sulandırıcılar söz konusu olmakla birlikte, sulandırıcı hazırlama işlemi uygulayıcılara iş yükü getirmektedir. Bunun yanı sıra ölçüm tartım hataları, kontaminasyon riskleri ve birden fazla kimyasal maddeyi hazır bulundurma zorunluluğu oluşturmaktadır. Çalışmamızda kangal köpeklerinin spermalarının dondurulmasında sulandırıcı hazırlama aşamasını ve buna bağlı riskleri azaltabilecek CaniPlus Freeze sulandırıcısının kullanımının klasik sulandırıcılarla benzer başarı oranları sağladığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak, CaniPlus Freeze adlı ticari sulandırıcının Kangal köpeği spermasının dondurulmasında rahatlıkla kullanılabileceği kanaatine varılmıştır.

Teşekkür

Çalışmanın planlanması ve verilerin istatistiksel açıdan değerlendirilmesindeki katkılarından dolayı Doç.Dr. Barış Atalay USLU'ya teşekkür ederim.

11. 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* 1989; 299-310.
12. Silva LDM, Verstegen JP. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology* 1995; 44: 571-579.
13. Gungor S, Bucak MN. Basal medium eagle solution may improve the post-thaw parameters of Kangal dog semen. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences* 2016; 32: 193-199.
14. Tekin N, İzgür H, Özyurt M. Köpeklerde penis masajı yöntemiyle sperma alma ve başlıca spermatolojik özellikler üzerinde araştırmalar. *Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1987; 1: 83-95.
15. Tekin N. Spermanın muayenesi ve değerlendirilmesi. In: Alaçam E. (Editor). *Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Sun'i Tohumlama, Doğum ve İnfertilite*. 1st Baskı, Konya: Dizgievi, 1994: 69-70.
16. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7: 871-891.
17. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 60: 481-492.
18. Holt WT. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology* 2000; 53: 47-58.
19. Hermansson U, Forsberg CL. Freezing of stored, chilled dog spermatozoa *Theriogenology* 2006; 65: 584-593.

20. Smith FO. Cryopreservation of canine semen. Technique and performance. Diss Abstr Int B-Sci 1985; 11: 3441.
21. Blesbois E, Caffin JP. Serum like' albumin of fowl seminal plasma and effects of albumin on fowl spermatozoa stored at 4⁰ C. Brh Poult Sci 1992; 33: 663-670.
22. Yu I. Canine sperm cryopreservation using glucose in glycerol-free tris. CryoLetters 2014; 35: 101-107.
23. Akçay E, Tekin N. Andrological examinations of Kangal sheepdogs (Karabash). Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 2002; 26: 965-973.
24. Brito MM, Lúcio CF, Angrimani DS, et al. Comparison of cryopreservation protocols (Single and Two-steps) and thawing (Fast and Slow) for canine sperm. Anim Biotechnol 2017; 28: 67-73.
25. Baran A. Köpek Spermasının Farklı Oranlarda Gliserol İçeren Sulandırıcılarda Dondurulması. Doktora Tezi, İstanbul: İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1997.