

**Mustafa SÖNMEZ**<sup>1,a</sup>  
**Fatma FIRAT**<sup>1,b</sup><sup>1</sup> Fırat Üniversitesi,  
Veteriner Fakültesi,  
Dölerme ve Suni  
Tohumlama Anabilim Dalı,  
Elazığ, TÜRKİYE<sup>a</sup> ORCID: 0000-0003-0281-7228<sup>b</sup> ORCID: 0000-0002-0165-7958

## Bilgisayar Destekli Sperma Analiz (CASA) Sistemiyle Yapılan İncelemelerde Spermatozoonların Motilitesini ve Kinematik Değerlerini Etkileyen Faktörler

Spermatozoon motilitesi, spermatozoonların döllenme yeteneği ile ilişkili en önemli özelliklerden birisi olup canlılıklarının ve yapısal bütünlüğünün bir ifadesidir. Bilgisayar Destekli Sperma Analiz (CASA) sistemleri, farklı türlerde spermatozoon motilitesinin ve kinematik özelliklerin belirlenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. CASA sistemleri, bu parametreleri değerlendirmek için daha objektif bir yol sağlasa da, bu ölçümleri önemli sayıda faktör etkileyebilir. Bu faktörler belli başlıklar altında sınıflandırılabilir. Bunlar arasında; (1) farklı CASA sistemlerinin varlığı, (2) slayt tipi gibi kullanılan ekipmanlardaki farklılıklar, (3) sperma sulandırıcısı seçimi ve seyreltme oranındaki farklılıklar, (4) ortamın sıcaklığı ve muayene sırasında inkübasyon süresi, (5) muayene sırasında görüntüleme alanlarının seçimi ve sayısı gibi bireysel değerlendirme farklılıkları, (6) sistem ayarlarında kare hızı gibi farklı seçeneklerin olması sayılabilir. Bu farklılıkların etkisini azaltmak için, CASA analizlerinden önce sperma örneklerinin hazırlanmasında belirli prosedürler oluşturulmalıdır. Ayrıca elde edilen değerlerin kullanımı ve güvenilirliği için kullanılan sistemik ayarların standardize edilmesi gerekmektedir. Bunlara ilaveten, muayeneler sırasında kullanılan ortam koşulları, kullanılan ekipmanların özellikleri ve sistemin tercih edilen ayarları sonuç raporunda detaylı olarak sunulmalıdır. Öte yandan, spermatozoonun motilite yeteneği ve kinematik parametrelerinin daha etkin değerlendirilmesi ve fertilizasyon ile ilişkisinin ortaya konması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu görülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** CASA, spermatozoon, motilite, kinematik parametreler

### The Factors Affecting Motility and Kinematic Values of Spermatozoa in Examinations by Computer Aided Semen Analysis (CASA) System

Spermatozoon motility is one of the most important characteristics associated with the fertilization ability of spermatozoa and is an expression of their viability and structural integrity. Computer-Assisted Semen Analysis (CASA) systems are commonly used for the determination of spermatozoon motility and the kinematic traits in different species. Although CASA systems provides a more objective way to evaluate them, a significant number of factors can affect these parameters. These factors can be classified under certain headlines. These include; (1) the existence of different CASA systems, (2) variations in used equipment's such as the type of slide, (3) the selection of the semen extender and differences in the dilution rate, (4) the temperature of the environment and the incubation time during examination, (5) individual evaluation differences such as selection and number of imaging areas during examination, (6) having different options such as frame rate in systemic settings. The certain procedures should be established in the preparation of semen samples before the CASA analyzes to reduce the impact of these differences. Moreover, the systemic settings used should be standardized in order to use and reliability of the obtained values. In addition, the environmental conditions in the evaluation, the features of used equipment's and preferred settings of the system must be presented in detail in final report. On the other hand, it is seen that more research is needed to evaluate the motility ability and kinematic parameters of spermatozoa more effectively and to reveal their relationship with fertilization.

**Key Words:** CASA, spermatozoon, motility, kinematic parameters

**Geliş Tarihi** : 09.03.2022  
**Kabul Tarihi** : 10.05.2022

#### Yazışma Adresi Correspondence

**Mustafa SÖNMEZ**  
Fırat Üniversitesi,  
Veteriner Fakültesi,  
Dölerme ve Suni  
Tohumlama Anabilim Dalı  
Elazığ – TÜRKİYE**msonmez@firat.edu.tr**

#### Giriş

Günümüzde, özellikle sığır yetiştiriciliğinde yürütülen hayvan ıslahı programları sayesinde suni tohumlama, saha şartlarında vazgeçilmez bir uygulama alanı bulmuştur. Bununla birlikte, böylesine geniş bir organizasyonda kullanılacak dondurulmuş spermanın çözündürme sonrası kalitesinin mutlaka belirli yöntemlerle tespit edilmesi gerekir (1). Dondurulmuş spermanın çözündürme sonrası kalitesinin belirlenmesinde; sperm motilitesi, morfolojisi, canlılığı, membran ve akrozom bütünlüğü gibi çeşitli parametreler kullanılmaktadır. Bunlar arasında en yaygın olarak kullanılan yöntem ise motilite tayinidir (2).

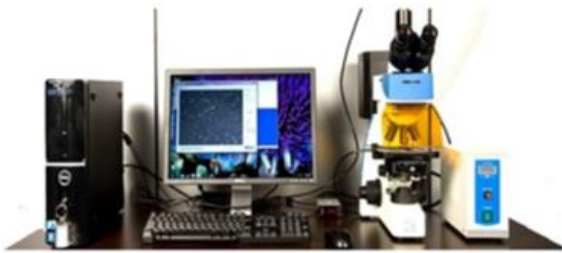
Motilite; kısaca hareketlilik veya hareket etme gücü anlamına gelen bir terim olmakla birlikte, spermanın motilitesi denildiğinde; sperma içerisindeki spermatozoonların hareketlilik oranı ifade edilmektedir. Yapılan spermatozoon incelemler sonucu spermanın motilitesi temelde iki farklı şekilde tanımlanır. Bunlardan ilki; tüm spermatozoonların içinde hareketli olan spermatozoonların oranı olup bu değer, total motilite olarak adlandırılırken, diğer bir tanımda ise tüm

spermatozoonların içinde herhangi bir yönde doğrusal ve hızlı hareket eden spermatozoonların oranı belirlenerek progresif motilite şeklinde ifade edilir.

Spermatozoonun herhangi bir yönde hızlı ve düz ileri doğru hareket etme yeteneği, spermatozoonun dişı üreme kanalındaki hareketi için gerekli olup aynı zamanda fertilitte yeteneği hakkında da bir ön bilgi sunar (3). Bunun yanında, kriyoprezervasyon işleminin neden olduğu sperm hasarının derecesini belirlemek için tercih edilen en önemli parametrelerden birisidir. Bu açıdan, spermada motilite tayini yapılırken, total motiliteye kıyasla özellikle progresif motilitenin de doğru bir şekilde belirlenmesi oldukça önemlidir.

Dondurulmuş spermalarda çözdüme sonrası istenen progresif motilite oranlarının belirlenmesinde karşılaşılan temel problemlerden birisi, spermanın özellikle progresif motilitesini belirleyen kişilerin ortaya koydukları subjektif (tahmine dayalı) sonuçlar arasındaki değişkenliklerdir. Subjektif olarak motilite muayenesi yapılırken bir ışık mikroskobu altında çeşitli alanlarda spermatozoonların hareketleri gözlenerek, genel popülasyonun ilerleyici hareketler özellikleri değerlendirilmekte ve sonuçlar tahmini olarak verilmektedir. Bu yöntem hızlı ve ucuz olmasına rağmen, sonuçların doğruluğu kişisel tahminlere dayandığı için belirli ölçüde farklılıklar gösterebilmektedir. Bu durum, muayeneyi yapan kişinin tecrübeli ve bu konuda yeterli bilgi birikimine sahip olmasını gerektirir. Tek bir laboratuvar da eğitilmiş tecrübeli kişilerin progresif motilite tayininde birbirleri arasında tutarlı sonuçlar verebildikleri görülmekle birlikte, aynı numunenin değişik laboratuvarlar tarafından değerlendirilmesi sonucunda, belirlenen değerler arasında önemli farklılıklar gözlenebilmektedir (4, 5).

Saha şartlarında suni tohumlama yapan bir veteriner hekim, kullandığı dondurulmuş boğa spermasının çözdüme sonrası yeterli kalite standartlarını taşımasını istemektedir. Bununla birlikte, progresif motilite değerleri açısından, dondurma işleminin gerçekleştirildiği laboratuvar sonuçları ile gerektiğinde suni tohumlama öncesi yapılan sperma muayene sonuçlarının mutlaka uyumluluk göstermesi arzu edilir. Ancak bu konuda tahmini bireysel değerlendirmelerin farklı sonuçlar oluşturması, birtakım önemli sorunlara yol açabilmektedir. Bu gibi durumlar son yıllarda yaygınlaşmaya başlayan Bilgisayar Destekli Sperma Analiz (CASA) sistemlerinin önemini daha da artırmaktadır (Şekil 1) (2, 6).



**Şekil 1.** Gelişmiş bir CASA sistemi (Proiser ISAS-V1) ve ekipmanları

## 1. Bilgisayar Destekli Sperma Analiz (CASA) Sistemi

Bilgisayar bağlantılı olarak tam veya yarı-otomatik olarak çalışan sperma analiz sistemlerinin tümüne birden Bilgisayar Destekli Sperma Analiz (CASA) adı verilmektedir. Bu sistemler; başta sperma örneklerindeki motilite özellikleri ve spermatozoon yoğunluğu olmak üzere, gelişmişlik düzeylerine göre spermatozoon morfolojisi ve DNA fragmentasyonu gibi birtakım özellikleri doğru ve etkin bir şekilde tespit edebilirler (2, 7).

CASA sistemleri; bilgisayardaki özel bir program sayesinde, özellikle spermatozoonların motilitesini ve bazı özel hareket özelliklerini çok hassas bir şekilde belirleyip bu çeşitliliğin değerlendirilerek sayısal bir şekilde sunulmasına imkân sağlar. Bunun yanında, CASA sistemlerinin bilgisayardaki özel bir program yardımıyla kinematik parametreler adı verilen birtakım özel hız değerlerini belirlemesi ve spermatozoonların motilitesini alt popülasyonlara ayırması sayesinde, spermatozoonların in vitro ve in vivo fertilizasyon yetenekleri hakkında da çeşitli değerlendirmelerin yapılabilmesine imkân sunar. Bununla birlikte, cihazın pahalı olmasının yanı sıra, farklı ülkelerde farklı şirketler tarafından geliştirilen CASA sistemlerinde ortak bir standardizasyonunun henüz oluşturulamaması ve her bir sistemin farklı bir yazılım programı ve buna bağlı olarak da farklı algoritma hesaplamaları içerebilmesi, elde edilen sonuçların bir örnekliliği açısından bir dezavantaj oluşturmaktadır (2, 8).

## 2. Casa Sistemlerinin Temel Ekipmanları

CASA sistemi; genellikle bir video kamera sistemi taşıyan faz kontrast bir mikroskop, bir video çerçevesi yakalama kartı ve sistem için özel bir yazılımla hazırlanmış programın yüklü olduğu bir bilgisayar sisteminden oluşur (7). Dünya geneline baktığımızda; uluslararası piyasada satışı olan birçok CASA sistemi (Hamilton-Thorne, Microptic Proiser, Minitube, IMV gibi) bulunmakta olup bunların birçoğu sperma üretim merkezleri ve gelişmiş bilimsel analiz laboratuvarları tarafından kullanılmaktadır (6, 8).

Her CASA sisteminin dahili veya harici bir mikroskobu ile mikroskopik görüntüleri izlemek ve kayıt altına alabilmek için genellikle bilgisayar sistemi ile bağlantılı olan ve mikroskop üzerine entegre edilmiş bir video kamera sistemi bulunmaktadır. Bu sistemlerin bağlı olduğu bilgisayara, gerekli muayenelerin yapılabilmesi amacıyla geliştirilmiş özel bir yazılım sistemi yüklenmiştir. Spermatozoonların hareket özelliklerini belirlenirken, bilgisayar yazılım sistemi; mikroskopik görüntüleme aracılığı ile video görüntülerinin alınması, bu görüntülerde spermatozoonların belirlenerek takip edilmesi ve bu görüntülerden elde edilecek tüm verilerin hesaplamalarını yapmak için kullanılmaktadır. Bu sistemler, farklı şirketler tarafından geliştirilmiş olsa da, hareket özelliklerinin belirlenmesinde temelde benzer algoritma prensibine dayalı yazılım programları kullanılmaktadır (9).

Buna ilaveten, yapılan muayeneler sırasında, sperma örneklerinin mikroskop altında incelenebilmesi amacıyla özel olarak üretilmiş lamalar kullanılır. Bu amaçla, farklı firmaların ürettiği tekrarlı kullanılabilen (SpermTrack, Makler gibi) veya tek kullanımlık (Leja, ISAS-D4C gibi) özelliğe sahip çeşitli özel lamalar bulunmaktadır (6). Diğer taraftan CASA sistemleri ile yapılan muayenelerde, hazırlanan sperma örneklerindeki motilite ve kinematik özelliklerinin doğru olarak belirlenmesi için, sıcaklık değerinin stabil tutulması oldukça önemlidir. Bu amaçla, muayene öncesinde örneklerin sulandırılması ve bekletilmesi ile muayene işlemleri sırasında sıcaklık derecelerinin korunması amacıyla özel ısıtma üniteleri kullanılır. Yapılan muayeneler sırasında incelenen değerlerin etkilenmemesi için kullanılan özel lamaların sıcaklığının sabit tutulması da oldukça önemlidir. Bunun sağlanması amacıyla da genellikle mikroskoba entegre edilmiş özel ısıtma tablaları vardır (7).

### 3. Casa Sistemi İle Spermatozoonların Hareket Özelliklerinin Belirlenmesi

CASA sistemi ile spermatozoonların hareketlilik oranları ve kinematik parametreleri belirleneceği zaman, bilgisayardaki CASA sistemine ait özel program çalıştırılarak motilite modülüne girilir. Modül içerisinde öncelikle sperma örneğine ait tür seçimi yapılır. Bu seçim, gelişmiş CASA sistemlerinde hız ölçütleri, sperm baş büyüklüğü gibi türlere göre değişiklik gösterebilen bazı özel ayarların otomatik olarak kurulmasını sağlayacaktır. CASA sistemi bu özelliğe sahip değilse, bu ayarların mutlaka manuel olarak girilmesi gerekir. Bunun yanında, optik görüntü büyüklüğü ve şekli ile kullanılan özel lamın çeşidi gibi bir takım özel ayarların, yine sistem üzerinden seçilmesi gerekir. Ayrıca setup kısmından, saniyede alınacak görüntü sayısı ve toplam görüntü kayıt süresi ile ilgili tercihlerin de yapılması gereklidir.

CASA sistemi ile herhangi bir taze, sulandırılmış veya dondurulup çözdürülmüş spermanın motilite ve kinematik parametreler yönünden gerekli muayeneleri yapılacağı zaman, öncelikle sperma örneği hesaplanan değerlere göre sulandırılıp bir ependorf tüpü içerisinde, sıcaklığı 38°C'ye ayarlanmış özel ısıtma plakasının kuyucuklarından birine konularak muhafaza edilir. CASA sisteminde gerekli ayarlar yapıldıktan sonra, belirli bir oranda sulandırılmış (yaklaşık 20–40 milyon spermatozoon/ml olacak şekilde) spermadan otomatik pipet yardımıyla belirli bir miktar (ortalama 4-7 µl) alınır. Alınan sperma örneği, muayene için ısıtma plakası üzerinde bulunan özel lamın belirlenmiş özel bölmesine aktarıldıktan sonra özel lameli kapatılıp mikroskobun ısıtma tablası üzerindeki görüntüleme alanına yerleştirilir.

Spermatozoonların hareketli görüntüsü mikroskopta tespit edildikten sonra, video kamera aracılığı ile bilgisayardaki yazılım programının ilgili alanında görüntülenir. Bu esnada CASA sisteminin özel yazılım programı aracılığıyla, karanlık bir arka plan üzerinde beyaz spermatozoon başlarının oluşturduğu negatif-yüksek fazlı kontrast görüntü sayesinde,

spermatozoonların baş kısmı algılanır. Algılanan her parlak görüntünün kapladığı alan, piksel büyüklüğüne göre değerlendirilerek, bunun bir spermatozoon olup olmadığı bilgisayar yazılımı tarafından tespit edilir (8,10).

Belirli bir görüntü kalitesi sağlandıktan sonra programın kayıt özelliği çalıştırılarak mikroskoptaki hareketli görüntü belirlenen bir süre boyunca kaydedilir. Yazılım programındaki ilk görüntüden itibaren tüm spermatozoon başları tanımlanıp bilgisayar verisi olarak kaydedildikten sonra bir sonraki alan veya çerçeve analiz edilir. Analiz programı, takip eden her görüntüde, spermatozoon başının etrafındaki belirli bir yarıçapa sahip bir olasılık bölgesi içinde, spermatozoon başının ardışık görüntüsünü arar ve bu sayede belirlenip sayısallaştırılan spermatozoon başı görüntüleri bilgisayar tarafından takip edilir. Bu şekilde, spermatozoon başının sıralı görüntüleri bulunduktan sonra x ve y koordinatları içinde belirli bir zaman periyodu içerisinde hareket yörüngesi oluşturularak elde edilen sayısal bilgiler ışığında bir dizi kinematik değer hesaplanır (2). Bu şekilde belirlenen sayıda alan incelenip ortalama değerler elde edilerek muayene tamamlanır. En son elde edilen değerler sistemik olarak kaydedilirken, özel program sayesinde bir rapor olarak da sunulur.

### 4. Casa Sistemlerinde Spermatozoon Hareketliliği ile İlgili Temel Parametreler

Günümüzde, spermatozoonların hareketlilik oranlarının tespit edilmesi ve hareket etme özelliklerinin sınıflandırılması; insan ya da hayvanlardan alınan bir spermanın kalitesinin belirlenmesinde ve özellikle spermanın dondurulup çözdürülmesi sonrasında meydana gelebilen birtakım hasarların derecesinin ortaya konulmasında ilk tercih edilen parametre olmaya devam etmektedir. Bu sebeple, geliştirilmiş bir CASA sistemi sayesinde, incelenen sperma örneklerindeki spermatozoonların hareketliliği ve bu hareket ile ilgili belirlenen bazı parametrelerin objektif olarak belirlenebilmesi oldukça önemlidir (2).

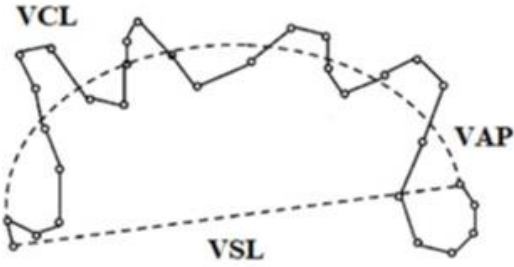
CASA sistemleri ile spermatozoonların hareket yetenekleriyle ilgili belirlenen başlıca önemli parametreler arasında; spermatozoonların hareket etme hızları ve bu esnada oluşturdukları ilerleme yörüngesine bağlı olarak belirlenen çeşitli kinematik değerler ile oransal olarak belirlenen total ve progresif motilite değerleri sayılabilir (11).

#### 4.1. Kinematik Parametreler

Kinematik terimi, "hareketin zamanla değişen geometrik yönleri" şeklinde ifade edilmekte olup spermatozoonların hız ölçütlerini ve hareket modellerini ayırt etmek için kullanılır. Gelişmiş CASA sistemlerinde, hareketli spermatozoonların oranının belirlenmesinin yanında, spermatozoonun hem kuyruk hem de baş kısmının hareket özelliklerinin belirlenmesi için hız ve gidiş doğrultusuna bağlı bazı kinematik parametre değerleri geliştirilmiştir. Bu sistem sayesinde total ve progresif motilite değerlerinin belirlenmesinin yanında, spermatozoonların gerçekleştirdiği hareketin genel karakteristik özelliklerinin de incelenmesi sağlanır (8).

CASA ile spermatozoonların hareket özelliklerinin değerlendirilmesinde kullanılan bazı kinematik parametreler şunlardır (2, 8);

**VCL (Velocity of Curvilinear - Eğrisel Hız -  $\mu\text{m/s}$ ):** Spermatozoon başının ileriye doğru hareket ederken kat ettiği iki boyutlu gerçek eğrisel yoldaki hız değeridir (Şekil 2). Bu parametre, genel olarak spermatozoonun ilerlediği rotanın hız bilgisini vermekte olup spermatozoonun hedefe doğru gerçekte ne kadar yol aldığını gösterir. VCL değeri, her zaman için üç temel hız parametresinin en yüksek değere sahip olanıdır.



Şekil 2. Spermatozoonun kinematik parametrelerinden VCL, VAP ve VSL'nin görünümü

**VAP (Velocity of Average Path - Ortalama Yol Hızı -  $\mu\text{m/s}$ ):** Spermatozoon başının izlediği eğrisel yolun, ortalama değerler üzerinden doğrusal bir eksen şeklinde belirtildiği hız değeridir (Şekil 2). Bu parametre, spermatozoonun izlediği eğrisel yolun (VCL'nin), CASA cihazlarındaki algoritmalarla düzleştirilmesiyle hesaplanan ortalama hız olup bu algoritmalar, cihazların yazılımları arasında farklılık gösterebilir. VAP değeri, spermatozoonun hedefe doğru ortalama kat ettiği yol bilgisini vermekte olup her zaman için üç hız değeri içinde ortadaki değerdir.

**VSL (Velocity of Straight Line - Doğrusal Hız -  $\mu\text{m/s}$ ):** Spermatozoonun başının, belirli bir süre içerisinde tespit edilen ilk noktadan son noktaya gidene kadar oluşturduğu düz çizgi boyunca aldığı ortalama hız değeridir (Şekil 2). Diğer bir deyişle hareketin başlangıç ve bitiş noktasının kuş bakışı uzaklığının, zamana bölünmesiyle elde edilen değerdir. VSL değeri, spermatozoonun hedefe doğru ne kadar hızlı doğrusal bir yol aldığı bilgisini vermekte olup her zaman için üç hız değerinden en düşük olanıdır.

Düzenli ve düz bir hat üzerinde devam eden spermatozoon hareketinde; VAP değeri, genellikle VSL'ye çok yakın iken; doğrusal olmayan hareketlerde ise VAP, VSL'ye göre oldukça yüksektir.

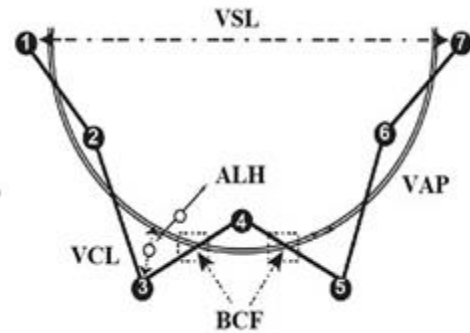
**LIN (Linearity - Doğrusallık - %):** Spermatozoonun doğrusal hızının, eğrisel hızına bölünmesi ( $VSL/VCL \times 100$ ) ile hesaplanan orantısal değer olup spermatozoonun aldığı yolun düzlüğünü yansıtır. Bu bilgi genel anlamda, spermatozoonların doğrusal olarak ilerlediği yoldan ne kadar saptığının da bilgisini vermektedir. Bu değer ölçütü; 0-100 aralığında olup elde edilen değer 100'e ne kadar yaklaşır ise,

spermatozoonun ilerlemesinin düzlüğü de o kadar artacaktır.

**STR (Straightness - Gidiş Doğrultusu - %);** Spermatozoonun doğrusal hızının, ortalama yol hızına bölünmesi ( $VSL/VAP \times 100$ ) ile hesaplanan orantısal değer olup spermatozoon hareketinin doğruluk oranını yansıtır. Bu bilgi genel anlamda, spermatozoonların hareketinin ne kadar doğrusal bir yörünge oluşturduğu bilgisini vermektedir. Bu değer ölçütü; 0-100 aralığında olup elde edilen değer 100'e ne kadar yaklaşır ise, spermatozoonun ilerleme yörüngesinin doğrusallığı da o kadar artacaktır.

**WOB (Wobbel Balancing)- Dengeleme / Yalpalama - %);** Spermatozoonun ortalama yol hızının eğrisel hızına bölünmesi ( $VAP/VCL \times 100$ ) ile hesaplanan orantısal değer olup spermatozoon başının asıl yolundan sapım (sapma) derecesini yansıtır. Bu değer ölçütü; 0-100 aralığında olup elde edilen değer 100'e ne kadar yaklaşır ise, spermatozoonun yalpalamasının veya kararsızlığının o kadar azaldığına işaret eder.

**ALH (Amplitude of Lateral Head Displacement - Yanal Baş Yer Değiştirme Genliği -  $\mu\text{m/s}$ ):** Bu değer, spermatozoon başının ortalama yolda ilerlerken laterale doğru saptığı ortalama uzaklığı (içeriye doğru oluşan dalgalanmanın uzunluğunun) ifade eder (Şekil 3). Belirlenen bu sapma mesafesi, genellikle ortalama değer halinde verilebilir.



Şekil 3. Spermatozoonun kinematik parametrelerinden ALH ve BCF değerinin görünümü

**BCF (Beat Cross Frequency - Çapraz frekans Geçişi - Hz):** Bu değer, spermatozoon başının eğrisel yolda (VCL) ilerlerken ortalama yoldan geçme frekansını ifade eder. Belirlenen bu değer, kuyruk hareketlerinin yön değiştirme ritminin incelenmesi açısından kullanışlı olabilir.

Gerek bilimsel araştırmalarda gerekse dondurulmuş boğa spermasının çözdürülme sonrası kalitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan kontrollerde; motilite sonuçları ile birlikte kinematik parametrelerin değerlendirilerek yorumlanması oldukça önemlidir. Bu yüzden, kinematik parametrelerin birbirleriyle olan ilişkileri ve spermatozoonların hareket şekillerini etkileme düzeyleri, belirli referans değerler oluşturularak mutlaka detaylı bir şekilde incelenmelidir.

#### 4.2. Spermatozoonların Hareketlilik Ölçütleri

Spermatozoonların kuyruk kısımlarında bulunan fibrillerde oluşan düzenli kontraksiyon zinciri, kuyruğun kamçı hareketi yapmasına sebep olarak spermatozoonun ileriye doğru itilmesini sağlar. Bu esnada spermatozoon devamlı olarak ileriye doğru hareket ederken, aynı zamanda uzun eksen etrafında da döner. Bu şekilde boğa spermatozoonları ileriye doğru ortalama 100 µm/sn hızla hareket etmektedir (11, 12).

Spermatozoonların hareket özelliklerinin belirlenmesinde esas alınan bazı temel özellikler vardır. Bunlar; bir spermatozoonun hareket ederken sahip olduğu hızı, bu hızla zaman içerisinde kat ettiği mesafe (VCL, VAP, VSL) ve spermatozoonun hareket ederken izlediği yol, diğer bir deyişle hareketi sırasında çizdiği yörüngenin doğrusallık düzeyidir (LIN, STR, WOB) (6).

WHO tarafından (13) önerilen sistemde spermatozoonlar, hareket çeşitlerine göre 4 ana bölümde sınıflandırılırlar;

(a) Herhangi bir yönde doğrusal ve hızlı hareket eden (progresif) spermatozoonlar (Bu tür spermatozoonlar, belirli bir hız değerinin üzerinde doğrusal ya da geniş bir dairesel düzlemde ilerleyici bir şekilde hareket ederler.)

(b) Herhangi bir yönde doğrusal ancak yavaş hareket eden spermatozoonlar (Bu tür spermatozoonlar, doğrusal ya da geniş bir dairesel düzlemde ilerleyici bir şekilde hareket etmekle birlikte hızları belirlenen değerden daha yavaştır.)

(c) Non-progresif hareket eden (doğrusal ve hızlı hareket etmeyen) spermatozoonlar (Bu tür spermatozoonlar, ilerleyici hareket etmeyip küçük dairesel veya yerinde sallanma şeklinde hareket ederler.)

(d) Hareketsiz spermatozoonlar (Spermatozoonlarda hiç hareket gözlenmiyorsa hareketsiz (statik) olarak sınıflandırılırlar.)

#### 4.3. CASA Sisteminde Belirlenen Hız Değerleri

CASA sistemi ile belirli bir süre içerisinde spermatozoonların baş kısmında oluşan yer değişikliği ölçülüp her bir spermatozoon için hız değerleri (VCL, VAP, VSL) hesaplanarak "µm/saniye" şeklinde ifade edilir. Bunun yanında, belirlenen hız ölçütlerine göre (genellikle VAP değeri dikkate alınarak) bir alt sınıflandırma daha oluşturularak spermatozoonların hız tanımları yapılır.

Bu tanımlama için, türlere göre değişen ve CASA sistemlerinde farklılık gösterebilen üst (MVV) ve alt (LVV) hız değeri ölçütleri vardır. CASA sisteminde yapılan analiz sonucu bir spermatozoonun belirlenen VAP değerinin bu değerlere göre yüksek ya da düşük olmasına göre; (1) çok hızlı hareket eden spermatozoonlar (rapid / hızlı) (VAP>MVV), (2) ortalama hızda hareket eden spermatozoonlar (medium / orta) (LVV<VAP<MVV), (3) yavaş hareket eden

spermatozoonlar (slow / yavaş) (VAP<LVV) ve yerinde hareket eden spermatozoonlar (non-mobile) ve bunların dışında hareket etmeyen spermatozoonlar (statik / hareketsiz) şeklinde hız alt tipleri belirlenir (2, 7). Bu belirlemede, örneğin boğa spermatozoonları için; 10 < slow < 25 < medium < 50 < rapid şeklinde bir değerlendirme sistemi oluşturulmuştur. Bu değerlere göre; görüntü içerisinde oluşturulan yörünge çizgileri farklı renkler (rapid – kırmızı; medium – mavi; slow – yeşil) şeklinde gösterilir.

Diğer taraftan, hareket yeteneğine sahip spermatozoonlar hareket rotalarına (yörüngelerine) göre de; temelde 2 ana grup altında incelenir. Bunlar; \* doğrusal yörüngede (ilerleyici) hareket eden spermatozoonlar ile doğrusal olmayan yörüngede hareket gösteren spermatozoonlar şeklinde değerlendirilir.

#### 4.4. Total ve Progresif Motilite

CASA sistemi ile total motilitesinin değerlendirilmesinde etkin belirleyici unsur; elde edilen görüntü süresi içerisinde spermatozoonların baş kısmında oluşan yer değişikliğinin algılanmasıdır. Bu sayede CASA sistemi, spermatozoonları motil (hareket eden) ve statik (hareketsiz) olarak temelde sınıflandırırken, tüm sayılan spermatozoonlar içerisinde hareketli olan spermatozoonların oranını da total motilite değeri olarak sunar (9).

Motilitenin diğer bir değerlendirme şeklinde ise tüm spermatozoonlar içerisinde herhangi bir yönde doğrusal ve hızlı hareket eden spermatozoonların oranı belirlenerek progresif motilite şeklinde ifade edilmesidir. CASA sistemlerinde total motiliteye göre progresif motilitenin belirlenmesi özel bir sınıflandırma sistemini gerektirir. Bu açıdan spermatozoonlar; hem hareket hızlarına (rapid ve medium) hem de hareketleri sırasında izledikleri yolun doğrusallık (STR veya LIN, ALH) düzeyine göre değerlendirilip referans değerlerin üzerinde değer taşıyan spermatozoonlar progresif olarak sınıflandırılırlar (14, 15).

**Tablo 1.** CASA sisteminde (Proiser) türlere göre progresif motilitenin belirlenme kriterler

	VAP Değerine Göre Hız Ölçütleri	STR	ALH
AYGIR	10 < Slow < 25 < Medium < 90 < Rapid	%75	10
BOĞA	10 < Slow < 25 < Medium < 50 < Rapid	%70	10
KOÇ	10 < Slow < 45 < Medium < 75 < Rapid	%80	10
KEÇİ	10 < Slow < 45 < Medium < 75 < Rapid	%80	10
KÖPEK	10 < Slow < 65 < Medium < 100 < Rapid	%75	10
TAVŞAN	10 < Slow < 25 < Medium < 50 < Rapid	%70	10

Dondurulmuş boğa spermalarının çözdürme sonrası CASA sistemleri ile yapılan muayenesinde; kullanılabilirlik ölçütünün alt sınırı ile ilgili net bir kriter tam olarak ortaya konulamamakla birlikte, total motilitenin %50'nin üzerinde ve progresif motilitenin ise %35'in üzerinde olması en az 5 milyon progressif motil spermatozoon içermesi tavsiye edilmektedir. Diğer taraftan bu durum, dondurulup çözdürülmüş sperma için hayvanın türü ve kullanılacak tohumlama tekniği gibi faktörler dikkate alındığında cevaplanması zor bir soruyu ortaya çıkarmaktadır (11, 16).

## 5. CASA Sisteminde Spermatozoon Hareketliliği ve Kinematik Parametrelerin Belirlenmesini Etkileyebilecek Faktörler

### 5.1. Farklı CASA Sistemleri

CASA sistemleriyle aynı örneğin değerlendirilerek sonuçların karşılaştırılmasına yönelik oldukça sınırlı çalışma bulunmaktadır. Bu konuda Holt ve ark.'nın (17) aynı kişiden (insan) toplanan sperma örneklerini kullanarak beş farklı CASA sistemini karşılaştırdıkları bir çalışmada, elde edilen spermatozoon motilite değeri ile belirlenen kinematik parametrelerden VCL ve VAP değerinin sistemler arasında önemli farklılıklar gösterdiğini belirtmişlerdir. Ancak araştırmacılar aynı sistem içinde yapılan ölçümlerde de önemli farklılıklar olduğunu ve bu durumun sperma örneklerinin hazırlanmasındaki teknik prosedürün ve muayene yapan kişinin değişkenliğinden kaynaklanabileceğini vurgulamışlardır.

Bu çalışmanın sonuçları her ne kadar sistemik farklılıkların önemli derecede etkili olduğunu belirtse de, günümüzde CASA teknolojilerinin çok ileri noktalara ulaşması ve belirli markaların teknolojik ve yazılım alanında oldukça gelişmiş seçenekler sunulması sayesinde aynı standart prosedürlerin uygulanması halinde, birçok parametre yönünden analizler sonrasında elde edilen değerlerin birbirine yakın sonuçlar verebileceği düşünülmektedir (8).

### 5.2. Hayvanın Türü

Castelli ve ark.'nın (18) farklı türlerden (insan, boğa, koç, tavşan) elde edilen taze spermaların hareket özelliklerinin CASA analizleri ile karşılaştırılmasına yönelik yaptıkları bir çalışmada, VCL yönünden tavşan spermatozoonlarının en hızlı, insan spermatozoonlarının ise en yavaş olduğunu ve total motilite oranının da buna benzer bir özellik gösterdiğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte, elde edilen sonuçlar LIN yönünden incelendiğinde ise, en yüksek doğrusallığı insan spermatozoonları gösterirken, bunu sırasıyla boğa, koç ve tavşan spermatozoonlarının takip ettiğini ifade etmişlerdir. Bu bulgulardan yola çıkarak farklı türlerin farklı temel kinematik özelliklere sahip olduğunu ve yapılan sonuç değerlendirilmelerinde türe ait özelliklerin mutlaka göz önünde bulundurulması gerektiğini vurgulamışlardır. Bu yüzden, yapılacak analizler öncesinde modül ayarları yapılırken, mutlaka sperması muayene edilen türe ait seçimler yapılmalı ve gerekli sayısal referans değerleri kontrol edilmelidir.

### 5.3. Sperma Alma Yöntemi

Günümüzde özellikle evcil hayvanlardan spermanın alınması amacıyla suni vajen yöntemi ile elektro-ejakülatör yöntemi yaygın bir şekilde kullanılmakta olup bu yöntemlerden suni vajen yardımıyla spermanın alınması, elektro-ejakülatör yardımıyla spermanın alınmasına göre çok daha yaygın ve geniş ölçüde kullanılmaktadır (11, 12). Elektro-ejakülatör yöntemiyle elde edilen ejakülatlar, suni vajenle elde edilen ejakülatlara göre genellikle hacim yönünden daha fazla, ancak spermatozoon yoğunluğu açısından ise daha düşük bir özellik gösterir. Ancak, ejakülattaki toplam spermatozoon sayısı, motilite özellikleri ve fertilizasyon kabiliyeti açısından genel bir değerlendirme yapıldığında ise, her iki yöntem için elde edilen toplam değerlerin birbirine benzediği (aralarında bir farkın olmadığı) ifade edilmektedir (19).

Robayo ve ark.'nın (14), koçlarda suni vajen ve elektroejakülatör yardımıyla elde edilen spermaların CASA sistemi ile hareket özelliklerinin karşılaştırılması amacıyla yaptıkları çalışmada hayvanların spermalarını bireysel olarak değerlendirdiklerinde, spermatozoonların kinematik parametre özelliklerinin elektroejakülatörle alınan spermalarda suni vajen yöntemine göre önemli derecede değişkenlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, elde edilen spermaların pooling yapılarak karşılaştırılması durumunda ise, sperma toplama yöntemine göre bu farklılığın sadece VCL değeri yönünden önemlilik gösterdiğini vurgulamışlardır. Diğer taraftan, Marco-Jimerez ve ark. (20) yaptıkları çalışmada ise, koçlardan suni vajen ve elektroejakülatör yardımıyla elde edilen spermaların taze olarak ve dondurulup çözdürülme sonrası yapılan muayenelerinde spermatozoonların hareketlilik ve kinematik parametre değerleri yönünden önemli bir farklılık göstermediğini bildirmişlerdir.

### 5.4. Dondurulmuş Spermalar İçin Çözdürme Yöntemi

Dondurulmuş spermaların çözdürme sonrası kalitesi açısından; çözdürülmesi için kullanılan sıcak su banyosunun sıcaklık derecesi ve bu derecede payetlerin tutulma süresi oldukça önemlidir. Bu konuyla ilgili olarak daha önceden yapılan çalışmaların sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde, yüksek sıcaklık derecelerinde daha hızlı bir çözülme oranının sağlanmasının daha iyi sperm hareketliliği ve akrozomal bütünlük ile sonuçlandığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, karşılaşılan birtakım zorluklar nedeniyle, saha koşullarında yapılan uygulamalarda vücut sıcaklığına yakın ve daha güvenli olarak kabul edilen sıcaklık dereceleri önerilmektedir (21, 22). Contri ve ark. (15), yaptıkları bir çalışmada, 0.25 mL'lik payetler içerisinde dondurulmuş boğa spermaların 37°C'de 1 dakika ve 70°C'de 5 saniye süreyle çözdürülmesi sonrası CASA sistemleri ile yapılan analizlerinde, spermatozoon motilitesi ve kinematik parametre değerlerinin benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Muino ve ark. (23) ise, dondurulmuş boğa spermalarının üç farklı prosedür uygulanarak (35°C'de 40 sn, 55°C'de 15 sn ve 70°C'de 5 sn) çözdürülmesi sonrası CASA sistemi ile yapılan analizlerinde; spermatozoon motilitesi ve

kinematik değerlerinde önemli bir değişimin olmadığını tespit etmişlerdir. Bununla birlikte araştırmacılar, bu spermaların 2 saatlik inkübasyon sonrası 35°C'de çözdürülen örneklerdeki değerlerin diğer sıcaklık derecelerine göre kinematik parametreler yönünden önemli bir azalma gösterdiğini belirtmişlerdir.

### 5.5. Örnekleri Bekletme Süresi

Contri ve ark. (15), CASA sistemleri ile yapılan muayenelerde analiz süresinin etkisini değerlendirdikleri bir çalışmada, aynı örnek için 2 dakika boyunca her 15 saniyede bir analiz yapıldığında tüm parametreler için önemli ölçüde değerlerin değişmediğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, CASA sistemlerinde yaptıkları analizlerde, sperma örneklerinin özel lama konulmasından 5 ve 10 dakika sonra VAP, VSL ve VCL değerlerinin önemli derecede azaldığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçları genel olarak değerlendirdiklerinde ise, CASA sistemleri ile yapılan muayeneler sırasında, spermatozoon hızlarında oluşan azalmanın önlenmesi için sperma analizinin 1-2 dakika içerisinde tamamlanmasını ve muayenenin asla 5 dakikayı geçmemesi gerektiğini vurgulamışlardır.

### 5.6. Muayene Sırasındaki Ortam Sıcaklığı

CASA sistemlerinde yapılan muayenelerin yürütüldüğü sıcaklık derecesi, spermatozoonların hareketliliğini etkileyebildiği için analizin gerçekleştirilmesi gereken en iyi sıcaklığın, genellikle normal vücut sıcaklığına en yakın sıcaklık olması gerektiğini bildirilmiştir. Bu yüzden, rutin uygulamalarda spermatolojik muayeneler sırasında genellikle 37°C ile 38°C tercih edilmektedir (5, 16).

Bu konuda, Iguer-Ouada ve Verstegen'nin (24) taze köpek spermasının CASA sistemlerinde yapılan analizlerini iki farklı sıcaklık derecesinde (38°C ve 30°C) yürüttüğü çalışmalarında, spermatozoon motilitesi ve kinematik değerlerin 30°C yürütülen analizlerde, 38°C'de elde edilen değerlere göre önemli derecede azaldığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar, vücut dışına çıktığında spermanın sıcaklığının 30-32°C olsa da, spermanın bu sıcaklıkta tutulmasının CASA sistemlerinde yapılan analizler sırasında hareket yeteneklerini azalttığını, bu yüzden dış genital kanal sıcaklığına yakın bir derece olan 38°C'de CASA analizlerinin yapılmasının gerçek fizyolojik koşullara uygun bir değerlendirme oluşturacağını belirtmişlerdir. Spermatozoonların hareket özelliklerinin ortam sıcaklığına göre önemli ölçüde değişiklik gösterebilmesi nedeniyle, sperma örneklerinin alındığı ya da çözdürüldüğü andan itibaren 38°C'de bir inkübatörde tutulması ve CASA analizleri sırasında spermanın konulacağı özel lamaların 38°C'deki bir ısıtıcı tabla üzerinde bulundurulması tavsiye edilmektedir (25).

### 5.7. Spermatozoon Konsantrasyonu

Spermatozoonların bireysel hareketlerinin belirlenebilmesi için görüntü analizlerinde spermatozoon başlarının oluşturdukları farklı hareket noktalarının başarılı bir şekilde izlenebilmesi gerekir. Görüntü alanında spermatozoon sayısının çok fazla olması, bu

hücrelerin çok fazla sayıda bireysel çarpışmalarına yol açarak yörünge takibinin yanlış yapılandırılmasına ve buna bağlı olarak da motilite sonuçlarının ve kinematik ölçümlerin yanlış değerlendirilmesine neden olabilir. Bunun yanı sıra, yoğun bir alandaki spermatozoonların flagellum vuruşlarının, ortamdaki sıvının aşırı hareketlenmesine yol açarak statik hücrelerin non-mobile olarak algılanmasına da sebep olabilir. Bu yüzden, CASA analizleri öncesinde görüntülenme alanında belirli bir sayı aralığında spermatozoon bulunmasını sağlamak amacıyla sperma örneğinin belirli bir oranda seyreltilmesi gereklidir (15, 26).

Rijselaere ve ark. (27) yaptıkları bir çalışmada, üç köpekten toplanan spermanın fizyolojik tuzlu su çözeltisi ile 25, 50 veya 100x10<sup>6</sup> spermatozoa/ml olacak şekilde seyrettiklerini, sonuçta elde edilen motilite ve kinematik değerler açısından 50x10<sup>6</sup> spermatozoa/ml konsantrasyonun her bir spermatozoonun sürekli olarak izlenmesine izin vererek daha gerçekçi sonuçlar sunduğunu bildirmişlerdir. Buna ilaveten, araştırmacılar, 100x10<sup>6</sup> spermatozoa/ml ve üzerindeki konsantrasyonun ise; CASA sisteminde tek tek hücre izlerinin oluşturulup başarılı bir şekilde analiz edilebilmesi açısından çok yüksek olduğunu vurgulamışlardır.

Contri ve ark. (15) ise, yüksek konsantrasyonlu (50x10<sup>6</sup> ve üzeri) örnekler kullanıldığında CASA sisteminin spermatozoon motilite ve kinematik değerlerinde bariz hatalar göstererek güvenilir olmayan sonuçlar gösterdiğini, buna kıyasla düşük konsantrasyonlarda (5, 10, 20 ve 30x10<sup>6</sup> sperm/mL) ise değerlerin tutarlılık göstermekle birlikte konsantrasyona bağlı olarak özellikle kinematik verilerde önemli ölçüde farklılıkların tespit edildiğini bildirmişlerdir. Bu açıdan, özellikle 20 ile 30x10<sup>6</sup> spermatozoon/ml konsantrasyonda, daha yüksek hareketlilik ile artan sperm hızı (VAP ve VCL) değerleri bulduklarını, daha düşük konsantrasyonların ise her spermatozoonun yörüngesinin güvenilir bir yeniden yapılandırılmaya izin verdiğini, ancak numune başına algılanan ve analiz edilen sperm sayısının az olmasından dolayı ortalama değer frekansının düşük olmasından dolayı elde edilen değerlerin güvenilirliğinin az olacağını belirtmişlerdir.

Davis ve Katz (28)'de yaptıkları çalışmada, CASA sistemi ile motilite ve kinematik değerlerin analizi sırasında, görüntü alanında ml başına yaklaşık 50x10<sup>6</sup> spermatozoondan fazla ya da ml başına yaklaşık 20x10<sup>6</sup> spermatozoondan az bir konsantrasyonun bulunmasının hata oranını artırdığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Farrell ve ark. (29) yaptıkları çalışmada, CASA analizleri için dondurulmuş boğa spermalarının yaklaşık 25x10<sup>6</sup> spermatozoon/ml olacak şekilde seyreltilmesinin iyi sonuç verdiğini tespit etmiştir. Bu konuda yapılan diğer bazı çalışmalarda da (30, 31), CASA sistemleri ile yapılan motilite ve kinematik analizler için en uygun spermatozoon konsantrasyonunun yaklaşık 25-30x10<sup>6</sup> spermatozoon/ml olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte, analiz için ml başına 40-50 x10<sup>6</sup> kadar yüksek sperm konsantrasyonunun kullanılabileceğini bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (32, 33).

### 5.8. Sperma Örneklerini Seyreltmek İçin Kullanılan Sulandırıcının İçeriği

Bir sperma örneğinin seyreltilmesinin hedefi, CASA analizlerinde spermatozoonların başının doğru ve net bir şekilde görselleştirilip tespit edilmesini sağlamak ve bu sayede spermatozoonların hareket rotalarının doğru bir şekilde takip edilerek yanlış yörüngelerin yapılandırılmasını önlemektir. Taze spermanın CASA ile yapılacak muayenelerinde, en iyi sulandırıcının homolog seminal plazma olduğu bildirilmekle birlikte, bu koşulların sağlanması çok pratik değildir. Bu yüzden, spermanın seyreltilmesi amacıyla kullanılacak sulandırıcı, spermatozoonların hareket ve kinematik parametrelerini en az düzeyde etkileyecek özellikte olmalıdır (34, 35).

Rijsselaere ve ark. (27) yaptıkları bir çalışmada, CASA analizleri sırasında köpek spermasının seyreltilmesi amacıyla HEPES TALP, prostat sıvısı, tris-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ve fizyolojik tuzlu su olmak üzere dört farklı sulandırıcının etkilerini araştırmış ve çalışmanın sonucunda sperma örneklerinin, HEPES TALP ve prostat sıvısı ile sulandırılması sonrası total ve progresif motilite değerleri ile VAP, VSL ve VCL kinematik değerlerinin, Tris yumurta sarısı glikoz sulandırıcısı ve fizyolojik tuzlu su ile sulandırılmaya göre daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, kullandıkları sulandırıcılar arasında tris-yumurta sarısı-glikoz sulandırıcısı ile elde edilen sonuçların en düşük olduğunu ve bu durumun özellikle bu seyreltici hareketli spermatozoonların yavaşlamasına yol açan yüksek viskoziteye sahip olmasından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Bu konuda yapılan bir başka çalışmada ise (36), dondurulmuş spermadaki kinematik özelliklerin, taze spermaya göre daha düşük olmasının, sulandırma ve dondurma sırasındaki işlemlerden etkilenme düzeyine bağlı olarak değişebileceğini, bunun yanında numunelerin daha yüksek bir viskozite oluşturan gliserol içeren sulandırıcılarla sulandırılmasından da etkilenebileceğini vurgulamaktadırlar.

Diğer taraftan, Contri ve ark. (15) yaptıkları çalışmada, ideal spermatozoon konsantrasyonu oluşturmak için izotonik NaCl% 0.9 çözeltisi, Fosfat buffer tampon çözeltisi ve spermanın sulandırılmasında kullanılan Bioxcell ticari sulandırıcısı olmak üzere üç farklı sulandırıcı kullanmış ve sonuç olarak yapılan incelemelerde, spermanın ticari sulandırıcı ile sulandırılmasının diğerlerine kıyasla motilite değerlerinde önemli bir farklılık oluşturmamakla birlikte daha yüksek bir VCL değeri sağladığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, bu durumu, spermanın diğer sulandırıcılarla sulandırılması sonrası ortamdaki gliserol oranının aniden düşmesi nedeniyle oluşabilecek hücrel osmotik stresin spermatozoonların hareketliliğinde bir azalmaya yol açabileceği şeklinde yorumlamış ve çözülme sonrası yapılacak sulandırmalarda osmotik şokun önlenmesi amacıyla aynı sulandırıcının kullanılmasını tavsiye etmişlerdir.

### 5.9. Lam Tipi ve Derinliği

CASA sistemlerinde yapılan spermatozoon motilitesi ve kinematik parametrelerin belirlenmesi sırasında, bu amaç için üretilmiş genellikle 10 µm veya 20 µm derinliğe sahip tekrarlı kullanılabilen veya tek kullanımlık özel lamlar kullanılmaktadır. Gacem ve ark. (37)'nin, yaptıkları bir çalışmada, eşek spermasının CASA sistemi ile yapılan analizlerinde; tekrarlı kullanılabilir lamların (Sperm Track) kullanılmasının, tek kullanımlık özel lamlara (ISAS-D4C) kıyasla spermatozoon kinematik hız parametrelerinden VCL, VAP ve VSL yönünden önemli ölçüde ( $p<0.05$ ) daha yüksek bir değer sunduğunu bildirmişlerdir. Buna ilaveten aynı çalışmada, aynı tip fakat farklı derinliklerdeki özel lamlar karşılaştırıldığında ise, 10 µm derinliğe sahip lam kullanılarak yapılan analizlerin, 20 µm derinlikteki özel lama göre daha yüksek bir VAP değeri ortaya koyduğunu, VCL değerinin ise daha düşük olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçları genel olarak değerlendirdiklerinde, kullanılan özel lam tipinin kinematik parametreleri önemli düzeyde etkilediğini, bununla birlikte, aynı tip fakat farklı derinliklerdeki lamlar için ise birbirine yakın sonuçlar gözlemlendiğini ve kinematik parametrelerde oluşan farklılıkların tolere edilebilir seviyede olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Bompert ve ark.'da (38) boğa spermasının CASA sistemi ile yapılan incelemelerinde, yeniden kullanılabilir özel lamlarda (SpermTrack 10 µm) VCL, VAP ve VSL kinematik değerlerinin, tek kullanımlık 10 µm ve 20 µm derinlikteki özel lamlara kıyasla daha yüksek olduğunu ve kinematik parametreler yönünden yeniden kullanılabilir özel lamların, farklı derinlikteki (10 ve 20 µm derinlik) tek kullanımlık özel lamlara göre daha güvenilir sonuçlar sağladığını bildirmişlerdir.

Bu konuda Contri ve ark. (15)'nin yaptığı bir çalışmada ise, CASA sistemi ile yapılan analizlerde; 10 µm derinliğinde tekrar kullanılabilir özellikteki bir Makler laminanın, 20 µm derinliğinde tek kullanımlık Leja lamına göre daha yüksek motilite değerleri ile yüksek VCL değerleri sağladığını, ALH ve BCF değerlerinin düşük olduğunu, bununla birlikte VSL değerlerinin ise önemli derecede etkilenmediğini belirtmişlerdir. Buna ilaveten, hız değerleri açısından ise orta ve yavaş hızda hareket eden spermatozoonların yüzdesinin her iki lam tipinde benzer olduğunu, ancak Makler lamında Leja lamına göre hızlı hareket eden spermatozoonların yüzdesinin daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Bu sonuçlara dayanarak araştırmacılar, CASA sistemlerinde kullanılan lam tipi ve derinliğinin spermatozoonların kinematik parametre değerlerinde önemli ölçüde değişiklik oluşturabileceğini vurgulamışlardır.

### 5.10. Özel Lamların İlgili Alanlarına Bırakılan Numune Miktarı

CASA sistemlerindeki analizler öncesinde, hazırlanan sperma örneğinden muayene alanına bırakılan sulandırılmış sperma miktarı; kullanılan özel lam tipine ve derinliğine bağlı olarak değişmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalarda, konulan numune miktarının 4 µL (30, 39) ile 10 µL (31, 32) arasında değiştiği görülmektedir. Bununla birlikte, Palacin ve



ark'nın (40) CASA sistemlerinde kullanılan özel bir lama farklı miktarlarda sperma örneği koyarak yaptıkları bir çalışmada, 5 µL ile 10 µL örnek konulmasının spermatozoonların motilite özellikleri ile kinematik değerlerini etkilemediği bildirilmiştir.

### 5.11. Özel Lam İçindeki Alan Seçimi ve Görüntüleme Sayısı

CASA analiz sonuçları üzerine özel sayım lamalarının potansiyel etkileri üzerine yapılan çalışmaların çoğunda, yapılan karşılaştırmalarda araştırmacıların bir örnek davranış göstermeye çalışmış oldukları düşünülmeyle birlikte, genellikle araştırmaların yöntem kısmında analizlerin yapıldığı lam üzerindeki görüntüleme alanının seçiminin açık bir şekilde tanımlanmadığı gözlenmektedir. Oysa CASA sistemlerinde yapılan analizlerde, özel lam içindeki görüntüleme alanının seçimi, kinematik parametre değerlerini etkileyebilecek bir faktördür.

Gacem ve ark (37), tek kullanımlık ISAS-D4C20 özel lamları kullanarak yaptıkları CASA analizlerinde, sayma yolu boyunca alan 1'den alan 7'ye doğru ilerledikçe spermatozoonların hız parametrelerinden VCL, VAP ve VSL yönünden hafif bir artış olduğunu, bununla birlikte, istatistikî yönden özellikle en son alanda (7 nolu odada) belirlenen hız değerlerinin önemli derecede azaldığını bildirmişlerdir. Diğer taraftan aynı çalışmada, SpermTrack20 ile yapılan CASA analizlerinde ise spermatozoonların kinematik değerlerinin (VCL, VAP ve VSL) merkezden kenarlara doğru gidildikçe önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar, kılcal özellikteki özel bölmelere sahip lamlara konulan sperma örneklerinin sıvısal yapısının hidrodinamik hareketi sonucu spermatozoonların hareket özelliklerinin etkilenebileceğini, aynı şekilde, daire şeklindeki SpermTrack lamı üzerine damla şeklinde bırakılan sperma örneğinin ise, üzerine kapatılan lamel kuvvetiyle yayılarak hareket ettiğini, bu nedenle, merkezden kenarlara doğru oluşan hareketin etkisinin tamamlanması için belirli bir süre beklenmesini tavsiye etmişlerdir. Palacin ve ark'nın (40) yaptıkları çalışmada da, kullanılan özel lamın merkezi ve periferik alanlarında yapılan görüntülemenin koç spermatozoonlarının motilitesini ve kinematik değerlerini etkilediğini, özellikle merkezi alanda toplam ve ilerleyici hareketlilik ile VCL ve VAP parametreleri için daha yüksek değerlerin tespit edildiğini bildirmişlerdir.

Valverde ve ark. (41) ise, CASA analizlerinde farklı görüntüleme alanlarının etkisini incelemek için iki farklı tek kullanımlık özel lam tipi (Cell-Vu ve Leja) kullanarak yaptıkları çalışmada, damlanın bırakıldığı yerden uzaklaştıkça, spermatozoonların kinematik değerlerinin azaldığını belirlemişlerdir. Benzer şekilde Farrell ve ark. (29)'da, tek kullanımlık lamlarla yapılan ölçümlerde farklı odaların CASA tarafından ölçülen değişkenler üzerinde etkisinin az olduğunu, bununla birlikte dolun tarafından en uzak olan haznedeki alandan diğer alanlara göre daha düşük değerler elde edildiğini bildirmişler ve özellikle yandan yüklenen özel lamlar kullanılırken bu duruma dikkat edilmesi gerektiğini vurgulamışlardır. Diğer taraftan, aynı araştırmacılar CASA sistemleri ile

progresif motilite değerinin belirlenmesi üzerine yaptıkları çalışmada, mikroskopta belirlenen görüntü üzerinde toplamda 16 alan incelendiğinde tekrarlanabilirlik değerinin 0.99 olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer şekilde, araştırmacıların yaptıkları bir başka çalışmada (42) ise, 12 alandan elde edilen toplam verilerin ortalamasının değerlendirilmesiyle progresif motilite oranının tekrarlanabilirlik değerinin 0.98 olduğu bildirilmiştir.

### 5.12. Kare Hızı (Görüntüleme Sayısı - Frame Rate)

Kare hızı, belirli bir sürede (genellikle saniye bazında), hareketli bir görüntüyü oluşturan kare sayısını ifade eder. Bu özellik, genel olarak fps (frame per second) değeri ile gösterilmekte olup saniye başına düşen kare sayısı şeklinde de değerlendirilebilir. Örneğin çekilen bir görüntünün 50 fps olması, 1 saniyede 50 kare fotoğrafın çekileceği anlamına gelir. İnsan gözüyle akıcı bir görüntü algısı için fps değerinin en az 24 olması gerektiği kabul edilmektedir (43). Rijsselaere ve ark.'nın (27) yaptıkları bir çalışmada, kullanılan CASA sistemi içinde 60 kare/sn'lik bir kare yakalama hızının, 30 ve 15 kare/sn'lik kare yakalama hızlarına göre progresif motilite değerleri ile VCL ve VAP kinematik değerlerini önemli ölçüde artırdığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu durumu, 60 fps'de mevcut artan iz bilgisi miktarının muhtemelen spermatozoonların gerçek yörüngelerinin daha ayrıntılı bir şekilde yapılandırılmasına bağlı olabileceğini ifade etmişlerdir.

Castellini ve ark (18)'nın CASA sistemi ile farklı kareleme hızlarında (25-50-100-200) spermatozoonların kinematik parametrelerini değerlendirmek amacıyla yaptıkları çalışmalarında, yüksek kare hızı ile yapılan analizlerden total motilite değerinin önemli derecede etkilenmediğini, bununla birlikte örnekleme hızı arttıkça VCL'nin büyük ölçüde arttığını ve LIN'in ise azaldığını, bu durumun ise VSL'nin yüksek kare hızı değişimlerden önemli düzeyde etkilenmemesinden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Diğer taraftan, örnekleme frekansı arttıkça; BCF değeri önemli düzeyde arttığını, ALH değerinin ise azaldığını belirtmişlerdir. Bu konuda yapılan bazı araştırmaların sonuçlarında da (44, 45), CASA sistemleri ile düşük kare hızlarında analiz yapılmasının, birbirini izleyen iki video karesi arasında geçen süreden daha kısa aralıklarla meydana gelen eğrisel yol (VCL) özelliklerinin ayrıntılarının kaybolmasına yol açarak yolun belirli ölçüde düzleşmesine ve dolayısıyla kısalmasına neden olabileceği ifade edilmiştir. CASA analizlerinde kare hızının yükseltilmesi; mevcut artan iz bilgisi miktarının artmasına bağlı olarak spermatozoonların yörüngelerinin daha doğru bir şekilde yeniden yapılandırılmasını sağlar. Diğer taraftan düşük kare hızlarında, özellikle hızlı ve doğrusal olmayan spermatozoonlar için bilgilerin bir kısmı algılanamayabilir. Bu açıdan, özellikle 50 fps'den daha düşük bir kare hızı ile yapılan analizlerde, takip eden video kareleri arasında geçen süreden daha kısa aralıklarla meydana gelen gerçek yolun (VCL) bazı ayrıntılarının tespit edilemediği ve bu durumun da çeşitli kinematik parametre değerlerinin yanlış belirlenmesine neden olduğu vurgulamışlardır (18).

CASA sistemi ile belirlenen spermatozoon kinematik parametre değerleri üzerine kare hızının etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada (37), VCL değeri temel alınarak yapılan incelemelerde bulunan en yüksek değerin 20 µm derinlikteki yeniden kullanılabilir özel lamlarda ve yüksek kare hızı değerlerinde (200-250 fps) belirlendiği bildirilmiş, elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde ise, özel lam tipi ve derinliği ne olursa olsun güvenilir sonuçlar elde etmek açısından en uygun kare hızı değerinin 200-250 fps olduğu bildirilmiştir. Ayrıca araştırmacılar, ortalama kare hızı değeri arttıkça, spermatozoonların yörüngesinin farklı bir form gösterdiği ve yüksek kare hızında, düşük değerlere göre tespit edilmesi mümkün olmayan salınımların belirlenebileceğini de vurgulamışlardır.

Bompart ve ark. (38) ise boğa spermasının kinematik parametrelerinin belirlenmesi üzerine yaptıkları çalışmada, motilite değerinin kare hızına bağlı olarak önemli bir değişiklik göstermediğini, ancak ırklar arasında kinematik parametrelerin önemli değişkenlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Buna ilaveten, genel olarak boğa spermasının kinematik parametrelerinin güvenilir bir şekilde değerlendirilmesini sağlamak için 200 fps ve üzeri bir kare hızına ihtiyaç olduğunu, bununla birlikte bu değerin en düşük 90 fps olması gerektiğini belirtmişlerdir.

CASA sistemleri ile bazı kinematik değerlerin belirlenmesindeki doğruluk düzeyi, belirli bir süre boyunca çekilen görüntü sayısı ile doğrudan ilişkilidir. Aynı örneklerin CASA sisteminde farklı kare hızı kullanılarak yapılan incelemelerinde, elde edilen sonuçlar arasında önemli farklılıkların olduğu görülmekte olup özellikle VCL değerinin, kare hızının düşük ve yüksek olmasına göre belirgin bir şekilde değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (15, 18). Bu yüzden, farklı laboratuvarlarda ya da çalışmalarda yapılmış CASA analiz sonuçları karşılaştırılırken, mutlaka analizlerde kullanılan kare hızı değerleri göz önünde tutulmalıdır (27). Diğer taraftan, numunedeki motilitenin değerlendirilmesi için gerekli olan kare hızı değeri ile kinematik parametrelerin belirlenmesi için gerekli olan kare hızı değeri arasında da önemli farklılıklar olabilir. Örneğin domuz spermasında total motilitenin belirlenmesi için 25 fps'lik bir kare hızı yeterli iken, aynı spermanın kinematik parametrelerinin doğru analizi için en uygun kare hızının 212 fps olduğu bildirilmiştir (41).

## Kaynaklar

1. Barth AD. Factors affecting fertility with artificial insemination. Vet Clin North Am Food Anim Pract 1993; 9: 275-289.
2. Kathiravan P, Kalatharan J, Karthikeya G, Rengarajan K, Kadirvel G. Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system--a review. Reprod Domest Anim 2011; 46: 165-172.
3. Li Y, Kalo D, Zeron Y, Roth Z. Progressive motility - a potential predictive parameter for semen fertilization capacity in bovines. Zygote 2016; 24: 70-82.

## 6. Sonuç

Spermatozoonların motilite oranları ile kinematik değerlerinin bilinmesi, dişi genital yoldaki göçlerinin başarısı açısından oldukça önemli olup bu özellikler aynı zamanda spermatozoonların *in vitro* ve *in vivo* fertilizasyon yetenekleri ile de ilişkilendirilmiştir. Bu sebeple, birçok türde spermatozoonların hareketliliğinin ve kinematik parametrelerinin objektif olarak ortaya konulması için CASA sistemlerinin kullanılması oldukça güven verici bir yöntemdir. Bununla birlikte, CASA sistemleri ile yapılan muayeneler açısından; farklı CASA sistemlerinin bulunması, muayene edilen spermanın türler arasında farklı özelliklere sahip olması, muayeneler için kullanılan lam tipi gibi gerekli ekipmanların değişkenlik gösterebilmesi, analizler için spermanın hazırlanması sırasında kullanılan sulandırıcının içeriği, spermanın sulandırılma oranındaki farklılıklar, muayene öncesi ve sırasındaki ortam sıcaklığı ile bekletme süresi gibi değişebilen koşullar, muayene sırasında görüntüleme alanı seçimi ve sayısı gibi kişisel değerlendirme farklılıklarının oluşabilmesi, sistemik ayarlarda kare hızı ve analiz süresi gibi farklı seçeneklerin bulunması şeklinde sıralanabilecek birçok faktör, laboratuvarlar arasında çoğu zaman bir örnekleğin sağlanamamasına yol açmakta olup elde edilen verilerin de geniş kapsamlı kabul edilebilirliğini ve kullanılabilirliğini sınırlamaktadır.

Bu problemi aşmak için, yapılan CASA analizleri öncesinde sperma örneklerinin hazırlanmasında belirli prosedürlerin oluşturulması ve analizler sırasında kullanılan sistemik ayarların tür ile sperma özellikleri dikkate alınarak standart hale getirilmesi gerekir. Ancak bu sayede belirlenecek parametre değerlerini etkileyebilecek sistemik ya da dişi faktörlerin etkinlik düzeyi en düşük seviyeye indirilerek elde edilecek bilgilerin doğru ve güvenilir olması sağlanabilir. Ayrıca muayeneler sırasındaki ortam koşullarının, kullanılan temel ekipmanların özelliklerinin ve yapılan değerlendirmelerde kullanılan sistem ayarlarına ait verilerin mutlaka muayene sonuç raporunda ayrıntılı olarak sunulması gerekir.

Diğer taraftan, spermatozoonların motilite yeteneği ile hız değerleri ve kinematik parametrelerinin daha etkin bir şekilde değerlendirilerek kullanılabilirlik ölçütlerinin belirlenmesi ve fertilizasyonla ilişkisinin bilimsel olarak daha net bir şekilde ortaya konulabilmesi için daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç olduğu da görülmektedir.

4. Loomis P. "What Is progressive motility?". <http://info.selectbreeders.com/blog/bid/152768/What-Is-Progressive-Motility/> / 28.09.2017.
5. Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology 2002; 57: 149-79.
6. Amann RP, Waberski D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. Theriogenology 2014; 81: 5-17.
7. İnan ME, Güngör ř, Ata A. Spermatozoa motilitesinin değerlendirilmesinde bilgisayar destekli sperm analiz

- sisteminin kullanımı. *Türkiye Klin J Reprod Artif Insemin Special Topics* 2017; 3: 73-78.
8. Yeste M, Bonet S, Rodríguez-Gil JE, Rivera Del Álamo MM. Evaluation of sperm motility with CASA-Mot: Which factors may influence our measurements? *Reprod Fertil Dev* 2018; 30: 789-798.
  9. Mortimer ST. CASA - practical aspects. *J Androl* 2000; 515-524.
  10. Wijchman JG, De Wolf BTHM, Jager S. Evaluation of a computer aided semen analysis system with sperm tail detection. *Hum Reprod* 1995; 10: 2090-2095.
  11. Sönmez M. Reprodüksiyon, Suni Tohumlama ve Androloji Ders Notları. Fırat Üniv Veteriner Fak Dölerme ve Suni Tohumlama AD Elazığ, 2022.
  12. Bearden HJ, Fuquay JW, Willard ST. *Applied Animal Reproduction*. 6th Edition, New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2004.
  13. WHO. *Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*. 6th Edition, 2021.
  14. Robayo I, Montenegro V, Valdes C, Cox JF. CASA assessment of kinematic parameters of ram spermatozoa and their relationship to migration efficiency in ruminant cervical mucus. *Reprod Dom Anim* 2008; 43: 393-399.
  15. Contri A, Valorz C, Faustini M, Wegher L, Carluccio A. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology* 2010; 74: 424-435.
  16. Hafez B, Hafez ESE. *Reproduction in Farm Animals*, 7th Edition, Lippincott Williams and Wilkins, Maryland, USA, 2000.
  17. Holt W, Watson P, Curry M, Holt C. Reproducibility of computer aided semen analysis: Comparison of five different systems used in a practical workshop. *Fertil Steril* 1994; 62: 1277-1282.
  18. Castellini C, Dal Bosco A, Ruggeri S, G Collodel G. What is the best frame rate for evaluation of sperm motility in different species by computer-assisted sperm analysis? *Fertil Steril* 2011; 96: 24-27.
  19. Barth AD, Arteaga AA, Brito FC, Palmer W. Use of internal artificial vaginas for breeding soundness evaluation in range bulls: An alternative for electroejaculation allowing observation of sex drive and mating ability. *Anim Reprod Sci* 2004; 84: 315-325.
  20. Marco-Jimenez F, Puchades S, Gadea J, Vicente JS, Viudesde-Castro MP. Effect of semen collection method on pre- and post-thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology* 2005; 64: 1756-1765.
  21. Nur Z, Dogan I, Soylu MK, Ak K. Effect of different thawing procedures on the quality of bull semen. *Revue Med Vet* 2003; 154: 487-490.
  22. Senger PL. Handling frozen bovine semen-factors which influence viability and fertility. *Theriogenology* 1980; 13: 51- 62.
  23. Muino R, Rivera MM, Rigau T, Rodriguez-Gil JE, Pena AI. Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. *Anim Reprod Sci* 2008; 109: 50-64.
  24. Iguer-Ouada M, Versteegen JP. Evaluation of the Hamilton Thorn computer-based automated system for dog semen analysis. *Theriogenology* 2001; 55: 733-749.
  25. Sherins RJ. Clinical use and misuse of automated semen analysis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1991.
  26. Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, Kruif de A. Use of the sperm quality analyzer (SQA II-C) for the assessment of dog sperm quality. *Reprod Domest Anim* 2002; 37: 158-163.
  27. Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, Kruif de A. Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology* 2003; 60: 1553-1568.
  28. Davis RO, Katz DF. Standardization and comparability of CASA instruments. *J Androl* 1992; 13: 81-86.
  29. Farrell PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote RH. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer assisted sperm analysis (CASA) and their relationship to fertility. *Theriogenology* 1998; 49: 871-879.
  30. Kathiravan P, Kalatharan J, John Edwin M, Veerapandian C. Post-thaw sperm motion characteristics of different crossbred bull spermatozoa assessed by computer assisted semen analyzer. *J Remount Vet Corps* 2005; 44: 33-38.
  31. Hoflack G, Opsomer G, Rijsselaere T, et al. Comparison of computer assisted sperm motility analysis parameters in semen from Belgian Blue and Holstein-Friesian bulls. *Reprod Domest Anim* 2007; 42: 153-161.
  32. Tuli RK, Schmidt Baulain R, Holtz W. Computer assisted motility assessment of spermatozoa from fresh and frozen-thawed semen of the bull, boar and goat. *Theriogenology* 1992; 38: 487-490.
  33. Hirai M, Cerbito WA, Wijayagunawardane MPB, et al. The effect of viscosity of semen diluent on motility of bull spermatozoa. *Theriogenology* 1997; 47: 1463-1478.
  34. Vantman D, Banks SM, Koukoulis G, Dennison L, Sherins RJ. Assessment of sperm motion characteristics from fertile and infertile men using a fully automated computer-assisted semen analyzer. *Fertil Steril* 1989; 51: 156-161.
  35. Neuwinger J, Knuth UA, Nieschlag E. Evaluation of the Hamilton-Thorne motility analyser for routine semen analysis in an infertility clinic. *Int J Androl* 1990; 13: 100-109.
  36. Amann RP. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately. *J Androl* 1989; 10: 89-98.
  37. Gacem S, Catalán J, Valverde A, Soler C, Miró J. Optimization of CASA motility analysis of donkey sperm: Optimum frame rate and values of kinematic variables for different counting chamber and fields. *Animals* 2020; 10: 1-16.
  38. Bompard D, Vazquez RF, Gomez R, et al. Combined effects of type and depth of counting chamber, and rate of image frame capture, on bull sperm motility and kinematics. *Anim Reprod Sci* 2019; 209: E1-9.
  39. Karthikeya G. Computer automated motility and morphometric analysis of bull and buck spermatozoa. MVSc Thesis, India Chennai: Tamil Nadu Veterinary Animal Science University, 2003.

40. Palacín I, Vicente-Fiel S, Santolaria P, Yániz JL. Standardization of CASA sperm motility assessment in the ram. *Small Rum Res* 2013; 112: 128-135.
41. Valverde A, Areán H, Fernández A, et al. Combined effect of type and capture area of counting chamber and diluent on Holstein bull sperm kinematics. *Andrologia*, 2019; 51: 1-10.
42. Farrell P, Trouern-Trend V, Foote RH, Doualas-Hamilton D. Repeatability of measurements on human, rabbit and bull sperm by computer-assisted sperm analysis when comparing individual fields and means of 12 fields. *Fertil Steril* 1995; 64: 208-210.
43. Anonim. "Fps nedir?" <https://www.guvenlikonline.com/makale/221/fps-nedir.html> / 27.12.2021.
44. Owen DH, Katz DF. Sampling factors influencing accuracy of sperm kinematic analysis. *J Androl* 1993; 14: 210-221.
45. Mortimer ST, Swan MA. Kinematics of capacitating human spermatozoa analysed at 60 Hz. *Hum Reprod.* 1995; 10: 873-879.