



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2024; 38 (1): 21 - 29
http://www.fusabil.org

Dondurulmuş Boğa Spermatozoonlarının Progresif Motilitesi, Kinematik Parametreleri ve Mitokondriyal Membran Potansiyeli Üzerine Vajinal Çözdürme Yönteminin Etkisi *

Mustafa SÖNMEZ^{1, a}
Sinem BAYRAK^{1, b}
Aslıhan ÇAKIR CİHANGİROLU^{2, c}
İbrahim Halil GÜNGÖR^{1, d}
Tutku Can ACISU^{1, e}

¹ Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Dölerme ve Suni
Tohumlama Ana Bilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0003-0281-7228

^b ORCID: 0009-0007-4988-3368

^c ORCID: 0000-0003-3365-8960

^d ORCID: 0000-0002-5250-1478

^e ORCID: 0000-0002-0882-937X

Bu çalışmanın amacı, donmuş boğa spermasında iki farklı çözme yönteminin (inek vajinasında ya da ılık su banyosunda) çözülme sonrası spermatolojik parametreler üzerindeki etkilerini karşılaştırmaktır. Çalışmada dört adet Simental boğaya ait toplam kırk sekiz adet 0.25 mL'lik payet kullanıldı. Payetler ılık suda çözülme (standart) yönteminde 38°C'deki su banyosunda 25 saniyede çözülürken, vajinal çözülme yönteminde ineğin vajinasında 3 dakikada çözülürdü. Çözülürken boğa spermasının hareketlilik ve kinematik parametre değerleri bir bilgisayar destekli sperm analiz (CASA) sistemi kullanılarak değerlendirildi. Ayrıca spermatozoonun mitokondriyal membran potansiyeli Flow-sitometri ile belirlendi. Ilık su banyosunda çözülürken örneklerle karşılaştırıldığında vajinal çözülme yöntemi ile çözülürken spermalarda; total motilite, yüksek mitokondriyal aktiviteye sahip spermatozoon oranı, hızlı spermatozoon oranı ve VCL önemli derecede daha düşük ($P<0.05$) iken, ölü spermatozoon oranı, LIN ve STR önemli derecede daha yüksekti ($P<0.05$). Bununla birlikte, progresif motilite, VAP, VSL, WOB, ALH, BCF açısından iki çözülme yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu ($P>0.05$). Sonuç olarak donmuş boğa spermasını doğrudan tohumlama kateterine yerleştirip ineğin vajinasında çözülmesi; çözülme sonrası yeterli spermatolojik kalitenin elde edilmesini sağlayabilir. Bununla birlikte, bu yöntemi saha koşullarında kullanmadan önce, daha büyük popülasyonlardaki bireysel farklılıkların ve inkübasyon süresinin çözülme sonrası spermatolojik özellikler üzerindeki etkilerini belirlemek faydalı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Boğa, sperma, vajinal çözülme, CASA, flow-sitometri, motilite

The Effect of Vaginal Thawing Method on Progressive Motility, Kinematic Parameters and Mitochondrial Membrane Potential of Frozen Bull Spermatozoa

The objective of this study was to compare the effects of two different thawing methods (in the vagina of cow or in warm water bath) on post-thaw spermatological parameters in frozen bull semen. A total forty-eight 0.25 mL straws belonging four Simmental bulls were used in this study. While straws were thawed in a water bath at 38°C for 25 seconds in warm water thawing (standard) method, they were thawed in the vagina of cow by holding for 3 minutes in vaginal thawing method. Motility and kinematic parameter values of thawed bull semen were evaluated using a computer-assisted sperm analyzer (CASA). In addition, mitochondrial membrane potential of spermatozoa was determined by using flow-cytometry. While the total motility, the rate of sperm with high mitochondrial activity, the rate of rapid spermatozoon and VCL was significantly lower ($P<0.05$), the rate of dead spermatozoon, LIN and STR was significantly higher ($P<0.05$) in vaginal thawing method compared to samples thawed in warm water bath. However, there was no statistically significant difference between the two thawing methods in terms of progresif motility, VAP, VSL, WOB, ALH, and BCF ($P>0.05$). In conclusion, it can provide sufficient spermatological quality after thawing by placing frozen bull semen directly into the insemination catheter and thawing it in the cow's vagina. However, it may useful to determine the effects of individual differences in larger populations and incubation time on post-thaw spermatological characteristics before using this method in field conditions.

Key Words: Bull, semen, vaginal thawing, CASA, flow-cytometry, motility

Giriş

Gliserolün kriyoprotektif etkisinin keşfedilmesinin ardından spermanın dondurulması alanında önemli gelişmeler kaydedilmiş ve özellikle boğa spermasının dondurularak uzun süreli olarak saklanabilmesindeki başarı; Dünya genelinde sığır yetiştiriciliği alanında yürütülen suni tohumlama uygulamalarının önemli ölçüde yaygınlaşmasını sağlamıştır (1, 2). Suni tohumlama yönteminin saha şartlarında etkin bir şekilde uygulanmaya devam etmesi, her şeyden önce yapılan uygulamalar sonucunda yeterli düzeyde gebelik oranı elde edilmesine bağlıdır. Başarılı bir fertilizasyonun gerçekleşebilmesi; spermatozoon ve ovumun dişi genital kanalda uygun yer, ortam ve zamanda karşılaşmasına bağlıdır. Bunun için spermatozoonların kendi hareket yetenekleri ile dişi genital kanalda ilerleyerek fertilizasyon bölgesine ulaşmaları gerekir. Bu sebeple ineklerde suni tohumlama uygulamalarında kullanılacak dondurulmuş boğa spermasının çözülme sonrası kalitesinin belirli standartların

* Yürütülen araştırma, TÜBİTAK-2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri kapsamında 02.03.2023 tarihinde kabul edilen 1919-B01-2220414 no'lu proje ile desteklenmiş olup çalışma sırasında kullanılan sarf malzemelerin bir bölümü bu proje desteği ile finanse edilmiştir.

Geliş Tarihi : 10.08.2023
Kabul Tarihi : 04.01.2024

Yazışma Adresi Correspondence

Mustafa SÖNMEZ
Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Dölerme ve Suni Tohumlama
Ana Bilim Dalı,
Elazığ – TÜRKİYE

msonmez@firat.edu.tr

üzerinde olması gerekir (3, 4). Çözdürülmüş bir payet içerisindeki spermanın spermatozojik özelliklerinin belirlenmesinde en yaygın olarak kullanılan yöntem; spermanın motilite oranının belirlenmesidir. Bunun yanında, spermatozoonların birtakım hareket özelliklerinin bilinmesi de spermatozoonların hareket çeşitliliğinin değişik yönlerden karşılaştırılması açısından önemlidir. Spermatozoonların hareket özelliklerinin doğru tespit edilmesinde, Bilgisayar Destekli Sperm Analiz (CASA) sistemleri önemli bir araçtır. Bu açıdan, CASA sistemleri sayesinde total ve progresif motilite değerleri ile birlikte çeşitli kinematik parametreleri de ayrıntılı bir şekilde incelenebilir (5, 6).

Spermatozoonun kuyruk bölümünün orta kısmında bulunan mitokondriler, oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP üreterek kuyruğunun koordineli bir şekilde kamçısız hareket etmesini sağlarlar. ATP üretiminin devamlılığı için yüksek mitokondriyal membran potansiyeli gereklidir. Ancak spermatozoonların mitokondrilerinde oluşan bir hasar, ATP üretiminde ve dolayısıyla spermatozoon hareketliliğinde bir azalmaya yol açar. Bu nedenle, dondurulmuş spermadaki spermatozoonların çözündürme sonrası fizyolojik durumunu incelemek amacıyla hareket özelliklerinin yanında mitokondriyal membran potansiyelinin de belirlenmesi önemlidir. Bu açıdan spermatozojik muayeneler kapsamında özel floresan boyalar yardımıyla süspanسیون halinde bulunan spermatozoonların flow sitometri cihazının kılcal kanalı boyunca tek tek geçmesi sağlanarak mitokondriyal membran potansiyelinin değerlendirilmesi oldukça hızlı ve güvenilir bir şekilde yapılmaktadır (7-9).

Birçok türde dondurulmuş sperma ile yapılan suni tohumlama uygulamaları sonucu elde edilen gebe kalma oranları, doğal aşım sonucu elde edilen oranlara göre daha düşük olmasına rağmen, özellikle siğir yetiştiriciliğinde elde edilen sonuçların oldukça tatmin edici olması, bu türde suni tohumlama yönteminin kullanılabilirliği açısından önemli bir uygulama alanı oluşturmuştur. Bununla birlikte, siğirlerde suni tohumlama sonucu elde edilen gebelik oranlarını etkileyen en önemli faktörler arasında; hayvanın fizyolojik durumu, tohumlama zamanı, çevresel faktörler ve tohumlamada kullanılan spermanın kalitesi sayılabilir. Bu faktörler içinde suni tohumlama uygulamalarında kullanılacak dondurulmuş spermanın çözündürme sonrası kalitesinin yüksek olması oldukça önemlidir. Bu yüzden saha şartlarında kullanılan dondurulmuş boğa spermalarının, çözündürme sonrası belirlenen kalite standartlarını taşıması istenmektedir (10, 11).

Dişi genital kanala aktarıldığı sırada kullanılan payetlerdeki dondurulmuş sperma kalitesinin düşük olması veya herhangi bir sebebe bağlı olarak azalması, suni tohumlama uygulamalarındaki başarı oranını düşürürken, aynı zamanda önemli bir ekonomik kaybın oluşmasına da yol açabilir (12, 13). Bu yüzden saha koşullarında yapılan uygulamalar sırasında, dondurulmuş sperma payetlerinin sıvı azot tankından alınmasından hayvana uygulanıncaya kadar geçen her aşama titizlikle ve kurallarına uygun bir şekilde yürütülmelidir. Bu uygulamalar içerisinde dondurulmuş sperma içeren payetlerin çözündürme prosedürü ve

çözöldükten sonra maruz kaldığı ortam oldukça önemli bir aşama olup spermatozoonların motilitesini ve hareket özelliklerini etkileyebilir (14). Bu açıdan, çözödürme işlemi sırasında hatalı uygulamaların yapılması, en iyi şartlarda dondurulmuş kaliteli payetlerin bile çok düşük motilite sonuçları vermesine neden olabilir (15).

Günümüzde dondurulmuş sperma payetlerinin sıcak su banyosu içerisinde tutularak çözödürülmesi; pratikliği ve saha şartlarında uygulanabilirliği açısından günümüzde en iyi çözödürme yöntemi olarak kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalarda (16-18) saha şartları düşünöldüğünde; dondurulmuş boğa sperması içeren 0.25 mL hacmindeki mini payetlerin 38°C'deki su banyosu içerisinde 25-30 saniyede çözödürülmesi tavsiye edilmektedir. Su banyosu sıcaklığının 38°C olmasının en önemli avantajı; kolay ayarlanabilmesi ve payetin bu sıcaklık derecesinde 25 saniyeden daha uzun bir süre tutulması durumunda bile spermanın sıcaklığının hayvanın vücut sıcaklığını aşmamasıdır (19). Bu yöntemin dışında, dondurulmuş boğa sperması içeren payetin su banyosunda 22°C veya 28°C'de 25 saniye süre ile tutularak çözödürülmesi ya da payetin gömlek cebinde veya avuç içinde tutularak çözödürülmesi gibi yöntemler, hatalı çözödürme yöntemleri olarak kabul edilmekte olup çözödürme işleminden sonra yeterli motilitenin sağlanamaması nedeniyle pratik olarak kullanılması uygun görülmemektedir. Diğer taraftan, dondurulmuş sperma payetinin sıvı azot tankından alındıktan sonra ineğin vajinası içerisinde tutularak çözödürülmesi yönteminin sıcak su banyosunda çözödürme yöntemine göre özel koşullarda kullanılabilir alternatif bir yöntem olarak önerildiği görölmektedir. Bu amaçla yapılan uygulamalar, tohumlanacak ineğin hemen yakınında bulundurulmuş sıvı azot tankından alınan payetin çok kısa bir sürede ineğin vajinası içerisine konularak belirli bir süre bekletilip çözödürülmesi şeklindedir. Ancak bu şekilde gerçekleştirilen çözödürmelerde normale yakın bir oranda motilite sağlanabilmesine rağmen, payetin aşırı soğuk olması tohumlanacak inekte stres faktörlerinin uyarılmasına neden olmaktadır. Bu sebeple, yöntemin kullanılması zorunlu bir hal alırsa, stres faktörlerini azaltmak için payetin işletmedeki bir başka ineğin vajinasında çözödürülmesi tavsiye edilmektedir. Ayrıca, payetin azot tankından alınmasından sonra uzun süre taşınmasını gerektiren bir ortam varsa bu yöntem önemli bir risk oluşturabilir (20, 21).

Bu yöntemin modifiye edilmiş bir alternatifi ise; azot tankından alınan payetin suni tohumlama katateri içine direkt olarak yerleştirilip ucu kesildikten sonra pistole kılıfı takılarak hazırlanan kataterin, suni tohumlama yapılacak ineğin vajinasına hızlı bir şekilde yerleştirilip çözödürenin ineğin genital kanalında sağlanması şeklindedir. Bu şekildeki bir uygulamanın saha şartlarında denendiği bazı çalışmalarda (17, 22) suda çözödürme yöntemiyle karşılaştırıldığında benzer gebelik oranları elde edildiği ileri sürölmektedir. Bu yöntem, diğer vajinal çözödürme yöntemine göre sıvı azotun soğutucu etkisinden hayvanın strese girmesini önlediği gibi aynı zamanda sıcaklığın sabit kalması ve stabil bir çözöünme sağlanması açısından da bir avantaj sağlayabilir.

Bununla birlikte, kataterin hazırlanması ve hayvana uygulanma süresi içinde gerçekleşen çözünme hızı elde edilecek sperma kalitesini olumsuz yönde etkileyebilir. Yapılan saha çalışmalarında (17, 22) vagina içinde çözündürme yönteminin çözündürme sonrası spermatolojik özellikleri etkilenme düzeyi hakkında ayrıntılı bir veriye rastlanmamıştır. Bu açıdan, soğuk tohumlama olarak adlandırılan ve alternatif bir çözündürme yöntemi olarak düşünülen vajinal çözündürme yönteminde, payetlerdeki spermatozoonların başlangıç total ve progresif motilite değerleri, yüksek mitokondriyal membran potansiyeli ve kinematik parametrelerinin etkilenme düzeyinin bilimsel yöntemlerle ortaya koyulması, saha uygulamalarında kullanılabilirliğinin belirlenmesi açısından oldukça faydalı olacaktır. Ayrıca payetler içerisinde dondurulmuş boğa spermalarının vajinal yöntemle çözündürülmesi neticesinde normal standart protokol olan su banyosunda çözündürme yöntemine benzer bir spermatolojik başarı sağlanırsa; suni tohumlama öncesi yapılan hazırlıklara daha pratik bir uygulama şekli kazandırılarak pozitif bir etki sağlanabilir.

Bu bilgiler ışığında yürütülen bu çalışma, vajinal çözündürme yöntemi ile su banyosunda çözündürme yönteminin dondurulmuş boğa spermatozoonlarının çözündürme sonrası total ve progresif motilitesi ile kinematik parametreleri ve mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkilerinin karşılaştırılması amacıyla yapıldı.

Gereç ve Yöntem

Araştırma ve Yayın Etiği: Çalışma için Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (FÜHADYEK)'nden onay alındı (Tarih: 22.03.2023 - Protokol No: 2023/05-06).

Araştırmanın Yeri: Araştırmanın hayvan üzerinde yapılan deneysel aşamaları; Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Hastanesi, Suni Tohumlama Uygulama biriminde yapılırken, laboratuvar muayene ve analizleri ise Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Androloji Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Hayvan Materyali: Araştırmada materyal olarak her grup için Simental ırkından 4 farklı damızlık boğaya ait farklı zamanlarda üretilmiş dondurulmuş sperma örneklerinden 6 adet payet olmak üzere her iki çözündürme yöntemi için toplam 48 payet kullanıldı. Gobleter içerisinde temin edilen 0.25 mL'lik payetler, araştırma süresince sıvı azot tankındaki sıvı nitrojen içerisinde (-196°C'de) muhafaza edildi. Araştırma sırasında, dondurulmuş sperma payetlerinin vajinada çözündürülmesi amacıyla; hayvan materyali olarak 3-4 yaşlarında genel sağlık durumu iyi ve herhangi bir reproduktif problemi olmayan bir inek kullanıldı.

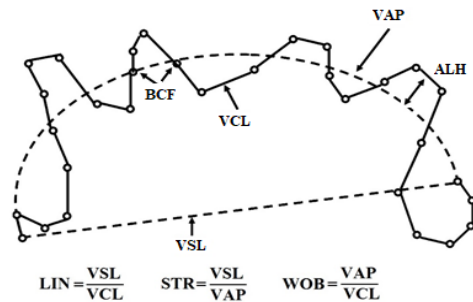
Deneysel Aşama: Dört boğa için dondurulmuş sperma içeren payetler; kontrol grubu (n=24) ve araştırma grubu (n=24) olarak iki gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki payetler; sıvı azot tankından alınıp 38°C'de hazırlanmış su banyosu içinde 25 saniye süreyle bekletilerek çözündürüldü. Sürenin sonunda su banyosundan alınıp bir peçete ile kurulan payetler,

sunî tohumlama kataterine yerleştirilerek üzerine pistole kılıfı takılıp normal prosedürlere uygun şekilde hazır hale getirildi. Bu işlemin ardından katater, hazır tutulan bir ineğin vajinası içerisine yerleştirilerek 3 dakika boyunca sabit olarak tutuldu. Araştırma grubundaki payetler ise; sıvı azot tankından alınıp doğrudan sunî tohumlama kataterine yerleştirildi. Bunun ardından bir makas yardımıyla ucu kesilen payetlerin üzerine pistole kılıfı geçirildi. Hazır hale getirilen katater, hızlı bir şekilde (10 saniyeden daha az bir sürede) hazır tutulan ineğin vajinası içerisine sokuldu. Katater, cervixin hemen önüne kadar ilerletilip burada 3 dakika boyunca tutularak donmuş spermanın vajina sıcaklığında (38.4°C'de) çözünmesi sağlandı. Her iki grup için de, tamamlanan inkübasyon süresinin ardından hayvanın vajinasından çıkarılan katater içerisindeki sperma, 37°C'ye ısıtılmış bir ependorf tüpüne aktarılıp sıcaklığı korunarak hızlı bir şekilde muayene laboratuvarına nakledildi. Bunu takiben, laboratuvarında gerekli spermatolojik muayene ve analizler gerçekleştirilerek sonuçlar kaydedildi.

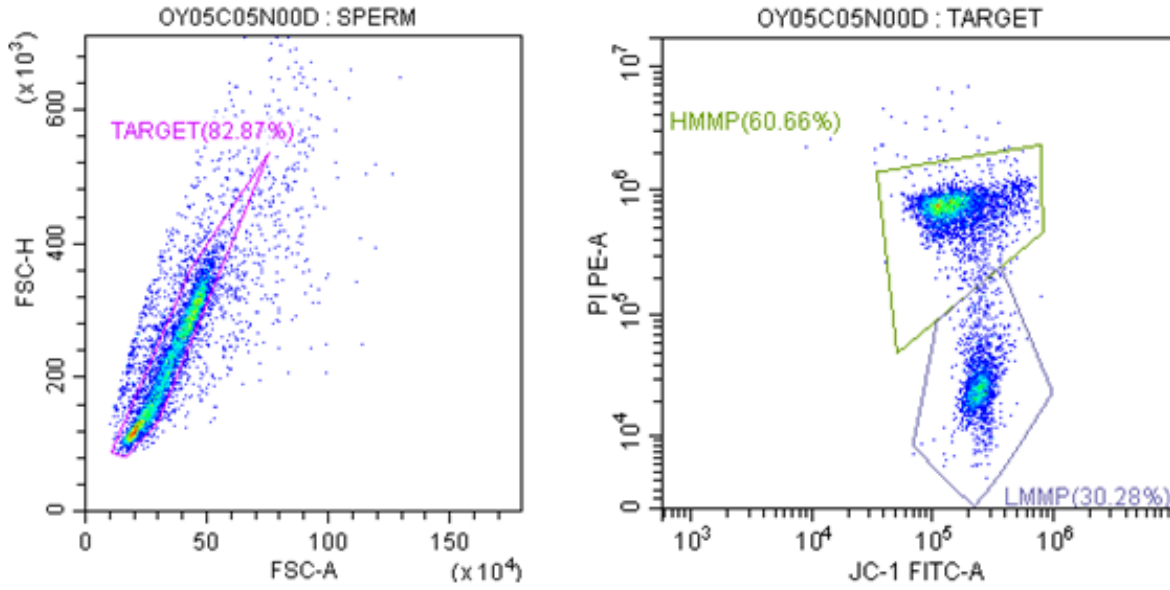
Spermatolojik Muayene ve Analizler

Motilite Değerleri ve Kinematik Parametreleri:

Sperma örneklerine ait total ve progresif motilite değerleri ile kinematik parametreleri Bilgisayar Destekli Sperm Analiz (CASA) cihazıyla (ISASv1.2, Proiser®) belirlendi. Alınan sperma örneği, özel bir sperma sulandırıcısı (Bioxcell) ile 1:10 oranında sulandırıldıktan sonra 3 µL alınarak özel lam (Spermtrack 20 µm) üzerine damlatılıp lamel kapatıldıktan sonra sisteme bağlı faz-kontrast mikroskopun 37°C'ye sabitlenmiş ısıtma tablalı sehpasına yerleştirildi. Ardından programın motilite modülündeki görüntü sistemi üzerinden en az 5 farklı saha incelenerek ortalama değerler kaydedildi. Bu muayene esnasında total ve progresif motilite değerleri ile birlikte spermatozoonların hareket özelliklerine bağlı olarak oluşan kinematik parametrelerine ait değerlerden VCL (Eğrisel yol hızı-µm/s), VAP (Ortalama yol hızı-µm/s), VSL (Doğrusal yol hızı-µm/s), LIN (Doğrusallık oranı-%), STR (Gidiş doğrultusu-%), WOB (Yalpalama oranı-%), ALH (Başın yer değiştirme genliği-µm/s) ve BCF (Başın çapraz geçişi-Hz) (Şekil 1) tespit edildi. Bunun yanında spermatozoonlar hız değerlerine göre; hızlı hareket eden spermatozoonlar (hızlı), orta hızda hareket eden spermatozoonlar (orta), yavaş hareket eden spermatozoonlar (yavaş) ve hareket etmeyen spermatozoonlar (hareketsiz-ölü) şeklinde sınıflandırıldı (yavaş < 25 µm < orta < 50 µm < hızlı) (23).



Şekil 1. Spermatozoonun kinematik parametre değerlerinin sematik görünümü



Şekil 2. Flow sitometri cihazı ile yapılan analizlerde yüksek mitokondriyal potansiyele sahip olan spermatozoonların grafiksel olarak gösterimi. HMMP: Yüksek Mitokondriyal Membran Potansiyeli, LMMP: Düşük Mitokondriyal Membran Potansiyeli

Tablo 1. Farklı çözdüme yöntemi uygulanan dondurulmuş boğa sperması örneklerindeki çözdüme sonrası total ve progresif motilite değerleri ile yüksek mitokondriyal membran potansiyeline sahip spermatozoon oranları (n=6)

Sperma	Total Motilite (%)		Progresif Motilite (%)		YMMP (%)	
	SÇ	VÇ	SÇ	VÇ	SÇ	VÇ
Boğa 1	77.1±8.0 ^a	63.4±6.0 ^b	51.0±7.6 ^a	49.4±4.9 ^a	70.0±10.8 ^a	53.1±3.0 ^b
Boğa 2	81.0±4.4 ^a	67.5±6.7 ^b	47.0±4.0 ^a	45.5±6.6 ^a	76.6±2.5 ^a	50.8±3.5 ^b
Boğa 3	84.2±3.5 ^a	68.1±6.8 ^b	48.4±7.6 ^a	45.0±9.6 ^a	75.6±2.7 ^a	57.2±4.8 ^b
Boğa 4	81.5±1.9 ^a	72.1±5.9 ^b	57.1±1.5 ^a	53.1±5.4 ^a	80.0±1.6 ^a	57.3±4.6 ^b
Genel	81.0±5.3 ^a	67.8±6.7 ^b	50.9±6.7 ^a	48.2±7.2 ^a	75.5±6.5 ^a	54.6±4.7 ^b

^{a,b}: Her bir parametre için aynı satır içinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemlidir (P<0.05). SÇ: Suda çözdüme, VÇ: Vajinal çözdüme, YMMP: Yüksek Mitokondriyal Membran Potansiyeli

Yüksek Mitokondriyal Membran Potansiyeli:

Yüksek mitokondriyal membran potansiyeline sahip spermatozoonların oranı, floresan bir boya olan JC-1 (T3168, ThermoFisher Scientific, USA) ayracı ile floresan boyama tekniği kullanılarak Flow sitometri cihazı (Cytotflex, Beckman Coulter®, USA) yardımıyla belirlendi. Muayene sırasında 1:4 oranında fosfat buffer sulandırıcısı ile sulandırılmış sperma örneklerinden 100 µL alınarak 37°C'de tutulan 0.5 mL'lik mikro tüplere konuldu. Bu sperma örneklerinin üzerine 2.5 µL JC-1 ilave edilerek 37°C'de 30 dakika süreyle karanlık bir ortamda inkübe edildi. Bu sürenin tamamlanmasının ardından floresan boya ilave edilmiş sperma solüsyonu Flow sitometri cihazındaki özel bölme yerleştirilerek gerekli sayım analizleri yapıldı. Oluşan grafiklerde (Şekil 2) spermatozoonlar boya alma özelliklerine göre değerlendirilip yüksek ve düşük mitokondriyal potansiyele sahip olanlar şeklinde orantısız (%) olarak sınıflandırıldı (24).

İstatistiki Analiz:

İstatistiki analizler için SPSS (Version 22.0) istatistik programı kullanıldı. Veriler ortalama ± standart sapma olarak sunuldu. Verilerin değerlendirilmesi amacıyla öncelikle normallik testi uygulandı. Normal değer gösteren veriler için gruplar arası farklılıkların belirlenmesi amacıyla t-testi kullanıldı. Diğer taraftan nonparametrik değer gösteren veriler için ise Mann-Whitney-U testi kullanıldı. Tüm analizlerde P değerinin 0.05'den daha küçük olduğu durumlar istatistiksel açıdan önemli olarak kabul edildi.

Bulgular

Yapılan çalışmada dondurulmuş sperma örneklerinin iki farklı çözdüme yöntemi kullanılarak çözdümlenmesi sonrası belirlenen total ve progresif motilite değerleri ile ortalama yüksek mitokondriyal aktiviteye sahip spermatozoon oranları Tablo 1'de sunuldu. Sunulan değerler incelendiğinde; vajinal yöntemle çözdümlenen spermalarda sıcak suda çözdümlenen örneklerle göre çözdüme sonrası ortalama total motilite

ve yüksek mitokondriyal membran potansiyeline sahip spermatozoon oranında önemli derecede bir azalma olduğu ($P<0.05$) belirlenirken, progresif motilite değeri açısından ise çözündürme yöntemleri arasında istatistiki yönden önemli derecede bir farklılık olmadığı ($P>0.05$) tespit edildi.

Sunulan çalışmada dondurulmuş sperma örneklerinin iki farklı çözündürme yöntemleri kullanılarak çözündürülmesi sonrası belirlenen hız ölçüt değerlerinin oransal dağılımı Tablo 2'de gösterildi. Buna göre, vajinal yöntemle çözündürülen spermalarda sıcak suda çözündürülen örneklerle göre çözündürme sonrası hızlı hareket eden spermatozoon oranının önemli derecede ($P<0.05$) düşük olduğu ve ölü spermatozoon oranının ise önemli derecede ($P<0.05$) yüksek olduğu belirlendi. Bununla birlikte, çözündürme yöntemleri arasında diğer hız ölçütlerinin (orta hızlı-yavaş) oransal dağılımı açısından önemli derecede bir farklılık oluşmadığı ($P>0.05$) bulundu.

Yapılan çalışmada dondurulmuş sperma örneklerinin iki farklı çözündürme yöntemi kullanılarak

çözündürmesi sonrası belirlenen ortalama kinematik parametre değerleri Tablo 3a ve b'de sunuldu. Verilen değerlere göre, vajinal yöntemle çözündürülen spermalarda sıcak suda çözündürülen örneklerle göre çözündürme sonrası ortalama VCL değerinin önemli derecede ($P<0.05$) düşük olduğu belirlendi. Bununla birlikte, diğer hız değerleri olan VAP ve VSL değerleri ile başın yayılım genişliği olan ALH değerlerinin çözündürme yöntemleri arasında benzerlik gösterdiği ($P>0.05$) görüldü.

Diğer taraftan hız değerlerine göre hesaplanan ve spermatozoon hareketlerinin doğrusallığını gösteren LIN ve STR değerlerinin çözündürme sonrası vajinal yöntemle çözündürülen spermalarda, sıcak suda çözündürülen örneklerle göre önemli derecede ($P<0.05$) yüksek olduğu dikkati çekti. Bununla birlikte, spermatozoon başının yalpalama şiddeti olan WOB değeri ile başın geçiş frekansı olan BCF değeri açısından çözündürme yöntemleri arasında her hangi bir farklılık ($P>0.05$) tespit edilmedi.

Tablo 2. Farklı çözündürme yöntemi uygulanan dondurulmuş boğa sperması örneklerinin çözündürme sonrası spermatozoonların hız ölçüt değerlerine göre oransal dağılımı (n=6)

Sperma	Ölü (Hareketsiz) (%)		Yavaş Hareketli (%)		Orta Hızda Hareketli (%)		Hızlı (%)	
	SÇ	VÇ	SÇ	VÇ	SÇ	VÇ	SÇ	VÇ
Boğa 1	22.9±8.0 ^b	36.6±5.9 ^a	8.1±2.9 ^a	8.0±1.9 ^a	6.9±2.2 ^a	3.7±1.9 ^b	62.1±6.4 ^a	51.8±5.3 ^b
Boğa 2	19.0±4.4 ^b	32.5±6.7 ^a	8.7±1.1 ^a	9.4±1.2 ^a	9.7±2.0 ^a	9.4±2.3 ^a	62.6±5.8 ^a	48.7±6.6 ^b
Boğa 3	15.8±3.5 ^b	31.9±6.8 ^a	11.4±2.6 ^a	11.5±3.9 ^a	8.4±1.0 ^a	7.2±2.1 ^a	64.4±2.9 ^a	49.4±8.1 ^b
Boğa 4	18.5±1.9 ^b	27.9±5.9 ^a	7.5±2.0 ^a	9.1±1.5 ^a	6.6±1.2 ^a	5.8±1.8 ^a	67.5±3.8 ^a	57.2±6.2 ^b
Genel	19.0±5.3 ^b	32.2±6.7 ^a	8.9±2.6 ^a	9.5±2.6 ^a	7.9±2.0 ^a	6.5±2.9 ^a	64.1±5.1 ^a	51.8±7.1 ^b

^{a,b}: Her bir parametre için aynı satır içinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemlidir ($P<0.05$). SÇ: Suda çözündürme, VÇ: Vajinal çözündürme

Tablo 3a. Farklı çözündürme yöntemi kullanılarak çözündürülen dondurulmuş boğa sperması örneklerinin çözündürme sonrası kinematik parametre değerleri (n=6)

Sperma	VCL (µm/s)		VAP (µm/s)		VSL (µm/s)		ALH (µm/s)	
	SÇ	VÇ	SÇ	VÇ	SÇ	VÇ	SÇ	VÇ
Boğa 1	138.7±14.1 ^a	118.9±4.1 ^b	90.2±16.5 ^a	77.9±4.9 ^a	76.0±12.2 ^a	72.2±6.2 ^a	4.6±0.6 ^a	4.2±0.4 ^a
Boğa 2	123.4±5.3 ^a	105.5±2.0 ^b	75.0±3.7 ^a	66.5±2.6 ^b	55.2±4.4 ^a	56.8±1.9 ^a	4.0±0.2 ^a	3.7±0.2 ^a
Boğa 3	139.5±5.7 ^a	126.9±4.7 ^b	100.0±18.4 ^a	95.3±16.5 ^a	77.5±10.5 ^a	82.7±13.2 ^a	4.3±0.6 ^a	3.8±0.5 ^a
Boğa 4	142.8±10.4 ^a	126.2±5.3 ^b	82.2±2.4 ^a	76.6±2.9 ^a	70.0±1.7 ^a	68.6±2.3 ^a	5.0±0.5 ^a	4.7±0.3 ^a
Genel	136.1±11.8 ^a	119.4±9.6 ^b	86.8±15.1 ^a	79.1±13.4 ^a	69.7±11.9 ^a	70.0±11.7 ^a	4.5±0.6 ^a	4.01±0.5 ^a

^{a,b}: Her bir parametre için aynı satır içinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemlidir ($P<0.05$). SÇ: Suda çözündürme, VÇ: Vajinal çözündürme, VCL: Eğrisel Yol Hızı, VAP Ortalama Yol Hızı, VSL: Doğrusal Yol Hızı, ALH:Yanal Baş Yer Değiştirme Genliği.

Tablo 3b. Farklı çözdürme yöntemi kullanılarak çözdürülen dondurulmuş boğa sperması örneklerinin çözdürme sonrası kinematik parametre değerleri (n=6)

Sperma	LIN (%)		STR (%)		WOB (%)		BCF (Hz)	
	SÇ	VÇ	SÇ	VÇ	SÇ	VÇ	SÇ	VÇ
Boğa 1	54.7±5.3 ^a	60.8±5.2 ^a	84.6±5.2 ^b	92.6±2.4 ^a	64.8±7.2 ^a	65.5±3.9 ^a	10.6±2.2 ^a	11.9±0.8 ^a
Boğa 2	44.8±4.2 ^b	53.8±2.4 ^a	73.6±3.9 ^b	85.2±2.3 ^a	60.8±2.7 ^a	63.1±2.6 ^a	11.9±0.4 ^a	11.8±0.4 ^a
Boğa 2	55.5±6.5 ^a	65.0±9.0 ^a	78.4±6.1 ^b	87.0±2.7 ^a	71.5±11.7 ^a	74.9±11.8 ^a	8.8±1.7 ^a	9.7±1.1 ^a
Boğa 3	49.2±2.7 ^b	54.5±3.2 ^a	85.2±1.8 ^b	89.6±2.0 ^a	57.8±3.6 ^a	60.8±2.7 ^a	10.6±0.7 ^a	11.0±0.8 ^a
Genel	51.1±6.4 ^b	58.5±7.0 ^a	80.4±6.4 ^b	88.6±3.6 ^a	63.7±8.5 ^a	66.1±8.2 ^a	10.5±1.7 ^a	11.1±1.2 ^a

^{a, b}: Her bir parametre için aynı satır içinde farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemlidir (P<0.05). SÇ: Suda çözdürme, VÇ: Vajinal çözdürme, LIN: Doğrusallık, STR: Gidiş doğrultusu, WOB: Yalpalama, BCF: Çapraz frekans geçişi

Tartışma

Yapılan çalışmada, vajinal yöntemle çözdürülen dondurulmuş boğa spermalarında sıcak suda çözdürülen örnekler göre çözdürme sonrası ortalama statik (ölü) spermatozoon oranının önemli derecede arttığı gözlenirken, buna uyumlu olarak ortalama total motilite değerinin de önemli derecede azaldığı (%67.8 - %81.0; P<0.05) belirlenmiştir. Bununla birlikte, çözdürme sonrası ortalama progresif motilite değeri açısından kullanılan iki yöntem arasında istatistiki yönden önemli derecede bir farklılık oluşmadığı (%48.2 - %50.9; P>0.05) dikkati çekmiştir. Dondurulmuş sperma payetlerinin çözdürme sonrası kalite standartlarını tespit etmek için motilite oranlarının belirlenmesi oldukça önemlidir. Spermanın motilitesinin belirlenmesinin temel amacı; spermatozoon hareket çeşitleri ve bunların kapsadığı oranları tespit etmektir. Spermatozoonlar hareket çeşitlerine göre genel olarak 5 grup altında incelenirler. Bunlar; herhangi bir yönde hızlı ve güçlü hareket eden (progresif), herhangi bir yönde ama yavaş hareket eden, yerinde sallanan, kendi eksenini etrafında dönme şeklinde hareket eden ve hareketsiz (ölü/statik) olan spermatozoonlardır. Total motilite oranı; muayene yapılan spermada hangi oranda hareketli ya da hareketsiz spermatozoon bulunduğunun bir göstergesidir. Ancak bu oran içerisinde çok yavaş ilerleyen, kendi etrafında dönen veya olduğu yerde titreme ya da sallanma hareketi yapan spermatozoonların hareketlerinde doğrusallık özelliği olmadığı için hızlı hareket etseler bile fertilitite yetenekleri düşüktür. Bu yüzden, yapılan muayenelerde total motilitenin yanında progresif spermatozoon oranının da belirlenmesi oldukça önemlidir (1, 21). Progresif motilite, spermatozoonun dişi üreme kanalındaki ileriye doğrusal hareketi için gerekli olup aynı zamanda fertilititeyle de önemli derecede ilişkilidir. Bu yüzden, motilite belirlenirken, total motiliteye göre özellikle progresif motilite oranı daha belirleyici bir rol oynamakta olup CASA sistemi ile yapılan analizlerde progresif motilitenin %35'in üzerinde olması gerektiği vurgulanmaktadır (5, 25). Ayrıca Ülkemizde Tarım ve Orman Bakanlığı'nın gerek yurt dışından getirilen gerekse de ülkemizde üretilen dondurulmuş boğa spermasının satışa sunulabilmesi için CASA sistemi ile yapılan motilite değerlendirmelerinde total motilitenin %40'in üzerinde olması ve payet içerisinde en az 7 milyon motil

spermatozoon şartı aranmaktadır (26). Yürütülen çalışmada dondurulmuş boğa spermasının iki farklı yöntemle çözdürülmesi sonrası elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, total motilite oranları arasında önemli bir farklılık belirlenmesine rağmen bulunan değerlerin belirtilen referans değerlerinin üzerinde olduğu, bunun yanında benzer bulunan progresif motilite oranlarının da yüksek olması nedeniyle suni tohumlama uygulamalarında bu spermaların kullanılabilirliği görülmektedir.

Spermatozoonların hareket yeteneklerinin devamı için gerekli olan enerji (ATP), yapısında bulunan mitokondriyeler tarafından oksidatif fosforilasyon yoluyla üretilmektedir. İç mitokondriyal membran üzerinde oldukça kompleks bir yapıya sahip olup bu bölgede bulunan metabolitler, burada bulunan alt birimlerden geçerek enerji üretiminde kullanılırlar. Elektron transfer zincirinin son proteini olan Sitokrom C, Kompleks III'den aldığı elektronları sitokrom oksidaza indirgeyip kompleks IV'e geçirerek kompleks V'de ATP üretilmesini sağlar. Sitokrom C proteini normal şartlarda sağlam mitokondriyal membrandan dışarı çıkamaz. Ancak, sıcaklığın aniden düşmesine bağlı olarak spermatozoonun soğuk şokuna uğraması sonucu mitokondriyal membran yapısının değişmesi ve geçirgenliğinin artması, sitokrom C düzeyinin sızmaya bağlı olarak düşmesine ve bunun sonucunda da mitokondriyal membran potansiyelinin azalmasına neden olabilir (27, 28). Nitekim Forero Gonzales ve ark. (29) dondurulup çözdürülmüş boğa spermasında, çözdürme sonrası mitokondriyal membran potansiyelinde bir azalmanın oluştuğunu ve bu durumun kriyoprezervasyon sırasında şekillenen soğuk şoku nedeniyle spermatozoonların mitokondriyal membran zarlarının lipid ve protein faz değişikliği sonucunda kararsız hale gelmesinden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Diğer taraftan, Khalil ve ark. (30) ise dondurulmuş boğa spermasının çözdürme sonrası mitokondriyal membran potansiyelinde %15 oranında düştüğünü, bu durumun ise genel olarak kabul edilebilir sınırlar içerisinde kaldığını belirtmiştir. Yapılan çalışmamızda, vajinal yöntemle çözdürülen dondurulmuş boğa spermalarında sıcak suda çözdürülen örnekler göre çözdürme sonrası ortalama yüksek mitokondriyal aktiviteye sahip spermatozoon oranında önemli derecede bir azalma olduğu (P<0.05) belirlenmiştir. Yüksek mitokondriyal

membran potansiyeline sahip spermatozoon oranındaki azalmanın total motilite değerlerinde belirlenen azalma ile benzer düzeyde olduğu görülmekle birlikte, bu düşüşün progresif motilite sonuçlarını etkilemediği görülmektedir. Bu sonuç, mitokondriyal membran potansiyelindeki aktivite azalmasının daha çok progresif motilite yeteneğine sahip olmayan spermatozoonlarda meydana geldiği şeklinde açıklanabilir.

Yapılan çalışmada spermatozoonlar hız değerlerine göre sınıflandırıldığında, çözündürme yöntemleri arasında orta hızlı ve yavaş hareket eden spermatozoon oranları yönünden önemli derecede bir farklılık oluşmadığı ($P>0.05$) görülürken, vajinal yöntemle çözdürülen spermalarda sıcak suda çözdürülen örnekler göre çözündürme sonrası hızlı hareket eden spermatozoon oranının önemli derecede ($P<0.05$) düşük olduğu ve bu düşüşün ölü (hareketsiz) spermatozoon oranındaki artışla paralellik gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen bu veriler, vajinal çözündürme yönteminin sıcak suda çözündürme yöntemine göre hızlı hareket eden spermatozoon oranında %10-15 oranında bir azalmaya yol açtığını göstermektedir. CASA sistemlerinde progresif motilitenin belirlenmesi özel bir sınıflandırma sistemi ile yapılmaktadır. Bu sistemde spermatozoonlar hem hareket hızlarına ($50 \mu\text{m} < \text{hızlı}$) hem de hareketleri sırasında izledikleri yolun doğrusalılık düzeyine göre ($0.80 < \text{STR}$ veya LIN) değerlendirilip referans değerlerin üzerinde değer taşıyan spermatozoonlar progresif olarak sınıflandırılırlar (31). Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, dondurulmuş boğa spermasının su banyosunda çözdürülmesi yöntemi vajinal çözündürme yöntemine göre daha hızlı bir çözünme ortamı oluşturduğu için hızlı hareket eden spermatozoon oranının artmasına yol açmış olabilir. Ayrıca her iki yöntem arasında progresif motilite oranının benzer olması, su banyosunda çözdürülen payetlerdeki spermatozoonların hız değerleri yüksek olmasına rağmen progresif hareket özelliğine sahip olmadığını göstermektedir.

Yapılan çalışmada, vajinal yöntemle çözdürülen spermalarda sıcak suda çözdürülen örnekler göre çözündürme sonrası ortalama VCL değerinin önemli derecede ($P<0.05$) düşük olmakla beraber, ortalama VAP ve VSL değerlerinin çözündürme yöntemleri arasında benzerlik gösterdiği ($P>0.05$) görülmüştür. Kinematik parametre değerleri açısından VAP değeri, spermatozoon hareket özelliğinin belirlenmesi açısından oldukça önemlidir. Nitekim Nagy ve ark. (32) CASA sistemi yardımıyla belirledikleri spermatozoonların kinematik parametre değerleri ile bu spermalarla yaptıkları tohumlamalar sonucunda elde ettikleri gebelik sonuçlarını değerlendirdiklerinde, kinematik parametreler açısından özellikle VAP değerinin fertilitenin tahmin edilmesinde en kullanışlı parametre olduğunu bildirilmişlerdir. Benzer şekilde Robayo ve ark. (33), koç spermatozoonlarının motilite ve kinematik parametrelerinin CASA'da belirlenmesinin ardından servikal mukustaki hareket yeteneklerini inceledikleri çalışmalarında, spermatozoonların koyun servikal mukusunda ilerleyişi ile VAP değerlerinin arasında pozitif yönde bir ilişkinin olduğunu tespit etmişlerdir.

Sunulan çalışmada, hız değerlerine göre hesaplanan ve spermatozoon hareketlerinin doğrusallığını gösteren LIN ve STR değerlerinin vajinal yöntemle çözdürülen spermalarda, sıcak suda çözdürülen örnekler göre önemli derecede ($P<0.05$) yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durum, sıcak suda çözdürülen örnekler göre vajinal yöntemle çözdürülen spermalarda, VCL değerinin düşük olmasına rağmen VAP ve VSL değerinin birbirine benzer olmasından kaynaklanmaktadır. Spermatozoonun doğrusal olmayan hareketlerinde VAP değeri VSL'ye göre oldukça yüksek iken, düzenli ve düz bir hat üzerinde devam eden spermatozoon hareketinde VAP değeri genellikle VSL'ye çok yakındır. Sunulan değerler incelendiğinde, vajinal yöntemle çözdürülen spermalarda spermatozoonların doğrusal hareket etme oranlarının sıcak suda çözdürülenlere göre daha yüksek bir potansiyel taşıması dikkat çekicidir. Diğer taraftan, başın yayılım genişliği olan ALH ile yalpalama şiddeti olan WOB değerinin ise çözündürme yöntemleri arasında farklılık göstermediği ($P>0.05$) tespit edilmiştir.

Kaczyk (22), su banyosunda çözündürme yöntemi ile payetin doğrudan tohumlama kataterine yerleştirilerek ineğin vajinasında çözdürülmesi yöntemini karşılaştırmak amacıyla yaptığı çalışmada, sperma kalitesi açısından motilite yönünden bir fark olmadığını belirlerken, senkronize edilen besi sığırlarında iki yöntemle çözdürülen dondurulmuş spermalarla yapılan tohumlamalarda ise gebe kalma oranlarının benzer olduğunu belirlemiştir. Benzer şekilde, Koch ve ark. (17), süt ineklerinin suni tohumlama uygulamalarında kullanılan dondurulmuş boğa sperması içeren payetlerin çözdürülmesinde farklı yöntemlerin kullanılmasının gebe kalma oranı üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmalarında, 38°C sıcaklıktaki su banyosunda çözdürülerek tohumlanan ineklerin gebelik oranı ($87/348$; %28) ile doğrudan ineğin vajinasında çözdürülerek tohumlanan hayvanların gebelik oranları ($85/385$; %32) arasında önemli bir farklılığın gözlenmediğini bildirmişlerdir. Vajinal ve su banyosunda çözündürme yöntemi kullanılarak suni tohumlama uygulamaları yapılan bu çalışmalarda elde edilen gebelik sonuçlarının benzer olması, çalışmamızda belirtilen dondurulmuş boğa spermasının çözündürme sonrası spermatolojik özellikleri üzerine her iki çözündürme yöntemi arasında ortaya çıkan farklılıkların elde edilecek gebelik oranlarını olumsuz yönde etkileyecek düzeyde olmadığı görüşünü desteklemektedir.

Dondurulmuş sperma payetlerinin çözdürülmesinden tohumlanacak ineğin genital organına nakledilinceye kadar geçen zaman içerisinde farklı sıcaklık değişimlerine maruz kalması, spermatozoonların hareket yeteneklerini ve yaşam süresini olumsuz yönde etkileyebilir. Bunun önlenmesindeki etkin yollardan birisi donmuş spermanın stabil sıcaklık derecesine sahip olan vajina içerisinde çözünmesinin sağlanmasıdır. Buna ilaveten, vajinal çözündürme yönteminde diğer standart çözündürme yöntemi olarak kabul edilen su banyosu içerisinde çözündürme yöntemine göre sıcak suya ihtiyaç duyulmaması, payetin çözdürülmesi ve kataterin hazırlanması sırasındaki kritik protokollerden

etkilenmemesi gibi avantajlarından dolayı saha koşullarında geniş sayıda tohumlamaların yapıldığı işletmeler açısından daha pratik bir uygulama rahatlığı sağlayabilir. Ayrıca vajinal çözündürme yöntemi, saha şartlarındaki suni tohumlama uygulamalarında inek başına geçen sürenin de daha kısa olmasını sağlayacaktır. Bununla birlikte, suni tohumlama tankından alınan payetin gerekli kontroller yapılmadan katatere yerleştirilmesi, payetin kesimi esnasında sperma seviyesinin görülememesi ve kataterin hazırlanmasından ineğin vajinasına yerleştirilinceye kadar geçen sürenin herhangi bir sebeple uzaması gibi durumlar vajinal çözündürme yöntemi sonrası elde edilecek sperma kalitesini olumsuz yönde etkileyebilecek risk faktörleri olarak sıralanabilir. Ayrıca bu yöntem uygulanırken, çözündürme işleminin tohumlanacak hayvana çok yakın bir yerde yapılması zorunluluğu, kataterin hazırlandıktan sonra belirli bir alana taşınması ihtimalini de ortadan kaldırmaktadır.

Kaynaklar

- Hafez ESE, Hafez B. *Reproduction in Farm Animals*. 7th Edition, London: Blackwell Publishing, 2013.
- Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Reprod Sci* 2000; 62: 3-22.
- Bearden HJ, Fuquay JW, Willard ST. *Applied Animal Reproduction*. 6th Edition, New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2004.
- Shukla M. *Applied Veterinary Andrology and Frozen Semen Technology*. 1st Edition, New India Publishing Agency, New Delhi; 2011.
- Kathiravan P, Kalatharan J, Karthikeya G et al. Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system - A review. *Reprod Domest Anim* 2011; 46: 165-172.
- Amann RP, Waberski D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* 2014; 81: 5-17.
- Moraes CR, Meyers S. The sperm mitochondrion: Organelle of many functions. *Anim Reprod Sci* 2018; 194: 71-80.
- Paoli D, Gallo M, Rizzo F, et al. Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. *Fertil Steril* 2011; 95: 2315-2329.
- Cossarizza A, Salvioli S. Flow cytometric analysis of mitochondrial membrane potential using JC-1. *Curr Protoc Cytom* 2000; 13: 1-7.
- Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Reprod Sci* 2000; 60-61: 481-492.
- Loomis P. "What is progressive motility?". <http://info.selectbreeders.com/blog/bid/152768/What-Is-Progressive-Motility>, 04.06.2021.
- Barth AD. Factors affecting fertility with artificial insemination. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1993; 9: 275-289.
- Amann RP, Hammerstedt RH. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl* 1993; 14: 397-406.
- Nur Z, Ak K. Donmuş spermanın saklanması ve eritilmesi. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2003; 22: 97-102.
- 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.
- Chaiprasat S, Benjakul W, Chartchue A. Effect of bull semen thawing methods on sperm progressive motility. *Chiang Mai Vet J* 2006; 4: 25-29.
- Koch J, Weber LP, Heppelmann M, et al. Effect of different thawing methods for frozen bull semen and additional factors on the conception rate of dairy cows in artificial insemination. *Animals* 2022; 12: 2330, 1-17.
- Kaya A, Çoyan K, Yıldız C, Ataman MB. Dondurulmuş boğa spermasını değişik ısı ve sürelerde çözündürmenin spermatolojik özellikler ve payet iç ısısı üzerine etkisi. *Hayvancılık Araştırma Dergisi* 1998; 8(1-2): 29-33.
- Barth AD, Bowman PA. Determination of the best practical method of thawing bovine semen. *Can Vet J* 1988; 29: 366-269.
- Çoyan K, Tekeli T. *İneklerde Suni Tohumlama*. Konya: Bahçıvanlar Basım; 1996.
- Sönmez M. Veteriner Hekimlikte Reprodüksiyon, Suni Tohumlama ve Androloji Ders Notları. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Elazığ, 2022.
- Kaczyk BL. A comparison of semen thawing for artificial insemination in cattle. Master's Thesis, MIR Center, Angelo State University San Angelo, Texas, USA, 2011.
- Krause W. Computer-assisted semen analysis systems: Comparison with routine evaluation and prognostic value in male fertility and assisted reproduction. *Hum Reprod* 1995; 10: 60-66.
- Kanno C, Kang SS, Kitade Y, et al. Simultaneous evaluation of plasma membrane integrity, acrosomal integrity, and mitochondrial membrane potential in bovine spermatozoa by flow cytometry. *Zygote* 2016; 24: 529-536.

25. Li Y, Kalo D, Zeron Y, et al. Progressive motility-a potential predictive parameter for semen fertilization capacity in bovines. *Zygote* 2016; 24: 70-82.
26. Tarım ve Orman Bakanlığı. "Cinsiyeti belirlenmemiş dondurulmuş boğa sperması raporu". <https://tarimorman.gov.tr/HAYGEM/Belgeler/Hayvanc%C4%B1%C4%B1k/%C4%B0thalat%C4%B0hracat/DONDURULMU%C5%9E%20SPERMA%20%C4%B0HTALATI/RAPORLAR/Cinsiyeti%20Belirsiz%20Sperma%20Raporlama.xls> / 10.6.2023.
27. Eljarah AH. Effects of Cryopreservation and Constituents of Semen Extenders on Mitochondrial Function of Bull Spermatozoa. PhD Thesis, Louisiana State University and Agricultural & Mechanical College USA, 2007.
28. Gillick K, Crompton M. Evaluating cytochrome c diffusion in the intermembrane spaces of mitochondria during cytochrome c release. *J Cell Sci* 2008; 121: 618-626.
29. Forero-Gonzalez RA, Celeghini ECC, Raphael CF, et al. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Andrologia* 2012; 44: 154-159.
30. Khalil WA, El-Harairy MA, Zeidan AEB, et al. Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. *Int J Vet Sci Med* 2018; 6: 49-56.
31. Sönmez M, Fırat F. Bilgisayar destekli sperma analiz (CASA) sistemiyle yapılan incelemelerde spermatozoonların motilitesini ve kinematik değerlerini etkileyen faktörler. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi* 2022; 36: 153-164.
32. Nagy A, Polichronopoulos T, Gaspard A, et al. Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis. *Acta Vet Hung* 2015; 63: 370-81.
33. Robayo I, Montenegro V, Valdes C, et al. 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.