

Kedi ve Köpeklerde Dölerme ve Suni Tohumlama Alanında Güncel Bilgiler

Editör
Volkan Koşal

BİDGE Yayınları

Kedi ve Köpeklerde Dölerme ve Suni Tohumlama Alanında
Güncel Bilgiler

Editör: Doç. Dr. Volkan Koşal

ISBN: 978-625-372-555-6

1. Baskı

Sayfa Düzeni: Gözde YÜCEL

Yayınlama Tarihi: 25.12.2024

BİDGE Yayınları

Bu eserin bütün hakları saklıdır. Kaynak gösterilerek tanıtım için yapılacak kısa alıntılar dışında yayıncının ve editörün yazılı izni olmaksızın hiçbir yolla çoğaltılamaz.

Sertifika No: 71374

Yayın hakları © BİDGE Yayınları

www.bidgeyayinlari.com.tr - bidgeyayinlari@gmail.com

Krc Bilişim Ticaret ve Organizasyon Ltd. Şti.

Güzeltepe Mahallesi Abidin Daver Sokak Sefer Apartmanı No: 7/9 Çankaya /
Ankara



İçindekiler

Köpeklerde Prostat	4
Volkan KOŞAL.....	4
Erkek Kedilerde Üreme Organları, Spermanın Alınması ve Spermatolojik Muayeneler.....	13
Nurdan COŞKUN.....	13
Can TOPALOĞLU.....	13
Fikret KARACA.....	13
Kedilerde Spermanın Saklanması ve Suni Tohumlama Uygulamaları	1
Nurdan COŞKUN.....	1
Fikret KARACA.....	1

BÖLÜM I

Köpeklerde Prostat

Volkan KOŞAL¹

Giriş

Prostat bezi, köpeklerdeki tek erkek aksesuar bezidir ve seminal plazma bileşenlerinin salgılanmasında önemli bir rol oynar. Bu iki loblu, oval şekilli bez, yetişkin köpeklerde pelvik boşlukta yer alır ve idrar yolu ile sperm taşıyan vas deferens bu bezin içinden geçer. Prostat, idrar yoluna açılan birçok delik aracılığıyla seminal plazma salgısını gerçekleştirir. Köpeklerde prostat hastalıkları oldukça yaygındır, bu nedenle bu hastalıkların daha iyi anlaşılması için prostatın incelenmesi büyük önem taşır. Kastrasyon durumu, farklı prostat hastalıklarının gelişiminde önemli bir rol oynar. Kanada, Amerika Birleşik Devletleri ve Avustralya gibi gelişmiş ülkelerde kastrasyon yaygındır ve bu nedenle düşük seviyelerdeki

¹ Doç. Dr., Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama ABD, Van/Türkiye, Orcid: 0000-0001-5268-5046 , volkan_kosal@hotmail.com , volkankosal@yyu.edu.tr

androjen hormonları nedeniyle prostat epitelinde atrofi gözlemlenebilir. Öte yandan, Güney Amerika ülkelerinde köpeklerin kastrasyonu yaygın olmadığından, benign prostat hiperplazisi (BPH) ve prostatit gibi prostat hastalıklarının görülme sıklığı yüksektir (Johnston ve ark., 2000; Leis-Filho & Fonseca-Alves, 2018).

Prostat Bezi

Prostat salgısı, seminal plazmanın önemli bir bileşenidir ve çeşitli işlevlere sahiptir:

Sperm Koruması ve Beslenmesi: Prostat salgısı, sperm hücrelerine besin sağlar ve onları korur. İçerdiği kalsiyum, sitrik asit, çinko, enzimler ve diğer maddeler, spermatazoonların hayatta kalmasını ve fonksiyonlarını sürdürmesini sağlar. Spermanın sıvı kısmında yer alarak spermatazoonların korunmasını sağlar. Spermatazoonların birbirlerine yapışmasını engeller. Spermatazoonların çökmesini (aglutinasyonu) engeller.

Motilite Artırma: Prostat sıvısı, spermin hareket kabiliyetini artırır. Bu sıvı, spermin vajinal ortamda ve uterusu ilerlemesine yardımcı olur. Üretrada kaygan bir ortam oluşmasında görev alır. Üretradaki idrar kalıntılarının temizlenmesini sağlar.

Spermatazoonları Asidik Ortamdan Koruma: Prostat sıvısı, vajinal ortamın asidik pH'ını nötralize etmeye yardımcı olur. Bu, spermin asidik ortamda hasar görmesini önler ve döllenme şansını artırır. Metabolizma artıklarının spermatazoonlara zarar vermesini engeller.

Enfeksiyona Karşı Koruma: Prostat sıvısındaki bazı enzimler ve maddeler, spermi ve üreme yollarını bakteriyel

enfeksiyonlardan koruyabilir. Üretrada kaygan bir ortam oluşmasında görev alır. Üretradaki idrar kalıntılarının temizlenmesini sağlar.

Hormon metabolizması: Prostatta erkeklik hormonu testosteron, biyolojik olarak aktif bir forma, DHT'ye (dihidrotestosteron) dönüşür.

Ejakülatın Pıhtılaşmasını Önleme: Prostat sıvısında bulunan enzimler, ejakülatın pıhtılaşmasını önleyerek spermilerin hareketini kolaylaştırır ve döllenme sürecine katkıda bulunur (Ballentine & Coffey, 1990; Hayvard & Cunha, 2000, Schmidt ve ark., 2011).

Prostatın Anatomik Yapısı

Prostat, rektum ile dorsalde, pubik simfiz ile ventralde, karın duvarı ile lateralde ve idrar kesesi ile kraniyelde temas halinde olan yarı oval, çift loblu bir ekzokrin bezdir. Prostatın konumu, köpeğin yaşına bağlı olarak hafif farklılıklar gösterebilir. 2 aylık yaşa kadar prostat, karın boşluğunun kaudal kısmında bulunur; bu yaştan itibaren cinsel olgunluğa ulaşana kadar ise pelvik boşlukta yer alır. Cinsel olgunluğa ulaşıldıktan sonra, prostatın boyutu artar ve kraniale doğru büyüyerek karın boşluğuna uzanır (Smith, 2008)

Sağ ve sol prostat loblarını ayıran sulkus, rektal palpasyonla dorsalde hissedilebilir. Her bir lob, trabeküller tarafından lobüllere ayrılmıştır; bu trabeküller, tübuloalveolar yapıda olan bileşik bezlerden oluşur ve bu bezlerin kanalları, prostatın çevresindeki tüm idrar yoluna açılır. Prostatik üretra (prostatın içinden geçen pelvik üretranın bir parçası), prostat parankimini merkezine hafif dorsalden keser. Ayrıca, prostat, fibromüsküler bir doku kapsülü olan prostat kapsülü ile örtülüdür. Vas deferens, prostatın kranio-dorsal

yüzeyinden prostat içine girer ve her biri bir lobda olmak üzere, prostat parankimasını kaudovertral yönde geçerek, colliculus seminalis ile üretraya ulaşır (Smith, 2008; Banerjee ve ark., 2018).

Prostatın vaskülarizasyonu, esas olarak internal pudendal arterden köken alan prostatik arter tarafından sağlanır. Prostatik arter, dallanarak orta rektal arteri oluşturur ve bu arter prostat kapsülüne dorsolateral yüzeyden girer, subkapsüler damarlar haline gelir ve daha sonra bez dokusuna gerekli kan akışını sağlamak üzere prostata girer. Prostatik damarlar ile üretral, kranial rektal ve kaudal arterler arasında anastomozlar bulunur, bu da prostatektomi işlemini karmaşık hale getirir (Ruel ve ark., 1998)

Prostatın venöz kanı, prostatik ve üretral damarlar aracılığıyla internal iliak vene drene edilir. Prostatik lenf damarları ise iliak lenf düğümlerine drene olur. Prostatın innervasyonu, prostatik arterle benzer bir yol izleyen hipogastrik sinir (sempatik sistem) ve pelvik sinir (parasempatik sistem) aracılığıyla gerçekleşir. Parasempatik uyarılar, bezin salgısını artırır (Levy ve ark., 2014).

Prostatın Histolojik Yapısı

Köpeklerde prostat, insan prostatı gibi farklı alanlara ayrılmayan, morfolojik olarak homojen bir organdır ve büyük ölçüde salgı yapan glandüler dokudan oluşur. Prostatik üretrayı çevreleyen prostat stroması, prostatın sınırlarına kadar dorsal ve ventral yönde uzanırken, stromanın lateral çıkıntıları daha incedir. Bu stromal çıkıntılar, prostatı birkaç glandüler epitel lobülüne böler. Bu epitelin çoğu kolumnar olup, prostatın duktal yapılarında kuboidal forma dönüşür; prostatik üretranın epiteliyumu ise kuboidal veya

kolumnar, basit veya çok katmanlı olabilir (Stolzenburg ve ark., 2002; Palmieri ve ark., 2022)

Prostatik üretra, prostat bezi içinden geçer ve ürotelyal (geçiş) epitel ile kaplıdır. Prostatik kanallar, prostatik üretra ile bağlantılıdır. Bu nedenle, idrar sistemine yükselen bakteriyel kontaminasyonla ilgili sürekli antijenik uyarı nedeniyle prostat stromasına sızan enflamatuvar hücreler yaygındır. Prostat stroması, kollajen lifler, fibroblastlar, prostatın kasılmasını sağlayan düz kaslar ve az sayıda mononükleer enflamatuvar hücrelerden oluşur. Köpeklerde, düz kas hücreleri ve sinirler bu bezin periferik bölgesinde yer alır (Lai ve ark., 2008; LeRoy & Northrup, 2009)

Prostatik üretra, prostat bezinden geçerken ürotelyal (geçiş) epitel ile kaplıdır. Prostatik kanallar, prostatik üretra ile bağlantılı olduğundan, idrar yolundan yükselen bakteriyel kontaminasyonun yol açtığı antijenik uyarılar nedeniyle prostat stromasında enflamatuvar hücrelerin bulunması yaygındır. Prostat stroması, kollajen lifler, fibroblastlar, düz kaslar ve az sayıda mononükleer enflamatuvar hücrelerden oluşur. Köpeklerde düz kas hücreleri ve sinirler, prostatın periferik bölgesinde yoğunlaşmıştır (Oesterling ve ark., 1988; Kawakami ve ark., 1991)).

Prostatın Fizyolojik Yapısı

Prostat, büyük miktarda protein içeren seminal plazmanın çoğunu üretmekle sorumludur. Hem insan hem de köpek prostat epitelinde üretilen ve insanlarda en çok çalışılan proteinlerden biri prostat spesifik antijen (PSA) olup, insanlarda kallikrein-3 (KLK 3) geni tarafından kodlanır. Ancak, köpek genomunda KLK 3 geni bulunmamaktadır. Köpeklerde, kallikrein-2 (köpek prostat spesifik

arjinin esterazı, CPSE), serin-proteaz sınıfına ait bir PSA homolog enzimidir. Bu protein normalde prostat kanallarının lümenine salgılanır ve fizyolojik koşullar altında kan dolaşımıyla temas etmez. Ancak, prostatın yapısını bozan bir lezyon meydana geldiğinde, bu protein kanda bulunabilir ve bu durum prostat hastalığının bir göstergesi olabilir (Huggins, 1945; Holst ve ark., 2017).

PSA'ya benzer şekilde, köpek prostat spesifik arjinin esterazı (CPSE), köpek prostatında en fazla üretilen proteindir ve köpeklerde bazı prostat hastalıklarının teşhisinde alternatif bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. Plazma belirteçlerinin insan tıbbında prostat patolojilerinin teşhisi için yaygın bir şekilde kullanılması, veteriner hekimlikte henüz yaygın bir uygulama değildir (Melandri & Alonge, 2021; Okulmus & Atakisi, 2024).

Prostat, testislerde üretilen testosterona bağlıdır ve bu hormon, 5 α -redüktaz enzimi tarafından dihidrotestosterona (DHT) dönüştürülür. Bu hormonal uyarı olmadan prostat, salgı fonksiyonunu ve hacmini azaltacaktır. Kastrasyon yapılan köpeklerde testosteron bulunmadığından, dolayısıyla DHT de olmayacak ve bu durum prostatın atrofiye uğramasına yol açacaktır. Böylece, prostat bezinin endokrin kontrolü, özellikle testisler tarafından sağlanması iyi bir şekilde karakterize edilmiştir. Erkek köpeklerde, dolaşımdaki en önemli androjen testosterondur ve CYP19 (aromataz) enzimi tarafından estradiol-17 β 'ye dönüştürülür. Östrojen, prostat bezinin büyümesini ve farklılaşmasını etkileyebilmektedir (Memon, 2007; Cunto ve arl., 2022).

KAYNAKÇA

Ballentine Carter, H., & Coffey, D. S. (1990). The prostate: an increasing medical problem. *The prostate*, 16(1), 39-48.

Banerjee, P. P., Banerjee, S., Brown, T. R., & Zirkin, B. R. (2018). Androgen action in prostate function and disease. *American journal of clinical and experimental urology*, 6(2), 62.

Cunto, M., Ballotta, G., & Zambelli, D. (2022). Benign prostatic hyperplasia in the dog. *Animal Reproduction Science*, 247, 107096.

Hayward, S. W., & Cunha, G. R. (2000). The prostate: development and physiology. *Radiologic Clinics of North America*, 38(1), 1-14.

Holst, B. S., Holmroos, E., Friling, L., Hanås, S., Langborg, L. M., Franko, M. A., & Hansson, K. (2017). The association between the serum concentration of canine prostate specific esterase (CPSE) and the size of the canine prostate. *Theriogenology*, 93, 33-39.

Huggins, C. (1945). The physiology of the prostate gland. *Physiological Reviews*, 25(2), 281-295.

Johnston, S. D., Kamolpatana, K., Root-Kustritz, M. V., & Johnston, G. R. (2000). Prostatic disorders in the dog. *Animal reproduction science*, 60, 405-415.

Kawakami, E., Tsutsui, T., & Ogasa, A. (1991). Histological observations of the reproductive organs of the male dog from birth to sexual maturity. *Journal of Veterinary Medical Science*, 53(2), 241-248.

Lai, C. L., van den Ham, R., van Leenders, G., van der Lugt, J., Mol, J. A., & Teske, E. (2008). Histopathological and immunohistochemical characterization of canine prostate cancer. *The Prostate*, 68(5), 477-488.

Leis-Filho, A. F., & Fonseca-Alves, C. E. (2018). Anatomy, histology, and physiology of the canine prostate gland. *Veterinary anatomy and physiology*, 47-67.

LeRoy, B. E., & Northrup, N. (2009). Prostate cancer in dogs: comparative and clinical aspects. *The Veterinary Journal*, 180(2), 149-162.

Lévy, X., Nizański, W., Von Heimendahl, A., & Mimouni, P. (2014). Diagnosis of common prostatic conditions in dogs: an update. *Reproduction in domestic animals*, 49, 50-57.

Melandri, M., & Alonge, S. (2021). Highlights on the Canine Prostatic Specific Esterase (CPSE): A diagnostic and screening tool in veterinary andrology. *Veterinary Medicine and Science*, 7(1), 35-40.

Memon, M. A. (2007). Common causes of male dog infertility. *Theriogenology*, 68(3), 322-328.

Oesterling, J. E., Juniewicz, P. E., Walters, J. R., Strandberg, J. D., Steele, R. E., Ewing, L. L., & Coffey, D. S. (1988). Aromatase inhibition in the dog. II. Effect on growth, function, and pathology of the prostate. *The Journal of urology*, 139(4), 832-839.

Okulmus, C., & Atakisi, E. (2024). Concentrations of plasma estradiol, progesterone, melatonin, serotonin and nitric oxide in Tuj ewes after estrus sincronization in and out of breeding

season. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 75(2), 7227-7234.

Palmieri, C., Fonseca-Alves, C. E., & Laufer-Amorim, R. (2022). A review on canine and feline prostate pathology. *Frontiers in veterinary science*, 9, 881232.

Ruel, Y., Barthez, P. Y., Mailles, A., & Begon, D. (1998). Ultrasonographic evaluation of the prostate in healthy intact dogs. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 39(3), 212-216.

Schmidt, R. F., Lang, F., & Heckmann, M. (Eds.). (2011). *Physiologie des menschen: mit pathophysiologie*. Springer-Verlag.

Smith, J. (2008). Canine prostatic disease: a review of anatomy, pathology, diagnosis, and treatment. *Theriogenology*, 70(3), 375-383.

Stolzenburg, J. U., Schwalenberg, T., Do, M., Dorschner, W., Salomon, F. V., Jurina, K., & Neuhaus, J. (2002). Is the male dog comparable to human? A histological study of the muscle systems of the lower urinary tract. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 31(4), 198-205.

BÖLÜM II

Erkek Kedilerde Üreme Organları, Spermanın Alınması ve Spermatolojik Muayeneler

**Nurdan COŞKUN
Can TOPALOĞLU
Fikret KARACA**

1. Giriş

Kedilerin M.Ö. 3000-6000 yıllarında Mısır, Mezopotamya, Anadolu ve Eski Harapan uygarlığında evcilleştirildiği arkeolojik çalışmalarda belirtilmiştir (Odabaşoğlu & Ateş, 2000). Değerli evcil kedi ırklarının ve taksonomik olarak evcil olmayan kedi türlerinin genetik olarak korunması önemlidir. Kedilerin üreme fizyolojisi hakkında daha fazla bilgi edinilmesi, evcil olmayan kedilere potansiyel olarak uygulanabilecek tekniklerin geliştirilmesinde zorunludur (Axnér, Hermansson & Linde-Forsberg, 2004; Siemieniuch & Dubiel, 2007). Kedilerde davranışsal ve fiziksel östrus belirtileri, proöstrus saldırganlığı, sperma toplama teknikleri, sperma hacmi, tohumlama için uygun zamanın belirlenmesi, ovulasyonların uyarılması ve sedasyon

prosedürlerinin kontrendikasyonu gibi etmenler suni tohumlama uygulamaları sınırlandırmaktadır (Güngör, 2023).

2. Erkek kedilerde üreme organları

Erkek üreme organları; hormon ve spermatozoa üretimi, spermatozoonların taşınması, spermatozoonların fonksiyonel bütünlüğüne ve yaşamlarına yardımcı olan seminal sıvıların salgılanması ve spermanın dışı üreme organlarına iletilmesi gibi işlevlere sahiptir. Erkek genital organlar; skrotum, testisler, epididimis, duktus deferens, prostat bezi, bulbo üretral bezler, üretra, penis ve prepusyumdan oluşmaktadır (Çebi, 2023; Davidson & Baker, 2009). Erkek kediler 38 kromozom sayısına ve XY kromozom bütünlüğüne sahiptir (Root & ark., 1996).

Üreme organlarının anatomisi

Scrotum

Scrotum, derinin devamı olup, düz ve ince yapıya sahiptir, anüsün birkaç santimetre altında bulunur ve tamamen kıllarla kaplıdır (Christiansen, 1984; Demirci, 1994).

Testisler

Yetişkin erkek kedilerde testisler, küre-oval yapılı 1.5x1x1 cm boyutlarında, 2-4 g ağırlığındadır (Scott & Scott, 1957). Testisler 12-14 haftalık yaşta skrotum içinde kalıcı pozisyon alırlar (Christiansen, 1984). Testosteron salgılanması ve spermatogenezisten sorumludur (Yavaş, 2018). Kedilerde skrotal kese anüsün ventralinde, prepusyumun dorsalinde bulunur ve kuyruk kaldırıldığında görülebilir. Testisler skrotum içinde peritondan köken alan tunika vajinalis adı verilen çift katmanlı bir bağ doku tarafından sarılır. Testis paraneşiminin çoğunluğunu, kıvrımlı seminifer tübüller ve sertoli destek hücreleri oluşturur. Spermatogenezis seminifer tübüllerde meydana gelir. Spermatogenezis siklusü kedilerde ortalama 45 gün kadar sürer. Testislerin doğumdaki ağırlığı 20 mg kadardır. Pubertaya eriştiğinde 500 mg ulaşmaktadır. Normal olarak yavru bir kedi testisleri

doğumla beraber scrotuma iner ve pubertaya kadar (7-10 ay) inguinal kanalda aşağı yukarı serbestçe hareket eder (Çebi, 2023; Scott & Scott, 1957; Sojka, 1980). Testis ve epididimis ölçüleri ile ağırlıkları 3-5 aylık yaşta belirgin bir şekilde artmaktadır. 5 aylık yaşta testosteron salgısı ve spermatogenezis başlamakta ve 6-7 aylık yaşta tübüllerde spermatozoonların bulunabildiği kaydedilmektedir (Christiansen, 1984).

Epididimis

Epididimisler, testislerin proksimalinden distaline kadar bütünleşik pozisyonda yerleşmiş konumdadır. Anatomik olarak kaput, korpus ve kauda olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır (Axnér, 2006). Kaput bölümü testisin kranial kenarının dorsomedial kısmında, korpus testisin dorsolateralinde seyreder ve kauda ise testisin dorsokaudal kısmında yer alır (Johnson, 2022). Mezonefrik kanaldan köken alan kanal (duktus epididimis), epididimis bölümleri içerisinde kıvrımlı şekilde seyreder. Duktus epididimis, konumdan ziyade işleve dayalı olarak başlangıç, orta ve terminal segment şeklinde tanımlanmaktadır. Başlangıç ve orta segmentlerin spermanın olgunlaşmasında, terminal segmentin ise ejakülasyon öncesinde spermanın depolanması işlev yaptığı kaydedilmektedir (Axnér 2006). Kedilerde epididimis kanalının uzunluğu 4-6 m kadardır (Çebi, 2023).

Duktus deferens

Ductus epididimis kauda epididimisten ayrıldıktan sonra dorsal olarak duktus deferens adını alır (Johnson, 2022). Duktus deferens, testisler tarafından üretilen spermatozoonları ve sıvıları kanal duvarının güçlü kasılmaları yardımıyla epididimisten üretraya kadar taşıyan bir çift kanaldır (Hewitt, 1998). Kedilerde duktus deferens, uretra ile birleşimden önce bir genişleme (ampulla) oluşturmaz.

Üretra

Üretra, idrar kesesinden penisin ucuna kadar uzanan sperma ve idrarın atılmasını sağlayan kanaldır. Erkek kedilerde idrar

kesesinin boynu ile prostat bezi arasında kısa bir preprostatik üretra vardır. Penis üretrası kısadır ve arkus işyadikusdan daha ileriye uzanmaz, uretranın çıkış kısmı kaudal yönde ve anüsün ventralinde bulunur. Bu pozisyon, erkek kedilerin diğer kedilerin burun hizasında dikey yüzeylere idrar püskürterek bölgesini kokuyla işaretlemesini sağlamaktadır (Higgs, 2023).

Prostat

Kedilerde prostat idrar kesesinin yaklaşık 2-3 cm kaudalinde yer alır, iki kranial ve iki kaudal lobdan (her biri 1 cm uzunluğunda) oluşur ve üretrayı dorsal ve lateral olarak çevreler (Johnson, 2022). Ultrasonografik olarak, prostatın kraniokaudal ve transversal boyutlarının ortalama değerleri sırasıyla 1.2 ve 2.2 cm olması nedeniyle şekli enlemesine oval olarak görüntülenmektedir. Prostat çevresi ortalama 5.5 cm ve alanı ise 2.2 cm² dir (Dimitrov, Yonkova & Georgiev, 2005). Prostat bezi ejakülattaki sıvının büyük kısmını oluşturur. Ejakülata hacminin artırılmasında ve sulandırılmasında rol oynar. İçeriğinde protein-lipid kompleksi, çinko, asit fosfataz, laktat, kolesterol ve çeşitli enzimler bulunmaktadır. Kedi prostatı, köpeklerdeki gibi üretranın ventral yüzünü kaplamaz (Christiansen, 1984). Prostat androjenlere bağımlıdır ve bu yüzde kastrasyon takiben atrofiye olur (Johnson, 2022).

Bulboüretral bez

Bulbourethral bezler, üretranın her iki yanında, penisin tabanında, arkus işyadikusun yakınında ve anüsün distalinde bulunan bir çift organdır. Ultrason görüntülemelerinde bezin dorsoventral boyutu (yükseklik) 6,4 ila 7,6 mm arasında, lateral boyut (genişlik) ise 5,4 ila 6,5 mm arasında değiştiği kaydedilmektedir. Bulboüretral bezlerin şekli dorsoventral olarak oval görünümündedir. Erkek kedide major ek salgı bezi glandula bulboüretralis bezidir (Christiansen, 1984; Hewitt, 1998; Dimitrov & Russenov, 2006).

Penis

Çiftleşme organı penis, spermanın vajinaya bırakılmasından sorumludur (Çebi, 2023). Penis skrotumun ventralinde prepusyum

içinde bulunur, 5-8 cm uzunluğunda ve kaudo-ventrale dönük pozisyonundadır. Çiftleşme sırasında penis şişer ve kranioventral yönde kıvrılır, böylece çiftleşme pozisyonu diğer memelilerde görülen pozisyonu alır. İdrarın ve spermanın boşaltılmasında görev almaktadır. Kedi penisi vasküler özellikte olup üretranın ventralinde erektil doku içinde kemiksi (os penis) bir yapı bulunur (Christiansen, 1984; Çoyan & ark., 2002; Aspinall, 2011). Glans penis konik şekillidir (Christiansen, 1984). Yapısında her iki yanda korpus kavernozum penis ve medialde korpus spongiosum penis bulunmaktadır. Penisin son kısmı serbesttir (Root & ark., 1996). Glans peniste 6-8 adet halka şeklinde sıralanmış 0.5- 1 mm uzunluğunda konik yapılı, kaudale doğru dönük 120-150 adet penil çıkıntı bulunmaktadır, bu yapılar 6-7 aylık yaşta tamamlanırlar. Penis üzerindeki kornifiye papillalar dişilerde vajinanın iç duvarını uyarak ovulasyonu sağlayabilmektedir (Kaya & Daşkın, 1997). Yetişkin erkek kediler kastre edildiklerinde penil çıkıntılar 5-6 haftada gerilerler (Hewitt, 1998). Kedilerde musculus cremaster bulunmamaktadır bu kas yerine musculus levator skroti adında anal sfinkter kökenli bir çizgili kas bulunmaktadır (Martin, Fletcher & Brandley, 1974).

Prepusyum

Prepisyumun dış kısmı tüylü bir deri ile iç kısmı ise müköz membran ve yağ bezleri ile kaplı olup, penise koruyucu örtü görevi yapar. Penis erekte olmadığı zaman tamamen prepisyum içerisindedir. Kedilerin prepisyumu kalın ve kısadır. Doğumda prepisyumun ve penisin epitel yüzeyi frenulum preputi ile bağlantılıdır ve prepisyumun penisten ayrılması ergenlikte meydana gelir (Aspinall, 2011; Çebi, 2023).

Üreme organlarının fizyolojisi

Evcil dişi kediler mevsime bağlı üreme özelliği gösterirken, erkek kedilerde üreme faaliyetlerinin yıl boyu devam ettiği belirtilmektedir. Ancak erkek kediler ile ilgili görüşler çelişkilidir (Axner & Linde-Forsberg, 2007; Blottner & Jewgenow, 2007; Tsutsui & ark., 2009). Mevsimsel değişimler evcil erkek kedilerde

spermatozoon sayısı ve hormon üretimini orta düzeyde etkilediği, spermatozoon fonksiyonunda da ihmal edilemeyecek yıllık değişimler olduğu kaydedilmektedir (Blottner & Jewgenow, 2007). Erkek kedilerin spermatogenezinde diğer hayvanlarda olduğu testesteron, FSH, LH ve Androjen Bağlayıcı Protein (ABP) etkilidir (Yavaş, 2018). Yetersiz beslenme, çevre ısısı, sık çiftleşme ve günlük ışık miktarı gibi faktörler sperma üretimini etkilemektedir (Kaya & Daşkın, 1997). Spermatogenez erkek kedilerde 20 haftalık yaşta başlar, 30 hafta civarında spermatidler testisler içinde belirgin olarak görülürler (Scott & Scott, 1957). Erkek kedilerde spermatogenez fonksiyonu 8-10 aylıkken olgunlaşır. Spermatogenezis, hipotalamustan salgılanan GnRH'nın etkisiyle hipofizde oluşan gonadotropik hormonların denetimi altındadır. LH testisin interstisyel dokusunda bulunan Leydig hücrelerini uyararak testosteron salınımını sağlar. Kan ve lenf yoluyla tübülüslerin lumenine gelen testosteron ve dihidrotestosteron gibi androjenler, FSH'nın etkisiyle Sertoli hücrelerinden salgılanan Androjen Binding Protein (ABP) ile birleşir ve bu sayede spermatogenezis başlar. Androjenler hipotalamus ve hipofize yaptıkları uyarımlarla LH salınımını kontrol ederler (İleri & ark., 1998). Spermatogenezisin gerçekleşebilmesi için ortalama olarak 62 gün gerekmektedir (Hewitt, 1998). Kedilerde günlük spermatozoon üretiminin 16×10^6 olduğu bildirilmiştir (França & Godinho, 2003). Erkek kedilerde reprodüktif aktivitenin 14 yıl kadar sürdüğü ve optimum dölverimi yaşının 4-6 yaş olduğu bildirilmektedir (Christiansen, 1984).

3. Spermanın toplanması

Kedilerden sperma yaygın olarak elektroejakülasyon ve suni vajen yöntemi ile toplanmaktadır. Ayrıca, epididimislerin dilimlenmesi, üretral kateterizasyon ve rutin orşiektomi sonrası erkeklerden spermanın elde edilebilmesi avantajı nedeniyle araştırmalarda kullanılmaktadır. Erkek kedigillerin fertilité değerlendirmesinde spermanın analizi esastır, ancak spermanın alınması zordur ve elde edilen hacim düşüktür. Erkek kedilerden

spermanın alınması ve dişi kedinin tohumlanması diğer evcil türlerle kıyaslandığında oldukça zordur. Bu sebeple diğer bazı türlerde olduğu gibi kedilerde sperma bankası tam olarak kurulamamıştır. Kedilerde hala sperma alınması ve tohumlama rutin bir işlem haline gelememiştir. Tüm zorluklara rağmen genetik materyallerinin korunması ve evcil kedilerin üreme sorunlarının çözülebilmesi için kedilerden sperma alınması gerekmektedir (Siemieniuch & Dubiel, 2007; Yavaş, 2018).

Sperma erkek hayvandan, teşhis ve araştırma ayrıca suni tohumlamada kullanım amacıyla toplanmaktadır. Suni tohumlamada hem taze hem de dondurularak saklanmış sperma kullanılabilir. Dondurularak saklanan sperma, coğrafi mesafeyi ortadan kaldırmak, ölü veya yaralı donörlerin spermasını kullanmak ve tekrarlanan deneysel manipölasyonlar için yeterli materyal sağlamak gibi avantajlara sahiptir (Zambelli & Cunto, 2006).

Suni vajen yöntemi

Suni vajen ile sperma toplanması ilk kez Sojka, Jemings & Hamner (1970) tarafından rapor edilmiştir. Erkek kedide suni vajen kullanımının en iyi sperma alma tekniği olduğu bildirilmektedir (Jordan & ark., 1999). Ancak bu yöntemde kedinin alıştırılması gerektiği ve bazı erkek kedilerin suni vajene asla yanıt vermeyebileceği ifade edilmektedir. Kediler suni vajen yöntemi ile sperma toplanmasına yaklaşık %85 oranında alıştırılabildiği ve bunun için 3.8 ± 3.1 eğitim seansı gerektiği belirtilmektedir (Ackermann & Lopes, 2015). Suni vajen kullanımı genellikle iyi kalitede ejakülatın toplanmasını sağlar fakat kedilerin mizacından dolayı bu yöntem sınırlıdır. Bu yöntemin avantajları arasında düşük maliyet, fiziksel veya kimyasal sınırlamaya gerek olmaması ve toplama işleminin tek bir teknisyen tarafından yapılabilmesi sayılabilir. Suni vajen kullanımı sperma vermeye alıştırılmış bir erkek kedi ile kızgınlık dönemindeki dişi veya östrojen uygulanmış kısırlaştırılmış bir dişi varlığında uygulanabilmektedir (Sojka, 1986). Alıştırma periyodu ortalama 2 hafta almaktadır. Haftada 3 kez spermanın toplanmasına izin vermektedir. Erkek kedide genital

bölge temizlenir ve erkeğin dişiye atlamasına izin verilir, penis erekte olduğunda suni vajene yerleştirilerek sperma toplanır. İşlem tek bir teknisyen tarafından gerçekleştirilebilir. Suni vajen ısısı 44 °C olmalı ve vazelin ile kayganlaştırılmalıdır. Bu yöntem ile 1- 4 dk. içinde sperma alınabilir (Kaya & Daşkın, 1997). Platz, Wildt & Seager (1978) suni vajen kullanılarak toplanan numunelerde yoğunluk ve motilitenin daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Alınan sperma hacmi az olduğu için hemen uygun bir sulandırıcı ile sulandırılmalıdır (Tanaka & ark., 2000). Bu yöntemle ortalama 0.04 ml, 57×10^6 /ml yoğunlukta ve %80–90 motilitede sperma elde edilebilmektedir (Sojka, 1980; Christiansen, 1984).

Elektroejakülasyon yöntemi

Kedilerde elektroejakülatör ile spermanın alınması ilk olarak Scott (1970) tarafından rapor edilmiştir. Bu yöntem etik açıdan birçok ülkede izin verilmemektedir. Üstelik gerekli ekipmanlar pahalıdır ve birçok kedi sahibi bu yöntemin uygulanması konusunda isteksizdir (Rijsslaere & Van Soom, 2012). Elektroejakülasyon yönteminde erkeğin eğitilmesine (alıştırılmasına) veya kızgın dişiye gereksinim olmamaktadır. Elektroejakülatör ile güvenli bir şekilde anestezi yapılabilecek her erkek kediden sperma alınabilir. Elektro-ejakülasyon yönteminde penisin ereksiyonu ve ejakülasyonunu sağlayan sinirler uyarılmaktadır, meydana gelen kas kontraksiyonları sonucu ductus ejakülatorius içindeki seminal sıvının ilerleyerek dışarı dökülmesi ilkesine dayanmaktadır.

Bu yöntemin uygulanmasında anesteziye ihtiyaç duyulması ve ekipman maliyeti ana dezavantajlarıdır. Ayrıca, kullanılan anestezi protokolünün sperma kalitesine etkisi de olabilmektedir. Elektro-ejakülasyon uygulanan kedilerde en sık kullanılan anestezi, tek başına (20 mg/kg intramüsküler) ya da medetomidin (5 mg/kg intramüsküler) ile ketamindir (2-10 mg/kg intramüsküler). Elektroejakülasyon ile spermanın toplanmasında hacim ve yoğunluk bakımından önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Kedilerde, tekrarlanan anestezi ve elektriksel uyarıların, ejakülasyon

kapasitesini değiştirdiğine ya da zararlı etkiler görüldüğüne dair literatür bildirimleri bulunmamaktadır. Bu yöntem ile alınan spermada yoğunluk, elektriksel uyarım voltajına ve sayısına bağlı iken hacim voltajdan etkilenmemektedir (Pineda, Dooley & Martin, 1984; Pineda & Dooley, 1984). Spermanın ozmolalitesinin kediden veya sperma toplama yönteminden etkilenmediği saptanmıştır. Suni vajen yöntemi ile elde edilen sperma örneklerinin hacmi, elektroejakülasyon yöntemine göre daha düşük, spermatozoon yoğunluğunun ise daha fazla olduğu bildirilmektedir (Dooley & Pineda, 1986).

Üretral kateterizasyon yöntemi

Günlük pratikte erkek kedilerden spermanın alınmasında üretral katerizasyon yöntemi en pratik ve en az invazif prosedür olarak tanımlanmaktadır (Rijsslaere & Van Soom, 2012). Üretral sperma toplama tekniği, sedasyon ve deferent kanaldaki adrenoseptörleri uyaran ve spermayı penil üretraya salan bir α 2-adrenerjik agonistin uygulanmasından sonra penil üretraya 1.3 mm'lik bir kateter yerleştirilmesiyle gerçekleştirilmektedir. Spermanın toplanmasında üretranın yaklaşık 5 cm içine bir idrar sondası yerleştirilerek insülin şıngası vasıtasıyla spermanın alınması da sağlanabilir. Üriner katater ile Kauda epididimisten sperma toplanabilmektedir. Yöntem uygulanırken idrar kesesine girmemeye dikkat edilmeli ve kateter yaklaşık 9 cm ilerletilmelidir (Yavaş, 2018). Toplanan spermada idrar ve seminal sıvının spermatozooanın dölleme yeteneğini olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir. Alınan spermanın çok düşük hızda (300 g) santrifüj edilmesi ve elde edilen pelletin uygun bir sulandırıcı ile sulandırılması tavsiye edilmektedir (Pineda, Dooley & Martin, 1984).

Üretral kateterizasyon teknięinde herhangi bir özel ekipman gerektirmemektedir, suni vajen ve elektro-ejakülasyon tekniklerine göre avantajlara sahiptir. Medetomidin ve deksmedetomidin, evcil kedilerde ejakülasyonu tetiklemek için kullanılan α 2-adrenerjik agonisttir. Üretral kateterizasyon yoluyla elde edilen sperma,

elektro-ejakülasyon yoluyla elde edilenlerle karşılaştırıldığında daha düşük bir hacme sahiptir, ancak spermatozoon konsantrasyonu daha yüksektir (Mphaphathi & ark., 2024).

Epididimislerden spermanın toplanması

Kastrasyondan sonra testisler ve epididimisler toplanarak petri kabına yerleştirilir. Epididimisler testislerden ayrılır, spermatozoanın 10 dakika boyunca Hepes TALP veya fizyolojik salin solüsyonu içeren sulandırıcıya geçişine izin verilir. Bu karışım santrifüje edilir. Bu prosedür oldukça kolaydır ve in vitro fertilizasyon işlemlerinde rutin olarak gerçekleştirilir (Filliers & ark., 2008). Bu yöntemin uygulanması basittir ancak rutinde kullanımı sınırlıdır ve aynı erkekte tekrarlı sperma toplanmasına olanak tanımamaktadır (Zambelli & ark., 2004). Araştırma amaçlı, nadir bulunan ve yabancı kedilerin spermalarının toplanabilmesi için tek ve en pratik yöntemdir (Hewitt, 1998). Spermatozoonların olgunlaştığı ve motilite kabiliyetini kazandığı yer olan epididimis kısmından spermanın toplanması işlemi, değerli damızlık kedilerinden özellikle de ejakülasyon gerçekleştiremeyen, kastrasyona ihtiyaç duyulan veya ölüm sonrası kedilerin genetiğini korumak için kullanılabilen bir protokoldür. Bu teknik özellikle ölü veya yaralı hayvanlarda faydalıdır. Epididimislerden toplanan spermanın dezavantajı, olgunlaşma epididimislerde ve vas deferenslerde meydana geldiği için morfolojik anormalliğin daha fazla olmasıdır (Howard & ark., 1990).

Diğer sperma toplama yöntemleri

Diğer sperma toplama yöntemleri olarak; sperma dışı kediden vajinal lavaj ile ya da erkek kediden sistosentez sonrası idrardan spermatozoa toplanması şeklinde gerçekleştirilebilir. Yöntem hem pratik değil hem de klinik kullanım için uygun görülmemektedir. Bu yöntemde sedasyon gerekli olup lavaj sırasında kullanılan sıvı ve vajinal akıntıların spermaya karışması nedeni ile spermatolojik kalite düşük olmaktadır. Lavaj işleminde %0.9'luk NaCl kullanılır (Hewitt, 1998).

4. Kedilerde Spermatolojik Muayeneler

Kedigillerin genel olarak sperma kalitesi düşüktür; (Wildt & ark., 1986) her popülasyonda genetik çeşitliliğin korunması ve akraba olmayan hayvanların suni tohumlamada kullanılması ile iyileşme sağlanabilir (Pope & ark., 1991; Pope, 2000). Kedilerde etkili bir suni tohumlamanın önündeki engel, taze spermada bile morfolojik olarak anormal spermatozoa yüzdesinin yüksek olması ve bu oranın dondurma/çözdürme protokollerinden sonra artmasıdır (Axnér, Hermansson & Linde-Forsberg, 2004; Siemieniuch & Dubiel, 2007).

Kedi ejakülatının hacminin düşük olması, diğer türlerde kullanılan bazı teşhis prosedürlerinin kedilerde yapılmasını güçleştirmektedir. Ancak sperma en azından görünüm ve hacim gibi makroskobik parametreler ile motilite, morfoloji, konsantrasyon ve canlılık gibi mikroskobik parametreler açısından değerlendirilmelidir. Bu parametreler genellikle rutin bir spermiogram için değerlendirilir ancak bazen membran bütünlüğünün, pH, osmolalite, sperma kültürü ve seminal biyokimyanın da değerlendirilmesi gerekli olabilir (Zambelli & ark., 2004).

Spermanın makroskobik muayenesinde miktar, renk, kıvam, koku ve pH, mikroskobik muayenede ise motilite, yoğunluk, canlılık ve anormal spermatozoon oranları değerlendirilmektedir.

Sperma hacmi

Sperma miktarı bir ejakülasyonla dışarıya verilen spermanın hacmidir. Hacim derecelendirilmiş sperma alma kadehi ya da ölçüm pipetleri ile ml olarak belirlenir (Tekin, 1994). Sperma hacminin belirlenmesinde kedilerde otomatik pipetler (100 mikrolitre) kullanılır (Platz & Seager, 1978). Kedilerdeki sperma hacmi 0.01-0.7 ml arasındadır (Kustritz Root, 2014; Johnstone, Root Kustritz & Olson, 2001).

Renk

Spermanın normal rengi krem beyazı ve homojen görünümde olmalıdır. Rengin yoğunluğu spermatozoa konsantrasyonunu yansıtır. Spermada sarı renk idrar veya irin varlığında, kırmızı renk ise kanama durumunda tespit edilebilir. Spermada normalin dışında renk görülmesi genital organlarda anormal bir durumun olduğunun ya da yabancı madde kontaminasyonunun göstergesidir (Tırpan, 2023a, 2023b).

Motilite

Motilite faz kontrast mikroskopuyla subjektif olarak progressif ve yüzde (%) motilite şeklinde değerlendirilmektedir. Progresif motilite, spermatozoonların ileriye doğru hareketlerinin 0 – 5 arasında değişen (0= hareket yok, 5= ileri doğru güçlü hareket) sabit bir ölçeklendirme ile belirlenir. Progressif motilite spermatozoonların hareket kalitesinin değerlendirilmesidir. Spermatozoa motilitesi; ısıtılmış lam üzerine 10 µl taze sperma örneği alınır. Sperma örneği *faz kontrast mikroskopta 100 ve 400 büyütmede ve en az dört farklı saha incelenerek % ortalaması alınarak* hesaplanır. Motilite değeri kedilerde %60-%90 arasında değişmektedir. Sperma örneğinde hem % motiliteye hem de ilerleyici motiliteye eşit vurgu yapmak için spermatozoon motilite indeksi (SMI) belirlenir. $SMI = 0.5 \times [(progressive\ motilite \times 20) + (\% \text{ spermatozoa motilite})]$ formülü ile hesaplanır. Günümüzde spermatozoon motilitesi Bilgisayar Destekli Semen Analizi (CASA) cihazı ile de değerlendirilmektedir (Johnstone, Root Kustritz & Olson, 2001; Zambelli & Cunto, 2006; Gañán, Gomendio & Roldan, 2009; Kustritz Root, 2014).

Spermatozoon yoğunluğu

Birim hacim spermada bulunan spermatozoon sayısıdır (İnanç, 2023). Spermatozoon yoğunluğu hemositometre, spektrofotometri ve CASA ile belirlenebilmektedir. Kedilerden alınan sperma; 1 kısım sperma ve 9 kısım formal buffer saline olacak şekilde

sulandırılır (1:10). Bu solüsyondan 1 kısım alınır, tekrar 9 kısım formol buffer saline solüsyonuna ilave edilerek (1:100) değerlendirme yapılabilir. Kedilerde spermatozoon yoğunluğunun $13-143 \times 10^6/\text{ml}$ arasında değiştiği ortalama $43 \times 10^6/\text{ml}$ olduğu kaydedilmektedir (Kustritz Root, 2010; Uslu, 2023). Muayenelerde spermatozoon konsantrasyonu genellikle 1:10, 1:25, 1:50 veya 1:100 sulandırma uygulanarak değerlendirilmektedir. Spermatozoon yoğunluğu ırka, sperma toplama yöntemine ve bireysel farklılıklara bağlı olarak değişebildiği, hatta aynı bireyden farklı zamanlarda alınan ejakülatlar arasında da farklılıklar görüldüğü bildirilmektedir (Çoyan & ark., 2002).

Morfoloji

Spermanın morfolojik muayenesinde eozin nigrozin, Diff-Quick veya diğer boyama yöntemleri ile 10 µl sperma örneği kullanılarak değerlendirilir. Spermatozoadaki anormal yapılar primer ve sekonder defektler şeklinde sınıflandırılmakta, primer defektler (çift baş, çift kuyruk, başta şekil bozuklukları, proksimal sitoplazmik damlacıklar ve orta kısım bükülmesi) spermatogenezis sürecinde, sekonder defektler (kopmuş başlar, distal sitoplazmik damlacıklar ve kuyruk kıvrımları) ise enfeksiyon orjinli ya da ejakülasyon sonrası yapılan maniplasyon ve işlemler sırasında şekillenen anormalliklerdir. Kedi spermasında en sık karşılaşılan anormallikler, sitoplazmik damlacık, orta parçanın bükülmesi, kıvrık kuyruk anormallikleridir. Kedilerde morfolojik olarak normal spermatozoa oranı ortalama %71 olarak kaydedilmektedir (Kustritz Root, 2010).

Azalan genetik çeşitlilik ve düşük testosteron konsantrasyonları durumunda teratospermi durumunda spermatozoonların %60'ından fazlası morfolojik olarak anormal olabilmektedir. Morfolojik değerlendirmede; kedi spermatozoasının oval bir kafası, belirgin bir orta parçası ve uzun bir kuyruğu vardır. Evcil kedilerde morfolojik olarak normal spermatozoa oranının

%40'tan az bulunması durumu teratospermi olarak değerlendirilmektedir (Johnson, 2022; Uslu, 2023).

Ölü-canlı spermatozoa oranı

Spermadaki ölü ve canlı spermatozoonları belirlemek için çeşitli hücre ve florokrom boyalar kullanılır. Değerlendirmeler, kullanılan boyaların özelliklerine göre faz kontrast, floresan mikroskopları, CASA sistemi ve akış sitometri (flow-cytometry) cihaz yardımı ile yapılabilmektedir. Ölü-canlı spermatozoa oranı, eosin ya da eosin-nigrosin boyama yöntemleri ile pratik olarak belirlenir. Bu yöntemde ölü spermatozoonlar boyayı alır, canlı spermatozoonlar ise boya almazlar. Genellikle eosin ve eosin-nigrosin gibi hücre boyamaları ile hazırlanan preparatlar, faz kontrast mikroskopta değerlendirilir. Lam üzerine 2-3 damla boya solüsyonu, yanına bir damla sperma konularak karıştırılır, daha sonra froti çekilir ve kurumaya bırakılır. Hazırlanan froti örneği faz kontrast mikroskopta incelenerek 200-400 adet spermatozoon sayılır, ölü-canlı spermatozoa oranı yüzde olarak ifade edilir (Zambelli & Cunto, 2006; Tırpan, 2023b).

Osmolalite ve pH

Kedi spermasının pH'sı 7.5'dir. Sperma alma yöntemi bazı spermatolojik özellikleri etkilemektedir (Kaya & Daşkın, 1997). Johnson, Osborne & Lipowitz (1988) seminal plazmanın, bulboüretal ve prostat sıvılarının ortalama osmolalite ve pH değerlerini sırasıyla 323, 327 ve 331 mOsm/L ve 6.6, 6.7, 7.8 olduğunu bildirmişlerdir.

Mitokondriyal DNA bütünlüğü

Mitokondriyal fonksiyonun değerlendirilmesi motilitenin tahmininde kullanılabilir. Mitokondri, spermatozoon hareketi için önemli bir enerji kaynağıdır. Çoğu zaman motilitenin azalması mitokondriyal membran bütünlüğündeki kusurlarla ilişkilendirilmektedir (Mphaphathi & ark., 2024).

Plazma membran bütünlüğü (HOS test)

Plazma membran bütünlüğünün belirlenmesinde düşük ozmotik basınçta (60-100 mOsm) speratozoaların reaksiyon vermesi değerlendirilir. Fonksiyonel olarak sağlam ve canlı spermatozoonlar hipoozmotik ortamda hücre içine su alır, plazma membranında ve kuyruk kısmında şişmeler görülmektedir. Hipoozmotik solüsyon olarak 9 g fruktoz, 4,9 g sodyum sitrat, 1 litre distile su karışımı kullanılır. Test edilecek sperma örneği bu solüsyon ile 37 °C’de inkübe edildikten sonra mikroskop altında 200-400 adet spermatozoon sayılarak şişen ve kuyruğu kıvrılan hücrelerin oranı değerlendirilir (İnanç, 2023; Tırpan, 2023b).

Kaynaklar

Ackermann, C.L. & Lopes, M.D. (2015). Training tom cats for semen collection using an artificial vagina: a retrospective study. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 22(12), 1155-1159.

Aspinall, V. (2011). Reproductive system of the dog and cat Part 2-the male system. *Veterinary Nursing Journal*. 26 (3), 89-91.

Axner, E, Hermansson, U, Linde-Forsberg, C. (2004). The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 84, 179-191.

Axner, E, Linde-Forsberg, C. (2007). Sperm morphology in the domestic cat, and it relation with fertility: a retrospective study. *Reprod Domest Anim* 42, 282-291.

Axner, E. (2006). Sperm maturation in the domestic cat. *Theriogenology*, 66(1), 14-24.

Blottner, S. & Jewgenow, K. (2007). Moderate Seasonality in Testis Function of Domestic Cat. *Reprod Dom Anim* 42, 536-540. Doi: 10.1111/j.1439-0531.2006.00817.x

Christiansen, I.J. (1984). *Reproduction Dog and Cat*. 1st Ed. (s. 225-262). London: Billiere and Tindall.

Çebi, Ç. (2023). Erkek kedilerde reproduktif anatomi ve fizyoloji. Soylu M.K. (Ed.), *Hayvanlarda reproduksiyon, androloji ve yardımcı üreme teknikleri* içinde 1. Baskı. (s.654-656). Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri.

Çoyan, K, Ataman, M.B, Kaya, A, Karaca, F. (2002). *Evcil Hayvanlarda Dölerme ve Suni Tohumlama*. Konya: Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları.

Davidson, A.P. & Baker, T.W (2009). Reproductive Ultrasound of the Dog and Tom. *Topics in Companion Anim Med.* 24:2, 64-70.

Demirci, E. (1994). Erkek üreme organlarının muayenesi. *Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Suni Tohumlama, Doğum ve İnfertilite* içinde. Birinci Baskı, (s.61-67), Konya: Dizgievi.

Dimitrov, R, Russenov, A. (2006). Ultrasonographic Features of Feline Bulbourethral Glands. *Trakia Journal of Sciences.* 4 (1), 18-21.

Dimitrov, R., Yonkova, P., & Georgiev, P. (2005). Ultrasonographic features of prostate gland in the cat. *Acta Morphologica and Antropologica*, 10, 99-103.

Dooley, M.P, Pineda, M.H. (1986). Effect of Method of Collection on Seminal Characteristics of The Domestic Cat. *Am J Vet Res.* 47, 286-292.

Filliers, M., Rijsselaere, T., De Causmaecker, V., Bossaert, P., Dewulf, J., Pope, C.E., Van Soom, A. (2008). Computer-assisted semen analysis of fresh epididymal cat spermatozoa and the impact of cooled storage (4°C) on sperm quality. *Theriogenology.* 70, 1550-1559.

França, L.R, Godinho, C.L. (2003). Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol Reprod.* 68, 1554-1561.

Gañán, N., Gomendio, M, Roldan, E.R.S. (2009). Effect of storage of domestic cat (*Felis catus*) epididymides at 5-8C on sperm quality and cryopreservation. *Theriogenology*. 72,1268-1277.

Güngör, Ş. (2023). Kedilerde reproduksiyon yönetimi ve en uygun suni tohumlama zamanının belirlenmesi. Taşdemir U (Ed.) *Evcil Hayvanlarda, Laboratuvar Hayvanlarında Reproduksiyon Yönetimi ve Evcil Hayvanlarda En Uygun Suni Tohumlama Zamanının Belirlenmesi* içinde. (s.48-53). 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri.

Hewitt, D. (1998). Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology. G. Simpson (Ed.). *Physiology and Endocrinology of the Male* içinde (s.61-69). British Small Animal Veterinary Association.

Higgs, V. (2023). Urinary Tract Blockage in Cats. (03/11/2024 tarihinde <https://www.petmd.com/cat/conditions/urinary/urinary-tract-blockage-cats>. Adresinden ulaşılmıştır.).

Howard, J.G, Brown, J.L, Bush, M, Wildt, D.E. (1990). Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing. *J Androl*. 11, 204-215.

İleri, İ.K, Ak, K, Pabuçcuoğlu, S, Birler, S. (1998). *Evcil Hayvanlarda Reproduksiyon ve Suni Tohumlama*. Ders Notu No: 84, İstanbul: İ.Ü. Veteriner Fakültesi Masaüstü Yayıncılık.

İnanç, M.E. (2023). Sperma kalitesinin in vitro değerlendirilmesi. Soylu M.K. (Ed.). *Hayvanlarda reproduksiyon*,

androloji ve yardımcı üreme teknikleri. 1. Baskı içinde (s.102-103). Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri.

Johnson, A.K. (2022). Normal feline reproduction: The tom. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 24(3), 212-220.

Johnston, S.D, Osborne, C.A, Lipowitz, A.J. (1988). Characterization of seminal plasma, prostatic fluid and bulbourethral gland secretions in the domestic cat. *Proceedings of the 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, vol. IV*, s.560.

Johnstone, S.D, Root Kustritz, M.V & Olson, P.N.S. (2001). *Canine and Feline Theriogenology*. (s.508-522). WB Saunders Co., Philadelphia.

Jordan, H.L, Liang, Y, Hudson, L.C, Tompkins, W.A. (1999). Shedding of feline immunodeficiency virus in semen of domestic cats during acute infection. *Am J Vet Res*. 60, 211-215.

Kaya, M., & Daşkın, A. (1997). Reproduction of the domestic cat and bitechnology. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 37(2), 109-120.

Kustritz, M.V.R. (2010). *Clinical Canine and Feline Reproduction*. USA: Wiley-Blackwell, Iowa.

Kustritz, M.V.R. (2014). Applied small animal andrology. *Animal andrology: theories and applications içinde* (s.177-196). UK: Wallingford CABI.

Martin, W.D., Fletcher, T.F., & Bradley, W.E. (1974). Perineal musculature in the cat. *The Anatomical Record*. 180(1), 3-13.

Mphaphathi, M.L., Thema, M.A., Ledwaba, M.R., Sebopela, M.D., & Mashilo, T.L. (2024). *Perspective Chapter: Wild and Domestic Cats Semen Cryopreservation–Main Aspects and Perspectives.*

Odabaşıoğlu, F, Ateş, C.T. (2000). *Van Kedisi*. Konya: 1. Baskı Selçuk Üniversitesi Basımevi.

Pineda, M.H, Dooley, M.P, Martin, P.A. (1984). Long term study on the effects of electroejaculation on seminal characteristics of the domestic cat. *AM J Vet Res.* 45, 1038-1040.

Pineda, M.H, Dooley, M.P. (1984). Effect of voltage and order of voltage application on seminal characteristics of electroejaculates of the domestic cat. *Am J Vet Res* 45, 1520-1525.

Platz, C.C, Seager, S.W.J. (1978). Semen Collection by Electroejaculation in The Domestic Cat. *JAVMA.* 173, 1353-1355.

Platz, C.C, Wildt, D.E, Seager, S.W.J. (1978). Pregnancy in The Domestic Cat After Artificial Insemination With Previously Frozen Spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 52, 279-282.

Pope, C.E, Turner, J.L, Quatman, S.P, Dresser, B.L. (1991). Semen storage in the domestic felid: a comparison of cryopreservation methods and storage temperature. *Biology of Reproduction* 44, (1), 117.

Pope, C.E., 2000. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology.* 53, 163-174.

Rijsselaere, T., & Van Soom, A. (2012). Semen collection, assessment and artificial insemination in the cat. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift.* 79(6), 467-470.

Root, M.V, Johnston, S.D, Johnston, G.R. & Olson, P.N. (1996). The effect of prepuberal and postpuberal gonadectomy on penile extrusion and urethral diameter in the domestic cat. *Vet Radiol Ultrasound*. 37, 363-366.

Scott, M.G. & Scott, P.P. (1957). Postnatal development of the testis and epididymis in the cat. *J Physiol*. 136: 40-41.

Siemieniuch, M., & Dubiel, A. (2007). Preservation of tomcat (*Felis catus*) semen in variable temperatures. *Animal reproduction science*. 99(1-2), 135-144.

Sojka, N.J. (1980). The male reproductive system. Morrow DA (Ed). *Current Therapy in Theriogenology* içinde (s.844-845). Philadelphia: WB Saunders.

Sojka, N.J. (1986). Management of artificial breeding in cats. Morrow DA. (Ed.) *Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in large and small animals* içinde. 2nd (s.805–808). Philadelphia: WB Saunders.

Sojka, N.J., Jemings, L.L., Hamner, C.E. (1970). Artificial insemination in the cat (*Felis catus*). *Laboratory Animal Care*. 20, 198-204.

Tanaka, A, Kuwabara, S, Takagi, Y, Nakagawa, K, Fujimoto, Y, Murai, M, Tsutsui, T. (2000). Effect of Ejaculation Intervals on Semen Quality in Cats. *J Vet Sci*. 62(11), 1157-1161.

Tekin, N. (1994). Spermanın muayenesi ve değerlendirilmesi. *Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Suni Tohumlama, Doğum ve İnfertilite* içinde. Birinci Baskı. (s.69-79). Konya: Dizgievi.

Tırpan, M.B. (2023a). Androloji laboratuvarında spermanın muayenesi. Soylu M.K. (Ed.) *Hayvanlarda reproduksiyon, androloji ve yardımcı üreme teknikleri. 1. Baskı* içinde (s.147-148). Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri.

Tırpan, M.B. (2023b). Androloji laboratuvarında spermanın muayenesi. Soylu M.K. (Ed.) *Hayvanlarda reproduksiyon, androloji ve yardımcı üreme teknikleri. 1. Baskı* içinde (s.152-158). Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri.

Tsutsui, T, Onodera, F, Oba, H, Mizutani, T. & Hori, T. (2009). Plasma Hormone Levels and Semen Quality in Male Cats during Non-Breeding and Breeding Seasons. *Reprod Dom Anim. 44* (2), 291-293. doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01449.x

Uslu B.A. (2023). Androlojik Muayeneler. Soylu M.K. (Ed.). *Hayvanlarda reproduksiyon, androloji ve yardımcı üreme teknikleri. 1. Baskı* içinde (s.660-661). Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri.

Wildt, D.E., Howard, J.G., Hall, L.L., Bush, M. (1986). Reproductive physiology of the clouded leopard. I. Electroejaculates contain high proportions of pleiomorphic spermatozoa throughout the year. *Biol. Reprod. 34*, 937-947.

Yavaş, İ. (2018). Kedi Spermasının Saklanması. *Türkiye Klinikleri Reproduction and Artificial Insemination-Special Topics*, 4 (2), 32-39.

Zambelli, D, Baietti, B, Prati, F, Belluzzi, S. (2004). The effect of ketamine and medetomidine on quality of domestic cat sperm after electroejaculation. *EVSSAR IV European Congress on*

Reproduction in Companion, Exotic and Laboratory Animals, June 4-6. s.311-312.

Zambelli, D, Cunto, M. (2006). Semen collection in cats: techniques and analysis. *Theriogenology*. 66 (2), 159-165.

BÖLÜM III

Kedilerde Spermanın Saklanması ve Suni Tohumlama Uygulamaları

Nurdan COŞKUN
Fikret KARACA

1. Giriş

Spermanın kısa ve uzun süreli saklanması, biyolojik çeşitliliğin korunması, değerli evcil kedi ırklarının genetik korunması ve yardımcı üreme teknolojilerinin iyileştirilmesi için önemli bir araçtır. Spermanın özellikle uzun süreli saklanması sonrası dölleme ve gelişimsel yeteneği de dahil olmak üzere canlılığını sürdürebilmesi için etkili protokollerin geliştirilmesi araştırmaları güncelliğini korumaktadır. Kedi sperması uygun bir sulandırıcı ile sulandırıldıktan sonra +5°C'ye soğutulularak kısa süreli muhafaza edilebilmektedir (Luvoni & ark., 2003). Ev kedilerinde, spermanın uzun süreli saklanmasına yönelik araştırmalarda optimum dondurma teknikleri henüz gerçekleştirilememiştir. Evcil kedi spermasının kendine özgü fiziksel özelliklere (tür spesifik) sahip olması, sığırlar için geliştirilen sperma sulandırıcıları ve prosedürlerle kedi spermasının başarılı bir şekilde dondurulamamasının nedeni olarak

değerlendirilmektedir (Luvoni, 2006). Kedi üreme programlarında dondurulmuş sperma ile suni tohumlama sonrası gebelik oranları sonuçlarına bakıldığında, kriyopreservasyon süreçlerinde yapılacak iyileştirmelerin, değerli kedi ırkları ve nesli tükenmekte olan türlerin korunmasına yönelik programların başarısını arttıracak beklenilmektedir (Madrigal-Valverde & ark., 2020). Kedilerde, doğal çiftleşme başarılı olmadığında veya erkek ve dişinin ayrı yerlerde barındırıldığı durumlarda suni tohumlama gerekebilir. Ayrıca, suni tohumlama nesli tükenmekte olan kedigillerin gen kaynağının korunmasında da uygulanma potansiyeline sahiptir. Kedilerde ilk başarılı suni tohumlama çalışmaları Sojka ve ark. tarafından 1970 yılında gerçekleştirilmiş olup, günümüze kadar taze ve dondurulmuş sperma ile intravajinal, intrauterin ve intratubal suni tohumlama uygulamaları araştırma amaçlı yürütülmüştür (Tsutsui, 2006).

2. Spermanın saklanması

Kedi sperması sulandırılmadan taze olarak *in vitro* ortamda 37 °C'de 1 saate yakın dayanabilmektedir. Bu süre, sperma 23 °C'de tutulduğunda 140 dakikaya kadar uzatılabilmektedir. Kedi sperması uygun bir medyum ile sulandırılarak ve 4-5 °C'ye soğutulması durumunda birkaç gün ya da dondurularak -196 °C'de uzun süre muhafaza edilebilir. Kedi spermatozoasının korunmasına yönelik tekniklerin geliştirilmesi evcil hayvan olarak beslenen kedilerin sayısının artması göz önüne alındığında mevcut dölverimi talebini için oldukça önemlidir (Jimenez & ark., 2013). Spermatozoanın uzun süreli saklanması, sperm bankacılığının kurulmasına olanak sağlayabilmektedir. Ayrıca, ejaküle edilmiş veya epididimisten toplanan, orşiektomize hatta ölü hayvanlardan alınan genetik materyalinin korunması kolaylaşır (Zambelli & ark., 2008).

3. Sperma sulandırıcıları ve bileşenleri

Sperma sulandırıcı olarak kullanılan medyumun ozmolalitesi önemlidir. Kedi spermasının ozmolalitesi 290 ile 320 mOsm/kg arasında değişir ve ideal bir sulandırıcı aynı değer aralığında olmalıdır. Kedi spermasında motilite, ozmolalite değişikliklerine

karşı membran bütünlüğünden daha duyarlıdır. Kedi spermatozoaları hipertonik strese karşı dirençli iken izotonik ortama tekrar döndüklerinde membran bütünlüğü zarar görmektedir (Pukazhenthı & ark., 2000). Hipotonik solüsyonlar spermatozoada şişmeye ve membran yırtılmasına, hipertonik solüsyonlar ise büzülmeye neden olmaktadır (Luvoni, 2006). Kedide seminal plazmanın varlığının, spermatozoonların dölleme yeteneğini olumsuz etkilediği ve düşük hızda (300g) santrifüje edilerek seminal plazmanın ayrılması işleminin spermatozoanın canlı kalma süresini önemli ölçüde uzattığı bildirilmektedir (Luvoni, 2006; Tsutsui, 2006; Buranaamnuay, 2017; Yavaş, 2018). Kedi spermasının saklanması spermatozoonların soğuk şokundan koruyucu olarak yumurta sarısı ve enerji ihtiyacının karşılanması için ise monosakkaritler kullanılmaktadır (Yavaş, 2018). Kedi spermatozoalarının soğuk şokuna dayanıklı olduğu ve yumurta sarısının motilite ve akrozom bütünlüğünün korunmasında faydalı olduğu, ancak plasma membran bütünlüğüne etkili olmadığı bildirilmektedir. Ayrıca, kedi spermasının sulandırılmasında ekzojen enerji olarak, monosakkaritlerin (glikoz, fruktoz ve galaktoz) kullanılmasının avantaj sağlamadığı kaydedilmektedir (Glover & Watson, 1987).

Kedi spermasının dondurulmasında yaygın olarak %20 yumurta sarısı ve %4-5'lik gliserol içeren TEST (tris hidroksi metil aminometan sülfonik asit bazlı Tes), Tris (tris hidroksi metil aminometan) ve laktöz tamponlu sulandırıcılar kullanılmaktadır. Ayrıca, farklı oranlarda gliserol (Baran & ark., 2004), sodyum dodesil sülfat (Axner, Hermansson & Linde-Forsberg, 2004; Zambelli & ark., 2010), yumurta sarısı ve şekerler denenmiştir (Glover & Watson, 1987).

Kedi sperminin dondurularak saklanması için özel olarak hazırlanan sulandırıcılar ticarileştirilememiştir. Spermanın saklanması diğer türler için formüle edilmiş ticari olarak pazarlanan sulandırıcılar kullanılmaktadır. Köpek spermasının dondurulması için geliştirilen glikoz içeren Tris-yumurta sarısı bazlı sulandırıcı, kedi spermasının dondurularak saklanması en sık

kullanılan sulandırıcıdır. Glikoz yerine, fruktoz veya laktoz eklenen Tris-yumurta sarısı sulandırıcısı da kedi spermasının dondurularak saklanması rapor edilmiştir. Yağsız süt-glikoz-aurin sulandırıcısı ile dondurularak saklanan kedi spermasının intrauterin tohumlama sonrası 19. günde gebelik oranları; Tris-yumurta sarısı sulandırıcısı için %42,9; yağsız süt-glikoz-aurin sulandırıcısı için %33,3 olarak saptanmıştır (Baran & ark., 2011; Tsutsui & ark., 2000). TEST-yumurta sarısı ya da TEST-soya lesitini sulandırıcısı kedi spermasının dondurulması için kullanılabilir. Vick & ark. (2012) %4 gliserol içeren TEST yumurta sarısı sulandırıcısını kullanarak kedi spermasını dondurmuşlar ve yumurta sarısı yerine soya fasulyesi lesitini kullanımının motilite, canlılık ve membran bütünlüğünü iyileştirdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca TEST-soya lesitini sulandırıcısıyla dondurulan kedi spermasının, laparoskopik oviduktal suni tohumlama sonrasında canlı yavru elde etmek için kullanılabileceği de rapor edilmiştir. Yukarıda bahsedilen sulandırıcılara ek olarak, yaban domuzunda kullanılan laktoz-yumurta sarısı sulandırıcısının kedi sperminin dondurularak saklanması motilite ve in vitro fertilizasyon kapasitesini koruduğu bildirilmiştir (Buranaamnuay, 2017).

Şekerler

Şekerler, sulandırıcıya ekzojen enerji kaynağı, ozmotik bileşen ve kriyoprotektif etkileri dolayısıyla eklenirler. Monosakkaritler genel olarak kullanılabilir ancak türe göre farklılıklar olabilir. Fruktoz ve glikoz, ejaküle edilen spermatozoa için ana enerji kaynağıdır (Ponglowhapan, Essen-Gustavsson & Linde-Forsberg, 2004). Kedilerde seminal plazmada monosakkarit bulunmaz (Johnston, Osborne & Lipowitz, 1988). Kedilerde spermanın dondurularak saklanması sulandırıcılara fruktoz ve glikoz yaygın olarak eklenmektedir (Cocchia & ark., 2010; Toyonaga & ark., 2010; Baran & ark., 2011; Thuwanut & ark., 2008; Zambelli & ark., 2010). Farklı şükroz bazlı sulandırıcıların kedi sperma kalitesi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Non-penetre bir kriyoprotektan olarak şükroz kullanımının ultra hızlı kriyopreservasyon sonrasında epididimislerden elde edilen kedi

spermatozoada progresif motilite ve normal morfolojisinde artış sağladığı saptanmıştır. Benzer sonuçlar 0,4 M sakkaroz kullanıldığında da elde edilmiştir (Vizuite & ark., 2014).

Kriyoprotektan konsantrasyonları

Dondurma-çözdürme işleminde spermin ozmotik denge ve sıcaklık değişikliklerine uyum sağlaması gerekir. Bu süreçte hücre zarının bozulmasına ve çözünme sonrasında spermatozoa kalitesinin azalmasına neden olan hücre içi buz kristallerinin oluşumu, dondurma stresi ve hasarlar meydana gelmektedir. Spermatozoayı dondurma hasarından korumak için çeşitli kriyoprotektanlar kullanılır. Bu maddeler, donma noktasını düşürerek, membran lipid ve proteinleri yeniden düzenleyerek, membran akışkanlığını artırarak ve hücre içi buz kristallerinin oluşumunu azaltarak görev yaparlar. Diğer evcil hayvanlarda olduğu gibi evcil kedi spermasının dondurulması için en sık kullanılan kriyoprotektan gliseroldür. Ancak yüksek konsantrasyonlarda hücrelere zararlıdır. Sulandırıcılara eklenecek gliserol konsantrasyonları %1.25 ile %8 arasında değişmektedir. Bununla birlikte, sulandırıcının özellikleri ve dondurma-çözdürme yöntemine bakılmaksızın gliserol konsantrasyonunun %4 ve %5 olarak kullanımı en yaygın ve optimum olup motiliteyi koruduğu bildirilmiştir (Zambelli & ark., 2002; Baran & ark., 2004; Chatdarong & ark., 2009). Ejaküle kedi spermasında yapılan bir çalışmada %3, %5 ve %7 gliserol konsantrasyonlarının kriyoprotektif etkinliği karşılaştırılmış, en yüksek koruyucu etki %5 oranında elde edilmiştir. Nelson & ark., (1999) %8 ve %4 oranında gliserol konsantrasyonlarında, %8 oranının dondurulmuş-çözülmüş kedi spermatozoa motilitesinde azalmaya sebep olduğunu bildirmiştir. Sulandırıcılardaki gliserol konsantrasyonlarını azaltmak için alternatif olarak gliserole kıyasla düşük moleküler ağırlıklı amidler kullanılmış ve spermatozoaya hızla nüfuz edebildikleri ve kriyopreservasyon sırasında dondurma hasarını azalttıkları bildirilmiştir (Alvarenga & ark., 2005; Martins & ark., 2024).

Bir diğerk hücre içi kriyoprotektan olan dimetil sülfoksit (DMSO), kedilerde spermanın dondurulması için kullanılmıştır (Nelson & ark., 1999). Aynı konsantrasyonlarda (%4 ve %8) DMSO ve gliserol kullanımının, dondurma-çözdürme sonrasında etkisinin değerlendirildiğı bir çalışmada %8'lik gruplarda %4'lük gruplara göre daha az motilite saptanmıştır. Vizuet & ark. (2014) epididimislerden elde edilen kedi spermasının hücre içi kriyoprotektan içermeyen dondurma medyumunda ultra hızlı bir kriyopreservasyona tabi tutulabileceğini bildirmiştir. Bu çalışmada geçirgen olmayan bir kriyoprotektan olarak sakkarozlu Dulbecco's fosfat tamponlu salin-%1 BSA sulandırıcısı kullanılmış, çözdürme sonrasında 0.4 M sakkaroz ilavesinin en yüksek sperm kalitesi sağladığı bildirilmiştir.

Antioksidanlar

Dondurularak saklanan sperma örneklerinde reaktif oksijen türlerinde artış ve membranlarda lipid peroksidasyonu ile kapasitasyon benzeri değişiklikler ve motilite kaybı bildirilmektedir (Medeiros & ark., 2002). Kedilerde sperma sulandırıcılarına, antioksidanların eklenmesinin sperm kalitesi üzerindeki etkilerine ilişkin çalışmalarda, bazı antioksidanların spermatozoada koruma sağladığı, bazılarının ise sağlamadığı kaydedilmiştir. Tris-yumurta sarısı sulandırıcısına 10 U/mL glutatyon peroksidaz ilavesi, çözdürme sonrası epididimislerden elde edilen kedi spermatozoası üzerine pozitif etkiler sağlarken, tris-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısına 200 U/mL katalaz ya da 600 U/mL süperoksit dismutaz ilavesinin, çözdürme sonrası sperm hareketliliğini ve akrozom bütünlüğünü iyileştirmedeği görülmüştür. Benzer şekilde, tris-yumurta sarısı-fruktoz sulandırıcısına 400 U/mL katalaz ya da süperoksit dismutaz ilave edilerek dondurulup-çözdürülen kedi spermasında motiliteye, canlılığa ve akrozom bütünlüğüne olumlu etkileri tespit edilmemiştir (Buranaamnuay, 2017). Thuwanut & ark. (2008), tris-yumurta sarısı-laktoz sulandırıcısına 5 mM DL-sistein ve suda çözünen E vitamini analogu (Trolox) ilavesinin, dondurulmuş-çözülmüş epididimal kedi spermatozoası üzerinde koruyucu etkileri olduğunu bildirmektedirler. Dondurma

medyumuna taurin ilavesinin (25 mM veya 50 mM) motilitede iyileşme sağladığı kaydedilmektedir (Luvoni & ark., 2002). Ayrıca, 25 mM L-karnitin içeren tris-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile dondurulan epididimal kedi spermasında, çözündürme sonrası ve çözöldükten 2 saat sonra spermatozoa motilitesini iyileştirdiği tespit edilmiştir (Manee-in & ark., 2014).

Deterjan etkileri

Equex STM macunu kriyopreservasyon işlemi sırasında akrozom bütönlüğünü korumaya ve kedi epididimal spermatozoasındaki kapasitasyon benzeri değışiklikleri önlemeye fayda sağlayabilmektedir (Axner, Hermansson & Linde-Forsberg, 2004; Rota & ark., 1997). Equex, sağlam akrozom oranını artırırken membran bütönlüğü ve motiliteyi azaltmıştır (Axner, Hermansson & Linde-Forsberg, 2004).

4. Sulandırma yöntemleri

Spermanın sulandırma işlemi bir ya da iki aşamalı olarak gerçekleştirilmektedir. Tek aşamalı sulandırma işlemi, taze spermanın kullanılması durumunda genellikle oda sıcaklığında ($23\pm3^{\circ}\text{C}$) gerçekleştirilir (Luvoni & ark., 2002; Tebet & ark., 2006). Daha sonra sulandırılmış sperma solüsyonu soğutulur ve 5°C 'de muhafaza edilir. Bu prosedür; kısa süreli saklamaya izin verebilir. Dondurulacak sulandırılmış sperma solüsyonu, $4-5^{\circ}\text{C}$ 'de 20 dakika ile 24 saat aralığında, spermatozoonların gliserole alışması için ekulibrasyona bırakılır (Luvoni & ark., 2003). Ganai & ark. (2009) kedi spermasında dondurma-çözödürme sonrasında motilite ve akrozom bütönlüğünün kısa süreli (30 dk) ekulibrasyona kıyasla uzun süreli (2 saat) ekulibrasyonda daha yüksek olduğunu kaydetmektedirler.

Sperma örneğinin iki aşamalı sulandırma işleminde ilk sulandırma oda sıcaklığında, ikinci sulandırma işlemi ise sulandırılmış sperma solüsyonunun soğutulmasından önce (oda sıcaklığında) veya soğutulduktan sonra $4-5^{\circ}\text{C}$ 'de gerçekleştirilir. Sulandırma işleminin her iki aşamasında da kullanılan sulandırıcılar,

yalnızca ikinci sulandırmada eklenen Equex STM (OES, Orvus ES Paste) ve gliserol dışında çok benzer bileşenlere sahiptir (Cocchia & ark., 2010). Epididimislerden elde edilen kedi spermasının dondurulmasında, iki aşamalı sulandırmanın tek aşamalı sulandırma prosedürüne göre daha yüksek sperm canlılığı ile sonuçlandığı kaydedilmektedir.

5. Spermanın kısa süreli saklanması

Kedilerden elde edilen sperma, uygun bir sulandırıcı ile sulandırıldıktan sonra 5 °C'ye soğutularak 24 saatten 5-7 güne kadar muhafaza edilebilmektedir (Luvoni & ark., 2003). Kedi sperması %20 yumurta sarısı içeren Tris sulandırıcısında ya da %10 yumurta sarısı içeren sütlü sulandırıcıyla sulandırıldıktan sonra 5 °C'de 24-48 saat süre ile başarılı bir şekilde saklanabildiği kaydedilmektedir (Baran & ark., 2009). Epididimislerden elde edilen kedi sperması -1°C'de 48 saate kadar saklanabilmektedir (Souza & ark., 2020). Ayrıca, kedi epididimisleri 4-5 °C'de 24 saat oda sıcaklığında, 20 °C'de ise 12 saat muhafaza edilebilmektedir (Buranaamnuay, 2017). Taze spermayla karşılaştırıldığında epididimal spermanın gece boyunca soğutulmasının spermatozoa motilitesini azalttığı bildirilmekle birlikte, Harris & ark. (2001), ejaküle edilen ve epididimal spermanın TEST-yolk solüsyonu ile sulandırılması ve 5 günlük saklama sonrasında, epididimal spermada daha iyi motilite (sırasıyla % 69 ve %51,4) tespit edildiği, canlılık oranında (%91'e karşı %88,5) ise önemli bir fark gözlenmediği kaydedilmektedir. Kedilerde epididimislerden elde edilen ve Tris sulandırıcısı ile sulandırılan spermanın 4 °C'de üçüncü günde 52.5 ± 13.8 , dördüncü günde 20.0 ± 5.7 ve yedinci günde 3.7 ± 1.8 ilerleyici motilite tespit edilmiştir (Siemieniuch & Dubiel, 2007). Lima & ark. (2016) kedilerin 4 saate kadar, Ganan & ark. (2009) ise 24 saat süre içerisinde 4 °C'ye soğutulmuş epididimislerden elde edilen spermanın uygun sulandırıcı ile sulandırılması sonrası başarıyla kullanılabileceğini, bu tekniğin nesli tükenmekte olan kedilerin korunmasına katkıda bulunabileceğini ifade etmektedirler.

6. Spermanın uzun süreli saklanması

Evcil kedilerde ejaküle spermasının uzun süreli saklanması ve dondurulmuş-çözdürülmüş sperma ile yapılan tohumlamalarda gebelik elde edilmesi ilk kez Platz, Wildt & Seager (1978) tarafından rapor edilmiştir. Spermanın dondurulmasına yönelik pek çok prosedür vardır ve tümü spermatozoon hücrelerine en az zararı vermeyi amaçlamaktadır. (Buranaamnuay, 2017).

Sulandırılan sperma yaygın olarak 0.25 ml'lik payetlere çekilir. Dondurma işlemi 40x30x30 cm ebatlarındaki strafor kapta, azot seviyesinin 4-5 cm üzerinde 7-10 dakika arasında ya da programlanabilir otomatik sperma dondurma cihazları ile sıvı azot buharında gerçekleştirilir. Spermatozoada buz kristallerinin oluşumunu en aza indirmek için dondurma işleminin başlangıç aşamasında soğutma hızı nispeten yavaş (4 °C'den -1 °C'ye veya -25 °C'ye -1 °C/dakika), daha sonra final sıcaklık -100 veya -196 °C'ye ulaşana kadar hızlı soğutma (-30 °C/dakika veya daha fazla) önerilmektedir. Spermanın dondurulmasında en uygun dondurma hızının +5 ile -80 °C arasında -10°C/dk. olduğu bildirilmektedir (Lengwinat & Blottner, 1994; Tsutsui & ark., 2000, Tsutsui & ark., 2003; Mizutani & ark., 2010). Dondurma işlemi tamamlanan numuneler daha sonra bir sıvı azot tankına aktarılır ve -196°C'de uzun süre muhafaza edilir.

Epididimislerden elde edilen spermanın dondurularak saklanması, değerli hayvanların genetik potansiyelinin korunmasında yararlı bir araçtır. Epididimislerden toplanan sperma seminal plazmayla temas etmemelerinden kaynaklı olarak daha hassas bir plazma membranına sahiplerdir ve elektroejakülasyon ile alınan spermaya kıyasla dondurma-çözdürmeye karşı hassastırlar. Equex STM macununun kedilerde epididimal spermatozoa akrozomları üzerinde koruyucu olduğu kaydedilmiştir (Axner, Hermansson & Linde-Forsberg, 2004).

Kedilerde Tris-%20 yumurta sarısı-%4 gliserol sulandırıcısını kullanarak 3.85°C/dk. dondurma hızında yüksek motilite ve morfoloji elde edildiği bildirilmektedir (Zambelli & ark.,

2002). Epididimal kedi spermasının dondurulmasında sulandırıcıya antioksidan taurin (25 veya 50 mM) ilavesinin motiliteyi arttırdığı kaydedilmektedir (Luvoni & ark., 2002). Kedi epididimislerinden elde edilen spermanın dondurulmasında gliserole alıştırma süresinin sperma kalitesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar çelişkilidir. Tris sulandırıcısı ile sulandırılan sperma 4 °C'de 1 saat buzdolabında bekletildikten sonra, %5 gliserol ilavesi yapılarak 5 ve 10 dakikalık sürelerde inkübe edildikten sonra dondurulmuş, çözündürme (37 °C'de 30 sn.) sonrası 5 dakika inkübasyon yapılan grupta epididimal sperm kalitesinin daha iyi korunduğu bildirilmiştir (Barbosa & ark., 2020). Ancak Ganan & ark. (2009) epididimislerden elde edilen spermanın dondurma sırasında motilite ve akrozom bütünlüğünün korunması açısından uzun süreli (120 dakika) ekulibrasyonun, kısa süreli (30 dakika) ekulibrasyona göre önemli ölçüde daha iyi olduğunu belirtmektedirler.

Dondurularak uzun süre saklanan 0.5 mL'lik payetler 40 °C'de 10 sn, 0.25 mL'lik payetler ise 37-38 °C'deki su banyosunda farklı sürelerde çözündürülür. Payetler azot tankından alındıktan sonra hemen ya da 10 sn havada bekletildikten sonra 37-38 °C'deki su banyosunda 10, 15, 20 ya da daha yaygın olarak 30 sn çözündürülür. Ayrıca, 0.25 mL'lik payetler, 42 °C de 15 sn, 46 °C de 12 sn, 65 °C de 5 sn ve 6 saniye boyunca 70 °C de 6 sn sürelerde de çözülebilir. Dondurma-çözündürme işleminden sonra kedi spermasında motilitenin %5-40 aralığında olduğu bildirilmektedir (Buranaamnuay, 2017).

7. Kedilerde suni tohumlama

Kedilerde suni tohumlamanın başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesi için dişi genital sistemine ilişkin temel bilgileri bilmek gereklidir. Kedilerde ilk başarılı suni tohumlama çalışmaları Sojka & ark. tarafından 1970 yılında yapılmıştır. Tohumlama vajinaya ya da doğrudan uterusu yapılabilir. Her iki durumda da genel anestezi veya sedasyon gerekir. Tohumlama sonrasında hayvanlar sırt üstü yatar pozisyonda 20 dakika kadar bekletilmelidir. İntrauterin suni tohumlama kolay olmasına rağmen, invaziv ve etik dışı kabul edilir ve birçok ülkede yasaklanmıştır (Tsutsui & ark.,

2000). Alternatif olarak, transservikal kateter ve spekulum kullanılarak suni tohumlama yapılabilir. Zambelli & Cunto (2005) transrektal dijital manipölasyonun yardımıyla transservikal intrauterin suni tohumlamayı başarılı şekilde kullanmışlardır. Genel olarak, taze sperma kullanılarak yapılan suni tohumlama uygulaması sonrası kabul edilebilir gebelik sonuçları alınmış iken, dondurulmuş sperma kullanılarak yapılan suni tohumlama uygulamasının sonuçları hala tatmin edici değildir. Kedilerde tohumlama dozu intrauterin tohumlamada, intravajinal tohumlamaya kıyasla daha düşüktür. Bu nedenle, dondurularak saklanan sperma için intrauterin suni tohumlama önerilmektedir (Rijsslaere & Van Soom, 2012).

Kedilerde suni tohumlama ile ilgili ilk yayınlar yetmişli yıllara ait olmakla birlikte, suni tohumlama hala evcil kedilerde rutin bir prosedür değildir. Ancak kediler, nesli tükenmekte olan yabani kedigiller için bir model olduğundan bu alanda yapılan çalışmalar ilgi görmektedir (Luvoni & ark., 2003). Kedilerde suni tohumlama ile hayvanlar arasındaki saldırganlık sorunları, dişi ve erkek kedi arasındaki davranışsal uyumsuzluğun ve/veya erkek veya dişi fiziksel engellerin çözülmesine yardımcı olabilir. Nadir ırklarda değerli damızlık hayvan sayısının az olması ve ülkeler arasındaki sperma taşınmasını kolaylaştırmak ve genetik çeşitliliği artırmak amacıyla suni tohumlama tercih edilmektedir. Ayrıca reproduktif hastalıkların yayılmasının önlenmesinde de gereklidir (Luvoni & ark., 2003). Suni tohumlama intravajinal veya intrauterin olarak taze, soğutulmuş veya dondurulmuş sperma kullanılarak gerçekleştirilebilir, aynı zamanda *in vitro* fertilizasyon teknikleri de kullanılabilir.

8. Taze ve dondurulmuş çözdürülmüş sperma ile suni tohumlama uygulaması

Kedilerde sperma alındıktan sonra %0.9 NaCl ile sulandırma ve 0.1 ml hacminde 5-50 milyon arasında değişen spermatozoa dozlarında yapılan suni tohumlama ve hCG ile ovulasyonların uyarılması durumunda % 50 oranında gebelik elde edilebileceği kaydedilmektedir. Kaya & Daşkın, (1997) kedilerde tohumlama

dozunda 50-100 milyon spermatozoon bulunan dondurulmuş sperma ve ovulasyonların uyarılması ile birlikte yaptıkları suni tohumlamalarda %11 oranında gebelik elde etmişlerdir.

Vajinal tohumlama

Bu yöntem, dişi kediye tohumlamanın en kolay yoludur. Sedasyon isteğe bağlıdır. Sperma, steril bir üretral kateter kullanılarak vajinanın kaudaline bırakılır, ardından dişi kedi arka bacakları yukarıda olacak şekilde 10 dakika boyunca tutulur. Bu yöntemde taze sperma kullanılmalıdır.

İntrauterin tohumlama

Spermanın doğrudan uterusu bırakılması işleminde genel anestezi uygulanır ve laparoskopi veya laparotomi gibi cerrahi bir prosedür gerekir. Dondurulan sperma ile yapılan intrauterin tohumlamalarda fertilité sonuçları yüksek ve tohumlama dozunun düşük olması avantajdır. İntravajinal tohumlama için en az 80×10^6 spermatozoa gerekirken intrauterin tohumlama için 8×10^6 spermatozoanın yeterli olduğu bildirilmektedir (Buff & ark., 2001). Son zamanlarda kedilerde transservikal kateterizasyon tekniği de uygulanmaktadır (Tsutsui & ark., 2000).

9. Ovulasyonun indüksiyonu ve tohumlamanın zamanlaması

Kedi spermatozoasının 26-29 saat boyunca fertil olabileceği gösterilmiştir. Ovulasyondan 49 saat sonra gerçekleştirilen ve gebelikle sonuçlanan bazı suni tohumlama uygulamaları, oositlerin en az 15 saatlik bir yaşam ömrüne sahip olabileceğini düşündürmektedir. Soğutulmuş veya dondurulmuş spermanın yaşam ömrü daha azdır, bu nedenle tohumlamanın doğru zamanda yapılmasına ihtiyaç vardır. Literatürde suni tohumlama işleminin ovulasyonun uyarılmasından hemen sonra veya takip eden 24 saat içerisinde yapılması gerektiği kaydedilmektedir. hCG uygulamasından 30-50 saat sonra suni tohumlama önerilmektedir. Kedilerde vajinal smear ve ultrason kullanılarak tohumlama zamanı belirlenebilmektedir (Verstegen-Onclin, Karine & Verstegen, 2006). Suni tohumlama uygulaması sonrasında kedilerde hormonlar

kullanılarak ovulasyon sağlanmalıdır (Wolfgang, 1991; Donoghue, Johnston & Goodrowe, 1993). GnRH, östrüsün ilk 2 gününde (25 µg İ.M.) verilebilir (Olson & ark., 1992; Platz, Wildt & Seager, 1978). hCG hormonu, östrüsün 1. ve 2. günlerinden sonra (250-500 IU.İ.M.) veya 3. gününde 250 IU ve 2 gün sonra tekrarlandığında uygulamadan sonraki 25-29 saat içerisinde ovulasyon şekillenmektedir. Uygulama sonrasında ovulasyon kontrolü amacıyla progesteron seviyesine bakılabilir. Çiftleşmeden sonraki 2. gün veya daha sonraki günlerde yapılan plazma progesteron seviyesinin en az 10 nmol/l olması ovulasyonu teyit etmektedir (Arthur, Noakes & Pearson, 1983; Uslu & Gülyüz, 2012).

Kaynaklar

Alvarenga, M.A., Papa, F.O., Landim-Alvarenga, F.C., & Medeiros, A.S.L. (2005). Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Animal Reproduction Science*, 89 (1-4), 105-113.

Arthur, H.G., Noakes, D.E., Pearson, H. (1983). Veterinary Reproduction and Obstetrics. 6 ed. Baillière th Tindall (s.30, 512, 414). London.

Axnér, E., Hermansson, U., Linde-Forsberg, C. (2004). The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 84, 179-191.

Baran, A., Bacinoğlu, S., Evecen, M., Şahin, B.E, Alkan, S., Demir, K., Ak, K., İleri, İ.K. (2004): Freezing of cat semen in straws with different glycerol levels containing tris extender, *Turkish J Vet Anim Sci*, 28, 545-552.

Baran, A., Demir, K., Şahin, B., Evecen, M., Bacinoglu, S., Alkan, S., İleri, I.K. (2009). Short-Term Chilled Storage of Cat Semen Extended with and Without Taurine Containing Milk Extenders. *Journal of Animal And Veterinary Advances*, 8 (7), 1367-1371.

Baran, A., Tek, C., Demir, K., Sabuncu, A., Ozdas, O.B. (2011). Intrauterine insemination with cat semen frozen with various extenders. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 35, 311-318.

Barbosa, B.D.S., Silva, H.V.R., da Silva, T.F.P., & da Silva, LD. M. (2020). Influence of glycerol addition on the quality of cat epididymal sperm during the freeze-thaw process. 1237-1246.

Buff, S., Donze, A., Guerin, P., Guillaud, J., Fontbonne, A., Menezo, Y. (2001). Taurine and hypotaurine in spermatozoa and epididymal fluid of cats. *J Reprod Fertil Suppl.* 57, 93-95.

Buranaamnuay, K. (2017). Protocols for sperm cryopreservation in the domestic cat: a review. *Animal Reproduction Science*, 183, 56-65.

Chatdarong, K., Thuwanut, P., Suksamai, P., Patanatiradaj, S., Sangwornrachasup, A. (2009). Survival of frozen-thawed cat spermatozoa pre-cooled in the epididymides. *Reprod. Domest. Anim.* 44 (2), 377-380.

Cocchia, N, Ciani, F., El-Rass, R., Russo, M., Borzacchiello, G., Esposito, V., Lorizio, R. (2010). Cryopreservation of feline epididymal spermatozoa from dead and alive animals and its use in assisted reproduction. *Zygote*, 18(1), 1-8.

Donoghue, A.M., Johnston, L.A., Goodrowe, K.L. (1993). Influence of Day of Oestrus on Egg Viability and Comparative Efficiency of in Vitro Fertilization in Domestic Cats in Natura Lor Gonadotrophin-induced Oestrus. *J Reprod Fertil*, 98, 85-90.

Ganan, N., Gomendio, M., & Roldan, E.R.S. (2009). Effect of storage of domestic cat (*Felis catus*) epididymides at 5 C on sperm quality and cryopreservation. *Theriogenology*, 72(9), 1268-1277.

Glover, T.E., Watson, P.F. (1987) The effects of egg yolk, the low density lipoprotein fraction of egg yolk, and three mono-

saccharides on the survival of cat (*Felis catus*) spermatozoa stored at 5°C. *Animal Reproduction Science* 13, 229-237.

Harris, R.F., Pope, C.E., Gomez, M.C., Leibo, S.P., Dresser, B.L. (2001) Storage of domestic cat spermatozoa for extended periods at 4°C. *Theriogenology* 55, 308.

Jiménez, E., Pérez-Marín, C.C., Vizuite, G., Millán, Y., Agüera, E.I. (2013). Effect of different extenders on in vitro characteristics of feline epididymal sperm during cryopreservation. *Reprod Domest Anim.* 48(2), 665-672.

Johnston, S.D., Osborne, C.A., Lipowitz, A.J. (1988). Characterization of seminal plasma, prostatic fluid and bulbourethral gland secretions in the domestic cat. *Proceedings of the 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, (4), 560.

Kaya, M., & Daşkın, A. (1997). Reproduction of the domestic cat and bitechnology. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 37 (2), 109-120.

Lengwinat, T., & Blottner, S. (1994). In vitro fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 35 (3-4), 291-301.

Lima, D.B.C., Silva, T.F.P., Aquino-Cortez, A., Pinto, J.N, Magalhães F.F., Caldini, B.N., Silva, L.D.M. (2016). Recovery of sperm after epididymal refrigeration from domestic cats using ACP-117c and Tris extenders. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 68 (4), 873-881.

Luvoni, G.C. (2006). Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology* 66 (2006) 101-111.

Luvoni, G.C., Ruggiero, C., Marinoni, G., Kalchschmidt, E. (2002). Effect of taurine-containing diluent for cryopreservation of domestic cat epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 57, 466.

Luvoni, G.C., Kalchschmidt, E., Leoni, S., & Ruggiero, C. (2003). Conservation of feline semen: Part I: Cooling and freezing protocols. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 5 (4), 203-208.

Madrigal-Valverde, M., Bittencourt, R.F., de Lisboa Ribeiro Filho, A., Araujo, G.R., Lents, M.P., Santos, E. S. & Mattos, P. (2020). Can amides be alternative cryoprotectors for the preservation of feline semen? *Cryobiology*, 97, 138-143.

Manee-in, S., Parmornsupornvichit, S., Kraiprayoon, S., Tharasanit, T., Chanapiwat, P. & Kaeoket, K. (2014). L-carnitine supplemented extender improves cryopreserved-thawed cat epididymal sperm motility. *Asian Aust. J. Anim. Sci.* 27, 791-796.

Martins, M.I.M., Silva, V.W., Hidalgo, M.M.T., & Fontbonne, A. (2024). Insights into alternative cryoprotectants to freeze sperm of domestic cats. *Reproduction in Domestic Animals*, 59 (1), 14524.

Medeiros, C.M.O., Forell, F., Oliveira, A.T.D., Rodrigues, J.L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't better? *Theriogenology* 57, 327-344.

Mizutani, T., Sumigama, S., Nagakubo, K., Shimizu, N., Oba, H., Hori, T., & Tsutsui, T. (2010). Usefulness of addition of Orvus ES paste and sodium lauryl sulfate to frozen feline semen. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72 (1), 23-27.

Nelson, K.L., Chrichton, E.G., Doty, L., Volenec, D.E., Morato, R.G., Pope, C.E., Dresser, B.L., Brown, C.S., Armstrong, D.L. & Loskutoff, N.M. (1999). Heterologous and homologous capacity of cryopreserved felid sperm: A model for endangered species. *Theriogenology*, 51, 290.

Olson, P.N., Johnnton, S.D., Root, M.V., Hegstad, R.L. (1992). Terminating Pregnancy in Dog and Cats. *Anim Reprod Sci*, 28, 399-406.

Platz, C.C., Wildt, D.E., Seager, S.W.J. (1978). Pregnancy in The Domestic Cat After Artificial Insemination With Previously Frozen Spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 52, 279-282.

Ponglowhapan, S., Essen-Gustavsson, B., Linde Forsberg, C. (2004). Influence of glucose and fructose in the extender during long- term storage of chilled canine semen. *Theriogenology* 62, 1498-1517.

Pukazhenth, B., Noiles, E., Pelican, K., Donoghue, A., Wildt, D., Howard, J.G. (2000). Osmotic effects on feline spermatozoa from normospermic versus teratospermic donors. *Cryobiology* 40, 139-150.

Rijsselaere, T., & Van Soom, A. (2012). Semen collection, assessment and artificial insemination in the cat. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 79 (6), 467-470.

Rota, A., Ström, B., Linde-Forsberg, C., Rodriguez-Martinez, H. (1997). Effects of STM paste on viability of frozen thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38 C. *Theriogenology*, 47, 1093-1101.

Siemieniuch, M. & Dubiel, A. (2007). Preservation of tomcat (*Felis catus*) semen in variable temperatures. *Animal Reproduction Science*, 99,135-144.

Sojka, N.J., Jemings, L.L., Hamner, C.E. (1970). Artificial insemination in the cat (*Felis catus*). *Laboratory Animal Care*. 20, 198-204.

Souza, A.K., Trautwein, L.G.C., Paranzini, C.S., Schnitzer, J.F., Perencin, F.M., Cardoso, G.S., & Martins, M.I.M. (2020). Effect of refrigeration at -1°C on spermatozoa quality of domestic cats. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 40, 306-314.

Tebet, J.M., Martins, M.I., Chirinea, V.H., Souza, F.F., Campagnol, D., Lopes, M.D. (2006). Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology*, 66 (6-7), 1629-1632.

Thuwanut, P., Chatdarong, K., Techakumphu, M. & Axner, E. (2008). The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. *Theriogenology* 70, 233-240.

Toyonaga, M., Sato, Y., Morita, M., Watanabe, M., Oba, H., Mizutani, T., Hori, T. & Tsutsiu, T. (2010). The qualities of cryopreserved epididymal sperm collected from feline epididymides stored at low temperature. *J Vet Med Sci* 72, 777-780.

Tsutsui, T., Tanaka, A., Takagi, Y., Nakagawa, K., Fujimoto, Y., Murai, M., Anzai, M. & Hori, T. (2000). Unilateral intrauterine horn insemination of fresh semen in cats. *J Vet Med Sci.*, 62 (12), 1241-1245.

Tsutsui, T. (2006). Artificial insemination in domestic cats (Felis catus). *Theriogenology*, 66 (1), 122-125.

Tsutsui, T., Tezuka, T., Mikasa, Y., Sugisawa, H., Kiriwara, N., Hori, T., & Kawakami, E. (2003). Artificial insemination with canine semen stored at a low temperature. *Journal of veterinary medical science*, 65 (3), 307-312.

Uslu, B.A. & Gülyüz, F. (2012). Evcil Kedilerde Sun'i Tohumlama. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 23 (2), 119-123.

Verstegen-Onclin, Karine M., Verstegen John P. (2006). Semen collection and artificial insemination in the cat. cabidigitallibrary.org, 1279-1281.

Vick, M.M., Bateman, H.L., Lambo, C.A. & Swanson, W.F. (2012). Improved cryopreservation of domestic cat sperm in a chemically defined medium. *Theriogenology* 78, 2120-2128.

Vizuite, G., Jimenez, E., Agüera, E.I. & Perez-Marin, C.C. (2014). Impact of ultra-rapid freezing on the motility, morphology, viability and acrosome integrity of epididymal cat sperm diluted in sucrose-based extenders. *Reprod. Dom. Anim.* 49, 5-8.

Wolfgang, J. (1991). Pet Population Control in Europe. *JAVMA*, 198 (7), 1225-1230.

Yavaş, İ. (2018). Kedi Spermasının Saklanması. *Türkiye Klinikleri Reproduction and Artificial Insemination-Special Topics*, 4 (2), 32-39.

Zambelli, D. & Cunto, M. (2005). Transcervical artificial insemination in the cat. *Theriogenology* 64, 698-705.

Zambelli, D., Caneppele, B., Castagnetti, C. & Belluzzi, S. (2002). Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. *Reproduction in Domestic Animals* 37, 310-313.

Zambelli, D., Prati, F., Cunto, M., Iacono, E. & Merlo, B. (2008). Quality and *in vitro* fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. *Theriogenology* 69 (4), 485-490.

Zambelli, D., Raccagni, R., Cunto, M., Andreania, G. & Isania, G. (2010). Sperm evaluation and biochemical characterization of cat seminal plasma collected by electroejaculation and urethral catheterization. *Theriogenology* 74, 1396-1402.

