



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**KOÇ SPERMASININ DONDURULMASINDA SULANDIRICILARA ÇİÇEK
BALI VE ÇAM BALI İLAVESİNİN SPERMATOLOJİK ÖZELLİKLERE
ETKİSİ**

HÜSEYİN YÜKSEL

**DANIŞMAN
PROF. DR. KEMAL AK**

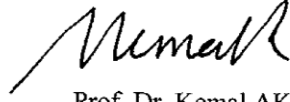
**II. DANIŞMAN
DR. JANİ MAVROMATİ**

**DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI
DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA DOKTORA
PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI

Bu çalışma 04.11.2019 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Doktora
Programı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

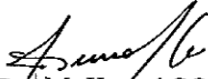
Prof. Dr. Kemal AK
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi
Dölerme ve Suni Tohumlama ABD



Prof. Dr. Serhat ALKAN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi
Dölerme ve Suni Tohumlama ABD



Prof. Dr. Ömür KOÇAK
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi Zootečni ABD



Prof. Dr. M. Kemal SOYLU
Bursa Uludağ Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Dölerme ve Suni Tohumlama ABD



Prof. Dr. Zekariya NUR
Bursa Uludağ Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Dölerme ve Suni Tohumlama ABD

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



Hüseyin Yüksel

İTHAF

Bugün bulunduğum yere ulaşmama olanak sağlayan, hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve üzerimde büyük emekleri olan annem Nevin YÜKSEL, babam Aysin YÜKSEL ile ablam Emine YÜKSEL ve sevgili eşim Çiler ERÇEVİK YÜKSEL'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim sürecim boyunca her türlü desteğini esirgemeyen danışmanım ve tezimin yazılmasında büyük emeği olan Prof.Dr. Kemal AK'a, gerek duyduğum tüm zamanlarda her türlü bilgi, tecrübe ve görüşlerini benimle paylaşan Prof.Dr. Serhat ALKAN'a ve tez izleme komitemin değerli üyesi Prof.Dr. Ömür KOÇAK'a teşekkür eder saygılarımı sunarım.

Tez çalışmamın bilimsel olarak kurgulanmasından yapılmasına kadar her türlü aşamasında sürekli yanımda olan, bu çalışmanın bitirilmesinde her alanda büyük bir katkısı bulunan, adeta ikinci tez danışmanım gibi yardımcı bulunan Prof.Dr. Serhat PABUCCUOĞLU'na teşekkür eder ve minnettar olduğumu bildiririm.

Doktora eğitimim boyunca bana her konuda yardımcı olan Doç.Dr. Kamber DEMİR'e ve çalışma arkadaşlarım Arş.Gör.Dr. Ramazan ARICI, Arş.Gör. Selin YAĞCIOĞLU'na ve Arş.Gör. Ahmet ESER'e teşekkür ederim. Tez çalışmamın laboratuvar döneminde yardımlarını esirgemeyen doktora öğrencisi arkadaşlarım; Veteriner Hekim Hatice ŞENLİKCİ, Veteriner Hekim Nur ERSOY ve Hayvan Sağlık Teknisyeni Ercan KETENCİ'ye de ayrıca teşekkür ederim.

Çalışmada kullanılan hayvanlarımızın bakımındaki hassasiyetinden ve çalışmaya olan özverili yardımlarından dolayı Hayvan Bakıcısı Muzaffer BORA'ya da teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 29551

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLOLAR LİSTESİ	Vİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Koyunlarda Suni Tohumlamanın Tarihçesi	3
2.2. Suni Tohumlama Uygulamalarını Sınırlandıran Etmenler	4
2.3. Koyunlarda Suni Tohumlamanın Avantajları	4
2.3.1. Koyunların Anatomik ve Fizyolojik Yapısı	5
2.3.2. Koç Spermasının Yapısına Bağlı Faktörler	6
2.4. Koçlarda Spermatogenesis	8
2.5. Koçlarda Spermatolojik Özellikler	8
2.6. Koçlardan Sperma Alma Yöntemleri	9
2.7. Koç Spermasının Muayenesi	10
2.7.1. Makroskopik Muayeneler	10
2.7.2. Mikroskopik Muayeneler	10
2.8. Koçlarda Potansiyel Fertilitenin Belirlenmesi	12
2.9. Spermanın Dondurularak Saklanması ve Eritilmesi	12
2.9.1. Koç Spermasının Sulandırılması	12
2.9.2. Koç Spermasının Soğutulması	15
2.9.3. Koç Spermasının Dondurulması	16
2.9.4. Dondurulmuş Koç Spermasının Eritilmesi	18
2.10. Sulandırıcılara İlave Edilen Kriyoprotektanlar	19
2.10.1. Hücre İçine Penetre Olabilen Kriyoprotektanlar	20
2.10.2. Hücre İçine Penetre Olamayan Kriyoprotektanlar	22

<u>2.10.3. Sulandırıcıya Kriyoprotektan Olarak Bal İlavesi</u>	23
<u>2.10.3.1. Balın genel özellikleri ve yapısı</u>	23
<u>2.10.3.2. Balın Reprodüktif Özellikler Üzerine Etkisi</u>	28
<u>3. GEREÇ VE YÖNTEM</u>	31
<u>3.1. Etik Kurul Onayı ve İzinler</u>	31
<u>3.2. Çalışmada Kullanılan Hayvan Materyali</u>	31
<u>3.2.1. Koçların Barındırılması ve Beslenmesi</u>	31
<u>3.2.2. Koçlardan Sperma Alma Sıklığı</u>	31
<u>3.2.3. Koçlardan Sperma Alma Yöntemi</u>	31
<u>3.3. Spermatolojik Parametreler</u>	32
<u>3.4. Spermanın Sulandırılması, Soğutulması ve Dondurulması</u>	36
<u>3.5. Spermanın Eritilmesi</u>	39
<u>3.6. İstatistiksel Analizler</u>	39
<u>4. BULGULAR</u>	40
<u>4.1. Donma Öncesi Spermatolojik Bulgular</u>	40
<u>4.2. Eritme Sonrası Spermatolojik Bulgular</u>	43
<u>5. TARTIŞMA</u>	48
<u>KAYNAKLAR</u>	55
<u>ETİK KURUL KARARI</u>	79
<u>İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI</u>	81
<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	82

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Çiçek ve Salgı (Çam) ballarının özellikleri - Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliğinden (2012/58) alınmıştır	28
Tablo 3-1: Referans laboratuvarı tarafından düzenlenen BPC17.0075 parti numaralı çiçek balı analiz raporu aşağıda verilmiştir.....	38
Tablo 3-2: Referans laboratuvarı tarafından düzenlenen BPM17.0021 parti numaralı çam balı analiz raporu aşağıda verilmiştir.....	39
Tablo 4-1: Pooling sonrası kinetik hız parametreleri ve motilite oranları (CASA)	40
Tablo 4-2: Ekilibrasyon sonrası saptanan motilite ve kinetik hız parametreleri (CASA)	41
Tablo 4-3: Ekilibrasyon sonrası faz kontrast mikroskopta gerçekleştirilen morfolojik incelemeler (%)	42
Tablo 4-4: Eritme sonrası saptanan motilite ve kinetik hız parametreleri (CASA)	43
Tablo 4-5: Eritme sonrası akış sitometresinde (Flow Cytometry) saptanan canlı spermatozoon oranları (%)	43
Tablo 4-6: Eritme sonrası akış sitometresinde bakılan mitokondriyal aktivite (%)	44
Tablo 4-7: Eritme sonrası florasan mikroskopta (CFDI PI) saptanan membran bütünlüğü oranları (%)	44
Tablo 4-8: Eritme sonrası akış sitometresi (Flow Cytometry) ile saptanan membran bütünlüğü ve akrozomal bütünlük oranları	44
Tablo 4-9: Eritme sonrası faz kontrast mikroskop yardımı ile yapılan morfoloji muayenesi (%)	45

ŞEKİLLER LİSTESİ

Metin içerisinde şekil mevcut değildir.



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

µg: Mikrogram

µl: Mikrolitre

µm: Mikrometre

µm/s: Mikrometre/saniye

µm²: Mikrometre kare

µm³: Mikrometre küp

ALH: (Lateral Head Amplitude) Salınım-sapma mesafesi

ANOVA: Tek yönlü varyans analizi

ark.: Arkadaşları

BAP: Bilimsel Araştırma Projeleri

BCF: (Beat Cross Frequency) Çapraz geçiş ritmi

CASA: Bilgisayar destekli sperma analiz sistemi

CFDA: Carboxyfluorescein diacetate

cm: Santimetre

dk: Dakika

DMSO: Dimetilsülfoksit

g: Gram

HOST: Hipoozmotik şişme testi

IM: Kas içi

kg: Kilogram

KHP: Kinetik hız parametreleri

L: Litre

LDF: Düşük lipoprotein

LIN: (Linearite) Eğrisel yolun doğrusallığı

M: Molar

m²: Metrekare

meq: Miliekivalan

mg: Miligram

ml: Mililitre

mM: Milimolar

mOsm: Miliosmol

ms: Milisiemens

nm: Nanometre

°C: Santigrat derece

PI: Propidium iodide

PNA: Peanut agglutinin

ppb: Milyarda bir

rpm: dakikada dönme hızı

sn: Saniye

SPSS: Statistical package for the social science

STR: (Straightness) Ortalama yolun doğrusallığı

Tris: (hydroxymethyl) aminomethane

TÜİK: Türkiye İstatistik Kurumu

V: Hacim

VAP: (Velocity Average Path) Eğrisel ortalama yol hızı

VCL: (Velocity Curve Linear) Eğrisel salınımlı yol hızı

VSL: (Velocity Straight Linear) Doğrusal yol hızı

ÖZET

Yuksel, H. (2019). Koç Spermasının Dondurulmasında Sulandırıcılara Çiçek Balı ve Çam Balı İlavesinin Spermatolojik Özelliklere Etkisi İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Doktora Tezi. İstanbul.

Çalışmada koç sperma sulandırıcısı olarak Tris-yumurta sarısı sulandırıcısına %1 ve %2,5 çiçek balı veya çam balı ilavelerinin etkisi araştırıldı. Bu amaçla 5 baş Kıvrıkcık ırkı koçtan alınan sperma %1 çiçek balı, %2,5 çiçek balı veya %1 çam balı, %2,5 çam balı ve bal içermeyen (kontrol) sulandırıcılarla iki aşamada sulandırılarak payet yöntemine göre donduruldu. Spermatolojik incelemeler donma öncesi (ekilibrasyon) ve eritme sonrası tekrarlandı. Çalışma gruplarında spermatozoon canlılığı (motilite, kinetik hız parametreleri, hız oranları ve mitokondriyal aktivite) ve morfolojik bütünlüğü (sıvı fiksasyon, akış sitometresi ve florasan boyama) ekilibrasyon ve eritme sonrası aşamalarında değerlendirildi. Sunulan çalışmada, çiçek balının özellikle %2,5 yoğunluğunun (CICB%2,5) eritme sonrası spermatozoon canlılığını daha iyi koruduğu, bal ilavelerinin morfolojik bütünlüğü kısmen koruduğu, Hancock sıvı fiksasyon yöntemine göre %1,0 çiçek balının akrozomal bütünlüğü önemli oranda koruduğu saptanmıştır.

Toplam 10 tekrar sonrası %1 ve %2,5 çiçek balı ilavelerinin koç sperma sulandırıcılarında kullanılabilir özellikte olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Koç sperması, donma, sulandırıcı, çiçek balı, çam balı

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 29551

ABSTRACT

Yuksel, H. (2019). Effects of the Addition of Flower Honey and Honeydew Honey to Extenders on Spermatological Characteristics in Ram Semen. Istanbul University - Cerrahpaşa, Postgraduate Education Institute, Department of Reproduction and Artificial Insemination. PhD thesis, Istanbul.

Effects of the addition of flower honey as 1.0% (v/v) and 2.5% (v/v) or honeydew honey as 1.0% (v/v) and 2.5% (v/v) to Tris-egg yolk extender were investigated in the current study. Semen collected from 5 Kivırcık rams were pooled and divided to 5 equal aliquots. Then the samples were frozen with straw method after two step dilution method with extender containing, no honey, 1.0% (v/v) flower honey, 2.5% (v/v) flower honey, 1.0% (v/v) honeydew honey, or 2.5% (v/v) honeydew honey. Equilibrated and post-thawed semen viability parameters (motility, kinetic velocity parameters, velocity rates and mitochondrial activity) and morphological integrity (Hancock fixation, flow cytometry and fluorescent dyeing) were evaluated. In the present study, post-thaw viability was better protected with flower honey especially with 2.5% concentration (CICB%2.5). Post-thaw membrane integrity was partially protected with all honey supplemented groups.

Hancock fixation results showed that, supplementation of 1.0% (v/v) flower honey results in better post-thaw acrosome integrity compared to other groups ($P<0.05$).

In conclusion with 10 repetitive study, addition of flower honey as 1.0% (v/v) and 2.5% (v/v) to ram semen extenders have some beneficial effects on post-thaw spermatological parameters.

Key Words: Ram semen, cryopreservation, extender, flower honey, honeydew honey

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 29551

ZUSAMMENFASSUNG / RESUME



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tarım ve hayvancılık insanların sağlıklı beslenmesinde ve ülke ekonomisinde yaşamsal öneme sahiptir. Türkiye’de halkın koyun eti ve sütüne olan ilgisi yüksek seviyededir. Ayrıca ülkenin arazi yapısı ve halkın koyun yetiştiriciliğine olan ilgisi büyük potansiyel yaratmaktadır (Kaymakçı ve ark. 2009; TİGEM 2016). 2017 verilerine göre Türkiye’de koyun popülasyonu 33.677.636’dır (TÜİK 2017). Mevcut koyun ırklarından elde edilen hayvansal verimler istenilen düzeyde değildir. Koyunların bireysel et ve süt verimlerini artırmada en etkin yöntem genetik ıslah çalışmalarıdır. Hayvan ıslahı çalışmalarında bir biyoteknolojik yöntem olan koç spermasının dondurulması ve suni tohumlama uygulamaları dünyada yaygın olarak kullanılmasına rağmen, koyun popülasyonunun yoğun olması ve dişi genital kanalının anatomik yapısı gibi nedenlerden dolayı, suni tohumlama uygulamalarında henüz istenilen düzeye ulaşamamıştır. Ayrıca koç spermatozoonlarının donma ve eritme aşamalarındaki ani sıcaklık değişimlerinden diğer türlere (boğa, teke vb.) göre daha fazla zarar görmesi de suni tohumlama uygulamalarını sınırlandıran diğer nedenlerin başında gelir (Fiser ve ark. 1987; Bacınoğlu ve ark. 2007; Ak ve ark. 2010).

Koç spermasının dondurulmasında başarı oranlarını artırmak amacıyla; sulandırıcı çeşitleri, sulandırma, soğutma, dondurma ve eritme teknikleri üzerinde yoğun olarak çalışılmıştır. Son yıllarda özellikle sulandırıcılara ilave edilen değişik katkı maddelerinin spermatozoon canlılığı ve morfolojisi üzerine etkileri araştırılmaktadır (Allai ve ark. 2018).

Sperma sulandırıcılarına ilave edilen balın, donma öncesi ve sonrası hücrelerde besin kaynağı ve kriyoprotektan olarak görev yaptığı bildirilmiştir (Fuller 2004). Balın yapısındaki antioksidanlar, reaktif oksijen türleri (ROS) serbest radikalleri bağlayarak lipid peroksidasyonu oluşumunu önlerler ve spermatozoon membranını hasara uğramaktan kurtarırlar (Maidin ve ark. 2018). Çam balının balık spermasının dondurulmasında kullanılabilir olduğu bildirilmiştir (Öğretmen ve İnanan 2014). İnsan, aygır ve teke gibi türlerde katkı maddesi olarak bal sperma sulandırıcılarına ilave edilmiş ve eritme sonrası değişen ölçülerde başarılı sonuçlar alınmıştır (Fakhrildin ve Alsaadi 2014; El-Sheshtawy ve ark. 2016; Maidin ve ark. 2018). Koç spermasında ise üretim şekli ve yapısı farklılıklar arz eden çam balı, çiçek balı ve farklı yoğunluklarına ilişkin donma

sonrası ayrıntılı çalışmalara ulaşılamamıştır. Sunulan çalışmada, ülkemize özgü Kıvırcık kou spermasının dondurulmasında medyumlara farklı yoğunluklarda (%1,0 ve %2,5) iek balı veya am balı ilavesinin spermatolojik özelliklere etkileri araştırılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Koyunlarda Suni Tohumlamanın Tarihçesi

Koyunlarda hayvan ıslahına yönelik çalışmaların temelini suni tohumlama uygulamaları oluşturur. Uzun yıllar süren programlar neticesinde elde edilen damızlık koçlarda kazanılan genetik özellikler kolaylıkla çok sayıda dişilere aktarılabilir. Damızlık koçların seçilmesinde ve damızlık koçlardan mümkün olduğunca fazla yararlanılmasında suni tohumlama biyoteknolojisi esastır (Salamon ve Maxwell 2000).

Koyunlarda suni tohumlama çalışmaları 20. yüzyıl başlarında (1907, 1912) İvanov tarafından başlatılmıştır. Zamanla sperma sulandırıcıları ve reproduksiyon bilim alanında ilerlemeler kaydedilmiş, çiftlik hayvanlarında suni tohumlama tekniği daha fazla uygulama alanı bulmuştur. Birinci Dünya Savaşı'ndan sonra çalışmalar Milovanov tarafından daha da geliştirilmiş, 1930'ların başlarında eski Sovyetler Birliği'nde geniş çaplı damızlık koyun programları gerçekleştirilmiştir (Salamon ve Maxwell 2000).

Türkiye, Sovyetler Birliği'nden sonra suni tohumlama uygulamalarını gerçekleştiren ikinci ülkedir. Türkiye'de yapağı ihtiyacını karşılamak amacıyla suni tohumlama yardımıyla ıslah çalışmaları 1926 yılında başlatılmış, bu amaçla Macaristan ve Almanya'dan getirilen Merinos koçları kullanılmıştır (Özkoca 1984). 1950'li yıllardan sonra giderek yaygınlaşan suni tohumlama faaliyetleri 1970 yılında 300'e yakın istasyonda gerçekleştirilmiş ve yaklaşık 300.000 koyuna bu reproduktif biyoteknolojik yöntem uygulanmıştır (Koşum 2006).

Koyunlarda suni tohumlama uygulamaları dünyada ve ülkemizde sığırlar kadar yaygın değildir. Koyun genital organlarının suni tohumlama için elverişli olmaması ve koç spermasının donma süreçlerine karşı hassaslığı en önemli iki etken olarak öne çıkmaktadır (Hafez 1993).

İntravajinal ve intraservikal suni tohumlama sonucunda arzulanan oranda bir başarıya ulaşılamaması, bu yöntemlerin sahada kullanımını sınırlandırmaktadır. Dondurulmuş-eritilmiş spermanın laparoskopik yöntemle doğrudan uterus içerisine bırakılması ile gebelik oranlarında başarı oranları önemli oranlarda artmış ve bu nedenle 1982 yılından sonra suni tohumlama uygulamalarında kısmi bir artış kaydedilmiştir (McKelvey ve ark. 1985; Hill ve ark. 1998; Emsen ve Koşum 2009).

2.2. Suni Tohumlama Uygulamalarını Sınırlandıran Etmenler

Koyun sürülerinde oldukça fazla sayıda dişi vardır. Veteriner hekimlerin ve yardımcı teknisyenlerin yüzlerce hatta binlerce dişiği aynı gün veya günlerde tohumlaması oldukça zahmetlidir. İntrauterin veya laparoskopik tohumlama uygulamaları, sığırlardaki suni tohumlama uygulamaları kadar pratik değildir ve kısa zamanda tamamlanması daha güçtür (Ak ve ark. 2010; Coyan ve ark. 1992). Bunlara ek olarak koç spermasının sulandırma, soğutma, donma ve eritme işlemlerinde gerçekleşen büyük sıcaklık farklılığına karşı daha hassas oldukları bildirilmiştir (Ak ve ark. 2010).

Dondurulmuş-çözündürülmüş sperma ile yapılan servikal tohumlamalar sonucunda elde edilen kuzulama oranları, taze sperma ile yapılanların sonuçlarına nadiren yaklaşmaktadır (Salamon ve Maxwell 2000).

2.3. Koyunlarda Suni Tohumlamanın Avantajları

Koyunlarda suni tohumlama uygulama nedenleri maddeler halinde özetlenirse;

- a) **Hayvan ıslahı:** Islah çalışmaları oldukça uzun süreç gerektirir. Test çalışmaları tamamlandığında damızlık koçlardan mümkün olduğunca fazla sperma almak ve sahaya göndermek esastır. Bu nedenle, damızlık koç adaylarının tümünden test süresince sperma alınarak dondurulur ve sadece damızlık olarak belirlenen koçların spermaları sahaya gönderilir.
- b) **Spermanın potansiyel fertilitesinin belirlenmesi:** Taze veya eritme sonrası spermatolojik özelliklerle fertilite arasında önemli bir korelasyonun olduğu farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Suni tohumlama uygulamalarında sperma dondurma uygulamalarında spermatolojik özelliklerin belirlenmesi rutin olarak gerçekleştirilmektedir (Taş ve ark. 2007; Ak ve ark. 2010).
- c) **Çiftleşme ile bulaşan mikrobiyolojik ve genetik hastalıkların kontrolü:** Islah çalışmalarında koçların ve spermalarının tüm mikrobiyal ajanlardan ari olmaları sağlanır. Ayrıca, akrabalı yetiştirme ile koçların genetik hastalıklardan da ari oldukları garanti altına alınır.
- d) **Androlojik muayeneler:** Erkek damızlıkların genel durumu ve reproduktif organların muayenesi belirli aralıklarla incelenir ve tohumlama sonrası spermadan kaynaklanan herhangi bir olumsuz faktöre izin verilmez.

- e) **Damızlık erkeklerden daha fazla yararlanılabilmesi:** Sığır ve koyun türlerinde serviks spermatozoonlar için en önemli bariyerdir. Bu türlerde çiftleşme sonrası sperma vajinaya bırakılır. Suni tohumlamada sperma serviks veya uterus içerisine bırakıldığında erkek damızlıktan 10 – 500 misli daha fazla yararlanmak mümkündür. Aşım sezonu dışında da senkronizasyon sonrası dişiler östrusa getirildiklerinde, doğal aşım veya suni tohumlama uygulamalarına ihtiyaç duyulmuştur. Östrus senkronizasyonu sonrası koyunların tamamı aynı günlerde östrusa geldiklerinden fazla sayıda koça ihtiyaç duyulmaktadır. Bu uygulamalar spermatozoonların dondurulması, depolanması ve tohumlama teknikleri ile ilgili çalışmaları tetiklemiştir. Az sayıdaki damızlık koçların cinsel sağlık kontrolü daha rahat incelenebilir. Ayrıca yem ve işçilik maliyetleri azalır. (Ak ve ark. 1994; Salamon ve Maxwell 2000)
- f) **Donmuş spermanın transportu:** Küçük hacimlerdeki (7-10 litre) suni tohumlama konteynerlerinde yaklaşık 1.000 – 1.500 adet payet saklanabilir. Konteynerlerdeki payetler sıvı azot ikmali olmaksızın binlerce kilometrelik mesafelere taşınabilir.
- g) **Östrus takibi ve dişi genital organların muayenesi:** Suni tohumlama uygulamalarında östrus ve genital organların takibi ve muayenesi yapılmak zorundadır. Tohumlama anında vulva, vajina (intraservikal tohumlama) ve uterus ovaryum vb. (intrauterin tohumlama) gözlemlenebilir.

2.3.1. Koyunların Anatomik ve Fizyolojik Yapısı

Ülkemizde koyunlar, Eylül, Ekim ve Kasım aylarında seksüel aktivite göstermekte olup yılın geriye kalan zamanlarında (mevsim dışı) anöstrus evresine girmektedirler. Gebelik ortalama 150 gün sürmesine karşın, doğumdan sonra koyunların tekrar östrus siklusuna girmeleri için belirli bir mevsimi beklemeleri gereklidir. Üreme mevsimine bağlı kalmaksızın kullanılabilen farklı senkronizasyon yöntemleri sayesinde, koyunlar kırgınlığa getirilerek iki yılda üç doğum yaptırılabilir (Keskin ve ark. 2002).

Koyunlarda suni tohumlama uygulamasında başarı sadece canlı spermatozoonlara veya spermatozoonların başarılı bir şekilde dondurularak saklanmasına bağlı değildir (Allai ve ark. 2018). Özgün anatomik yapısı sebebiyle koyun serviksine müdahale zordur. Bu nedenle, başarı oranları ineklerde elde edilen sonuçlar kadar yüksek olmamaktadır

(Salamon ve Maxwell 2000). Spermanın genital kanaldaki yolculuğunda karşılaştığı ilk bariyer servikstir. Servikal kanal tohumlama kataterinin geçişini sınırlandırmakta ve spermanın uterusu ulaşma şansını azaltmaktadır (Ritar ve Salamon 1983; Dattena ve ark. 1992; Eppleston 1992; Ak 2005a; Rashidi 2011; Allai ve ark. 2018). Spermatozoonların dışı genital kanalda uterusu ulaşmasındaki zorluklar fertilizasyon bölgesindeki spermatozoon canlılığının düşmesine de neden olmaktadır (Ak ve ark. 2010; Cayan ve ark. 1992). Ayrıca, servikal tohumlamalarda, küçük hacimlerdeki spermanın bile serviksin kasılmasını uyardığı ve spermanın vajinaya geri püskürtüldüğü bildirilmiştir (Windsor ve ark. 1994; Gillan ve Maxwell 1999; Ak ve ark. 2010).

Servikal tohumlamada spermanın daha derine bırakılması ile fertilite oranlarının artırabildiği, ancak serviks içerisinde kateterin ilerletilmesinin oldukça zor olduğu bildirilmiştir (Salamon ve Maxwell 2000).

Dondurulmuş eritilmiş sperma uterusu veya oviduktlara verildiğinde spermatozoonların fertilizasyon yeteneğinin etkilenmediği, yüksek gebelik oranları (% 85-90) elde edildiği bildirilmiştir (Gillan ve Maxwell 1999).

2.3.2. Koç Spermasının Yapısına Bağlı Faktörler

Elektroejekülatör veya suni vajina yardımıyla alınan koç sperması plazma membranlarındaki yüksek doymamış:doymuş yağ asidi oranı (White 1993; Bacınoğlu ve ark. 2007; Valente ve ark. 2010) ve düşük kolesterol:fosfolipit molar oranına bağlı olarak ani sıcaklık değişimlerinden kolaylıkla etkilenmektedir. (Motamedi-Mojdehi ve ark. 2014).

Koç sperması için eritme sonrası %40-60 motilite oranı kabul edilebilir bir düzeydir. Ancak, hücrelerin sadece %20-30'u biyolojik olarak zarar görmezler ve bu nedenle donmuş koç sperması ile yapılan tohumlamalarda başarı oranları düşüktür. Bilim insanları, dondurma ve eritme işlemleri sonrasında spermanın potansiyel fertilitasını korumak amacıyla farklı medyumlar ve kriyoprotektanlar üzerinde çalışmışlardır (Gökçen ve ark. 1985; Chen ve ark. 1993; Salamon ve Maxwell 2000).

Spermatozoonların sulandırma, soğutma, donma ve çözündürme aşamalarında metabolizmalarındaki, fiziksel ve biyokimyasal yapılarındaki değişimler ve aşamaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Spermatozoonlardaki temel kriyojenik hasarlar ultrastrüktürel (fiziksel), biyokimyasal ve fizikokimyasaldır. Ultrastrüktürel hasarlar; plazma ve akrozom membranlarında, akrozomda, mitokondriyal kılıfta ve aksonemde

gelişmektedir. Hem yavaş ve hem de hızlı soğutma hızlarında spermatozoon motilitesi morfolojik bütünlüğe nazaran daha iyi korunmaktadır. Plazma ve akrozom membranı nükleus ve orta kısma göre daha hassastır. Mitokondriyal yapının, donma ve çözünme aşamalarında değişime uğradığı gözlenirken, kuyruk ve fibrillerde tespit edilebilir bir değişimin olmadığı bildirilmiştir (Salamon ve Maxwell 2000).

Sulandırma, soğutma, dondurma ve eritmeye bağlı oluşan ölçülebilen biyokimyasal kayıp ve değişimler; glutamik okzaloasetik transaminaz salınımı, lipoprotein ve amino asit kaybı, fosfataz aktivitesinde azalma, sodyum artışı ve potasyum azalması, hiyaluronidaz ve akrozin enzimlerinin inaktivasyonu, prostoglandin kaybı, ATP ve ADP sentezinde azalma, akrozomal proteolitik aktivitede azalma olarak özetlenebilir (Salamon ve Maxwell 1995b). DNA denatürasyonunun oluşabildiği de bildirilmiştir (Gillan ve Maxwell 1999).

Soğutma-donma-çözündürme prosedürünün bazı aşamalarında, spermatozoon membranlarında maturasyon, kapasitasyonu tamamlamış ve akrozom reaksiyonu geçirmiş spermatozoon sayılarında artış kaydedilmiştir (Watson 1995; Maxwell ve Watson 1996). Spermatozoon membranında meydana gelen değişimler motiliteyi etkilemese de hücrenin yaşam süresi kısalmış ve fertilite yeteneği olumsuz etkiler. Servikal tohumlamadan sonra kapasitasyonu tamamlayan spermatozoonlar, kısa süre içinde oosit ile karşılaşmazsa yaşlanır ve zamanla dölleme yeteneği azalır. Ayrıca, spermatozoonların genital kanalın uç kısımlarında doğal bir şekilde ölme olasılıkları da vardır (Salamon ve Maxwell 2000).

Donma-çözündürme aşamalarında ölümcül hasara uğramış veya tohumlama sonrasında dişi genital kanalda yaşlanmış olan spermatozoonlar ile fertilizasyon, erken embriyonik ölümlere neden olur. Ovulasyona yakın zamanda doğrudan uterus kornularına bırakılan eritilmiş sperma ile embriyo oluşumunun ve gelişiminin daha sağlıklı olduğu bildirilmiştir (Salamon ve Maxwell 2000).

Donma-çözündürme sonrası koç spermasının fertil yaşam süresi kısa olmakla birlikte, bu sorun laparoskopik yöntemle intrauterin tohumlama ile aşılmıştır (Ak ve ark. 2010; Cayan ve ark. 1992).

Koç spermasında donma hızı (Fiser ve Fairfull 1984; Maxwell ve ark. 1995; Woelders ve ark. 1997; Gunay ve ark. 2006;), sulandırıcı ozmolaritesi (Soylu ve ark. 2007), kriyoprotektan çeşitleri (Yildiz ve ark. 2000; Soylu ve ark. 2007; Nur ve ark.

2010), kriyoprotektan yoğunlukları (Fiser ve Fairfull 1984; Woelders ve ark. 1997; Yildiz ve ark. 2000), sulandırma oranları (Sanchez-Partida ve ark. 1992; Maxwell ve ark. 1995), gliserolün spermaya ilave edildiği andaki sıcaklıklar, ekilibasyon süreleri, eritme hızları (Fiser ve Fairfull 1984; Abdelhakeam ve ark. 1991a; Ali ve ark. 1992; Salamon and Maxwell 1995b. Ak ve ark. 2010) araştırılmıştır.

2.4. Koçlarda Spermatogenesis

Koçlarda spermatogenesis 9-10 haftalık yaştan itibaren başlamakta olup, fertilizasyon yeteneğine sahip spermatozoon üretiminin başarılı bir şekilde tamamlanması için erkek hayvanın yaklaşık 6-7 ay olması beklenir (Schanbacher ve ark. 1974; Foster ve Hileman. Bir seminifer epitel siklusu erişkin koçlarda 10,6 gün sürerken, toplam spermatogenez süresi 47-50 gündür (Thwaites, 1995; Zeng ve ark. 2006).

Spermatogonyumlar seminifer epitelyumda bölünmelerine, gelişimlerine ve farklılaşmalarına devam ettikçe seminifer tübül lümenine doğru ilerler ve 12-14 gün sonra spermatozoon olarak seminifer tübüllerden ayrılıp lümene geçerler. Önce kaput epididimise gelen spermatozoonlar oradan korpus epididimise ardından da ejakülasyona kadar depolanacakları kauda epididimise gelirler. Epididimisteki yolculukları yaklaşık 14 gün süren spermatozoonlar kauda epididimiste fertilizasyon kabiliyeti ve motilite gibi özellikleri kazandığı olgunlaşma sürecini geçirir (Robaire ve Hinton 2015).

2.5. Koçlarda Spermatolojik Özellikler

Spermatozoon histolojisi hayvan türlerine göre farklılık göstermektedir. Koç spermasının biyometrik özellikleri aşağıda verilmiştir (Ak 2005a; Naoman 2013).

- Uzunluk: 60 - 70 μm
- Baş: 8,3 - 9,62 μm
- Orta kısım: 8 - 11,92 μm
- Kuyruk: 40 - 50 μm
- Spermatozoon hacmi: 31 μm^3
- Yüzey alanı 42 μm^2

Koç ejakülatı yaklaşık 1 ml ve spermatozoon yoğunluğu mililitrede $1-3 \times 10^9$ kadardır (Ak 2005a). Koç spermasında motil spermatozoon oranı % 85-90, mass aktivite

++++ ve normal morfoloojiye sahip spermatozoon oranı % 85-95 olarak raporlanmıştır (Ak 2005a).

Türkiye’de koç spermasında yapılan çalışmalarda; ejakülat hacmi 1-1,5 ml, spermatozoon yoğunluğu 2,7 - 3,5 milyar/ml, motil spermatozoon oranı %70 - 84, canlı spermatozoon oranı %82, normal morfolojiye sahip spermatozoon oranı %84 - 96 ve pH oranı 6,5 olarak bildirilmiştir (Gökçen 1977; Tekin ve ark. 1991; Tekin ve ark. 2006).

Ak ve ark. (Ak ve ark. 1994; 1995) suni vajina ve elektroejekülatör kullanarak yaptıkları çalışmalarda sırasıyla 0,91 ml ve 0,89 ml ejakülat hacmi, %85 ve %87,3 motil spermatozoon oranı, 2,12 milyar ve 1,87 milyar spermatozoon/ml yoğunlukt ve %87,9 ve %83,5 normal morfolojiye sahip spermatozoon oranları bildirmişlerdir.

2.6. Koçlardan Sperma Alma Yöntemleri

Sahada en yaygın olarak kullanılan sperma alma yöntemleri suni vajina ve elektroejekülatör yöntemleridir. Suni vajina yönteminde; ebat, kayganlık ve sıcaklık dikkate alınarak koyun vajinasının imitasyonu yapılmaya çalışılır. Koçların aşım hareketi yapması ve ejakülasyonu sağlanır. Koç penisi, sıcaklığa ve basınca karşı oldukça duyarlıdır. Suni vajen iç sıcaklığı 40-44°C’ye ayarlanır. Suni vajina basıncı da subapından üflemek suretiyle ayarlanır. Aşım hareketinin gerçekleşmesi ve spermanın alınması için ortamda muhakkak östrusta olan bir koyunun bulunması gerekmektedir. Koçların görsel ve kokusal olarak uyarılması beklenir. Aşım hareketi gerçekleşince penis vücuda en yakın noktadan (prepusyum) kavranarak suni vajinaya yönlendirilir, ardından da suni vajinaya teması sağlanır. Temas sonrası koç yüklenme aşamasına geçer ve hemen ardından ejakülasyon şekillenir (Marco-Jiménez ve ark. 2005; Jiménez-Rabadán ve ark. 2016).

Suni vajina ile spermanın alınamadığı durumlarda, elektroejekülatör yönteminden yararlanılır. İşlem öncesi hayvanlar sedasyona alınır. Elektrotların bulunduğu prop, lubrikasyon sonrası rektuma yerleştirilir. Periyodik olarak, arada dinlenme fazları bulunacak şekilde, belirli bir akımda elektrik verilip sinirler uyarılarak ejakülasyon sağlanır. Bu tekniğin en büyük avantajı mevsim dışında da sperma almaya olanak sağlamasıdır (Marco-Jiménez ve ark. 2005; Jiménez-Rabadán ve ark. 2016).

Koçlardan elektroejekülatör yardımı ile alınan spermatozoonların donma işleminine karşı daha hassas olduğunu bildiren çalışmalar (Marco-Jimenez ve ark. 2005; Ledesma ve ark. 2015) olmakla birlikte bunun aksi sonuçların alındığı çalışmalar da

bulunmaktadır (Quinn ve ark. 1968). Jiménez-Rabadán ve ark. ise (2016), koçlardan elektrojekülatör veya suni vajen yardımıyla alınan spermalarda eritme sonrası motilite, progresif motilite ve hareket parametrelerinde bir farklılık olmadığını bildirmişlerdir.

Seminal plazma içeriğindeki protein kompozisyonu ve yoğunluğu sperma alma yöntemine bağlı olarak değişebilmektedir (Jiménez-Rabadán ve ark. 2016). Bu proteinlerin bazıları soğuk şokundan kaynaklanan hasarların önlenmesinde önemli bir role sahip olabilir (Barrios ve ark. 2005). Sperma hücrelerinin soğuğa karşı direnci seminal plazma içerisindeki protein oranından etkilenebilmektedir (Jiménez-Rabadán ve ark. 2016).

2.7. Koç Spermasının Muayenesi

Koç spermasının potansiyel fertilitésinin belirlenmesinde en etkin olarak kullanılan yöntem, spermatolojik özelliklerin incelenmesidir. Bunların temelini makroskobik ve mikroskobik özellikler oluşturmaktadır (Hafez 1993).

2.7.1. Makroskobik Muayeneler

Aynı tür hayvanlarda ırklar arasında sperma hacminin değişkenlik gösterdiği bildirilmektedir (Trimberger 1974). Ejakülat hacmi koçlarda üreme sezonu, bakım-besleme, ortamda dişi hayvan bulunması, sağlık durumu, vücut kondisyon skoru gibi faktörlerden etkilenebilmektedir (Trimberger 1974; Evans ve Maxwell 1987; Gökçen 1990; Tekin ve ark. 1991).

Sağlıklı koç spermasının vizkozitesi yoğun kıvamlıdır. Gözle bakıldığında kitle hareketi (mass aktivite) rahatlıkla görülebilmektedir. Vizkozite ile yoğunluk arasında pozitif bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Evans ve Maxwell; 1987; İleri ve ark. 2000; Ömür 2015).

Kendine has bir kokusu olan koç spermasının rengi beyaza yakındır. İdrar, kan veya ortamda bulunan diğer yabancı maddelerin karışması durumunda renk değişimi gözlemlenebilmektedir (Hafez 1993).

2.7.2. Mikroskobik Muayeneler

Mass aktivite çıplak gözle ve mikroskop altında incelenebilir. Mikroskobik inceleme ısıtılmış lam üzerinde ve lamel kapatılmaksızın 100 büyütmede gerçekleştirilir (Hafez 1993).

Motilite; progresif motilite, ters yönde hareket, titreme hareketi ve sirküler hareket olmak üzere 4 ana başlıkta incelenebilir (Hafez 1993). Motilite muayenesinde progresif motil spermatozoonlar dikkate alınır ve sonuçlar % olarak değerlendirilir. Sulandırıcı veya serum fizyolojik kullanılarak sulandırılan sperma örneği lama aktarılır ve üzerine lamel kapatılarak ısıtılmalı faz kontrast mikroskopta 400 büyütmede muayene gerçekleştirilir. Muayene sonucunda %70 ve üzeri motiliteye sahip olan spermalar donmaya elverişli olarak kabul edilir (Evans ve Maxwell 1987).

Vital boyama tekniklerinden yararlanılan canlılık muayeneleri, ışık, faz kontrast veya floresan ataçmanlı mikroskoplarda incelenebilmektedir (Hafez 1993). Floresan boyama teknikleri ile hazırlanan preparatlarda hücreler aldıkları renge göre ölü, canlı veya ölmek üzere (moribund) olarak değerlendirilmektedirler. En sık kullanılan floresan boyama tekniklerinden biri CFDI-PI boyamadır ve bu boyamada floresan mikroskop altında membranı sağlam canlı hücrelerin yeşil, membranı hasarlı hücrelerin kırmızı veya her iki renkte de floresan ışımaya yaptıkları görülmektedir (Câmara ve ark. 2011). Canlılık muayenesinde kullanılan eosin-nigrosin boyama tekniği (ölü spermatozoonlar kırmızı renk alır) aynı zamanda morfolojik bütünlük muayenesine de olanak sağlamaktadır. Yine bahsedilen floresan boyama tekniği ile de morfolojik bütünlük değerlendirilebilir (Bodu ve Bucak 2017). Akrozom, baş, orta kısım ve kuyrukta meydana gelen morfolojik bozukluklar bu tekniklerle değerlendirilir ve normal morfolojiye sahip spermatozoon oranının en az %80 olması arzulanır (Lasley ve ark. 1942; Evans ve Maxwell 1987; Ak 2005b). Akrozom muayenesi PNA-FITC boyama tekniği ile incelenebilmektedir (Marco-Jiménez ve ark. 2005).

Spermanın yoğunluğu, bilgisayar destekli sperma analiz cihazında gerçekleştirilmektedir. Bu yöntem, hemositometri gibi daha önce kullanılan yöntemlere nazaran daha güvenilir olmasının yanında, incelemenin daha kısa sürmesine olanak sağlamaktadır (Amann ve Waberski 2014). CASA cihazı sayesinde, spermatozoonların bireysel olarak kinetik hız parametreleri de incelenmektedir (motilite, ileri motilite, VAP, VCL ve VSL vb.). Fertilizasyon kapasitesi ve bu değerler arasında korelasyon olduğu bildirilmiştir (Foote 2003; İnanç ve ark. 2017).

Son zamanlarda daha detaylı ve güvenilir analizler geliştirilmeye çalışılmıştır. Akış (flow) sitometresi cihazında; akrozom bütünlüğü, membran bütünlüğü, canlılık ve mitokondriyal aktivite gibi parametreler incelenebilmektedir. Floresan boyama tekniği ile

hazırlanan örneklerde toplam 10.000 spermatozoonu kısa sürede inceleyebilen bu cihaz ile yapılan analizlerde daha hassas sonuçlar alındığı bildirilmiştir (Gillan ve ark. 2005).

2.8. Koçlarda Potansiyel Fertilitenin Belirlenmesi

Koçlarda fertilite, sağlıklı koyunlarla doğru zamanda çiftleştikten sonra gebeliğin şekillenmesi ve canlı yavru elde edilmesi olarak tanımlanabilmektedir. Yukarıda anlatılan spermatolojik testler sayesinde koçların potansiyel fertilitesi hakkında yorum yapılabilmektedir. Ayrıca servikal mukus penetrasyonu ve ovum penetrasyonu gibi testler de koçların potansiyel fertilitesi hakkında fikir vermektedir (Taş ve ark. 2006; Nur 2014).

Standart spermatolojik analizlerin yanında, HOST analizi ve floresan boyama tekniklerinin de potansiyel fertilitenin belirlenmesinde etkili olduğu bildirilmiştir (Malmgren 1997). Sağlıklı spermatozoonların ve oositin *in vitro* koşullarda bir araya getirilip fertilizasyonun sağlandığı bir yöntem olan *in vitro* fertilizasyon yöntemi, bilim insanları arasında en sık kullanılan potansiyel fertilite belirleme yöntemlerinden biridir (O'Meara 2005).

2.9. Spermanın Dondurularak Saklanması ve Eritilmesi

Koç spermatozoonunun plazma membran yapısı donma ve eritme işlemlerinde meydana gelen ani sıcaklık değişimlerine diğer hayvan türlerine nazaran daha duyarlıdır. Özellikle 0°C'ye yaklaşan sıcaklık değişimleri, plazma membran kompozisyonunda değişimlere sebep olmaktadır (Salamon ve Maxwell 2000). Bu duyarlılık sperma membran yapısındaki yüksek doymamış:doymuş yağ asidi oranı (White 1993; Bacinoğlu ve ark. 2007; Valente ve ark. 2010) ve düşük kolesterol:fosfolipit oranından (Motamedi-Mojdehi ve ark. 2014) kaynaklandığı ifade edilmektedir (Darin-Bennett ve White 1977; Holt 2000).

Dondurma ve eritme çalışmaları temelde; sulandırma, soğutma, dondurma ve eritme işlemlerini kapsar (Ak ve ark. 2010).

2.9.1. Koç Spermasının Sulandırılması

Spermayı soğuk şokundan korumak amacıyla çeşitli kaynaklardan sağlanan sulandırıcılar kullanılır. Yumurta sarısı, testisler, korpus luteum, beyin ve soya fasülyesinde bulunan lipidlerin fizyolojik önemi ilk olarak Milovanov ve Selivanova tarafından 1932 yılında bildirilmiştir (Milovanov ve Selivanova 1932).

Yumurta sarısı sitrat sulandırıcısı Salisbury ve arkadaşları (1941) tarafından ve Willet ve Salisbury (1942) tarafından geliştirilmiştir (Salamon ve Maxwell 2000).

Koç spermasının soğutma-donma-eritme aşamalarında özellikle akrozom olmak üzere morfolojik bütünlüğünün korunmasında ozmotik basıncı yüksek sulandırıcılar daha başarılıdır (Soylu ve ark. 2007; Ak ve ark. 2010).

Koç spermasının dondurulmasında Tris-(hydroxymethyl) aminomethane (asit-baz dengesi için), sitrik asit (ozmotik basınç dengesi için) ve sakaritler (kriyoprotektif madde ve enerji kaynağı) sulandırıcılarda sıklıkla kullanılmaktadır (Abdelhakeam ve ark. 1991b; Salamon ve Maxwell 2000; Paulenz ve ark. 2002; Camara ve ark. 2011).

Pini ve ark. (2018), yumurta sarısı içeren medyumda inkübe edilen koç spermasında 51 farklı proteinde değişimlerin şekillendiğini ve spermatozoonlara 15 farklı protein geçişinin gerçekleştiğini, spermanın endüstriyel standartlarda dondurularak saklanması belirtilen proteinleri başarılı bir şekilde tanımladıklarını açıklamışlardır.

Yumurta sarısının kriyoprotektif etkileri çoğunlukla düşük dansiteli lipoprotein (LDL) içeriğine atfedilir. Hemopeksin ve transferrin gibi yumurta sarısı içeriğinde tanımlanan ve antioksidan özellikleri olan diğer proteinlerin de kriyoprotektif etkileri olabileceği bildirilmiştir (Pini ve ark. 2018).

Sperma sulandırıcılarında sıkça tercih edilen yumurta sarısı, spermatozoaları soğuk şokuna karşı hem donma ve hem de eritme aşamalarında korumaktadır. Bu koruyucu etkinin hücre membranında rol oynadığına inanılmaktadır. Yumurta sarısının kriyoprotektif etkileri; termal şoka, spermatozoon motilitesine, akrozomal enzimlerin (hyaluronidaz) salınımını azaltmasına ve mitokondriyal membran bütünlüğünün korunmasına bağlanabilir. Yumurta sarısının kriyoprotektan etkisinin düşük dansiteli lipoprotein (LDL) fraksiyonundan kaynaklandığı raporlanmıştır (Salamon ve Maxwell 2000). Basit santrifüj işlemi uygulanarak, yumurta sarısının plazma ve granüler fraksiyonlarını ayırıştırıp LDL içeriği % 85'e kadar artırılabilir (Anton ve ark. 2003; Garcia ve ark. 2017).

LDL, faz değişimlerinde hızlıca spermatozoonun plazma membran reseptörlerine bağlanarak ortamdaki "katyonik peptit" moleküllerinin olumsuz etkilerini azaltmaktadır (Drobnis ve ark. 1993; Nauc ve Manjunath 2000; Manjunath ve ark. 2002).

Birçok araştırmacı yaptıkları çalışmalarda farklı sulandırıcılarda %1,5-50 arasında yumurta sarısının ilave edilebileceğini bildirmişler (Salamon ve Maxwell 1995a). Bu oran süt kullanılarak hazırlanan sulandırıcı medyumlarında %5-20 arasındadır. Koç sperması yüksek ozmotik basınçlı medyumlara %25-30 oranında yumurta sarısı ilave edildiğinde gliserol ilavesi yapılmaksızın başarıyla dondurulmuştur (Abdelhakeam ve ark. 1991b).

Sulandırıcılara yüksek oranda yumurta sarısı ilavesi; membran, akrozom ve kapasitasyon üzerine olumsuz etkilere neden olmaktadır (Watson ve Martin 1976; Gil ve ark. 2003b).

Sperma sulandırıcılarına donmanın zararlı etkilerinden korumak amacıyla ilave edilen bir diğer kriyoprotektan da süttür (Salamon ve Maxwell 1995a; Watson 1995). İçerdiği lipoproteinler ve lactoalbumin spermatozoon canlılığı ve motilitesi üzerine olumlu etki göstermektedir (Ollero ve ark. 1998; Ak 2005c). Süt içeriğinde bulunan kazein molekülü iyon yapıda olup, kimyasal özellikleri sayesinde kriyoprotektif ve antioksidan etki göstermektedir. Ayrıca sulandırıcıya ilave edilen süt, akrozom bütünlüğü üzerine de koruyucu etkiye sahiptir (D'Allessandro ve ark. 2001; D'Allessandro ve Martemucci 2005).

Sulandırma işlemi spermanın soğutma, dondurma ve eritme prosedürleri sırasında spermatozoonları korumak ve tohumlama dozundaki spermatozoon sayısını standardize etmek amacıyla gerçekleştirilmektedir (Salamon ve Maxwell 2000). Sulandırma oranı, düşük ısılarda (-79°C ile -196°C) gerçekleştirilen dondurma işlemlerinde koç spermasının dondurma-eritme sonrası spermatolojik parametrelerini etkilemektedir. Sulandırma oranı hesaplanırken, ejakülat hacmi, yoğunluğu, motilite ve tohumlama dozu değerlendirilir (Colas 1975; Fiser ve ark. 1987). Serviksin özgün anatomik yapısından dolayı, intraservikal tohumlamada dışı genital kanala bırakılan sperma serviks tarafında geriye doğru püskürtülebilir. Bu nedenle tohumlama hacmi ve dozuna dikkat edilmelidir (El-Alamy ve Foote 2001; D'Allessandro ve ark. 2001; Gil ve ark. 2003a; Morrier ve ark. 2003). Ancak, hacmin düşük olması gereken durumlarda sulandırma oranı da düşük olacağından, ortamda bulunan kriyoprotektan madde yoğunluğu yetersiz kalabilir (Gil ve ark. 2000; Salamon ve Maxwell 2000; D'Allessandro ve ark. 2001; Gil ve ark. 2002).

2.9.2. Koç Spermasının Soğutulması

Spermanın soğutulması işleminin en önemli amaçları spermatozoon metabolizmasını azaltmak, mevcut enerjiden daha uzun süre faydalanmasını sağlamak, metabolik artıkların daha az olmasını sağlamak ve hücreleri donma aşamasına hazırlamaktır. Sulandırıldıktan sonra spermayı 0°C'ye yakın sıcaklıklara soğutma işlemi, spermatozoonların metabolizma hızlarının düşmesine adapte olma sürecidir (Salamon ve Maxwell 2000).

Spermanın soğutulması sırasında ani sıcaklık değişimlerine maruz kalmaması için özel önlemler alınması gerekmektedir. Ortamın sıcaklığı 0°C'ye düşürülmesi sperma hücrelerinde geri dönüşümsüz hasarlara neden olur (Salamon ve Maxwell 2000). Soğuk şokunun zararlı etkileri 1931 yılında bulunmuş, kademeli soğutma ve sulandırıcıya lipit eklenmesi gibi teknikler geliştirilmiştir (Salamon ve Maxwell 2000).

Membran geçirgenliğinin soğutma işleminden sonra arttığı bilinmektedir (Robertson ve Watson 1986; Robertson ve ark. 1988). Bu durum genel olarak membranın sızdırma özelliğinin artmasından ve spesifik protein kanalları üzerindeki etkiden kaynaklanabilir (Watson 2000). Kalsiyum regülasyonu net bir şekilde soğutma işleminden etkilenmektedir ve hücre fonksiyonu üzerinde ciddi sonuçları ortaya çıkarmaktadır (Bailey ve Buhr 1994; Watson 2000). Soğutma sırasında meydana gelen kalsiyum tutulumu, hem kapasitasyona benzeyen değişimlerine ve hem de plazma membranı ile akrozom membranı arasında şekillenen füzyon olaylarına katkıda bulunur (Watson 2000). Soğutma sırasındaki membran hasarı ile akrozom reaksiyonu arasında önemli benzerlikler bulunmaktadır (Watson 2000).

Koç sperması farklı sürelerde 5°C'ye soğutulmaktadır. Bu süreler genellikle 1-3 saat arasındadır (Salamon ve Maxwell 1995b). Sperma oda sıcaklığından 5°C'ye soğutma aşamasında soğuk şokuna karşı daha hassastır (Fiser ve Fairfull 1986; Salamon ve Maxwell 1995b; Maxwell ve Watson 1996; Yavasca ve ark. 1999; Demir ve ark. 2015). Gliserol ilave edilmemiş sulandırıcıların spermaya katılmasından sonra ortamın 5°C'ye soğutulması 2 saatten daha uzun sürede gerçekleşmelidir (Evans ve Maxwell 1987; Salamon ve Maxwell 1995a). Dakikada 0,3°C'den daha hızlı soğutma hızlarında progresif motilite olumsuz etkilenmektedir (Demir ve ark. 2015).

Soğutma sonrası gliserol içeren sulandırıcı ile tekrar sulandırma işlemine gliserolizasyon denir. İki aşamalı sulandırma metodunda spermatozoonların gliserol ile

ilk teması 2-5°C’de gerçekleşir. Tek aşamalı sulandırma metodunda ise gliserollü sulandırma işlemi 30°C’de yapılır (Salamon ve Maxwell 2000).

Ekilibrasyon, spermatozoonların donma öncesinde gliserol ile temas içerisinde bulundukları süreye verilen isimdir. Bu süreçte gliserol hücre içine girmekte ve hücre içi ve hücre dışı ortamda bir denge sağlanmaktadır. Sadece gliserolün değil, ozmotik olarak aktif olan diğer maddelerin de bu dengeyi sağlaması için bekleme işlemi ekilibrasyon olarak tanımlanmaktadır (Salamon ve Maxwell 2000).

2.9.3. Koç Spermasının Dondurulması

Koç sperması dondurma çalışmaları alanındaki ilk çalışmalar tavşan, kobay, boğa, yaban domuzu ve aygır gibi türlerde gliserol kullanarak başarılı bir donma tekniğini geliştiren Bernstein ve Petropavlovsky tarafından 1937 senesinde başlatıldı (Salamon ve Maxwell 2000). Koç spermasının dondurulmasına ilişkin çalışmalar 1950’lerde önemli sayıya ulaşmıştır. Bu çalışmalarda boğa için kullanılan sulandırıcı ve dondurma prosedürleri uygulanmış, ancak %5 gibi düşük fertilite oranları elde edilmiştir (Salamon ve Maxwell 2000).

Medeiros ve ark. (2002), yaptıkları çalışmada, spermanın 0°C’den -196°C’ye soğutulması sonrası sıvı azotta metabolizmalarının durma seviyesine geldiğini ve çok uzun süre boyunca canlılıklarının devam edebileceğini bildirmişlerdir.

Payet içerisinde spermanın donma işlemi sıvı azot buharında gerçekleştirilmekte olup soğutma hızı sıvı azota olan uzaklık ile ayarlanmaktadır. Optimal soğutma hızı -110°C ile -130°C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleştirilmektedir. Daha düşük donma hızında (-55°C) gerçekleştirilen dondurma işleminin sperma hücreleri üzerinde olumsuz etki yaptıkları bildirilmiştir (Mazur 1984; Salamon ve Maxwell 2000).

Hiperozmotik sulandırıcılar ile spermatozoonların kısmi dehidre olmaları ile donma sırasında hücre içinde kristalleşen su moleküllerinin hücreye zarar vermesi büyük ölçüde engellenmektedir. Donma sürecinde hücre içinde büyük hacimli buz kristali oluşumu spermatozoon plazma membranı ve akrozomunun yapısındaki protein ve lipid molekülleri üzerinde olumsuz etki yaratmaktadır (Hafez 1993).

Hücre içi buz kristallerinin oluşumu, sulandırılmış spermanın sıcaklığının 5°C’ye düşürülme hızı, medyumun akışkanlığı ve membran permeabilitesi gibi faktörlerden etkilenmekte olup buz kristallerinin küçük hacimli ve çok sayıda olması istenmektedir (Ak ve ark. 2010). Çalışmalarda buz kristallerinin -6°C ve -10°C arasında oluştuğu,

donma devam ederken en önemli hasarların ise -10°C ve -25°C arasında şekillendiği bildirilmiştir (Morris ve Farrant 1972; Salamon ve Maxwell 1995b).

Koç spermasının dondurularak saklanması ve eritilmesi sürecinde hücrede tirozin fosforilasyonu ve hücre içi kalsiyum yoğunluğu artar. Bunun sonucunda da bazı spermatozoonlarda prematüre kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu gelişerek membran maturasyonu şekillenir (Bailey ve ark. 2003). Prematür kapasite olmuş spermatozoonlarda canlılık azalır. Dişi genital kanallarda spermatozoonların dölleme yetenekleri sınırlı bir süre için korunabildiğinden, servikal tohumlamalarda fertilizasyon bölgesine ulaşmadan bu yeteneklerini kaybetmektedirler (Maxwell and Watson 1996).

Spermatozoon kapasitasyonunda hücreden kolesterol çıkışı en önemli olaylardan biridir (Osheroff ve ark. 1999). Prematür kapasitasyon sonucunda gelişen plazma membranından kolesterol kaybına, membran stabilizasyonunda hasarlara (Leahy ve Gadella 2015) ve akrozom bütünlüğünde bozulmaya (Iborra ve ark. 2000) sebebiyet vermektedir. Spermatozoon membranındaki bozulmalar, dişi genital kanalındaki canlılık sürelerini azaltıp fertilite potansiyelini etkilemektedir (Pini ve ark. 2018).

Spermada, oksidatif metabolizmanın doğal bir sonucu olarak reaktif oksijen türleri (ROS) ortaya çıkmaktadır. ROS'un düşük yoğunlukları; kapasitasyon, hiperaktivasyon, akrozom reaksiyonu, zona pellucida ile etkileşim ve mitokondriyal kapsül stabilizasyonu gibi fonksiyonlar için önemli bir role sahiptir (Alvarez ve Storey 1984; Aitken ve Fisher 1994; Kodama ve ark. 1996; Griveau ve Le Lannou 1997; Baumber ve ark. 2000, La Falci ve ark. 2011). Spermatozoonun fizyolojik aktivitelerini sürdürebilmesi konusunda ROS üretimi ile bunların eliminasyonu arasında hassas bir denge vardır (Allai ve ark. 2018). Oluşabilecek herhangi bir dengesizlik, oksidatif stres aracılığıyla spermatozoon fonksiyonlarında negatif etkiler yaratabilir. Dondurulmuş spermanın depolamasında, lipid peroksidasyonunda artışa sebep olarak, motilite kaybına yol açabilir (Aitken 1995; Gibb ve Aitken 2016). Donma işlemi süresince koç sperması fazla miktarda hidrojen peroksit üretmekte (Maia ve ark. 2010; La Falci ve ark. 2011) ve eritme sonrası spermatozoon motilitesi düşmektedir (Maia ve ark. 2014).

Spermatozoon sınırlı bir sitoplazmaya sahip olmasından dolayı transkripsiyonel anlamda inaktiftir. Reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerine karşı koruma sağlayacak savunma sistemi yeterli olmadığından oldukça duyarlıdır (La Falci ve ark. 2011). Oksidasyon ürünleri, başta poliansatüre membran lipidleri olmak üzere, membran lipidlerinin peroksidasyonu sonucu oluşmaktadır (La Falci ve ark. 2011). Koç

spermasının dondurularak saklanması sırasında ortaya çıkan peroksidlerin temel kaynağı ölü veya hasar görmüş spermatozoonlardan salınan aromatik amino asit oksidazın aktif deaminosyonudur (Shannon ve Curson 1982).

Dondurularak saklanan spermanın fertilitésinin düşmesinde başta gelen sebeplerden birinin DNA hasarı olduğu, bu hasarın soğutma dondurma eritme gibi işlemlerdeki sıcaklık dalgalanmalarından kaynaklandığı bildirilmiştir. Ayrıca DNA'nın ROS'a karşı duyarlı olduğu ortaya konmuştur (López-Fernández ve ark. 2008; La Falci ve ark. 2011).

Memeli spermatozoonları; süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi enzimatik antioksidan savunma sistemine sahip olduğu gibi, metiyonin, askorbik asit ve α tokoferol gibi enzimatik olmayan savunma sistemine de sahiptir (Kantola ve ark. 1988; Aitken 1995; Mara ve ark. 2005; Bucak ve ark. 2012). Spermanın biyosentez kapasitesi sınırlıdır (Aitken 1995). Sperma içeriğinde bulunan antioksidan yoğunluğu sulandırma sonrasında azalır ve bunun bir sonucu olarak endojen antioksidan savunmasının yararlı etkileri de azalır. Bundan dolayı, düşük yoğunluklarda da olsa antioksidan ilavesi saklama süresince spermatozoon fonksiyonlarını iyileştirebilir (Allai ve ark. 2018).

Donma işleminin dolaylı olarak sebebiyet verdiği zararlı etkileri azaltmak amacıyla yavaş ve hızlı donma teknikleri araştırılmışır (O'Neill 1998). Koç spermasının dondurulması için kullanılan yöntemler arasında, sıvı azot buharında (sıvı azot seviyesinin 4-6 cm üzeri) spermanın yaklaşık -110°C 'de ve $17^{\circ}\text{C}/\text{dakika}$ hızla dondurulması optimal olarak kabul edilmektedir (Ak 2005c). Bu yöntemle dondurulan koç spermasında, sıcaklığın grafiksel olarak doğrusal bir şekilde azalmasına kıyasla parabolik eğri şeklinde azalması ile daha iyi sonuçlar alınmıştır (Salamon ve Maxwell 2000).

2.9.4. Dondurulmuş Koç Spermasının Eritilmesi

Donma eritme prosedüründe, spermatozoon canlılığı için eritme en az soğutma aşaması kadar önem arz etmektedir. Sıcaklığın -196°C 'ye düşürülmesinden sonra canlılığını koruyan spermatozoonlar, ısıtma ve eritme sürecinde yine kritik sıcaklık aralığı olan -15°C ve -60°C arasındaki sıcaklığa maruz kalırlar (Salamon ve Maxwell 2000). Soğutma ve eritme hızlarının yüksek olması spermatozoon canlılığı üzerinde etkilidir. Bu etki, soğutma hızının hücre içi donmayı başlatacak hızda olmasının yanında,

hücresinin dehidre olabileceği kadar da yavaş olup olmamasına bağlıdır. Eritme sırasında, kritik sıcaklık aralıklarında, hücre içi kristal yapıları değişebilir (rekristalizasyon). Bu durumun şekillenmemesi için hızlı bir eritme yöntemi önerilmektedir (Holt ve North 1994; Salamon ve Maxwell 1995b; Salamon ve Maxwell 2000).

Payetlerde dondurularak depolanan koç sperması 38°C ile 42°C sıcaklıkta eritilebilmektedir (Salamon ve Maxwell 2000). Genelde sıcaklığı 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda 30 saniyede eritme tekniği kullanılmaktadır. Araştırmacılar su banyosunda farklı eritme teknikleri sonrası gerek spermatolojik parametreler arasında gerekse gebelik sonuçları arasında önemli bir farklılık olmadığını bildirmişlerdir (Pontbriand ve ark. 1989; Söderquist ve ark. 1997; Holt 2000; Paulenz ve ark. 2004).

2.10. Sulandırıcılara İlave Edilen Kriyoprotektanlar

Sulandırma, soğutma, donma ve eritme aşamalarında spermatozoonlar farklı sıcaklıklara, farklı ozmotik basınçlara, bir takım kimyasal ve mekanik etkenlere maruz kalmakta, sonuçta fonksiyonel, morfolojik ve nükleer hasarlar oluşmaktadır. Hasarlar kullanılan yöntemlere ve kimyasal maddelere göre değişebileceği gibi hayvan türüne (spermatozoon plazma membran yapısı, permeabilite özelliği gibi) göre de değişkenlik göstermektedir. Bilim insanları oluşan hasarları en aza indirmek ve daha başarılı bir protokol oluşturmak için çalışmalarında kriyoprotektif maddeler ve sıcaklık değişimleri üzerine ağırlık vermişlerdir (Vajta ve Kuwayama 2006).

Sperma dondurma çalışmalarında membran, akrozom, DNA ve diğer spermatozoon organellerinde meydana gelen hasarları engellemek için sulandırıcıya koruyucu maddeler ilave edilir. Kriyoprotektif maddeler, donma aşamasında sıvı fazdan katı faza geçişte molekül hacmini ve aktif molekül (iyon) miktarını azaltarak etki gösterirler (Critser ve ark. 1988).

Kriyoprotektan maddelerin görevleri, donma-eritme sürecinin zarar verici etkilerinden hücreyi korumaktır. Bu etki;

- a. Hücre içi ve dışındaki çözünen maddelerin yoğunluğunun toksik olmayan seviyelerde tutulmasına (hücre içine penetre olabilen kriyoprotektanlar, gliserol, DMSO),
- b. Hücre kısmi dehidrasyonuna ve/veya
- c. Hücre membranının stabilize edilmesine (hücre içine penetre olamayan kriyoprotektanlar, sükroz) bağlıdır (Critser ve ark. 1988).

Ayrıca, doğal veya sentetik kriyoprotektan maddelerin, buz kristallerinin belirli yüzeyleriyle spesifik olarak etkileşime girdiği ve böylece kristal genişlemesini önlediği düşünülmektedir (Uchida ve ark. 2007).

Kütle ağırlıkları düşük olan kriyoprotektif maddelerin yüksek oranları spermatozoonlar üzerinde olumsuz bir dizi etkiler yaratmaktadır (Payne ve ark. 1994; Palasz ve Mapletoft 1996). Spermatozoonların başarılı bir şekilde dondurularak saklanması için su ve kriyoprotektif maddelerin hücre içi ve hücre dışı ortama taşınması (difüzyon ve aktif taşıma) önem arz etmektedir. Bu transport işlemleri plazma membranının yapısında bulunan protein yapılı moleküller sayesinde olmaktadır. Buradan hareketle bilim insanları sulandırıcılara protein yapılı kriyoprotektif maddeler eklenmesinin dondurma işlemlerinde ani sıcaklık değişimleri ve ozmotik değişikliklere karşı olan hücrelerin korunabileceğini bildirmişlerdir (Edashige ve ark. 2003).

Kriyoprotektanlar; hücre içine girebilme durumlarına göre penetre olabilen ve penetre olamayan kriyoprotektanlar olarak sınıflandırılmaktadır.

2.10.1. Hücre İçine Penetre Olabilen Kriyoprotektanlar

Hücre içine girebilen (permeabl) kriyoprotektanlar farklı sulandırıcılar için değişen oranlarda olmak üzere, hücre dışına su geçişini sağlayarak spermatozoonda dehidrasyonu sağlarlar (Purdy 2006). Kısa süre içinde kriyoprotektan ve su ekilibre olur ve hücre içi ile hücre dışı yoğunlukların eşitlenmesiyle sonuçlanır (Amann 1999). Dehidrasyon sonrası sperma hücresi daha az hücre içi su içerdiği için, hücrenin donma noktası düşer ve hücre içi toplam kristal miktarı azalır. Fazla miktardaki hücre içi buz kristali, hücre ölümü ve potansiyel fertilitede azalma ile sonuçlanır (Purdy 2006).

Permeabl kriyoprotektanlar membran lipid ve proteinlerini yeniden düzenler. Membran akışkanlığını artırarak düşük sıcaklıklarda daha fazla dehidrasyon sağlar ve böylece donma sonrası hücre canlılığını korur (Holt 2000).

Sperma dondurma sulandırıcılarına en sık ilave edilen permeabl kriyoprotektanlar; gliserol, etilen glikol ve dimetil sülfoksittir (DMSO).

Dondurularak saklanan koç sperması sulandırıcılarında en sık tercih edilen koruyucu madde gliseroldür. Gliserolün koruyucu özelliği 20. yüzyılın ilk yarısında ortaya konmuştur (Phillips 1939; Polge ve ark. 1949; Salamon ve Maxwell 2000).

Hidrofilik yapıda olan gliserolün koruyucu özelliği; yoğunluğuna, yapısındaki karbon:hidroksit oranına ve su bağlayıcı

özelliğine bağlıdır. Spermatozoon içerisine penetre olarak düşük sıcaklıklarda hücrenin su kaybetmesine neden olur ve büyük hacimli buz kristali şekillenmesinin önüne geçer (Nauk ve ark. 1970; Farrant ve ark. 1977; Salamon ve Maxwell 1995a).

Optimal gliserol oranı, yumurta sarısı oranından etkilenebilmektedir. Yumurta sarısı oranı arttıkça gliserol ihtiyacı azalmaktadır (First ve ark. 1957; Watson ve Martin 1976). Gliserol hücre membranının katmanları arasına girebilmektedir ve membrandaki lipid yapısında değişimler yaratarak membranın stabilitesini, akışkanlığını ve su geçirgenliğini değiştirebilmektedir (Noiles ve ark. 1995; Holt 2000; Tharasanit ve Techakumphu 2013).

Optimum gliserol oranı, sulandırıcı kompozisyonuna ve özellikle sulandırıcının ozmotik basıncına bağlıdır (Salamon 1968; Lightfoot ve Salamon 1969). Uygun olmayan oranlarda veya yöntemle eklenmesi durumunda, gliserol hücre üzerinde zararlı etki gösterebilmektedir (Fahy 1986; Salamon ve Maxwell 1995b; 2000). Bu zararın gliserol metabolizma ürünlerinden ‘methylglycosal’ molekülünden kaynaklandığı bildirilmiştir (Katkov ve ark. 1998; Alvarenga ve ark. 2000; Woods ve ark. 2000). Koçlarda gliserolün spermatozoonlara daha kolay penetre olabildiği ve bu nedenle hem olumlu hem de zararlı etkilerinin hayvan türlerine göre farklılık gösterdiği bildirilmiştir (Nauk ve ark. 1970). Bazı araştırmacılara göre, sulandırılmış spermaya gliserol 5°C’de eklendiğinde, membranları geçme yeteneği ve toksik etkisi daha azdır (Bacinoglu ve ark. 2007; Ak ve ark. 2010). 30°C gibi yüksek sıcaklıklarda gliserol ilavesinin zararlı olduğu, spermanın uzun süre gliserole maruz kaldığı ve bu sıcaklıkta gliserolün toksik etkisinin arttığı bildirmiştir (Bacinoglu ve ark. 2007; Critser ve ark. 1988).

Geleneksel yöntemlerle dondurulan koç spermasında sulandırıcılarda optimum gliserol yoğunluğu %6-8 arasında değişmektedir (First ve ark. 1957; 1961; Part ve Nath 1969; Kareta ve ark. 1972; Andersen ve ark. 1973; Salamon ve Maxwell 1995a; 2000). Bazı araştırmacılar en iyi etkiyi %4-6 oranında gliserol ilavesinde elde ettiklerini bildirmişlerdir (Gökçen ve ark. 1983; Fiser ve Fairfull 1984).

Gliserol haricinde birçok madde kriyoprotektif amaçlı olarak sulandırıcılara eklenmiştir. DMSO, etilen glikol, düşük moleküler ağırlıklı poliyoller, polimerik bileşikler, surfaktanlar, yüksek yoğunlukta şekerler vb. araştırılmış, ancak bu maddelerin hiçbirisi gliserol kadar yaygın olarak kullanılmamıştır (Salamon ve Maxwell 2000).

2.10.2. Hücre İçine Penetre Olamayan Kriyoprotektanlar

Hücre içine penetre olamayan (non-permeabl) kriyoprotektanlar spermatozoon plazma membranından geçemedikleri için etkilerini hücre dışında göstermektedirler (Amann 1999). Sulandırıcının ozmolaritesini artırdıkları için hücre membranının yapısında mekanik olarak değişimlere sebep olurlar ve ozmolarite farkından dolayı intraselüler ortamdaki su ve katyonik moleküllerin ekstraselüler ortama geçmesini sağlarlar. Non-permeabl kriyoprotektanlar hücrenin plazma membranında değişiklikler yapabildiği gibi çözelti olarak da etkilidirler ve bulundukları medyumun donma sıcaklığını düşürürler (Amann 1999). Sulandırıcının bu tipte kriyoprotektan içermesi, hücre içine girebilen maddelere olan ihtiyacı azaltarak dolaylı olarak toksik etkilerini de sınırlandırmaktadır (Arav ve ark. 1993; Cabria ve ark. 2001).

Şekerler sperma sulandırıcılarına eklendiğinde koç spermasının kalitesini ve fertilitatesini artırmaktadırlar (Jafaroghli ve ark. 2011). Farklı şeker yoğunlukları ile hazırlanmış hiperozmotik sulandırıcıların, donma-eritme sonrası, spermatozoon bütünlüğünü iyileştirdiği bilinmektedir (Salamon ve Visser 1972). Şekerler, monosakkaritler, disakkaritler ve trisakkaritler olarak sınıflandırılabilen ve olup, her sınıftaki şekerlerin donma ve eritme sırasında sergiledikleri kriyoprotektif özellikleri farklıdır (Yildiz ve ark. 2000; Panyaboriban ve ark. 2015). Sperma sulandırıcılarına ekzojen olarak ilave edilen şekerlerin birincil görevleri enerji kaynağı olmalarıdır (Panyaboriban ve ark. 2015). Sakkaritler, hücre membranından geçemezler ve sulandırıcıya ilave edildiğinde, enerji sağlamanın yanında, oluşturdukları hiperozmotik ortam sayesinde donma öncesi hücresel dehidrasyonu sağlarlar (Schmehl ve ark. 1986; Fiser ve ark. 1987; Molinia ve ark. 1994; Storey ve ark. 1998). Bu ozmotik etki hücre içinde donabilecek olan su miktarını azaltır ve buz kristali olumşumunu azaltarak hücrenin zarar görmesinin önüne geçer (Aisen ve ark. 2002).

Monosakkaritler, koç spermatozoonunun seminal plazmasında temel madde olarak bulunduğu için, sperma dondurma sulandırıcısına enerji kaynağı ve koruyucu madde olarak eklenmesi önerilmektedir (Salamon ve Maxwell 2000). Früktoz, koç spermasının kriyoprezervasyonunda sulandırıcılarda kullanılan en faydalı şekerlerdendir (Salamon ve Maxwell 2000; Ak ve ark. 2010; Panyaboriban ve ark. 2015). Küçük ruminantlarda, sperma seminal plazmasında früktoz, glikoliz için birincil substrattır (Glover 1956; Pellicer-Rubio ve ark. 1997). Sperma sulandırıcısına ilave edilen früktoz, glikoza oranla daha iyi bir ATP üretimi sağlamaktadır (Panyaboriban ve ark. 2015). Koç spermasında

basit şekerlerden sadece früktoz bulunmasına karşın, sulandırıcıya eklendiğinde glikoz ve mannoz, spermatozoa tarafından metabolize edilebilmektedir (Salamon ve Maxwell 2000). Monosakaritler ayrıca düşük molekül ağırlığına (früktoz ve glikoz) sahip olmaları nedeniyle spermatozoon plazma membranına penetre olabilmektedirler (Purdy 2006; Panyaboriban ve ark. 2015).

Disakkaritler, basit şekerlerin (glikoz ve früktozun) aksine daha kriyoprotektan etkilidirler (Purdy 2006). Disakkaritler (laktoz, rafinoz, trehaloz ve sükroz), yüksek ozmotik basınç oluşturarak hücre dehidrasyonunu başlatır ve böylece hücre içi buz kristali oluşumunu azaltırlar (Parks ve Graham 1992). Bu şekerler aynı zamanda plazma membranındaki fosfolipitler ile etkileşime girerek membranı yeniden düzenlerler. Membran akışkanlığını artırarak spermatozoonların donma sürecinden daha sağlıklı çıkmalarını sağlarlar (McGann 1978; Molinia ve ark. 1994; McWilliams ve ark. 1995; Aisen ve ark. 2002; Purdy 2006). Hücre içine penetre olamayan şekerlerin plazma membranının katmanları arasına penetre oldukları, fosfolipitlerin polar grupları ile birlikte hidrojen bağı oluşturdıkları ve bu şekilde de buz kristali oluşumunu önledikleri bildirilmiştir (Liu ve ark. 1998; Aboagla ve Terada 2003; Purdy 2006; Uchida ve ark. 2007; Panyaboriban ve ark. 2015). Lipit katmanları arasına girmeleri sonucunda membrandaki kuru lipidlerin katı faz geçişi daha kolaylaşır (Molinia ve ark. 1994; Aisen ve ark. 2002; Meyers 2005; Patist ve Zoerb 2005; Fernández-Santos ve ark. 2007) ve buz kristali oluşumu azalır. Trehaloz, sulandırıcıda spermatozoonlara sağlanan serbest su moleküllerini azaltarak hücrenin dehidrasyonunu indüklemekte ve buz kristali oluşumunu azaltmaktadır; eritme sonrası membran bütünlüğünün korunmasında da olumlu etkileri vardır (Cirit ve ark. 2013). Aynı zamanda sükroz da buz kristali oluşumunu azaltmaktadır (Panyaboriban ve ark. 2015).

2.10.3. Sulandırıcıya Kriyoprotektan Olarak Bal İlavesi

2.10.3.1. Balın genel özellikleri ve yapısı

Türk Gıda Kodeksinde bal, “Bitki nektarlarının, bitkilerin canlı kısımlarının salgılarının veya bitkilerin canlı kısımları üzerinde yaşayan bitki emici böceklerin salgılarının balarısı tarafından toplandıktan sonra kendine özgü maddelerle birleştirerek değişikliğe uğrattığı, su içeriğini düşürdüğü ve petekte depolayarak olgunlaştırdığı doğal ürün” olarak tanımlanmaktadır (Türk Gıda Kodeksi 2012/58).

Gıda kodeksinde üretim şekline göre çiçek balı; bitki nektarından elde edilen bal; salgı balı, bitkilerin canlı kısımlarının salgılarından veya bitkilerin canlı kısımları üzerinde yaşayan bitki emici böceklerin *-Hemiptera-* salgılarından elde edilen bal olarak tanımlanmaktadır (Türk Gıda Kodeksi 2012/58). Salgı balı özelliğinde olan çam balı ise, bal arısının, *Pinus brutia* (kızılçam) üzerinde yaşayan *Marchalina hellenica* (pamuklu koşnili) isimli böceklerin çam bitkisinin canlı kısımları tarafından salgılanan şeker çözeltisinin içerisinde bulunan ve kendileri için esansiyel olan besin maddelerini alıp kalanları vücut dışına bıraktıkları atıkları alıp bala çevirmesi ile oluşur (Özkök ve ark. 2016).

Bal hakkında ilk yazılı referans milattan önce 2100-2000 yılları arasında yazılan Sümer tabletlerinde ortaya çıkmıştır. Bu tabletlerde ilaç ve merhem olarak kullanıldığından bahsedilmektedir (Bogdanov ve ark. 2008). Antik kültürlerde bal, hem beslenme amaçlı hem de tıbbi amaçlı olarak kullanılmıştır (Crane 1975; Allsop ve Miller 1996).

Son yıllarda alternatif bir tıp yöntemi olarak “apiterapi” geliştirilmiş olup başta bal olmak üzere diğer arı ürünlerinin de birçok hastalığa karşı kullanılması önerilmektedir. Günümüzde sağaltım alanında balın en geniş kullanım alanı yaralar, yanıklar ve enfeksiyonlardır (Molan 1999). Bal, erkek ratlarda sperma kalitesini ve fertilitiyi artırmak amacıyla oral yoldan kullanılmış, spermatogenezisi, spermatozoon sayısını ve normal spermatozoon sayısını artırmış spermatozoon baş ve kuyruk bozukluklarını ise azatmıştır (Syazana ve ark. 2011).

Balın bileşimi, kalitesi, rengi ve lezzeti; elde edildiği bölgenin iklimi, bitki türleri, çevresel özellikleri, arı çeşidi, balın hasat şekli, hasat sonrası depolama koşulları gibi faktörlere bağlıdır (Turkmen ve ark. 2005; Kukurova ve ark. 2008). Balın görünümü ve içeriği botanik kökenine göre büyük farklılık göstermektedir (Persano Oddo ve Piro 2004). Besleyicilikle ve sağlıkla ilgili olan bileşenleri karbonhidratlar olup, früktoz ve glikozun yanı sıra 25 farklı oligosakkarit ihtiva etmektedir (Bogdanov ve ark. 2008). Az miktarlarda protein, enzim, amino asit, mineral, iz elementler, vitamin, aromatik bileşikler ve polifenoller de içermektedir (Bogdanov ve ark. 2008).

Balın kuru maddesinin yaklaşık %95’i başta früktoz ve glikoz olmak üzere karbonhidratlardan oluşmaktadır (Bogdanov ve ark. 2008). Çiçek (nektar) balında bulunan temel oligosakkaritler; sükroz, maltoz trehaloz ve turanoz gibi disakkaritler olmaktadır (Bogdanov ve ark. 2008).

Çiçek balı ile karşılaştırıldığında çam balı, melezitoz ve rafinoz gibi oligasakaritleri daha yüksek miktarda ihtiva etmektedir (Bogdanov ve ark. 2008). Bal, %0,5 oranda protein içermekte olup, proteinlerin çoğunluğu enzim ve amino asitlerden oluşmaktadır. Protein içeriğini oluşturan üç ana enzim, diastaz, invertaz ve glikoz oksidazdır (Bogdanov ve ark. 2008). Farklı kaynaktan toplanan unifloral ballar değişen oranlarda mineral ve iz element içermektedir (Bengsch 1992).

Değişik bal tiplerinde 56-500 mg/kg'a kadar değişen miktarlarda polifenol bulunmaktadır (Al-Mamary ve ark. 2002; Gheldof ve ark. 2002). Balda bulunan polifenoller genel olarak flavonoid (quercetin, luteolin, kaempferoll, apigenin, chrysin, galangin), fenolik asit ve fenolik asit derivatlarıdır. Bu bileşiklerin antioksidan özellikleri olduğu bilinmektedir (Tomás-Barberán ve ark. 2001).

Balın; antimikrobiyel, antiparaziter, antiinflamatuvar, antioksidan, antiaterojenik, antitrombotik, immünmodülatif, antitumörjenik, antineoplastik ve antimetastazik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Vinson ve ark. 1998; Weston 2000; Gheldof ve ark. 2002; Bogdanov ve ark. 2008). Bal, mikroorganizma ve mantarların üremesini durdurmaktadır. Antibakteriyel etkisi daha çok gram pozitif bakterilere karşıdır (Bogdanov 1997; Molan 1999). Birçok patojen suş üzerine hem bakteriyostatik hem de bakterisit etkileri kaydedilmiştir (Bogdanov ve ark. 2008). Balın bileşiminde bulunan glikoz oksidaz enzimi, antibakteriyel ajan olan hidrojen peroksit üretir (White ve ark. 1963). Balda peroksit olmayan, farklı kimyasal kökene sahip olan aromatik asitler (Russell ve ark. 1988), fenolik bileşikler ve flavonoidler (Weston ve ark. 1999; Cushnie ve Lamb 2005) gibi antibakteriyel maddeler de bulunmaktadır. Bal, sahip olduğu düşük pH değeri sayesinde de antibakteriyel etki göstermektedir (Yatsunami ve Echigo 1984). Düşük su aktivitesine sahip olması nedeniyle bal mikrobiyal çoğalmayı durdurur (Bogdanov ve ark. 2008; Fakhrildin ve Alsaadi 2014).

Bal, bileşiminde bulunan glikoz oksidaz, katalaz, askorbik asit, flavonoidler, fenolik asitler, karotenoid derivatları, organik asitler, Maillard reaksiyonu ürünleri, amino asitler ve proteinler sayesinde belirgin bir antioksidan etkiye sahiptir (Frankel ve ark. 1998; Al-Mamary ve ark. 2002; Fahey ve Stephenson 2002; Gheldof ve ark. 2002; Aljady ve Kamaruddin 2004; Beretta ve ark. 2005; D'arcy 2005; Inoue ve ark. 2005; Blasa ve ark. 2006; Nagai ve ark. 2006; Perez ve ark. 2007). Yapılan çalışmalar, balın antioksidan aktivitesi, fenolik içeriği ve insan serumunda *in vitro* lipoprotein oksidasyonu inhibisyonu arasında belirgin oranda pozitif korelasyon mevcut olduğunu ortaya koymuştur (Gheldof

ve ark. 2003). Bal, az miktarda da olsa, antioksidan özelliğe sahip olan krisin, pinobanksin, C vitamini, katalaz ve pinosembirin gibi birçok bileşiği yapısında bulundurmaktadır (Bogdanov ve ark. 2008; Fakhrildin ve Alsaadi 2014).

Türkiye’de çam balının ana kaynağı, *Pinus brutia* (kızılçam) üzerinde yaşayan *Marchalina hellenica* (pamuklu koşnili) isimli böcektir (Akbulut ve ark. 2009; Özkök ve ark. 2016). Bu böceğin yaşam alanı sadece Güney Marmara, Ege ve Batı Akdeniz başta olmak üzere Türkiye (Gürkan 1989) ve Yunanistan’dır. (Santas 1979; Öğretmen ve İnanan 2014). Çam balı, bitkilerin canlı kısımlarının salgılarından ve/veya bitkilerin canlı kısımlarında yaşayan böcek atıklarından kaynaklanmaktadır (Sanz ve ark. 2005). Böcekler, bitkideki şeker çözeltisi içerisindeki kendileri için esansiyel olan besin maddelerini alıp kalanları vücut dışına bırakırlar; alarıları bu kalıntıları alıp kovana götürerek bala çevirirler (Özkök ve ark. 2016).

Çam balı yüksek oranda monosakkaritler (%70-80), su (%10-20), organik asit, mineral, protein, fenolik bileşikler ve serbest amino asitler gibi diğer minör maddelerden oluşmaktadır (Akbulut ve ark. 2009). Karbonhidrat içeriği temel olarak früktoz ve glikozdan oluşmaktadır (Louveaux 1985; Jean-Prost 1987; Sato ve Miyata 2000; Terrab ve ark. 2001; Nagai ve ark. 2002; Ouchemoukh ve ark. 2005; Öğretmen ve İnanan, 2014). Çam balı aynı zamanda magnezyum, potasyum, kalsiyum, sodyum klorür, kükürt, demir ve fosfatları; ayrıca B1, B2, B3, B5, B6 ve C vitaminlerini de içermektedir (Estevinho ve ark. 2008).

Çam balı, çiçek balına oranla daha yüksek fenolik madde içermektedir (Ouchemoukh ve ark. 2005). Bileşiminde, yüksek miktarda fenolik bileşik içermekte olup antioksidan özelliği çok yüksek olan falavanon grubu flavanoidler mevcuttur (Akbulut ve ark. 2009; Özkök ve ark. 2016). Akbulut ve ark. (2009), çam balı içeriğindeki fenolik bileşik miktarının, antiradikal aktivite ile pozitif korelasyon içerisinde olduğunu bildirmiş, çam balının çok sayıda antioksidan madde içerdiğini, önemli bir doğal antioksidan kaynağı olduğunu ve birçok hücre tipi üzerinde etkisi olduğunu açıklamıştır.

Erejuwa ve ark. (2012), balın çeşitli vücut organlarının sağlığı üzerine etkilerini değerlendirdiği derlemede, balı yeni kuşak antioksidan olarak tarif etmiştir.

Çiçek ve çam ballarının sahip olması gereken özellikler Türk Gıda Kodeksi’nin Ek-1’inde yayınlanan tabloda belirtilmiştir (Tablo 2-1).

Tablo 2-1: Çiçek ve Salgı (Çam) ballarının özellikleri - Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliğinden (2012/58) alınmıştır.

	Çiçek Balı	Salgı Balı
Nem (en fazla)	%20	%20
	%23 Püren (<i>Calluna</i>) ballarında	
Sakaroz (en fazla)	5 g/100 g	5 g/100 g
	10g/100g (Yalancı akasya (<i>Robinapsedoacacia</i>) Adi yonca (<i>Medicago sativa</i>) Menzies Banksia (<i>Banksiameziesii</i>) Tatlı yonca (<i>Hedysarum</i>) Kırmızı okaliptüs (<i>Eucalyptuscamadulensis</i>) Meşin ağacı (<i>Eucryhia lucida</i> , <i>Eucyrphia milliganii</i>) ve Narenciye ballarında)	10g/100g (Kızılçam (<i>Pinusbrutia</i>) ve Fıstık çamlarından (<i>Pinuspineae</i>) elde edilen salgı ballarında)
	15 g/100 g Lavanta çiçeği (<i>Lavandulaspp.</i> <i>Boraga officinalis</i>) ballarında	
Fruktoz +Glukoz(en az)	100 g'da 60 g	100 g'da 45 g
Fruktoz / Glukoz	0,9 - 1,4 1,0-1,85 Kestane (<i>Castanea sativa</i>) 1,2-1,85 Akasya (<i>Robiniapseudoacacia</i>) 1,0-1,65 Kekik (<i>Thymus spp.</i>)	1,0-1,4
Suda çözünmeyen madde (en fazla)*	0,1 g/100 g	0,1 g/100 g
Serbest asitlik (en fazla)	50 meq/kg	50 meq/kg
Elektrik iletkenliği	En fazla 0,8 mS/cm (Kocayemiş (<i>Arbutus unedo</i>), Çanotu (<i>Erica</i>), Okaliptus, İhlamur (<i>Tilia spp.</i>), Süprügeçalı (<i>Callunavulgaris</i>), Okyanus mersini (<i>Leptospermum</i>) Çay ağacı (<i>Melaleuca spp.</i>), ve Pamuk (<i>Gossipium spp.</i> 'danelde edilenler hariç) En az 0,8 mS/cm (Kestane balında)	En az 0,8 mS/cm
Diastaz sayısı (en az)	8 3 (Narenciye balı gibi yapısında doğal olarak düşük miktarda enzim bulunan ve doğal olarak HMF miktarı 15 mg/kg'dan fazla olmayan balda)	8
HMF (en fazla)**	40 mg/kg	40 mg/kg
Balda protein ve ham bal delta Cl3 değerleri arasındaki fark	-1,0 veya daha pozitif	-1,0 veya daha pozitif
Balda protein ve ham bal delta Cl3 değerlerinden	%7	%7

	Çiçek Balı	Salgı Balı
hesaplanan C4 şekerleri oranı (en fazla)		
Prolin miktarı (en az)	300 mg/kg	300 mg/kg
	180 mg/kg (Kanola, ıhlamur, narenciye, lavanta, okaliptüs ballarında)	
	120 mg/kg (Biberiye, akasya ballarında)	
Naftalin miktarı (en fazla)***	10 ppb	10 ppb

2.10.3.2. Balın Reprodüktif Özellikler Üzerine Etkisi

Saxena ve ark. (2010), balarılar tarafından üretilen balın süpersatüre bir şeker çözeltisi olduğunu bildirmiş ve karbonhidrat, protein, enzim, amino asitler ve organik asitler, lipit, vitamin, uçucu kimyasallar, fenolik asit, flavonoidler ve minerallerin kompleks karışımından oluştuğunu belirtmişlerdir. Balın üreme sağlığının korunmasındaki olumlu etkileri araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur (Oršolić ve Bašić. 2007; Zoheir ve ark. 2015). Bu etkilerin; früktoz ve glikoz gibi şekerler, magnezyum, potasyum, kalsiyum, sodyum klorür, kükürt, demir ve fosfatlar, kafeik asit, kafeik asit fenetil ester, flavonoid glikonları, B1, B2, C, B6, B5 ve B3 vitamini gibi zengin besleyici içeriğe sahip olmasına bağlı olduğu düşünülmektedir (Oršolić ve Bašić. 2007; Estevinho ve ark. 2008; El-Sheshtawy ve ark. 2016).

Bal, spermanın dondurularak saklanması sırasında, hem hücre için besin kaynağı olan hem de hücre içine penetre olmayan kriyoprotektanlar olarak görev yapan birçok basit şekeri yüksek miktarda içermektedir (Fuller 2004) ve spermatozoonları soğuk şokuna bağlı olarak gelişen hasarlardan koruyabilir (Jerez-Ebensperger ve ark. 2015). Aynı şekilde çam balı içerisinde yüksek miktarda bulunan früktoz ve glikozun yanı sıra K^+ , Na^+ , Ca^{++} ve Mg^{++} bulunur ve dondurarak saklama prosedürlerinde sıklıkla kullanılır (Öğretmen ve İnanan 2014).

Arı balı antioksidan ve antibakteriyel özelliklere sahiptir (Zoheir ve ark. 2015; Aljady ve ark. 2000). Yapısında bulunan antioksidanlar sayesinde reaktif oksijen türleri (ROS) serbest radikallerini bağlayarak lipit peroksidasyonu oluşumunu önler ve sperma membranını hasara uğramaktan kurtarır (Maidin ve ark. 2018). Arı balı içeriğindeki flavonoidler, serbest radikal süpürücü aktiviteye sahip olup serbest radikallerin başlattığı DNA hasarını inhibe eder (Chen ve ark. 2004).

Bal, çok düşük sıcaklıklarda katı faza geçmemekte ve sıcaklık düştükçe viskozitesi artmaktadır (Fakhrildin ve Alsaadi 2014). Azalan sıcaklıklarda çok yoğun sıvılar gibi, bal daha kalın ve kondens bir yapıya dönüşüp, katı olarak görünüp

hissedildiği durumlarda bile çok yavaş oranda bir akışkanlık sergilemektedir (Fakhrildin ve Alsaadi 2014). Bal -42°C ile -51°C arasında camlaşma sergilemekte ve daha düşük sıcaklıklarda camsı duruma dönüşüp anamorfoz katı olmaktadır (Kántor ve ark. 1999; Russell ve Israeloff 2000).

Boğa spermasının dondurulmasında ticari Bioexcell sulandırıcısı ile bal içeren Tris bazlı sulandırıcı karşılaştırılmış, eritme sonrası incelemelerde benzer sonuçlar alınmıştır (Yimer ve ark. 2015).

İnsan sperması ile yapılan bir çalışmada, balın sperma kalitesini yükselten özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Fakhrildin ve Alsaadi 2014). İnsan spermasının dondurularak saklanması sulandırıcıya %10 oranında bal eklenmesi eritme sonrası sperma parametrelerinde iyileşme sağlamıştır (Fakhrildin ve Alsaadi 2014).

Teke spermasının dondurulmasında Tris-sitrik asit sulandırıcısına %0,5 v/v çörek otu ve %2 v/v bal ilavesi ile spermatozoonların canlılık süresinin uzadığı bulunmuştur (Maidin ve ark. 2018).

Yapılan bir çalışmada, katkı maddesi olarak çam balı balık spermasının dondurulmasında kullanılmış, antioksidan etkisinin yanında, aynı zamanda içerdiği organik ve inorganik maddelerin yararları açıklanmıştır (Öğretmen ve İnanan 2014).

Jerez-Ebensperger ve ark. (2015), pastörize yumurta sarısı ile biberiye balının sperma sulandırıcısına birlikte ilave edilmesinin, koçlarda eritme sonrasında sperma motilitesi ve akrozom bütünlüğünü artırdığını bildirmişlerdir.

Olayemi ve ark. (2011), soğukta (5°C) saklanan teke sperması için yumurta sarısı sulandırıcısına az oranda bal ilavesinin spermatozoon motilitesi ve canlılığını koruduğunu bildirmişlerdir.

El-Sheshtawy ve ark. (2014), Tris bazlı sulandırıcıya bal ilavesi sonrası boğa spermasını dondurmuş, eritme sonrası motilite ve suni tohumlama sonrası gebelik oranlarında daha başarılı sonuç aldıklarını bildirmişlerdir.

Arap aygırlarında yapılan çalışmada, sulandırıcılara katkı maddesi olarak ilave edilen balın, donmaya bağlı oluşan hasarlara karşı daha iyi koruma sağladığı bildirilmiştir. Çalışmada balın, eritme sonrası spermatozoon parametrelerinden motilite, canlılık ve membran bütünlüğünü koruduğu bilirlmiş, balın besin değeri, enerji kaynağı, antibakteriyel ve antioksidan özellikleri sebebi ile olumlu etkilere sahip olduğu belirtilmiştir (El-Sheshtawy ve ark. 2016).

Jerez-Ebensperger ve ark. (2015), 4°C’de saklanan koç sperması için, sulandırıcıya bal ilavesinin spermada şekillenen hasarları azalttığı sonucuna varmışlardır.

Manda boğalarında yapılan bir çalışmada Tris-sitrat sulandırıcısı kullanılarak, soğukta (5°C) saklanan spermalarda %1, dondurularak saklanan spermalarda ise %2,5 bal ilavesinin spermatolojik özellikleri olumlu etkilediği saptanmıştır (El-Nattat ve ark. 2016).

Abdullah ve ark. (2015) tarafından, insan spermasının dondurulmasında sulandırıcıya %10 bal ilavesinin, %5 bal ilavesine göre eritme sonrası spermatolojik özelliklere daha olumlu etkilere sahip olduğunu gösterilmiştir. Araştırmacılar, %10 arı balı ve 10 M koenzim Q10 kombinasyonunun ilavesi ile daha başarılı eritme sonrası değerler saptamışlardır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma 2018 yılı mayıs ve kasım ayları arasında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı barınaklı ve laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Etik Kurul Onayı ve İzinler

Doktora çalışmasında İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Biriminin 29551 proje nolu desteği kullanılmıştır.

“İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’nun” 13/11/2017 tarihli 425005 sayılı yazısı ile gerekli etik kurul onayı alınmıştır.

3.2. Çalışmada Kullanılan Hayvan Materyali

Çalışmada anabilim dalı barınaklarında barındırılan 5 baş Kıvırcık ırkı koç kullanıldı. Koçların her birinden dörder kez ejakülat alınarak bireysel spermatolojik özellikleri saptandı. Alınan sperma örnekleri Yumurta sarısı-Tris-Sitrik asit-Früktoz sulandırıcısı ile motilite oranı dikkate alınarak payette 50 milyon spermatozoon bulunacak şekilde sulandırılıp payet yöntemine göre donduruldu. Donma sonrası sıvı azotta depolanan örnekler 37°C’de 30 saniyede eritildi. Koçlardan alınan sperma örneklerinin bireysel donma yetenekleri belirlendi.

3.2.1. Koçların Barındırılması ve Beslenmesi

Koçlar 18 m² alanı olan bokslarda barındırıldı. Ayrıca gündüz saatlerinde en az 8 saat serbest dolaşabildikleri açık gezinme alanlarına bırakıldı. Beslemede her bir koç için günlük 1 kg/koç konsantre yem ve yüksek kalitede ot verildi. Hayvanların önlerinde her zaman içelebilen nitelikte temiz su bulunduruldu.

3.2.2. Koçlardan Sperma Alma Sıklığı

Anöstrus döneminde olunması ve suni vajinayı reddetmeleri nedeniyle koçlardan elektroejakülatör ile haftada bir kez sperma alındı (P-T Electronics, Model 302, Boring, Oregon, USA) (Marco-Jimenez ve ark. 2005).

3.2.3. Koçlardan Sperma Alma Yöntemi

Koçlarda sedatif etki sağlamak amacıyla ksilazin 0,2 mg/kg dozda kas içi uygulandı (Marco-Jiménez ve ark. 2005). Koçlar sağ tarafı alta gelecek şekilde tespit edildi. Prepusyum uç bölgesinde bulunan kıllar makas yardımı ile kısaltıldı. Prepusyum

bölgesi, steril serum fizyolojik ile yıkanarak kurulandı. Bipolar prop fizyolojik tuzlu su ile yıkandı. Kayganlaşmayı sağlamak amacıyla probun ucuna bir miktar vazelin sürülerek elektrot ventralde kalacak şekilde rektuma yerleştirildi. Flexura sigmoidea manipüle edilerek penisin bir miktar prepsiyumdan çıkması sağlandı. Glans penis vücut sıcaklığında bulunan cam huni ve sperma toplama kadehine yönlendirildi. Birkaç saniye aralıklarla 2-5 Volt akım uygulandı ve ejakülasyon sağlandı (Ak ve ark. 2010).

3.3. Spermatolojik Parametreler

Sperma toplama kadehindeki ejakülat 26°C'deki su banyosuna yerleştirildi. Dereceli sperma toplama kadehine bakılarak sperma hacmi ölçüldü. Spermatozoon motilitesi ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopta incelendi. Mikroskop sahasında 40–60 adet hücre olacak şekilde örnek sulandırıldı ve 200 büyütmede subjektif olarak incelendi ve yüzde değeri kaydedildi.

Kitle hareketi için örnekler sulandırılmadan ve üzerine lamel kapatılmaksızın 100 büyütmede incelendi. Değerlendirmelerde ++++ sistemi kullanıldı (+++ çok iyi, +++iyi, ++vasat, +kötü). Vasat ve kötü özellik gösteren ejakülatlar çalışmada kullanılmadı (Ak ve ark. 2010).

Beş baş koça ait ejakülatlar tek kapta birleştirildi (pooling). Pooling sonrası spermatozoon motilitesi ve yoğunluğu bilgisayar ile desteklenen spermatozoon analizi yapan makine (CASA) yardımı ile belirlendi ("CASA 12.3 IVOS, Hamilton-Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA") (Amann ve Waberski 2014).

Spermatolojik incelemeler tüm gruplar için ekilibrasyon sonrası gerçekleştirildi. Bu aşamada, CASA yardımı ile motilite, progresif motilite ve spermatozoon kinetik hız parametreleri (KHP) incelendi (Amann ve Waberski 2014). Subjektif spermatozoon motilitesi faz kontrast mikroskopta muayene edildi. Ayrıca, ekilibrasyon sonrasında çalışma gruplarının morfolojik muayenesi (Hancock Tespit Solüsyonu) faz kontrast mikroskopta incelendi (Hancock 1952)

Bilgisayar Destekli Sperma Analiz Cihazı (CASA) ile Spermatolojik Özelliklerinin Belirlenmesi: İncelemelerden önce cihaz koç sperması için belirtilen standart değerlere ayarlandı (Demir ve ark., 2015). Ekilibrasyon sonrasında çalışma gruplarından alınan üçer µl örnekler makler sayım kamarasına ('Makler counting chamber, Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel') yerleştirildi ve analizler

gerçekleştirildi. Motilite ve progresif motilite parametrelerinin yanısıra Kinetik Hız Parametreleri değerlendirildi (Amann ve Waberski 2014).

Donma işleminden en az bir hafta sonra aynı çalışma gününde dondurulmuş tüm çalışma gruplarından birer payet depolandıkları sıvı azot tankından rastgele alınarak 37°C'lik suda 30 saniye bekletilerek eritme işlemi gerçekleştirildi (Ak ve ark. 2010). Eritme sonrası payetler kurulandı ve poli vinil alkol (PVA) kaplı uçlarından kesildi. Payetin içeriği önceden numaralandırılmış 500 µl hacimdeki plastik tüplere aktarıldı. Her bir tüpten alınan üçer µl örnek CASA cihazında ölçüm yapmaya yarayan makler sayım kamerasına ayrı ayrı koyularak analizler gerçekleştirildi. Sperma hücreleri için CASA'da; motilite ve progresif motilite, kinetik hız parametreleri (VAP, VSL, VCL), hız oranları (hızlı, orta, yavaş, hareketsiz) incelendi.

Kinetik Hız Parametreleri (µm/sn): İncelenen örnekte hücrelerin birim zaman diliminde yol aldıkları mesafedir.

VSL (Progressive Velocity/Düz Çizgi Hızı): Spermatozoonların bir saniyede kat ettikleri düzleştirilmiş (kuş uçuşu) mesafedir. Hücre başının bir saniyede kat ettiği iki nokta arasındaki uzaklıktır.

VCL (Track Speed/Eğrisel Hız): Spermatozoon başının birim zamanda (bir saniye) kat ettiği gerçek mesafedir. Uzaklığın hesaplanmasında spermatozoonun eğrisel hareket etmesi ve sağa-sola baş salınımları dikkate alınır.

VAP (Path Velocity/Ortalama Hız): Spermatozoon başının birim zamanda (bir saniye) kat ettiği uzaklıktır. Uzaklığın hesaplanmasında spermatozoonun eğrisel hareket etmesi dikkate alınır, sağa-sola baş salınımları değerlendirilmez.

Spermatozoon Hız Oranları (%): İncelenen örnekte hücrelerin hızlarına göre sınıflandırılması ve % değerlerinin saptanmasıdır.

Hızlı/Rapid: Saniyede 75 µ ve üzeri hıza sahip olan spermatozoonların oranıdır.

Orta Hızlı/Medium: Saniyede 21,9 - 75 µ arası hıza sahip olan spermatozoonların oranıdır.

Yavaş/Slow: Saniyede 6-21,9 µ arası hıza sahip olan spermatozoonların oranıdır.

Hareketsiz/Static: Saniyede 6 μ hızdan daha düşük hıza sahip olan spermatozoonların oranıdır.

Sıvı Fikzasyon Yöntemi ile Akrozom Bütünlüğünün Belirlenmesi: Sıvı fikzasyon tekniğinde Hancock eriyiği kullanıldı (Hancock 1952). Mikrosantrifüj tüplerindeki sperma örneklerinden 10 μ l alınıp 100 μ l Hancock tespit solüsyonu ile yavaşça karıştırıldı. Karışımdan, 3 μ l lam üzerine konularak üzerine lamel kapatıldı. Lamel üzerine immersiyon yağı damlatıldıktan sonra faz-kontrast mikroskopta x1000 büyütmede spermatozoonların morfolojik yapıları incelendi. Morfolojik değerlendirmelerde toplam 200 hücrede akrozom, baş, orta kısım ve kuyruk bozuklukları incelendi (Öztürkler ve ark. 2001, Bacinoglu ve ark. 2008). İncelemeler ekilibrasyon sonrası ve eritme sonrası gerçekleştirildi.

Membran Bütünlüğü Muayenesi (Floresan Mikroskop): Membran bütünlüğü muayenesinde floresan boyama tekniğinden yararlanıldı. Bu amaçla, modifiye CFDA (carboxyfluorescein diacetate) ve PI (propidium iodide) kullanıldı (Camara ve ark. 2011). Her bir grup için 50 μ l sperma alındı ve ışık almayan bir ortamda CFDA (0,46 mg/ml stok) ve PI (0,5 mg/ml stok) boya ları sırasıyla 5 μ l ve 20 μ l hacimde eklendi. Hazırlanan preparatlar, eksitasyon oranı 485/20 nm ve emisyon ayarı 580-630 nm'ye ayarlanmış, Nikon Eclipse Ni-U floresan donanımlı mikroskop altında, 400 büyütmede 300 adet spermatozoon sayılmak suretiyle değerlendirildi. Floresan mikroskopta yeşil ışımaya yapan spermatozoonlar membranı sağlam ve canlı, kırmızı ışımaya veya hem kırmızı hem de yeşil ışımaya yapan hücreler ise membranı hasarlı (ölü veya ölmek üzere) olarak kabul edildi. İncelemeler eritme sonrası gerçekleştirildi.

Spermatozoon Canlılığının Akış Sitometresi Cihazında Belirlenmesi: Eritme sonrası spermatozoonların yoğunluğunu ve canlılığını belirlemek amaçlı akış sitometresinde “*count and viability*” kiti kullanıldı. Tris tamponlu medyum ile 1:1 oranda yıkanan spermadan 20 μ l alınarak üzerine 380 μ l kit solüsyonu ilave edildi.

Preparatlar 5 dakika karanlık ortamda inkübe edildikten sonra akış sitometresinde değerlendirildi. Örneklerde spermatozoon yoğunluğu, canlılık oranı (%) ve mililitrede canlı spermatozoon sayısı belirlendi.

Membran Bütünlüğünün Değerlendirilmesi (Akış sitometresi): Örneklerde membran bütünlüğü, carboxyfluorescein diacetate (CFDA) ve propidium iodide (PI)

kullanılarak değerlendirildi. Kullanılan metot Camara ve ark. 2011 yayınından modifiye edildi ve akış sitometresinde kullanılmak üzere bir protokol oluşturuldu. Sperma, spermatozoon yoğunluğu, 50×10^6 spermatozoon/ml olacak şekilde, Tris tampon çözeltisi ile sulandırıldı ve 100 µl örnek 1,5 ml mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Karanlık ortamda üzerlerine 0,5 µl CFDA (0,46 mg/ml stok) ve 0,5 µl PI (0,5 mg/ml stok) eklendikten sonra 200 µl Tris tampon çözeltisi ilave edildi. Örnekler akış sitometresinde değerlendirilmek üzere yüklendi. Guava marka akış sitometresinde EasyCyte programı kullanıldı. Spermatozoonların 519 nm ve 630 nm eksitasyon aralığında yeşil ve kırmızı floresan yansımaları değerlendirildi. Numune başına 5000 hücre sayımı gerçekleştirildi ve histogram ile data plot grafikleri kaydedildi.

Mitokondriyal Membran Potansiyeli Değerlendirilmesi: Örnekler 50×10^6 spt/ml olacak şekilde Tris tampon çözeltisi ile sulandırıldı ve 100 µl alınarak 1,5 ml hacmindeki mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Üzerlerine 200 mikrolitre Tris tampon çözeltisi eklendikten sonra, 0,5 µl JC-1 stok çözeltisi (DMSO içerisinde 3mM JC-1) ilave edildi. Mikrosantrifüj tüpleri 38°C su banyosunda 40 dakika boyunca bekletildi (Gillan ve ark. 2005).

Turuncu ışıma yapanlar, mitokondriyal membran potansiyeli yüksek (hMMP) olan hücre popülasyonu olarak değerlendirildi.

Akrozom Bütünlüğünün Akış Sitometresi Cihazında Belirlenmesi: Akrozomal bozuklukların canlı veya ölü hücrelerde oluşmasının belirlenmesi amacıyla PNA-FITC yöntemi kullanıldı. Floresan boyamada, Marco-Jiménez ve ark. (2005) tarafından bildirilen yöntem modifiye edildi (peanut agglutinin - fluorescein isothiocyanate konjugatlı, PNA-FITC ve propidium iodide, PI). Sperma örneklerinden her bir gruptan 0,5 ml alınıp üzerlerine 500 µl Tris tampon çözeltisi eklendi ve 700 rpm'de 5 dakika santrifüje edildi. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant atıldı ve mikrosantrifüj tüplerinin dibinde kalan pelletin üzerine 1000 µl Tris tampon çözeltisi eklendi. Bu örneklerden 100 µl, başka bir mikrosantrifüj tüpüne alındı ve karanlık ortamda üzerine 2 µl PNA-FITC (100 µg/mL stok), 200 µl Tris çözeltisi ve 2 µl PI (0,5 mg/ml stok) eklendi. Numunelerin analizleri Guava marka akış sitometresi cihazında, EasyCyte programı ile gerçekleştirildi. Örneklerin, 519 nm ve 590 nm emisyon aralığında yeşil ve kırmızı floresan yansımaları değerlendirildi. Numune başına 5000 hücrenin sayımı yaptırıldı ve histogram ile data plot grafikleri kaydedildi. Akış sitometresinde PNA-FITC boyası ve PI

boyası almayan hücreler, akrozomu sağlam canlı olarak sayıldı (PNA-FITC - PI - : Akrozomu sağlam canlı hücreler). PNA-FITC boyası alan ancak PI boyası almayan hücreler, akrozomu hasarlı canlı hücreler olarak sayıldı (PNA-FITC + PI - : Akromozu hasarlı canlı hücreler). Her iki boyayı da alan hücreler akrozomu hasarlı ölü hücreler olarak sayıldı (PNA-FITC + PI + : Akrozomu hasarlı ölü hücreler). PNA-FITC boyası almayan ancak PI boyası alan hücreler akrozomu sağlam ölü hücreler olarak sayıldı (PNA-FITC - PI + : Akromozu sağlam ölü hücreler).

3.4. Spermanın Sulandırılması, Soğutulması ve Dondurulması

Pooling hacmi, spermatozoon yoğunluğu, motilite ve bir payette bulunması gereken spermatozoon sayısı (50×10^6 adet motil spermatozoon) dikkate alınarak sulandırma oranı belirlendi.

Ejekülat 5 eşit hacme bölünerek 5 farklı grup oluşturuldu. Bu amaçla, sperma sulandırıcısı olarak Tris bazlı yumurta sarısı (TYS) hazırlandı. Sulandırıcı; Tris 27,1 g/lt, sitrik asit 14 g/lt, früktoz 10 g/lt, yumurta sarısı %15 (v/v) oranında kullanılarak hazırlandı (Cirit ve ark. 2013).

Bal çeşidi ve yoğunluklarına göre grupların oluşturulması:

1. CICB1,0: YYS sulandırıcısına %1,0 (v/v) çiçek balı ilave edildi.
2. CICB2,5: YYS sulandırıcısına %2,5 (v/v) çiçek balı ilave edildi.
3. CAMB1,0: YYS sulandırıcısına %1,0 (v/v) çam balı ilave edildi.
4. CAMB2,5: YYS sulandırıcısına %2,5 (v/v) çam balı ilave edildi.
5. Kontrol Grubu: hiçbir bal ilavesi yapılmadı.

Sulandırıcı hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler Sigma Chemical Co. firmasından (Saint Louis, MO, USA) temin edildi. Dondurma protokolünde piyasada bulunan “Balparmak” marka ticari çiçek ve çam balları kullanılmıştır. Çalışmada BPC17.0075 parti numaralı çiçek balı ve BPM17.0021 parti numaralı çam balı kullanılmıştır. Kullanılan ticari balların analiz raporları akredite laboratuvar olan “Altıparmak Gıda Analiz Laboratuvarı” tarafından internette yayınlanmış olup bu tez projesi kapsamında sunulmuştur (Tablo 3.4.1 ve Tablo 3.4.2).

Tablo 3-1: Referans laboratuvarı tarafından düzenlenen BPC17.0075 parti numaralı çiçek balı analiz raporu aşağıda verilmiştir.



TÜRKAK
TÜRK AKREDİTASYON KURUMU

TURKISH ACCREDITATION AGENCY
tarafından akredite edilmiştir

ALTIPARMAK GIDA ANALİZ LABORATUVARI
(APİLAB)

Altıparmak Gıda Sanayi ve Ticaret A. Ş.
Çarşıbaşı Caddesi No:70, Çekmeköy 34782 İstanbul, Türkiye T: +90 (216) 643 02 02 - F: +90 (216) 641 30 30

ANALİZ RAPORU
ANALYSIS REPORT



Ambalajlayıcı adı ve adresi Packer name and address	Altıparmak Gıda Sanayi ve Ticaret A. Ş. Çarşıbaşı Caddesi No:70, Çekmeköy 34782 İstanbul, Türkiye
Ürünün Parti Numarası Batch number of product	BPC-17.0075
Numunenin adı ve tanımı Name and identity of test item	Balparmak Çiçek Balı / Balparmak Flower Honey
Numunenin kabul tarihi The date of receipt of test item	30.05.2017
Açıklamalar Remarks	Yukarıda parti numarası verilen üründe incelenen kalite parametreleri "Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği"ne uygundur. Bu kalite parametreleri 2'nci sayfada verilmiştir. "Balparmak Bilim Merkezi-APİLAB'da incelenen diğer kalite parametrelerinin özet raporu ise 3'üncü sayfada yer almaktadır. Quality parameters analyzed in the product with the above given batch number comply with "Turkish Food Codex Honey Regulation". These quality parameters are given in the 2nd page. The summary report of other quality parameters analyzed in "Balparmak Science Center-APİLAB" are given on the 3rd page.
Analizin yapıldığı tarih Date of Analysis	30.05.2017
Raporun Sayfa Sayısı Number of pages of the Report	3
Deney laboratuvarı olarak faaliyet gösteren Altıparmak Gıda Analiz Laboratuvarı (Apilab), TÜRKAK'tan AB-0499-T akreditasyon dosya numarası ile TS EN ISO IEC 17025-2012 şartlarına göre akredite edilmiştir. Altıparmak Gıda Analiz Laboratuvarı (Apilab) accredited by TÜRKAK under registration number AB-0499-T for TS EN ISO IEC 17025-2012 as test laboratory. Türk Akreditasyon Kurumu (TÜRKAK) deney raporlarının tanınması konusunda Avrupa Akreditasyon Birliği (EA) ile Çok Taraflı Anlaşma ve Uluslararası Laboratuvar Akreditasyon Birliği (ILAC) ile karşılıklı tanıma anlaşması imzalamıştır. Turkish Accreditation Agency (TÜRKAK) is a signatory to the European co-operation for accreditation (EA) multilateral agreement (MLA) and to the International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC) Mutual Recognition Arrangement (MRA) for the recognition of test reports. Deney ve/veya ölçüm sonuçları, genişletilmiş ölçüm belirsizlikleri (olması halinde) ve deney metodları bu sertifikanın tamamlayıcı kısmı olan takip eden sayfa(lar)ında verilmiştir. The test and/or measurement results, the uncertainties (if applicable) with confidence probability and test methods are given on the following pages which are part of this report.	

Mühür
Seal

Tarih
Date

30.05.2017

Analiz Sorumluları
Persons in charge of analysis

Apilab Sistem Müdürü
Apilab System Manager

USA ALPAT

Kalite Kontrol Müdürü
Quality Control Manager

İsmir COŞKUN

Laboratuvar Müdürü
Head of Laboratory

Arge ve Kalite Direktörü
R&D and Quality Director

Dr. Emel DAMARLI



TP-P03/F01 REV.15 Rev. Tar: 05.08.2016

Sayfa No:1/3 Page No:1/3

Tablo 3-2: Referans laboratuvarı tarafından düzenlenen BPM17.0021 parti numaralı çam balı analiz raporu aşağıda verilmiştir.



TÜRKAK
TÜRK AKREDİTASYON KURUMU

TURKISH ACCREDITATION AGENCY
tarafından akredite edilmiştir

ALTIPARMAC GIDA ANALİZ LABORATUVARI
(APİLAB)

Altıparmak Gıda Sanayi ve Ticaret A. Ş.
Çavuşbaşı Caddesi No:70, Çekmeköy 34782 İstanbul, Türkiye T:+90 (216) 843 02 02 • F:+90 (216) 841 30 30

ANALİZ RAPORU
ANALYSIS REPORT



Test TS EN ISO 17025 AR-MRA-T
AB-0499-T
91
03-17

Ambalajlayıcı adı ve adresi <i>Packet name and address</i>	Altıparmak Gıda Sanayi ve Ticaret A. Ş. Çavuşbaşı Caddesi No:70, Çekmeköy 34782 İstanbul, Türkiye
Ürünün Parti Numarası <i>Batch number of product</i>	BPM17.0021
Numunenin adı ve tanımı <i>Name and identity of test item</i>	Balparmak Çam Balı/ Balparmak Pine Honey
Numunenin kabul tarihi <i>The date of receipt of test item</i>	02.03.2017
Açıklamalar <i>Remarks</i>	Yukarıda parti numarası verilen gründe incelenen kalite parametreleri "Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği"ne uygundur. Bu kalite parametreleri 2'nci sayfada verilmiştir. "Balparmak Bilim Merkezi-APİLAB'da incelenen diğer kalite parametrelerinin özet raporu ise 3'üncü sayfada yer almaktadır. Quality parameters analyzed in the product with the above given batch number comply with "Turkish Food Codex Honey Regulation". These quality parameters are given in the 2nd page. The summary report of other quality parameters analyzed in "Balparmak Science Center-APİLAB" are given on the 3rd page.
Analizin yapıldığı tarih <i>Date of Analysis</i>	02.03.2017
Raporun Sayfa Sayısı <i>Number of pages of the Report</i>	3
Deney laboratuvarı olarak faaliyet gösteren Altıparmak Gıda Analiz Laboratuvarı (Aplab), TÜRKAK'tan AB-0499-T akreditasyon dosya numarası ile TS EN ISO IEC 17025:2012 standartlarına göre akredite edilmiştir. Altıparmak Gıda Analiz Laboratuvarı (Aplab) accredited by TÜRKAK under registration number AB-0499-T for TS EN ISO IEC 17025:2012 as test laboratory. Türk Akreditasyon Kurumu (TÜRKAK) deney raporlarının tanınırlığı konusunda Avrupa Akreditasyon Birliği (EA) ile Çok Taraflı Anlaşma ve Uluslararası Laboratuvar Akreditasyon Birliği (ILAC) ile karşılıklı tanıma anlaşması imzalamıştır. Turkish Accreditation Agency (TÜRKAK) is a signatory to the European co-operation for accreditation (EA) multilateral agreement (MLA) and to the International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC) Mutual Recognition Arrangement (MRA) for the recognition of test reports. Deney ve/veya ölçüm sonuçları, genişletilmiş ölçüm belirsizlikleri (olması halinde) ve deney metodları bu sertifikanın tamamlayıcı kısmı olan takip eden sayfa(lar)ında verilmiştir. The test and/or measurement results, the uncertainties (if applicable) with confidence probability and test methods are given on the following pages which are part of this report.	

Mühür
Seal

Tarih
Date

02.03.2017


Ulaş ALPAT
Aplab Sistem Müdürü
System Manager

Analiz Sorumluları
Persons in charge of analysis

Aplab Sistem Müdürü
System Manager

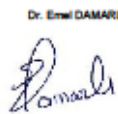

Ulaş ALPAT

Kalite Kontrol Müdürü
Quality Control Manager


İlker COŞKUN

Laboratuvar Müdürü
Head of Laboratory

Arge ve Kalite Direktörü
R&D and Quality Director


Dr. Emel DAMARLI

Bu rapor, laboratuvarın yazılı izni olmadan kısmen kopyalanıp çoğaltılamaz. İmzasız ve mühürlü raporlar geçersizdir.
This report shall not be reproduced other than in full except with the permission of the laboratory. Testing reports without signature and seal are not valid



TP-P03/F01 REV.15 Rev. Tar: 05.08.2016

Sayfa No:1/3 Page No:1/3

Sulandırıcılar spermaya ikişer dakika aralıklarla sırasıyla, %10, %20, %30 ve %40 oranlarında aşamalı olarak ilave edildi. Sulandırma sonrası, 26°C'deki sperma

örnekleri otomatik soğutma cihazında (Bio-cool III-40 Controlled Rate Freezer) 0,3 C/dk hızda 5°C'ye soğutuldu. TYS sulandırıcısında %10 gliserol (v/v) bulunan, örneğin toplam hacmi kadar kademeli olarak ilave edildi (gliserolizasyon). Sonuçta gliserol oranı %5 ve her payette bulunan spermatozoon sayısı 50 milyon oldu. Gliserolizasyon işlemi, sekizer dakika aralıklarla %10, %20, %30, %40 hacim ilaveleri (v/v) ile gerçekleştirildi.

Sulandırılan spermalar, 5°C'de bir saat bekleme sonrasında (ekilibrasyon) manuel olarak 0,25 ml'lik payetlere çekildi. Payetlerin açık ucu toz polivinil alkol ile kapatıldıktan sonra payet dizme rampası yardımı ile payet dizme rafına yerleştirildi. Sıvı azot buharında yaklaşık -110°C sıcaklıkta (sıvı azot düzeyinin 4 cm üzerinde) 8 dakika süreyle donduruldu. Gobletlere konulan payetler sıvı azot içerisine aktarılarak inceleme gününe kadar saklandı.

3.5. Spermanın Eritilmesi

Donma işleminden en az bir hafta sonra payetler 37°C'lik suda 30 saniye süresince eritildi. Eritme sonrası örneklerde yukarıda belirtilen motilite parametreleri, morfolojik muayene ve canlılık muayeneleri gerçekleştirildi.

3.6. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler için “SPSS for Windows programı 13.0 versiyonu” kullanıldı (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Spermatolojik parametrelerin kontrollerinden elde edilen verilerin gruplar arasındaki farklılıklarının belirlenmesinde “Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve farklılıkların önem kontrolünde Duncan's Multiple Range testi” kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Donma Öncesi Spermatolojik Bulgular

26°C’de pooling sonrası spermatozoonların kinetik hız parametreleri (VAP, VSL ve VCL olmak üzere) sırasıyla $159,50 \pm 19,40 \mu\text{m/sn}$, $135,60 \pm 22,80 \mu\text{m/sn}$ ve $243,30 \pm 22,70 \mu\text{m/sn}$ olarak belirlendi. Motilite değeri $93,80 \pm 3,90$, progresif motilite değeri $62,80 \pm 11,60$ olarak saptandı. Hızlı, orta hızlı, yavaş ve hareketsiz spermatozoon oranları sırasıyla; $84,50 \pm 7,10$, $9,3 \pm 4,50$, $3,10 \pm 2,10$ ve $3,1 \pm 2,00$ bulundu (Tablo 4-1).

Tablo 4-1: Pooling sonrası (26°C) saptanan kinetik hız parametreleri ve motilite oranları (CASA), (n=10).

Özellik	Pooling
Motilite (%)	$93,80 \pm 3,90$
Progresif motilite (%)	$62,80 \pm 11,60$
Hızlı (%)	$84,50 \pm 7,10$
Orta hızlı (%)	$9,3 \pm 4,50$
Yavaş (%)	$3,10 \pm 2,10$
Hareketsiz (%)	$3,1 \pm 2,00$
VAP ($\mu\text{m/sn}$)	$159,50 \pm 19,40$
VSL ($\mu\text{m/sn}$)	$135,60 \pm 22,80$
VCL ($\mu\text{m/sn}$)	$243,30 \pm 22,70$

Pooling ve sulandırma sonrası oluşturulan gruptaki örnekler kademeli olarak 5°C’ye soğutuldu. Gliserolizasyon ve ekilibasyon sonrası bulunan değerler Tablo 4-2’de gösterildiği gibidir. %1 çiçek balı (CICB1), %2,5 çiçek balı (CICB2,5), %1 çam balı (CAMB1,0), %2,5 çam balı (CAMB2,5) ve kontrol gruplarında sırasıyla; $94,90 \pm 0,93$, $90,80 \pm 1,56$, $92,60 \pm 2,02$, $90,00 \pm 2,33$ ve $93,20 \pm 1,47$ motilite ve $45,10 \pm 3,27$, $44,10 \pm 4,00$, $46,30 \pm 3,67$, $42,80 \pm 5,65$ ve $42,80 \pm 4,72$ progresif motilite saptandı. Motilite ve progresif motilite oranlarında gruplar arasında istatistiksel fark bulunmadı. Gruplara göre sırasıyla

hızlı spermatozoon oranları; %74,90±2,92, %65,30±3,36, %74,50±2,25, %61,00±4,60 ve %76,30±2,98, orta hızlı spermatozoon oranları; %20,00±2,57, %25,60±2,86, %18,10±2,41, %29,00±3,40 ve %16,90±2,50, yavaş spermatozoon oranları; %3,00±0,49, %3,8±0,64, %3,00±0,59, %4,70±0,93 ve %3,30±0,88, hareketsiz spermatozoon oranları; %2,00±0,49, %5,60±1,17, %4,40±1,82, %5,50±1,54 ve %3,30±1,05 olarak saptandı. Hızlı spermatozoon oranları en yüksek %76,30±2,98 ile kontrol grubunda ve en düşük %61,00±4,60 ile CAMB2,5'te bulundu ($P \leq 0,05$). Orta hızdaki spermatozoon oranlarında ise en düşük değer %16,90±2,50 kontrol grubunda saptanırken, en yüksek değer %29,00±3,40 ile CAMB2,5'te elde edildi. Yavaş spermatozoon oranları gruplara göre farklılık göstermedi. Hareketsiz spermatozoon oranları en düşük CICB1,0 ve en yüksek CICB2,5 gruplarında bulundu (Tablo 4-2).

Kinetik hız parametreleri ($\mu\text{m/sn}$) gruplara göre sırasıyla VAP değerleri için; 128,81±4,31, 111,52±3,95, 133,63±5,43, 106,16±5,81 ve 134,88±5,05, VSL değerleri için; 100,35±3,89, 89,29±4,52, 105,75±6,11, 85,25±5,91 ve 101,81±4,75, VCL değerleri için; 214,28±9,31, 184,69±7,09, 220,64±9,85, 174,58±7,34 ve 234,45±10,46 oldu. En düşük VAP değerleri yoğun bal oranlarında (CICB2,5, CAMB2,5) saptandı. En yüksek VSL değeri 105,75±6,11 ile CAMB1,0 grubunda ve en düşük değer 85,25±5,91 ile CAMB2,5 grubunda bulundu. En düşük VCL değerleri yine yoğun bal oranlarında (CICB2,5, CAMB2,5) saptandı ($P \leq 0,05$), (Tablo 4-2).

Tablo 4-2: Ekilibrasyon sonrası saptanan motilite ve kinetik hız parametreleri (CASA), (n=10).

Özellik		Gruplar					
		CICB1,0	CICB2,5	CAMB1,0	CAMB2,5	KONTROL	Önem Derecesi
		Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	
Motilite	Motilite (%)	94,90±0,93	90,80±1,56	92,60±2,02	90,00±2,33	93,20±1,47	ÖD
	Prog.Mot. (%)	45,10±3,27	44,10±4,00	46,30±3,67	42,80±5,65	42,80±4,72	ÖD
Hız Parametreleri	Hızlı (%)	74,90±2,92 ^{ab}	65,30±3,36 ^{bc}	74,50±2,25 ^{ab}	61,00±4,60 ^c	76,30±2,98 ^a	*
	Orta hızlı (%)	20,00±2,57 ^{bc}	25,60±2,86 ^{ab}	18,10±2,41 ^{bc}	29,00±3,40 ^a	16,90±2,50 ^c	*
	Yavaş (%)	3,00±0,49	3,8±0,64	3,00±0,59	4,70±0,93	3,30±0,88	ÖD
	Hareketsiz (%)	2,00±0,49 ^b	5,60±1,17 ^a	4,40±1,82 ^{ab}	5,50±1,54 ^{ab}	3,30±1,05 ^{ab}	*
Kinetik Hız Parametre.	VAP (µm/sn)	128,81±4,31 ^a	111,52±3,95 ^b	133,63±5,43 ^a	106,16±5,81 ^b	134,88±5,05 ^a	*
	VSL (µm/sn)	100,35±3,89 ^{abc}	89,29±4,52 ^{bc}	105,75±6,11 ^a	85,25±5,91 ^c	101,81±4,75 ^{ab}	*
	VCL (µm/sn)	214,28±9,31 ^a	184,69±7,09 ^b	220,64±9,85 ^a	174,58±7,34 ^b	234,45±10,46 ^a	*

^{a,b,c}Her satırda ortak harf taşımayan gruplar arasındaki fark önemlidir (P≤0,05), One Way Anova Varyans Analizi Duncan testi. *Gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir. ÖD, Gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli değildir.

Aynı örneklerde ekilibrasyon sonrası saptanan morfolojik özellikler Tablo 4-3'te gösterildiği gibidir. Gruplara göre sırasıyla akrozomal bozukluklar; %10,30±1,96, %9,30±1,79, %9,80±2,12, %9,50±1,56 ve %16,20±2,50, toplam morfolojik bozukluklar; %18,20±1,97, %17,70±2,12, %15,50±2,09, %17,00±1,53 ve %24,40±2,62 olarak saptandı. Akrozomal bozukluklar bütün gruplarda benzer bulundu. Toplam morfolojik bozukluklar ise en yüksek olarak %24,40±2,62 ile Kontrol grubunda saptandı (P≤0,05).

Tablo 4-3: Ekilibrasyon sonrası faz kontrast mikroskopta gerçekleştirilen morfolojik incelemeler (%), (n=10).

Morfolojik Bozukluk	Gruplar					
	CICB1,0	CICB2,5	CAMB1,0	CAMB2,5	KONTROL	Önem Derecesi
	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	
Akrozom	10,30±1,96	9,30±1,79	9,80±2,12	9,50±1,56	16,20±2,50	ÖD
Toplam	18,20±1,97 ^b	17,70±2,12 ^b	15,50±2,09 ^b	17,00±1,53 ^b	24,40±2,62 ^a	*

^{a,b}Her satırda ortak harf taşımayan gruplar arasındaki fark önemlidir ($P \leq 0,05$), One Way Anova Varyans Analizi Duncan testi. *Gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir. ÖD, Gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli değildir.

4.2. Eritme Sonrası Spermatolojik Bulgular

Gruplardaki örnekler -110°C’de dondurulduktan sonra inceleme gününe kadar -196°C’de depolandı. 37°C’deki su banyosunda eritilen örneklerdeki spermatolojik özellikler CASA yardımı ile incelendi (Tablo 4-4). Gruplara göre sırası ile motilite değerleri %65,70±5,22, %77,10±3,47, %70,00±2,44, %71,40±3,38 ve %63,30±6,92, progresif motilite değerleri; %32,50±3,05, %31,00±2,14, %29,50±2,99, %27,00±1,59 ve %28,70±3,40 olarak bulundu. Motilite ve progresif motilite oranlarında gruplar arasında istatistiksel fark bulunmadı.

Aynı örneklerde gruplara göre sırasıyla hızlı spermatozoon oranları; %43,50±3,67, %41,30±2,10, %39,50±3,40, %37,30±2,37 ve %41,40±4,70, orta hızlı spermatozoon oranları; %22,20±2,54, %35,70±2,97, %30,50±3,82, %34,10±3,32 ve %21,90±3,19, yavaş spermatozoon oranları; %12,10±1,12, %10,50±1,27, %14,30±1,23, %12,20±1,05 ve %11,30±1,01, hareketsiz spermatozoon oranları; %22,40±4,84, %12,50±2,32, %15,90±1,80, %16,40±2,97 ve %25,50±7,47 olarak saptandı. Hareketsiz ve hızlı spermatozoon oranları tüm gruplarda benzer olurken yavaş hızdaki spermatozoon oranları arasındaki fark CICB2,5 ve CAMB1,0 arasında önemli bulundu ($P \leq 0,05$). Orta hızdaki en yüksek oranlar CICB2,5 ve CAMB2,5 gruplarında saptanırken en düşük bulgular CICB1 ve Kontrol gruplarında elde edildi. Aynı örneklerde kinetik hız parametreleri ($\mu\text{m}/\text{sn}$) gruplara göre sırası ile VAP için; 109,76±4,40, 91,08±3,54, 100,68±5,57, 91,85±2,36 ve 113,37±4,48, VSL için, 92,20±5,06, 75,82±2,99,

84,03±5,38, 76,17±2,26 ve 93,12±4,72, VCL için; 176,63±4,56, 148,03±7,52, 164,97±8,82, 150,34±5,51 ve 187,25±6,40 oldu. Gruplardaki en düşük değerler yoğun bal içeren CICB2,5 ve CAMB2,5 gruplarında saptandı (Tablo 4-4).

Tablo 4-4: Eritme sonrası saptanan motilite ve kinetik hız parametreleri (CASA), (n=10).

Özellik		Gruplar					
		CICB1,0	CICB2,5	CAMB1,0	CAMB2,5	KONTROL	Önem Derecesi
		Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	
Motilite	Motilite (%)	65,70±5,22	77,10±3,47	70,00±2,44	71,40±3,38	63,30±6,92	ÖD
	Prog.Mot.(%)	32,50±3,05	31,00±2,14	29,50±2,99	27,00±1,59	28,70±3,40	ÖD
Hız Parametreleri	Hızlı (%)	43,50±3,67	41,30±2,10	39,50±3,40	37,30±2,37	41,40±4,70	ÖD
	Orta (%)	22,20±2,54 ^b	35,70±2,97 ^a	30,50±3,82 ^{ab}	34,10±3,32 ^a	21,90±3,19 ^b	*
	Yavaş (%)	12,10±1,12 ^{ab}	10,50±1,27 ^b	14,30±1,23 ^a	12,20±1,05 ^{ab}	11,30±1,01 ^{ab}	*
	Hareketsiz(%)	22,40±4,84	12,50±2,32	15,90±1,80	16,40±2,97	25,50±7,47	ÖD
Kinetik Hız Parametreleri	VAP(µm/sn)	109,76±4,40 ^{ab}	91,08±3,54 ^c	100,68±5,57 ^{bc}	91,85±2,36 ^c	113,37±4,48 ^a	*
	VSL(µm/sn)	92,20±5,06 ^a	75,82±2,99 ^b	84,03±5,38 ^{ab}	76,17±2,26 ^b	93,12±4,72 ^a	*
	VCL(µm/sn)	176,63±4,56 ^{ab}	148,03±7,52 ^c	164,97±8,82 ^{bc}	150,34±5,51 ^c	187,25±6,40 ^a	*

^{a,b,c}Her satırda ortak harf taşımayan gruplar arasındaki fark önemlidir (P≤0,05), One Way Anova Varyans Analizi Duncan testi. *Gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir. ÖD, Gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli değildir.

Eritme sonrası akış sitometresinde (FLOW) saptanan canlı spermatozoon oranları Tablo 4-5'te gösterilmiştir. Gruplara göre sırasıyla canlılık (FLOW) değerleri; %42,16±3,18, %49,58±3,57, %45,36±4,23, %46,89±4,97 ve %35,22±3,58 olarak bulunmuştur. Akış sitometresi verilerinde en yüksek canlılık oranı %49,58±3,57 ile CICB2,5 grubunda ve en düşük veriler %35,22±3,58 ile Kontrol grubunda elde edilmiştir (P≤0,05).

Tablo 4-5: Eritme sonrası akış sitometresinde (FLOW) saptanan canlı spermatozoon oranları (%), (n=10).

Özellik	Gruplar					
	CICB1,0	CICB2,5	CAMB1,0	CAMB2,5	KONTROL	Önem Derecesi
	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	
Canlı Spermatozoon	42,16±3,18 ^{ab}	49,58±3,57 ^a	45,36±4,23 ^{ab}	46,89±4,97 ^{ab}	35,22±3,58 ^b	*

^{a,b}Her satırda ortak harf taşımayan gruplar arasındaki fark önemlidir ($P \leq 0,05$), One Way Anova Varyans Analizi Duncan testi. *Gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir. ÖD, Gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli değildir.

Eritme sonrası akış sitometresinde saptanan mitokondriyal aktivite oranları gruplara göre sırasıyla; %60,41±2,49, %63,42±3,12 %61,17±2,60, %61,35±3,15 ve 53,29±3,71 olarak saptandı (Tablo 4-6). Kontrol grubuna göre CICB2,5 grubunda elde edilen oranlar yüksek bulundu ($P \leq 0,05$).

Tablo 4-6: Eritme sonrası akış sitometresinde bakılan mitokondriyal aktivite (%), (n=10).

Özellik	Gruplar					
	CICB1,0	CICB2,5	CAMB1,0	CAMB2,5	KONTROL	Önem Derecesi
	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	
Mitokondriyal Aktivite	60,41±2,49 ^{ab}	63,42±3,12 ^a	61,17±2,60 ^{ab}	61,35±3,15 ^{ab}	53,29±3,71 ^b	*

^{a,b}Her satırda ortak harf taşımayan gruplar arasındaki fark önemlidir ($P \leq 0,05$), One Way Anova Varyans Analizi Duncan testi. *Gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir. ÖD, Gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli değildir.

Eritme sonrası floresan mikroskopta saptanan membran bütünlük oranları Tablo 4-7’de gösterilmiştir. Membran bütünlük oranları gruplara göre sırasıyla; %42,23±1,91, %41,80±2,73, %38,15±2,81, %40,10±1,81 ve %34,89±1,08 olarak saptanmıştır. Kontrol grubuna göre en yüksek bütünlük oranları çiçek balı gruplarında bulunmuştur ($P \leq 0,05$).

Tablo 4-7: Eritme sonrası floresan mikroskopta (CFDI PI) saptanan membran bütünlüğü oranları (%), (n=10).

Özellik	Gruplar					
	CICB1,0	CICB2,5	CAMB1,0	CAMB2,5	KONTROL	Önem Derecesi
	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	
Membran Bütünlüğü	42,23±1,91 ^a	41,80±2,73 ^a	38,15±2,81 ^{ab}	40,10±1,81 ^{ab}	34,89±1,08 ^b	*

^{a,b}Her satırda ortak harf taşımayan gruplar arasındaki fark önemlidir ($P \leq 0,05$), One Way Anova Varyans Analizi Duncan testi. *Gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir. ÖD, Gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli değildir.

Eritme sonrası akış sitometresi ile saptanan, membran bütünlüğü ve akrozomal bütünlük oranları Tablo 4-8’de verilmiştir. Sağlam membranlı hücreler gruplara göre sırasıyla; %18,40±5,69, %17,53±5,59, %14,20±4,24, %15,14±5,24 ve %16,52±4,11, sağlam akrozomlu canlı hücreler; %32,25±3,33, %32,34±2,60, %31,66±2,91, %34,35±2,84 ve %26,75±2,13, olarak bulundu. Akış sitometresi ile saptanan membran bütünlüğü ve canlı/sağlam akrozomlu spermatozoon oranları tüm gruplarda benzer bulundu.

Tablo 4-8: Eritme sonrası akış sitometresi (Flow Cytometry) ile saptanan, membran bütünlüğü ve akrozomal bütünlük oranları (%), (n=10).

Özellik	Gruplar					
	CICB1,0	CICB2,5	CAMB1,0	CAMB2,5	KONTROL	Önem Derecesi
	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	
Membran Bütünlüğü	18,40±5,69	17,53±5,59	14,20±4,24	15,14±5,24	16,52±4,11	ÖD
Canlı/Sağlam Akrozomlu	32,25±3,33	32,34±2,60	31,66±2,91	34,35±2,84	26,75±2,13	ÖD

^aHer satırda ortak harf taşıyan gruplar arasındaki fark önemsizdir ($P \leq 0,05$), One Way Anova Varyans Analizi Duncan testi. *Gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir. ÖD, Gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli değildir.

Eritme sonrası faz kontrast mikroskop yardımı ile yapılan morfolojik muayeneler Tablo 4-9’da gösterilmiştir. Gruplara göre sırası ile akrozomal bozukluk oranları; %13,60±1,51, %15,20±2,06, %15,90±2,04, %16,10±1,63 ve %20,30±1,92, toplam

morfolojik bozukluk oranları; %25,60±2,01, %25,70±2,21, %28,30±2,26, %26,50±2,15 ve %30,20±2,64 oldu. Akrozomal bozukluklar dikkate alındığında ise kontrol grubuna göre CICB1,0’de saptanan akrozomal bozuklukların daha düşük oranda olduğu belirlendi ($P \leq 0,05$). Toplam morfolojik bozukluk oranları gruplara göre değişmedi.

Tablo 4-9: Eritme sonrası faz kontrast mikroskop yardımı ile yapılan morfoloji muayenesi (%), (n=10).

Morfolojik Bozukluk	Gruplar					
	CICB1,0	CICB2,5	CAMB1,0	CAMB2,5	KONTROL	Önem Derecesi
	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	Ort.±Std. Hata	
Akrozom	13,60±1,51 ^b	15,20±2,06 ^{ab}	15,90±2,04 ^{ab}	16,10±1,63 ^{ab}	20,30±1,92 ^a	*
Toplam	25,60±2,01	25,70±2,21	28,30±2,26	26,50±2,15	30,20±2,64	ÖD

^{a,b}Her satırda ortak harf taşımayan gruplar arasındaki fark önemlidir ($P \leq 0,05$), One Way Anova Varyans Analizi Duncan testi. *Gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir. ÖD, Gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli değildir.

5. TARTIŞMA

Koç spermasının dondurulmasında elde edilen başarıların sınırlı olması, zaten geniş uygulama alanı bulamayan suni tohumlama faaliyetlerini daha da zora sokmuştur. Koç sperma sulandırıcılarına ilave edilen katkı maddeleri ile spermanın dondurulabilirliği üzerinde çalışmalarda başarı oranları araştırmacılara göre farklılıklar göstermektedir. Günümüzde sorun halen devam etmekte olup katkı maddeleri bilim insanlarının yoğun ilgisini çekmektedir. Yüksek oranda monosakkarit, organik asit, mineral, protein, fenolik bileşikler ve serbest amino asitlerden oluşan balın, antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri bilinmektedir (Molan 1999; Tomás-Barberán ve ark. 2001; Bogdanov ve ark. 2008). Ancak çiçek ve çam balının donma öncesi ve sonrası spermatozoonlara ve özellikle donma aşamasında şekillenen kristalizasyona etkileri konusunda detaylı bilgilere ulaşılamamıştır. Çalışmada sperma sulandırıcısına %1 ve %2,5 çiçek ve çam balı ilavelerinin koç spermatozoonları üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

Araştırmada sulandırma, soğutma, gliserolizasyon ve ekilibasyon sonrası saptanan motilite oranları tüm gruplarda %90'ın üzerinde bulunmuştur (Tablo 4-2). Aynı örneklerde progresif motilitelerin de %42'nin üzerinde olduğu saptanmıştır. Tüm gruplarda sulandırma, soğutma, gliserolizasyon ve ekilibasyon işlemleri başarıyla gerçekleşmiştir. Elde edilen veriler, çoğu araştırmacının bildirdiği değerlerle paralellik göstermektedir (Öztürkler ve ark. 1999; Cirit ve ark. 2013; Yimer ve ark. 2015). Bacinoğlu ve ark. (2007) ile Ak ve ark. (2010), früktoz ve laktoz ilave edilmiş medyum ile sulandırılmış koç spermasında, ekilibasyon sonrasında tüm deneme gruplarında %73 ve üzeri motilite değeri saptamışlardır. Ancak motilite değerleri gruplara göre farklılık göstermemiştir.

Donma öncesi gruplarda motilite ve progresif motilite oranları benzer bulunmuştur. Çiçek ve çam balı ile farklı yoğunlukları; sulandırma, soğutma, gliserolizasyon ve ekilibasyon işlemlerinde spermatozoonların motilite ve progresif motilitesini etkilememiştir. Sperma sulandırıcılarına şeker ilavelerine ilişkin çalışmalarda farklı sonuçlar alınmıştır. Koç sperma sulandırıcılarına trehaloz ilavesinin soğutma sonrası motilite üzerine bir etkisinin olmadığı, ancak artan yoğunluklarda olumsuz etki yarattığı bildirilmiştir (Aisen ve ark. 2002). Jerez ve ark. (2013). Koç sperma sulandırıcılarında bal ilavesinin, soğutma işlemlerinin zararlı etkisine karşı, koç spermasının kısmi olarak motilitesini koruduğunu saptamışlardır. Sığır ve manda boğası

spermalarının 5°C’de saklamasında sulandırıcıya bal ilavesinin motilite başta olmak üzere spermatolojik özelliklere olumlu katkı yaptığı bildirilmiştir (El-Sheshtawy ve ark. 2014; El-Nattat ve ark. 2016). Maidin ve ark. (2018), balın tek başına veya çörek otu ile kombinasyonunun sulandırıcıya ilave edilmesi sonucunda, teke spermasının soğukta saklanmasında daha başarılı motilite sonuçları almışlardır. Olayemi ve ark. (2011), soğukta (5°C) saklanan teke spermasıyla yaptıkları çalışmada, sulandırıcıya bal ilavesinin spermatozoon motilitesi ve canlılığını koruduğunu ve bu olumlu etkinin ilave edilen bal oranına bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Pelufo ve ark. (2015), glikoz, trehaloz ve sükroz ilave edilen sulandırıcılarla yaptıkları çalışmada, ilave edilen monosakarit ve disakaritlerin, koç spermatozoonlarının soğutulduktan sonraki motilitesi üzerine bir etkisinin bulunmadığını bildirmişlerdir. Çalışmalardaki farklılık türe, ırka, sulandırıcı çeşitlerine, katkı maddelerinin oranlarına, sulandırma ve soğutma tekniklerine bağlanabilir.

Araştırmamızda çiçek ve çam balının değişik yoğunluklarının motilite üzerine etkili olmadığı saptansa da, spermatozoon hızlarında farklılıklar bulunmuştur. Aynı örneklerde hız oranları dikkate alındığında yoğun bal gruplarında (CICB2,5, CAMB2,5) hızların nispeten daha düşük olduğu dikkati çekmektedir (Tablo 4-2). Kontrol grubuna göre bal içeren diğer gruplarda hızlı spermatozoon oranlarının düştüğü ve bu düşüklüğün yoğun bal içeren gruplarda daha da belirgin olduğu ($P \leq 0,05$) görülmektedir. Orta hızdaki spermatozoon oranlarında ise en yüksek değerler yoğun bal gruplarında şekillenmiştir. Yoğun bal gruplarında hızlı hücre oranlarının azalması, orta hızlı hücrelerin artması, medyumun ozmolaritesine bağlanabilir. Yoğun ortamlarda fiziksel nedenlerle spermatozoon hareketlerinin kısıtlanabileceği ileri sürülebilir. Spermatozoon hızları medyumlara ve özellikle medyumların viskozitelerine göre değişebilmektedir (Amann 1989, Jerez-Ebensperger ve ark. 2015). Kinetik hız parametreleri bulguları da bu durumu desteklemektedir. Her üç (VAP, VSL, VCL) hız parametresinde de yoğun bal gruplarında hareketlerin daha az olduğu gözlemlenmektedir. Donma öncesi kinetik hız parametrelerine ilişkin kaynaklara ulaşılamamıştır. Sonuç olarak, hareketleri kısmen de olsa sınırlandırılan yoğun bal içeren gruplarda, spermatozoonların enerji depolarını koruduklarını ve metabolik artıkların daha az oluşacağını ileri sürmek mümkündür.

Ekilibrazyon sonrasında en yüksek akrozomal bozukluk $16,20 \pm 2,50$ ile kontrol grubunda bulunmuş, diğer gruplarda bu değer $9,30 \pm 1,79$ ile $10,30 \pm 1,96$ arasında değişmiştir. Kontrol grubundaki yükseklik istatistiksel açıdan önemsiz bulunsa da dikkat

çekicidir (Tablo 4-3). Keza en yüksek toplam morfolojik bozukluklar $24,40 \pm 2,72$ ile kontrol grubunda saptanmıştır ($P \leq 0,05$). Bu durum, sperma sulandırıcılarına bal ilavelerinin sulandırma, soğutma, gliserolizasyon ve ekilibrasyon aşamalarında spermatozoonlarda morfolojik bütünlüğü koruduğunu göstermektedir. Koç sperma sulandırıcılarına bir disakkarit olan trehaloz ilavesinin soğutma sonrası akrozom ve membran bütünlüğü üzerine bir etkisinin olmadığı, ancak artan yoğunluklarda zararlı olduğu bildirilmiştir (Aisen ve ark. 2002). Pelufo ve ark. (2015), glikoz, trehaloz ve sükroz ilave edilen sulandırıcılarla yaptıkları çalışmada, monosakarit ve disakaritlerin, soğutma sonrası akrozom bütünlüğü üzerine bir etkisinin bulunmadığını ve, glikoz içeren sulandırıcılarda soğutma sonrası koç spermatozoonlarında membran bütünlüğünün daha iyi korunduğunu bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada da koç sperma sulandırıcısında %1,0 ve %2,5 çiçek ve çam balı varlığı, sulandırma ve soğutma aşamalarının zararlı etkilerine karşı morfolojik bütünlüğü korumuştur.

Donma öncesinde olduğu gibi donma sonrasında da motilite ve progresif motilite değerleri gruplara göre değişmemiştir (Tablo 4-4). Çam ve çiçek balının farklı oranlarının koç spermasının dondurulmasında spermatozoon motilitesine ve progresif motilitesine etki etmediği saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda, sulandırıcılara bal veya şeker ilavesi ile donma sonrası daha yüksek motilite oranları elde edilmiştir. Panyaboriban ve ark. (2015), değişik monosakarit (glikoz ve früktoz) ve disakarit (sükroz ve trehaloz) ilave edilen sulandırıcılar ile koç spermasını dondurmuşlar, eritme sonrası früktoz veya sükroz ilave edilen sulandırıcılarda daha yüksek motilite bulmuşlardır. El-Nattat ve ark. (2016), sulandırıcıya %2-3 ve %4-5 bal ilavesinin, manda spermatozoonlarının motilitesini donmanın zararlı etkilerine karşı koruduğunu belirtmişlerdir. Balın koruyucu etkisinin içerdiği protein, enzim, amino asit, organik asit, vitamin ve fenolik bileşiklerin antioksidan özelliğinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (El-Nattat ve ark. 2016). El-Sheshtawy ve ark. (2016), aygır sperma sulandırıcısına bal ilavesinin eritme sonrası motilite üzerine olumlu etki yaptığını saptamışlardır. Koç spermasının dondurulmasında sulandırıcılara biberiye balı ilavesinin, eritme sonrası motilite oranlarının olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir (Jerez-Ebensperger ve ark. 2015). Koç sperma sulandırıcılarına değişik oranlarda trehaloz ilaveleri araştırılmış, 100 mOsm trehaloz dozunun eritme sonrasında motilite değerlerini artırdığı bildirilmiştir (Aisen ve ark. 2002). Rafinoz, trehaloz ve sükrozun değişik yoğunluklarını içeren sulandırıcılarla dondurulan koç spermasında, eritme sonrası elde edilen motilite değerleri kontrol grubuna oranla belirgin

bir şekilde daha yüksek bulunmuştur (Jafaroghli ve ark. 2011). Çalışmamızda saptanan bulgular, diğer araştırmacıların sonuçlarını desteklememektedir. Ancak istatistiksel olarak önemsiz bulunsa da, eritme sonrası en düşük motilite kontrol grubunda saptanmıştır. Bal gruplarındaki rakamsal yüksekliklerdeki farklılıkların istatistiksel analizlerde önemsiz çıkması, tekrar sayısının (n) sınırlı olmasına bağlanabilir. Ayrıca Türkiye’de üretilen balın içeriği ve koyun ırkları gibi faktörler de sonuçları etkilemiş olabilir.

Aynı örneklerde, hız parametrelerinden hızlı spermatozoon oranları, donma öncesinin aksine, donma sonrasında gruplara göre farklılık göstermemiştir (Tablo 4.4). Bu durum balın, eritme sonrası hızlı spermatozoon oranlarını etkilemediği şeklinde yorumlanabilir. Orta hızdaki spermatozoon oranlarında ise en yüksek değerler yoğun bal ilaveli gruplarda saptanmıştır ($P \leq 0,05$). Kinetik hız parametrelerinin tümünde (VAP, VSL, VCL); kontrol grubuna göre yoğun bal gruplarında saptanan hızlar daha düşüktür ($P \leq 0,05$). Bu farklılık, yine yoğun medyumlarda spermatozoon hareketlerinin sınırlanmış olmasından kaynaklanabilir (Amann 1989, Jerez-Ebensperger ve ark. 2015).

Akış sitometresi (FLOW) ile saptanan en düşük canlılık oranı $\%35,22 \pm 3,58$ ile kontrol grubunda ve en yüksek canlılık oranı $\%49,58 \pm 3,57$ olarak $\%2,5$ ’lik çiçek balı grubunda saptanmıştır ($P \leq 0,05$). Diğer gruplarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Tablo 4-5). Canlı spermatozoon oranında olduğu gibi mitokondriyal aktivite oranlarında da kontrol grubuna göre sulandırıcılara $\%2,5$ çiçek balı ilavesi başarılı olmuştur ($P \leq 0,05$) (Tablo 4-6). Eritme sonrası akış sitometresinde saptanan mitokondriyal aktivite oranları sırasıyla; $\%60,41 \pm 2,49$, $\%63,42 \pm 3,12$, $\%61,17 \pm 2,60$, $\%61,35 \pm 3,15$ ve $53,29 \pm 3,71$ olarak saptandı (Tablo 4-6). Saptanan bulgulardan, sulandırıcılara bal ilavelerinin donmanın zararlı etkilerine karşı spermatozoon canlılığına kısmen katkı yaptığı, $\%2,5$ çiçek balı ilavesinde bu katkının önemli olduğu anlaşılmaktadır. Eritme sonrası koç spermatozoonlarının donma işlemlerinin canlılık üzerine olan zararlarına karşı şekerlerin (früktoz, früktoz-sükroz ve früktoz-trehaloz ve sükroz-trehaloz) olumlu etki yaptığı, hatta kombinasyonlarının daha da etkili olduğu bildirilmiştir (Panyaboriban ve ark. 2015). El-Sheshtawy ve ark. (2016), aygırlarda yaptıkları bir çalışmada, sulandırıcıya bal ilavesinin eritme sonrası canlılık üzerine olumlu etkiler oluşturduğunu bildirmişlerdir. Rafinoz, trehaloz ve sükrozun değişik yoğunluklarını içeren sulandırıcılarla dondurulan koç spermasında, eritme sonrası elde edilen canlılığa ilişkin değerler kontrol grubuna oranla belirgin bir şekilde daha yüksek bulunmuştur (Jafaroghli ve ark. 2011). Mitokondriyal

aktivite ve motilite arasında pozitif korelasyon bulunduğu bilinmektedir (Mehdipour ve ark. 2017). Mitokondriyal hasar sonucu oluşabilecek enerji kaybı, ATP eksikliğine sebebiyet vereceğinden donma-eritme işlemleri sonrasında motilite parametrelerinde düşüşe yol açmaktadır (Medeiros ve ark. 2002). Maidin ve ark. (2018), teke spermasında yaptıkları çalışmada, sulandırıcıya bal ilavesinin soğutma, dondurma ve eritme işlemlerinin sebep olduğu reaktif oksijen türleri oluşumunu azalttığını, aynı zamanda da motilite üzerinde iyileştirici etkileri olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar sperma sulandırıcılarına çörek otu ile kombine edilerek ilave edilen balın spermatozoon plazma membranını, dondurma işleminin neden olduğu lipid peroksidasyonu ve buz kristali oluşumu gibi olumsuz etkilerden koruduğunu bildirmişlerdir (Maidin ve ark. 2018). Sunulan çalışmada da sulandırıcılara %2,5 çiçek balı ilavesinin, spermatozoon canlılığının ve mitokondriyal aktivitesinin korunmasında etkili olduğu bulunmuştur. Sperma sulandırıcılarında çiçek ve çam balı ile oranları hakkında ayrıntılı çalışmalara ulaşılamamıştır. Sunulan çalışmada çiçek balının (%2,5) daha başarılı bulunması birçok faktöre bağlı olabilir. Bunlardan ilk akla gelenler balların içeriği ve ozmotik basınç değerleridir.

Eritme sonrası floresan mikroskopta saptanan membran bütünlük oranları gruplara göre sırasıyla; $42,23 \pm 1,91$, $41,80 \pm 2,73$, $38,15 \pm 2,81$, $40,10 \pm 1,81$ ve $34,89 \pm 1,08$ olarak saptanmıştır (Tablo 4-7). Kontrol grubuna göre en yüksek membran bütünlüğü oranları çiçek balı gruplarında bulunmuştur ($P \leq 0,05$). Eritme sonrası akış sitometresi ile saptanan membran bütünlüğü ve canlı/sağlam akrozom oranları tüm gruplarda benzer bulunmasına rağmen, en olumsuz sonuçlar kontrol grubunda elde edilmiştir (Tablo 4-8). Yine aynı örneklerde, faz kontrast mikroskopta yapılan muayenelerde, en yüksek akrozomal bozukluklar kontrol grubunda saptanmış ancak sadece %1 çiçek balı grubunda saptanan değerle arasındaki fark önemli bulunmuştur. ($P \leq 0,05$) (Tablo 4-9). Toplam morfolojik bozukluklarda ise en yüksek değerler bal içermeyen kontrol grubunda saptansa da tüm gruplarda elde edilen değerler benzer bulunmuştur (Tablo 4-9).

Membran bütünlüğü ile ilgili her üç inceleme tekniği genel olarak değerlendirildiğinde (CFDI-PI, Flow, Sıvı Fikzasyon), bal ilavelerinin yararlı olduğu, sıvı fikzasyon tekniğindeki %1,0 çiçek balı grubu hariç, bal çeşidi ve yoğunlukları arasında çok önemli farklılıkların bulunmadığı söylenebilir.

Donma sonrası morfolojik bütünlüğe ilişkin çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Mandalarda balın membran bütünlüğü üzerine etkili olduğu kanıtlanmıştır (El-Nattat ve ark. 2016). El-Sheshtawy ve ark. (2016), aygır sperma sulandırıcılarına bal ilavesinin eritme sonrası membran bütünlüğü üzerine olumlu etkiler oluşturduğunu bildirmişlerdir. Değişik oranlarda trehaloz ilave edilerek hazırlanan koç sperma sulandırıcıları ile yapılan bir çalışmada, trehaloz varlığının (100 mOsm) eritme sonrasında membran bütünlüğü üzerine koruyucu etkisinin olduğu bildirilmiştir (Aisen ve ark. 2002). Koç sperma sulandırıcılarına ilave edilen değişik yoğunluktaki rafinoz, trehaloz ve sükrozun donma-eritme aşamalarında membran bütünlüğünü koruduğu saptanmıştır (Jafaroghli ve ark. 2011). Koç sperma sulandırıcısına biberiye balı ilavesinin eritme sonrası akrozomal bütünlüğe olumlu etkisi rapor edilmiştir (Jerez-Ebensperger ve ark. 2015). Koç sperması sulandırıcılarında değişik oranlarda trehaloz (100 mOsm) ilavesinin eritme sonrasında akrozom bütünlüğü üzerine koruyucu etkisinin olduğu bildirilmiştir (Aisen ve ark. 2002). Rafinoz, trehaloz ve sükrozun değişik yoğunluklarını içeren sulandırıcılarla dondurulan koç spermasında, eritme sonrası elde edilen akrozomal bozukluk ve toplam morfolojik bozukluk, kontrol grubuna oranla belirgin bir şekilde daha düşük bulunmuştur (Jafaroghli ve ark. 2011). Panyaboriban ve ark. (2015), değişik monosakarit (glikoz ve früktoz) ve disakarit (sükroz ve trehaloz) ilave edilen sulandırıcılarla dondurulan koç spermasında eritme sonrası akrozom bütünlüğünü incelemiş ve ilave edilen şekerlerin bu parametre üzerine yarattığı etkinin gruplar arasında bir farklılık oluşturmadığını tespit etmişlerdir (%79,6 ile %82,3 arası). Hemen hemen araştırmaların tamamı çalışmada bulunan sonuçları destekler niteliktedir.

Balın olumlu etkisi çoğu araştırmacı tarafından rapor edilse bile, etki mekanizması hakkında bilinenler sınırlıdır. Bununla birlikte, koç spermasında donma sonrası balın yararlı etkisinin, içerdiği protein, enzim, amino asit, organik asit, vitamin ve fenolik bileşiklerin antioksidan özelliğinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Jerez-Ebensperger ve ark. 2015, El-Nattat ve ark. 2016).

Sunulan çalışmada, çiçek balının özellikle %2,5 yoğunluğunun (CICB%2,5) eritme sonrası spermatozoon canlılığını daha iyi koruduğu, bal ilavelerinin morfolojik bütünlüğü kısmen koruduğu, %1,0 çiçek balı yoğunluğunun sıvı fizyasyonda akrozomal bütünlüğü önemli oranda koruduğu saptanmıştır.

Çalışmanın sonucunda, Tris-yumurta sarısı sulandırıcısında %1 ve/veya %2,5 çiçek balı ilavelerinin koç sperma sulandırıcılarında katkı maddesi olarak kullanılabilir özellikte olduğu sonucuna varılmıştır.



KAYNAKLAR

- Abdelhakeam, A.A., Graham, E.F. ve Vazquez, I.A. (1991a). Studies on the presence and absence of glycerol in unfrozen ram semen: Fertility trials and the effects of dilution methods on freezing ram semen in the absence of glycerol. *Cryobiology*, 28, 36-42.
- Abdelhakeam, A. A., Graham, E. F., Vazquez, I. A., & Chaloner, K. M. (1991b). Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: development of an extender for freezing: effects of osmotic pressure, egg yolk levels, type of sugars, and the method of dilution. *Cryobiology*, 28(1), 43-49.
- Abdullah, M. H., Selman, M. O., & Fakhrildin, M. B. M. R. (2015). Effect of honey bee and COQ10 supplemented to cryopreservation solution on freeze-thawed human sperm parameters. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4(12), 524-534.
- Aboagla, E.M.E ve Terada, T. (2003). Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biology of Reproduction*, 69, 1245-1250.
- Aisen, E. G., Medina, V. H., & Venturino, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, 57(7), 1801-1808.
- Aitken, J., & Fisher, H. (1994). Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays*, 16(4), 259-267.
- Aitken, R. J. (1995). Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 659-668.
- Ak, K., İleri, İ.K., Horoz, H., Şenünver, A., Alkan, S., Rahimi, H., Kaşıkçı, G. (1994). Kıvrıcık koyunlarında mevsim içi östrus senkronizasyonu. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20, 2-3.
- Ak, K., Ak, S., Gurel, A., Hasoksuz, M., Baran, A., Ozturkler, Y., ve ark. (1995). Experimental studies on the effects of Mycoplasma agalactiae on spermatological characters and genitals in rams. *Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 26, 139-155.
- Ak, K. (2005a). Koyunlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. İçinde *Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama*, İ.K. İleri, K. Ak, S. Pabuccuoğlu, S. Birler, İstanbul: İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, Ders Notu No: 138, 189-204.

- Ak, K. (2005b). Spermanın Muayenesi. İçinde, *Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama*, İ.K. İleri, K. Ak, S. Pabuccuoğlu, S. Birler, İstanbul: İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, Ders Notu No: 138, 75-90.
- Ak, K. (2005c). Spermanın Saklanması. İçinde *Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama*, İ.K. İleri, K. Ak, S. Pabuccuoğlu, S. Birler, İstanbul: İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, Ders Notu No: 138, 100-110.
- Ak, K., Cirit, Ü., Nur, Z., Bacinoğlu, S., Pabuccuoğlu, S., Özdaş, Ö.B. ve Birler, S. (2010). Effects of extender osmolarity, cooling rate, dilution rate and glycerol addition time on post-thaw ram semen characteristics and fertilization. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 36 (2), 33-46.
- Akbulut, M., Özcan, M. M., & Çoklar, H. (2009). Evaluation of antioxidant activity, phenolic, mineral contents and some physicochemical properties of several pine honeys collected from Western Anatolia. *International journal of food sciences and nutrition*, 60(7), 577-589.
- Ali, S., Ahmad, N., Samad, H. A., & Ahmad, K. M. (1992). Effects of various glycerolization, temperatures and equilibration periods on freezability of ram spermatozoa. *Pakistan Veterinary Journal*, 12, 142-142.
- Aljady, A. M., Kamaruddin, M. Y., Jamal, A. M., & Mohd Yassim, M. Y. (2000). Biochemical study on the efficacy of Malaysian honey on inflicted wounds: an animal model. *Medical Journal of Islamic Academy of Sciences*, 13(3), 125-132.
- Aljady AM, Kamaruddin MY. (2004). Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chem* 85:513-518.
- Allai, L., Benmoula, A., da Silva Maia, M., Nasser, B., & El Amiri, B. (2018). Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. *Animal reproduction science*, 192 (2018) 6–17.
- Allsop KA, Miller JB. (1996). Honey revisited: A reappraisal of honey in pre-industrial diets. *Br J Nutr* 75:513-520.
- Al-Mamary M, Al-Meer A, Al-Habori M. (2002) Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutr Res* 22:1041-1047.
- Alvarenga, M.A., Alvarenga, F.C., Moreira, R.M. ve Cesarino, M.M. (2000). Acrozoal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packing systems. *Equine Veterinary Journal*, 32, 541-545.

- Alvarez, J. G., & Storey, B. T. (1984). Assessment of cell damage caused by spontaneous lipid peroxidation in rabbit spermatozoa. *Biology of reproduction*, 30(2), 323-331.
- Amann, R. P. (1989). Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately?. *Journal of Andrology*, 10(2), 89-98.
- Amann, R.P., (1999). Cryopreservation of sperm. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press, Burlington, MA, pp. 773–783.
- Amann, R.P. ve Waberski, D. (2014). Computer assisted sperm analysis (CASA) capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81 (1), 5-17.
- Andersen, K., Aamdal, J. and Fougner, J.A., (1973). Intra-uterine and deep cervical insemination with frozen semen in sheep. *Zuchthygiene*, 8:113-118.
- Anton, M., Martinet, V., Dalgalarondo, M., Beaumal, V., David-Briand, E., & Rabesona, H. (2003). Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chemistry*, 83(2), 175-183.
- Arav, A., Hehu, D. ve Mattioli, M. (1993). Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Infertility*, 99, 353-358.
- Bacinoğlu, S., Cirit, Ü., Nur, Z. Ve Ak, K. (2007). Eritilmiş Koç Spermasında Farklı Gliserol Katma Tekniklerinin Ve Soğutma Hızının Spermatolojik Özelliklere Etkisi. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 33(1), 11-21.
- Bacinoglu, S., Taş, M., Cirit, Ü., Özdaş, Ö. B., & Ak, K. (2008). The potential fertility estimation capacity of the hypoosmotic swelling test, the thermal stress test and a modified cervical mucus penetration test in the bovine. *Animal reproduction science*, 104(1), 38-46.
- Bailey, J.L., & Buhr, M.M. (1994). Cryopreservation alters the Ca²⁺ flux of bovine spermatozoa. *Canadian Journal of Animal Science*, 74(1), 45-51.
- Bailey, J., Morrier, A., & Cormier, N. (2003). Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. *Canadian journal of animal science*, 83(3), 393-401.
- Barrios, B., Fernández-Juan, M., Muiño-Blanco, T., & Cebrián-Pérez, J. A. (2005). Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *Journal of Andrology*, 26(4), 539-549.

- Baumber J., Ball, B. A., Gravance, C. G., Medina, V. ve Davies-Morel, M. C. (2000). The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *Journal of andrology*, 21(6), 895-902.
- Bengsch E. (1992). Connaissance du miel. Des oligo-éléments pour la santé. *Rev franç apicult* 569:383-386.
- Beretta G, Granata P, Ferrero M, Orioli M, Facino RM. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Anal Chim Acta* 533:185-191.
- Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini M., Albertini, M, Piatti, E. (2006). Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chem* 97:217-222.
- Bodu, M., ve Bucak, M.N. (2017). Sperm Parametrelerinin Değerlendirilmesinde Kullanılan Floresan Boyamalara Genel Bakış. *Türkiye Klinikleri Journal of Reproduction and Artificial Insemination-Special Topics*, 3(2), 79-88.
- Bogdanov S. (1997). Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *Lebensm.-Wiss -Technol* 30:748-753.
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., & Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: a review. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(6), 677-689.
- Bucak, M.N., Çoyan, K., Öztürk, C., Güngör, Ş., & Ömür, A.D. (2012). Methionine supplementation improves ram sperm parameters during liquid storage at 5 C. *Cryobiology*, 65(3), 335-337.
- Cabria, E., Anel, L. ve Herraéz, M.P. (2001). Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theriogenology*, 52, 623-635.
- Câmara, D. R., Silva, S. V., Almeida, F. C., Nunes, J. F., Guerra, M. M. P. (2011). Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. *Theriogenology*, 76(2), 342-350.
- Chen, Y., Foote, R.H. ve Brockett, C.C. (1993). Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology*, 30, 423-431.
- Chen, C. N., Weng, M. S., Wu, C. L., & Lin, J. K. (2004). Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma

cells by Taiwanese propolis from different sources. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1(2), 175-185.

Cirit, Ü., Bağış, H., Demir, K., Agca, C., Pabuccuoğlu, S., Varışlı, Ö., Agca, Y. (2013). Comparison of cryoprotective effects of iodixanol, trehalose and cysteamine on ram semen. *Animal Reproduction Science*, 139, 38-44.

Colas, G. (1975). Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep frozen ram semen. *Journal of Reproduction and Infertility*, 42, 277-285.

Coyan, K., Aksoy, M., Tekeli, T., Ayar, A., & Ataman, M. B. (1992). Die intrauterine Besamung von Schafen unter Anwendung des tiefgefrorenen Spermas mit Hilfe der Laparoskopie. *Hayvancilik Arastirma Dergisi*, 2, 15-17.

Crane E: History of honey. In Crane E. (ed) (1975). "Honey, a comprehensive survey." London: William Heinemann, pp. 439-488.

Critser, J.K., Huse-Benda, A.R., Aaker, D.V., Arneson, B.W and Ball, G.D. (1988). Cryopreservation of human spermatozoon III: The effect of cryoprotectants on motility. *Fertil Steril*, 50 (2): 314-320.

Cushnie, T, Lamb, A. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 26:343-356.

D'Allessandro, A.G.D., Martemucci, G., Collanna, M.A. ve Bellini, A. (2001). Post thaw survival of ram spermatozoon and fertility after insemination as affected by prefreezing sperm concentration and extender composition. *Theriogenology*, 55, 1159-1170.

D'Allessandro, A.G. ve Martemucci, G. (2005). Post-thaw survival and acrosome integrity of spermatozoa of Lecce rams frozen in different seasons with a milk-egg yolk extender. *Italian Journal of Animal Science*, 4, 139-148.

D'Arcy, B.R. (2005). Antioxidants in Australian floral honeys -Identification of health-enhancing nutrient components. *RIRDC Publication No 05/040*, 1.

Dattena, M., Gallus, M., Loi, P. Branca, A. Cappai, P. ve Casu, S. (1992). Artificial insemination in ewe lambs: effect of the insemination technique on fertility. İçinde *Proceedings of the 10th Symposium SIPAOC*, 276-277.

Demir, K., Bakırer, G., Öztürk, G., Cirit, Ü., Bozkurt, H.H., Aktaş, A. ve ark. (2015). Effects of cooling rate on membrane integrity and motility parameters of

cryopreserved ram spermatozoa. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 21, 61-67.

Drobnis, E.Z., Crowe, L.M., Berger, T., Anchordoguy, T. J., Overstreet, J.W ve Crowe, J.H. (1993). Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cellmembranes: a demonstration using sperm as a model. *Journal of Experimental Zoology*, 265, 432-437.

Edashige, K., Yamaji, Y., Kleinhans, F.W. ve Kasai, M. (2003). Artificial expression of aquaporin-3 improves the survival of mouse oocytes after cryopreservation. *Biology of Reproduction*, 68, 87-94.

El-Alamy, M.A. ve Foote, R.H. (2001). Freezaability of spermatozoon from finn and dorset rams in multiple extenders. *Animal Reproduction Science*, 65,245-254.

El-Nattat, W. S., El-Sheshtawy, R. I., El-Batawy, K. A., Shahba, M. I., ve El-Seadawy, I. E. (2016). Preservability of buffalo bull semen in tris-citrate extender enriched with bee's honey. *J. Innov. Pharm. Biol. Sci*, 3, 180-185.

El-Sheshtawy, R. I., El-Nattat, W. S., Sabra, H. A., ve Ali, A. H. (2014). Effect of honey solution on semen preservability of local breeds of cattle bulls. *World Appl. Sci. J*, 32, 2076-2078.

El-Sheshtawy, R. I., El-Badry, D. A., Gamal, A., El-Nattat, W. S., ve Almaaty, A. M. A. (2016). Natural honey as a cryoprotectant to improve Arab stallion post-thawing sperm parameters. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(4), 331-334.

Emsen, E. ve Koşum, N. (2009). Koyunculukta yeni üretim teknikleri. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 23, 33-42

Eppleston, J. (1992). Studies on the fertility for frozen-thawed ram semen. *Ph.D. thesis, University of New South Wales*.

Erejuwa, O.O., Siti, A., Sulaiman, M.S. and Wahab, A.B. (2012). Honey: A novel antioxidant (Review). *Molecules*, 17: 4400-4423.

Estevinho, L., Pereira, A. P., Moreira, L., Dias, L. G., & Pereira, E. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*, 46(12), 3774-3779.

Evans, G ve Maxwell, W.M.C. (1987). Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Sydney: Butterworths, 19, 91-141.

- Fahey JW ve Stephenson KK. (2002). Pinostrobin from honey and Thai ginger (*Boesenbergia pandurata*): A potent flavonoid inducer of mammalian phase 2 chemoprotective and antioxidant enzymes. *J Agric Food Chem.* 50:7472-7476.
- Fahy, G.M. (1986). The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology *Cryobiology*, 23, 1-13.
- Fakhrildin, M. B. M., ve Alsaadi, R. A. (2014). Honey supplementation to semen-freezing medium improves human sperm parameters post-thawing. *Journal of family & reproductive health*, 8(1), 27.
- Farrant, J., Lee, H. and Walter, C.A., (1977). Effects of interaction between cooling and rewarming conditions on survival of cells. In: K. Elliot and J. Whelan (Editors), *The Freezing of Mammalian Embryos*. Ciba Foundation Symposium 52 (New Series). *Elsevier*, Amsterdam, pp. 49-67.
- Fernández-Santos, M. R., Martínez-Pastor, F., Garcia-Macias, V., Estes, M. C., Soler, A. J., De Paz, P., ve ark. (2007). Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 67(4), 738-753.
- First, N.L., Henneman, H.A. ve Williams, J.A. (1957). The influence of glycerol and various diluents on low temperature survival of ram spermatozoon. *Journal of Animal Science*, 16, 1106.
- First, N.L., Henneman, H.A., Magee, W.T. and Williams, J.A. (1961). The frozen storage of ram semen. *J. Anim. Sci.*, 20: 74-78.
- Fiser, P.S ve Fairfull, R.W. (1984). The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoon frozen in straws. *Cryobiology*, 21, 542-551.
- Fiser, P.S. ve Fairfull, R.W. (1986). Combined effects of glycerol concentration, cooling velocity and osmolality of skim milk diluents on cryopreservation of ram spermatozoon. *Theriogenology*, 25 (3), 473-484.
- Fiser, P.S., Ainsworth, L. ve Fairfull, R.W. (1987). Evaluation of a new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 28, 599-607.
- Foote, R.H. (2003). Fertility estimation a review of past experience and future prospects. *Animal Reproduction Science*, 75, 119-139.

- Foster, D. L. ve Hileman, S. M. (2015). Puberty in the Sheep. İçinde Knobil, E. (2006). Knobil and Neill's physiology of reproduction (Vol. 2) (4th ed.) London: Elsevier Inc. Pages 1441-1485.
- Frankel, S., Robinson, G.E. ve Berenbaum M.R. (1998). Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. *J Apic Res* 37:27-31.
- Fuller, B. J. (2004). Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *CryoLetters*, 25(6), 375-388.
- García, W., Tabarez, A., & Palomo, M. (2017). Effect of the type of egg yolk, removal of seminal plasma and donor age on ram sperm cryopreservation. *Animal Reproduction*, 14(4), 1124-1132.
- Gheldof, N., Wang, X.H. ve Engeseth, N.J. (2002). Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J Agric Food Chem* 50:5870-5877.
- Gheldof, N., Wang, X.H. ve Engeseth, N.J. (2003). Buckwheat honey increases serum antioxidant capacity in humans. *J Agric Food Chem* 51:1500-1505.
- Gibb, Z., & Aitken, R. J. (2016). The impact of sperm metabolism during in vitro storage: the stallion as a model. BioMed research international, 2016.
- Gil, J., Söderquist, L., ve Rodriguez-Martinez, H. (2000). Influence of centrifugation and different extenders on post thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology*, 54, 93-108.
- Gil, J., Rodriguez-Irazaqui, M., Söderquist, L ve Rodriguez-Martinez, H. (2002). Influence of centrifugation or low extension rates prefreezing on the fertility of ram semen after cervical insemination. *Theriogenology*, 57, 1781-1792.
- Gil, J., Rodriguez-Irazaqui, M., Lundeheim, N., Söderquist, L ve Rodriguez-Martinez, H. (2003a). Fertility of ram semen frozen in bioexcell and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*, 59, 1157-1170.
- Gil, J., Lundeheim, N., Söderquist, L ve Rodriguez-Martinez, H. (2003b). Influence of extender, temperature and addition of glycerol on post thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*, 59, 1241-1255.
- Gillan, L. ve Maxwell, W.M.C., (1999). The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl. 54, 271–283.

- Gillan, L., Evans, G., & Maxwell, W. M. C. (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 63(2), 445-457.
- Glover, T. D. (1956). The effect of scrotal insulation and the influence of the breeding season upon fructose concentration in the semen of the ram. *Journal of Endocrinology*, 13(3), 235-242.
- Gökçen, H. (1977). Koç spermasının kimi özellikleri, dondurulması ve dondurulan spermanın döl verimi üzerine araştırmalar. Doktora Tezi. *Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Lalahan Zootekni Araştırma Enstitüsü, Yayın No:48*.
- Gökçen, H., Aştı, R.N. ve Kozandağı, M. (1983). Çeşitli ekilibasyon süreleri ve çözme ısılarının donmuş koç spermatozoonlarının motilitesi ve akrozom bozuklukları üzerine etkisi. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2 (1), 51-58.
- Gökçen, H., Aştı, R.N., Çekgöl, E., ve Şener, E. (1985). Prostaglandin F2 alfa ve Vit. E katılarak dondurulan koç spermalarında akrozom morfolojisi ve döl verimi üzerinde araştırmalar. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 4, 1-3.
- Gökçen, H. (1990). Koyunlarda sun'i tohumlama, İçinde Aytuğ, C.N (ed), *Koyun-keçi Hastalıkları ve Yetiştiriciliği*. İstanbul: 485-501; Teknografik Matbaası.
- Griveau, J. F., & Lannou, D. L. (1997). Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *International journal of andrology*, 20(2), 61-69.
- Gunay, U., Dogan, I., Nur, Z., Manolov, I., Sagirkaya, H., Soylu, M. K., ... & Akpınar, L. (2006). Influence of bull seminal plasma on post-thaw ram semen parameters and fertility. *Bulletin-Veterinary Institute In Pulawy*, 50(4), 503.
- Gürkan, B., & Boşgelmez, A. (1989). Çam Pamuklu Koşnili *Marchalina hellenica* (Gennadius)'nin biyo-ekolojisi ve populasyon dinamiği [Bioecology and population dynamics of the pine scale *Marchalina hellenica* (Gennadius)]–Ph. D (Doctoral dissertation, thesis, HÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 87 pp.(in Turkish)).
- Hafez, E.S.E. (1993). *Reproduction in Farm Animals*. (6th ed), Philadelphia. 503-525.
- Hancock, J. L. (1952). The morphology of bull spermatozoa. *Journal of Experimental Biology*, 29(3), 445-453.
- Hill, J.R., Thompson, J.A. ve Perkins, N.R. (1998). Factors affecting pregnancy rates following laparoscopic insemination of 28,447 merino ewes under commercial conditions: A survey. *Theriogenology*, 49, 697-709.

- Holt, W.V. ve North, R.D. (1994). Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 51, 414-424.
- Holt, W.T. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62,3-22.
- Iborra, A., Companyó, M., Martínez, P., & Morros, A. (2000). Cholesterol efflux promotes acrosome reaction in goat spermatozoa. *Biology of reproduction*, 62(2), 378-383.
- Inoue, K., Murayama, S., Seshimo, F., Takeba, K., Yoshimura, Y., Nakazawa, H. (2005). Identification of phenolic compound in manuka honey as specific superoxide anion radical scavenger using electron spin resonance (ESR) and liquid chromatography with coulometric array detection. *J Sci Food Agric* 85:872-878.
- İleri, İ.K., Ak, K., Pabuccuoğlu, S. ve Birler, S. (2000). Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, Ders Notu No: 112*, İstanbul.
- İnanç, M.E., Güngör, Ş., Ata, A. (2017). Spermatozoa Motilitesinin Değerlendirilmesinde Bilgisayar Destekli Sperm Analiz Sistemi'nin Kullanımı. *Türkiye Klinikleri Journal of Reproduction and Artificial Insemination-Special Topics*, 3(2), 73-78.
- Jafaroghli, M., Khalili, B., Farshad, A. ve Zamiri, M.J. (2011). The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. *Small Ruminant Research*, 96, 58-63.
- Jean-Prost, P. (1987). Miel. In: Apiculture. Ed Tech document, 6th ed. pp 310–346.
- Jerez, R., Gil, L., Gonzalez, N., Luno, V., Olaciregui, M., Martinez, F., ve Malo, C. (2013). Rosemary honey as natural energetic source on refrigeration ram semen. In *Reproduction in Domestic Animals* (48). 79-79.
- Jerez-Ebensperger, R. A., Luno, V., Olaciregui, M., Gonzalez, N., de Blas, I., ve Gil, L. (2015). Effect of pasteurized egg yolk and rosemary honey supplementation on quality of cryopreserved ram semen. *Small Ruminant Research*, 130, 153-156.
- Jiménez-Rabadán, P., Soler, A. J., Ramón, M., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Iniesta-Cuerda, M., & Garde, J. J. (2016). Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Animal reproduction science*, 167, 103-108.

- Kantola, M., Saaranen, M., & Vanha-Perttula, T. (1988). Selenium and glutathione peroxidase in seminal plasma of men and bulls. *Journal of reproduction and fertility*, 83(2), 785-794.
- Kántor, Z., Pitsi, G., ve Thoen, J. (1999). Glass transition temperature of honey as a function of water content as determined by differential scanning calorimetry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(6), 2327-2330.
- Kareta, W., Pilch, J. and Wierzbowski, S., (1972). Fertility of frozen ram semen diluted in citrate buffer with or without added bull seminal plasma. Proc. 7th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., 6-9 June 1972, Munich, Vol. 3, pp. 1479-1484.
- Katkov, II., Katkova, N., Crister, J.K. ve Mazur, P. (1998). Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: Chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Cryobiology*, 37, 325-338.
- Kaymakçı, M., Özder, M., Karaca, O., Torun, O., Baş, S., Koşum, N. (2009). Türkiye Koyun Islahı Stratejisi. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 23(2), 67-77.
- Keskin, M., Biçer, O. ve Gül, S. (2002). Sık kuzulatma sistemleri. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 7 (1-2), 89-94.
- Kim, S., Lee, Y. J., & Kim, Y. J. (2011). Changes in sperm membrane and ROS following cryopreservation of liquid boar semen stored at 15 C. *Animal reproduction science*, 124(1-2), 118-124.
- Kodama, H., Kuribayashi, Y., & Gagnon, C. (1996). Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. *Journal of andrology*, 17(2), 151-157.
- Koşum, N. (2006). Koyun ve keçilerde yapay tohumlama. *Hasad, Aylık Gıda, Tarım ve Hayvancılık Dergisi*, Yıl: 22, Sayı: 259.
- Kukurova, K., Karovièová, J., Kohajdova, Z., & Bilikova, K. (2008). Authentication of honey by multivariate analysis of its physicochemical parameters. *Journal of Food & Nutrition Research*, 47(4).
- La Falci, V. S. N., Yrjö-Koskinen, A. E., Fazeli, A., Holt, W. V., & Watson, P. F. (2011). Antioxidant combinations are no more beneficial than individual components in combating ram sperm oxidative stress during storage at 5 C. *Animal reproduction science*, 129(3-4), 180-187.
- Leahy, T., & Gadella, B. M. (2015). New insights into the regulation of cholesterol efflux from the sperm membrane. *Asian journal of andrology*, 17(4), 561.

- Lightfoot, R.J. ve Salamon, S., (1969). Freezing of ram semen by the pellet method. II. The effect of method of dilution, dilution rate, glycerol concentration, and duration of storage at 58C prior to freezing on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* 22, 1547–1560.
- Liu, Z., Foote, R. H., & Brockett, C. C. (1998). Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. *Cryobiology*, 37(3), 219-230.
- López-Fernández, C., Fernández, J. L., Gosálbez, A., Arroyo, F., Vázquez, J. M., Holt, W. V., & Gosálvez, J. (2008). Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals: III. Ram. *Theriogenology*, 70(6), 898-908.
- Louveaux J. (1985). Les produits du rucher. In *Les abeilles et leur élevage OPIDA*, pp 165–199.
- Maia, M. D. S., Bicudo, S. D., Sicherle, C. C., Rodello, L., & Gallego, I. C. S. (2010). Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. *Animal reproduction science*, 122(1-2), 118-123.
- Maia, M. D. S., Bicudo, S. D., & Rodello, L. (2014). Effect of hydrogen peroxide on thawed ovine sperm motility. *Animal Reproduction*, 119-123.
- Maidin, M. S., Padlan, M. H., Azuan, S. A. N., Jonit, R., Mohammed, N. H., & Abdullah, R. (2018). Supplementation of Nigella sativa Oil and Honey Prolong the Survival Rate of Fresh and Post-Thawed Goat Sperms. *Tropical Animal Science Journal*, 41(2), 94-99.
- Malmgren, L. (1997). Assessing the quality of raw semen: a review. *Theriogenology*, 48(4), 523-530.
- Manjunath, P., Nauc, V., Bergeron, A ve Ménard, M. (2002). Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biology of Reproduction*, 67, 1250-1258.
- Mara, L., Accardo, C., Pilichi, S., Dattena, M., Chessa, F., Chessa, B., ... & Cappai, P. (2005). Benefits of TEMPOL on ram semen motility and in vitro fertility: a preliminary study. *Theriogenology*, 63(8), 2243-2253.
- Marco-Jiménez, F., Puchades, S., Gadea, J., Vicente, J. S., Viudes-de-Castro, M. P. (2005). Effect of semen collection method on pre-and post-thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology*, 64(8), 1756-1765.

- Maxwell, W. M. C., Landers, A. J., & Evans, G. (1995). Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubes. *Theriogenology*, 43(7), 1201-1210.
- Maxwell, W.M.C ve Watson, P.F. (1996). Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 42, 55-65.
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*, 247, 125-142.
- McGann, L.E. (1978). Differing action of penetrating and nonpenetrating agents. *Cryobiology*, 15, 382-390.
- McKelvey, W.A.C., Robinson, J.J. ve Aitken, R.P. (1985). The evaluation of a laparoscopic insemination technique in ewes. *Theriogenology*, 24, 519-535.
- McWilliams, R.B., Gibbons, W.E. ve Leibo, S.P. (1995). Osmotic and physiological responses zygotes and human oocytes to mono and disaccharides. *Human Reproduction*, 10, 1163-1171.
- Medeiros, C.M.O., Forell, F., Oliverira, A.T.D ve Rodriques, J.L. (2002). Current Status of Sperm Cryopreservation: Why isn't it better. *Theriogenology*, 57, 327-344.
- Meyers, S.A. (2005). Spermatozoal response to osmotic stress. *Animal Reproduction Science*, 89, 57-74.
- Mehdipour, M., Kia, H. D., Nazari, M., & Najafi, A. (2017). Effect of lecithin nanoliposome or soybean lecithin supplemented by pomegranate extract on post-thaw flow cytometric, microscopic and oxidative parameters in ram semen. *Cryobiology*, 78, 34-40.
- Milovanov, V. K., & Selivanova, O. (1932). Dilutors for sperm of livestock. *Probl zhiwotn*, 2, 75-86.
- Milovanov, V.K. (1962). *Biology of Reproduction and Artificial Insemination of Animals*. Seljhozizdat, Moscow, Win Russian, 696.
- Molan, P. (1999). Why honey is effective as a medicine. 1. Its use in modern medicine. *Bee World* 80:79-92.
- Molinia, F.C., Evans, G., Casares, P.I. ve Maxwell, W.M.C. (1994). Effect of monosaccharides and disaccharides in tris based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 36, 113-122.

- Morrier, A., Castonguay, F. ve Baily, J.L. (2003). Glycerol addition and conservation of fresh and cryopreserved ram semen. *Canadian Journal of Animal Science*, 221-227.
- Morris, G.J. ve Farrant, J. (1972). Interactions of cooling rate and protective additive on the survival of wash human erythrocytes frozen to -196°C . *Cryobiology*, 9, 173-181.
- Motamedi-Mojdehi, R., Roostaei-Ali Mehr, M., Rajabi-Toustani, R. (2014). Effect of Different Levels of Glycerol and Cholesterol-Loaded Cyclodextrin on Cryosurvival of Ram Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(1), 65-70.
- Nagai, T., Inoue, R. ve Suzuki, N. (2002). Scavenging capacities of polen extracts from *Citrus ladaniferus* on autoxidation, superoxide radicals, hydroxyl radicals and DPPH radicals. *Nutr Res* 22:519–526.
- Nagai, T., Inoue, R., Kanamori, N., Suzuki, N. ve Nagashima, T. (2006). Characterization of honey from different floral sources. Its functional properties and effects of honey species on storage of meat. *Food Chem* 97:256-262.
- Naoman, U. D. (2013). Sperms biometry of local Iraqi Awassi Rams. *AL-Qadisiyah Journal of Veterinary Medicine Sciences*, 12(2), 19-23.
- Nauc, V. ve Manjunath, P. (2000). Radio-immuno assay for bull seminal plasma and proteins (BSP-A1/A2., BSP-A3., BSP-30kDa) and their quantification inseminial plasma and sperm. *Biology of Reproduction*, 63, 1058-1066.
- Nauk, V.A., Ljansberg, E.S., Seikin, V.N. (1970). Cryogenic changes on ram spermatozoa. *Ovtsevodstvo*, Vol.16, No.10; S. 25-27.
- Noiles, E.E., Bailey, J ve Storey, B.T. (1995). Temperature dependence of the water permeability, LP of murine sperm shows a discontinuity between 4°C and 0°C . *Cryobiology*, 32, 220-238.
- Nur, Z., Zik, B., Ustuner, B., Sagirkaya, H., & Ozguden, C. G. (2010). Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. *Theriogenology*, 73(9), 1267-1275.
- Nur, Z., (2014) Spermanın alınması ve muayenesi, saklanması ve eritilmesi. Editör: Soylu M.K., *Doğum Bilgisi ve Suni Tohumlama*, Anadolu Üniversitesi Yayınları, 18-59

- Olayemi, F. O., Adenigi, D. A., ve Oyeyemi, M. O. (2011). Evaluation of sperm motility and viability in honey included egg yolk based extenders. *Global Vet*, 7(1), 19-21.
- O'Meara, C. M., Hanrahan, J. P., Donovan, A., Fair, S., Rizos, D., Wade, M., ve ark.(2005). Relationship between in vitro fertilisation of ewe oocytes and the fertility of ewes following cervical artificial insemination with frozen-thawed ram semen. *Theriogenology*, 64(8), 1797-1808.
- O'Neill, D.J. (1998). Studies on the cryopreservation of ram spermatozoa. *M Sc (agric) Thesis, National University of Ireland, Ireland*.
- Ollero, M., Perez-pe, R., Muino-Blanco, T ve Cebrian-Perez, J.A. (1998). Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. *Cryobiology*, 37, 1-12
- Oršolić, N., & Bašić, I. (2007). Cancer chemoprevention by propolis and its polyphenolic compounds in experimental animals. *In Phytochemistry and Pharmacology*; Vol. 3. Studium-Press.
- Osheroff, J. E., Visconti, P. E., Valenzuela, J. P., Travis, A. J., Alvarez, J., & Kopf, G. S. (1999). Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. *Molecular Human Reproduction*, 5(11), 1017-1026.
- Ouchemoukh, S., Louaileche, H. ve Schweitzer, P. (2005). Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys. *Food Control* 18:52–58.
- Öğretmen, F., ve İnanan, B. E. (2014). Evaluation of Cryoprotective Effect OfTurkish Pine Honey on Common Carp (Cyprinus Carpio) Spermatozoa. *CryoLetters*, 35(5), 427-437.
- Ömür, A.D. (2015). Koç spermasının dondurulmasında antioksidanların etkisi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 10 (1), 61-69
- Özkoca A. (1984). Çiftlik Hayvanlarında Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları*, 93.
- Özkök, A., Sorkun, K., & Salih, B. (2016). The Microscopic and GC-MS Analysis of Turkish Honeydew (Pine) Honey. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 44(4), 375-383.

- Öztürkler, Y., Ak, K. ve İleri, İ. K. (1999). Koç Spermasının Yoğun Gliserollü Sulandırıcılarda Dondurulması. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 25(2), 399-414.
- Öztürkler, Y., Baran, A., Evecen, M., Ak, K. ve İleri, İ.K. (2001). Comparison of ovine spermatozoal morphological features after staining of fixation and assessment of morphological abnormalities in dead/live spermatozoa. *Turkish Journal of Veterinary And Animal Sciences*, 25, 675-680.
- Palasz, A.T. ve Mapletoft, R.J. (1996). Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes recent advances. *Biotechnology Advances*, 14, 127-149.
- Panyaboriban, S., Suwimonteerabutr, J., Phutikanit, N., Swangchan-Uthai, T., Tharasanit, T., & Techakumphu, M. (2015). Effect of various combinations of sugar supplementation in the extender on frozen-thawed ram semen quality and fertility. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 45(2), 229.
- Parks, J. E. ve Graham, J. K. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38(2), 209-222.
- Part, Jr., J.A. and Nath, J., (1969). Effects of diluents, equilibration time and freezing rates on the storage of ram semen. *Cryobiology*, 5: 385-392.
- Patist, A. ve Zoerb, H. (2005). Preservation mechanism of trehalose in food and biosystems. *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces*, 40, 107-113.
- Paulenz, H., Söderquist, L., Perez-Pe, R ve Berg, K.A. (2002). Effect of different extenders and storage temperature on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*, 57, 823-836.
- Paulenz, H., Söderquist, L., Adnoy, T., Nordstoga, A., Gulbrandsen, B ve Berg, K.A. (2004). Fertility results after different thawing procedures for ram semen frozen in minitubes and mini straws. *Theriogenology*, 61, 1719-1727.
- Payne, S.R., Oliver, J.E. ve Upreti, G.C. (1994). Effect of antifreeze proteins on the motility of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 31, 180-184.
- Pellicer-Rubio, M. T., Magallon, T., & Combarnous, Y. (1997). Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biology of reproduction*, 57(5), 1023-1031.
- Pelugo, V., Armengol, M. L., Malcotti, V., Venturino, A., & Aisen, E. G. (2015). Effects of glycerol and sugar mixing temperature on the morphologic and functional integrity of cryopreserved ram sperm. *Theriogenology*, 83(1), 144-151.

- Perez, R.A., Iglesias, M.T., Pueyo, E., Gonzalez, M. ve de Lorenzo, C. (2007). Amino acid composition and antioxidant capacity of Spanish honeys. *J Agric Food Chem* 55:360-365.
- Persano Oddo, L. ve Piro, R. (2004). Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie* 35:S38-S81.
- Phillips, P.H. (1939). Preservation of bull semen. *Journal of Biological Chemistry*, 130, 415.
- Pini, T., Rickard, J. P., Leahy, T., Crossett, B., Druart, X., & de Graaf, S. P. (2018). Cryopreservation and egg yolk medium alter the proteome of ram spermatozoa. *Journal of proteomics*, 181, 73-82.
- Polge, C., Smith, A.U. ve Parks, A.S. (1949). Revival of spermatozoon after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164, 666.
- Pontbriand, D., Howard, J.G., Schieve, M.C., Stuart, L.D. ve Wildt, D.E. (1989). Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoon. *Cryobiology*, 26, 341-354.
- Purdy, P. H. (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 63(3), 215-225.
- Quinn, P.J., Salamon, S. ve White, I.G. (1968). The effect of cold shock and deep-freezing on ram spermatozoa collected by electrical ejaculation and by an artificial vagina. *Australian Journal of Biological Sciences*, 19, 119-128.
- Rashidi, M. (2011). Koyunlarda dondurulmuş koç sperması ile trans servikal yapay tohumlama. *Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara
- Ritar, A.J. ve Salamon, S. (1983). Fertility of fresh and frozen-thawed sperm of angora goat. *Australian Journal of Biology Science*, 36, 49-59.
- Robaire, B. ve Hinton, B. T.; (2015) The Epididymis. İçinde Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Vol. 2) (4th ed.) Pages 691-771.
- Robertson, L., & Watson, P. F. (1986). Calcium transport in diluted or cooled ram semen. *Journal of reproduction and fertility*, 77(1), 177-185.
- Robertson, L., Watson, P. F., & Plummer, J. M. (1988). Prior incubation reduces calcium uptake and membrane disruption in boar spermatozoa subjected to cold shock. *Cryo-Letters (UK)* 9, 286-293.

- Russell, K.M., Molan, P.C., Wilkins, A.L. ve Holland, P.T. (1988). Identification of some antibacterial constituents of New Zealand Manuka honey. *J Agric Food Chem* 38:10-13.
- Russell, E. V. & Israeloff, N. E. (2000). Direct observation of molecular cooperativity near the glass transition. *Nature*, 408(6813), 695.
- Salamon, S. (1968). Deep Freezing of Ram Semen: Recovery of Spermatozoa After Pelleting and Comparison With Other Methods of Freezing. *Australian Journal of Biological Sciences* 21(2); 351 - 360
- Salamon, S., & Visser, D. (1972). Effect of composition of tris-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. *Australian journal of biological sciences*, 25(3), 605-618.
- Salamon, S. ve Maxwell, W.M.C. (1995a). Frozen storage of ram semen I. processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination., *Animal Reproduction Science*, 37, 185-249.
- Salamon, S. ve Maxwell, W.M.C. (1995b). Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and method of improvement. *Animal Reproduction Science*, 38, 1-36.
- Salamon, S. ve Maxwell, W.M.C. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62, 77-111.
- Salisbury, G.W., Fuller, H.K ve Willett, E.L., (1941). Preservation of bovine spermatozoa in yolk–citrate diluent and field results from its use. *J. Dairy Sci.* 24, 905–910.
- Sanchez-Partida, L. G., Maxwell, W. M., Paleg, L. G., & Setchell, B. P. (1992). Proline and glycine betaine in cryoprotective diluents for ram spermatozoa. *Reproduction, fertility and development*, 4(1), 113-118.
- Santas, L.A. (1979). *Marchalina hellenica* An Important Insect for Apiculture of Greece, *The XXVIIth International Congress of Apicultur of Apimondia*, Athens, 419-422.
- Sanz, M.L., Gonzalez, M., Lorenzo, C., Sanz, J. ve Martinez-Castro, I. (2005). A contribution to the differentiation between nectar honey and honeydew honey, *Food Chemistry* 91:313-317.
- Sato, T. ve Miyata, G. (2000). The nutraceutical benefit, part II: Honey. *Nutrition* 16:468–469.

- Saxena, S., Gautam, S., & Sharma, A. (2010). Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food Chemistry*, 118(2), 391-397.
- Schanbacher, B. D., Gomes, W. R., & VanDemark, N. L. (1974). Developmental changes in spermatogenesis, testicular carnitine acetyltransferase activity and serum testosterone in the ram. *Journal of animal science*, 39(5), 889-892.
- Schmehl, M.K., Vazquez, I.A. ve Graham, E.F. (1986). The effects of non penetrating cryoprotectants added to test yolk glycerol extender on the post thaw motility of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 23, 512-517.
- Shannon, P., & Curson, B. (1982). Site of aromatic L-amino acid oxidase in dead bovine spermatozoa and determination of between-bull differences in the percentage of dead spermatozoa by oxidase activity. *Journal of reproduction and fertility*, 64(2), 469-473.
- Soylu, M. K., Nur, Z., Ustuner, B., Dogan, I., Sagirkaya, H., Gunay, U., & Ak, K. (2007). Effects of various cryoprotective agents and extender osmolality on post-thawed ram semen. *Bulletin-Veterinary Institute In Pulawy*, 51(2), 241.
- Söderquist, L., Madrit-Bury, N. ve Rodriguez-Martinez, H. (1997). Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. *Theriogenology*, 48, 1115-1125.
- Storey, B.T., Noiles, E.E. ve Thompson, K.A. (1998). Comparison of glycerol, other polyols, trehalose and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 37, 46-58.
- Syazana N.S, Hashida N.H, Majid A.M, Durriyah Sharifah H.A, Kamaruddin M.Y. (2011). Effects of Gelam Honey on sperm quality and testis of rat. *Sains Malaysiana*, 40 (11). pp. 1243-1246.
- Taş., M, Cirit., Ü., Bacinoğlu., S., Ak. K., ve İleri. İ.K. (2006). Boğaların potansiyel fertilitelilerinin belirlenmesinde yeni bir servikal mukus penetrasyon test tekniği (Payet Yöntemi). *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 20 (5), 351-356.
- Taş, M., Bacinoglu, S., Cirit, Ü., Özdaş, Ö. B., & Ak, K. (2007). Relationship between bovine fertility and the number of spermatozoa penetrating the cervical mucus within straws. *Animal Reproduction Science*, 101(1-2), 18-27.
- Tekin, N., Apel, A.R., Yurdaydın, N. Yavaş, Y. Daşkın, A. Keskin, O. ve ark. (1991). Östrusları senkronize edilen koyunlarda suni tohumlama yöntemiyle elde edilen dölverimi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 38 (1-2), 60-73.

- Tekin, N., Uysal, O., Akçay, E. ve Yavaş, İ. (2006). Farklı taurin dozlarının ve dondurma hızının koç spermasının dondurulması üzerine etkileri. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 53, 179-184.
- Terrab, A., Vega-Perez, J.M., Diez, M.J. ve Heredia, F.J. (2001). Characterisation of Northwest Moroccan honeys by gas chromatographic-mass spectrometric analysis of their sugar components. *J Sci Food Agric* 82:179–185.
- Tharasanit, N. A. J., & Techakumphu, N. P. J. (2013). Glycerol concentration effects on quality and longevity of post-thaw goat semen. *Thai J. Vet. Med*, 43(2), 179-186.
- Thwaites, C. J. (1995). Effect of undernutrition on the size and tone of the ram's testes. *Small ruminant research*, 16(3), 283-286.
- TİGEM (2016) *2016 Hayvancılık Sektör Raporu*. Ankara: Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü. Erişim 10.11.2017, <https://www.tigem.gov.tr>
- Tomás-Barberán, F.A., Martos, I., Ferreres, F., Radovic, B.S. ve Anklam, E. (2001). HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *J Sci Food Agric* 81:485-496.
- Trimberger, W.G. (1974). *Artificial Insemination Reproduction in Farm Animals*, 145-174. P., London.
- Turkmen N, Sari F, Poyrazoglu ES, Velioglu YS (2005) Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chemistry* 95, 653-57.
- TÜİK (2017, 12 Eylül). *Hayvansal Üretim İstatistikleri, Haziran 2017*. Ankara: Türkiye İstatistik Kurumu. Erişim 10.11.2017, <http://www.tuik.gov.tr>
- Türk Gıda Kodeksi (2012, 27 Temmuz). Bal Tebliği, 2012/58. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2012/07/20120727-12.htm>
- Uchida, T., Nagayama, M., Shibayama, T., & Gohara, K. (2007). Morphological investigations of disaccharide molecules for growth inhibition of ice crystals. *Journal of Crystal Growth*, 299(1), 125-135.
- Vajta G. ve Kuwayama M. (2006). Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 65, 236-244.
- Valente, S. S., Pereira, R. M., Baptista, M. C., Marques, C. C., Vasques, M. I., Pereira, M. S., ve ark. (2010). In vitro and in vivo fertility of ram semen cryopreserved in different extenders. *Animal reproduction science*, 117(1-2), 74-77.

- Vinson, J. A., Hao, Y., Su, X., & Zubik, L. (1998). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(9), 3630-3634.
- Watson, P.F ve Martin, I.C. (1976). Artificial insemination of sheep the effect of semen diluents containing egg yolk on the fertility of ram semen. *Theriogenology*, 6, 559-564.
- Watson, P.F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post- thawing function. *Reproduction Fertility and Development*, 7, 871-791.
- Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science*, 60, 481-492.
- Weston, R.J., Mitchell, K.R. ve Allen, K.L. (1999). Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey. *Food Chem* 64:295-301.
- Weston, R. J. (2000). The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. *Food Chem*, 71(2), 235-239.
- White, I.G. (1993). Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation a review. *Reproduction Fertility and Development*, 5, 639-658.
- White, J.W., Subers, M.H. ve Schepartz, A.J. (1963): The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochim Biophys Acta* 73:57-70.
- Willett, E.L., Salisbury, G.W., (1942). The effect of various diluters, cooling rate, temperature of storage, some other factors, on the livability of spermatozoa in stored samples of bull semen. Cornell Univ. Agric. Exp. Sta. Mem. 249.
- Windsor, D.P., Szell, A.Z., Buschbeck, C., Edward, A.Y., Milton, J.T.B., Buckrell, B.C., (1994). Transcervical artificial insemination of Australian Merino ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 42, 147-157.
- Woelders, H., Matthij, A. ve Engel, B. (1997). Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology*, 35, 93-105.
- Woods, E.J., Gilmore, J.A. ve Liu, J. (2000). Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Human Reproduction*, 15, 335-343.

- Yatsunami, K. ve Echigo, T. (1984). Antibacterial action of honey and royal jelly (Japanese). *Honeybee Sci* 5:125-130.
- Yavasca I, Ak K, Ileri IK. (1999). Einwirkungen verschiedener umgebungstermperaturen und besamungszeiten auf die fertilität der nach paillettenverfahren aufgetauten bullenspermien (in German). *J Fac Vet Med Istanbul Univ.* 25: 215-223.
- Yildiz, C., Kaya, A., Aksoy, M. ve Tekeli, T. (2000). Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, 54, 579-585.
- Yimer, N., Muhammad, N., Sarsaifi, K., Rosnina, Y., Wahid, H., Khumran, A. M. ve ark. (2015). Effect of honey supplementation into Tris Extender on Cryopreservation of Bull Spermatozoa. *Malaysian Journal of Animal Science*, 18(2), 47-54.
- Zeng, W., Avelar, G. F., Rathi, R., Franca, L. R., & Dobrinski, I. (2006). The length of the spermatogenic cycle is conserved in porcine and ovine testis xenografts. *Journal of andrology*, 27(4), 527-533.
- Zoheir, K. M. A., Harisa, G. I., Abo-Salem, O. M., & Ahmad, S. F. (2015). Honey bee is a potential antioxidant against cyclophosphamide-induced genotoxicity in albino male mice. *Pak. J. Pharm. Sci*, 28(3), 973-981.

HAM VERİLER



FORMLAR

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayın Prof. Dr. Kemal AK
İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Basvuru : 12.10.2017

Toplantı Tarihi : 26.10.2017

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen **Veteriner Hekim Hüseyin YÜKSEL'e** ait "Koç Spermatozom Dondurulmasında Saldırıdırılara Çiçek Balı ve Çam Balı İavesinin Spermatozolojik Özelliklere Etkisi" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kural ilkelere uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Koyun (Koç)
	Cinsiyeti	Erkek
	Sayısı	5
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi	13.11.2017/ 29.06.2018	

Prof. Dr. Alev KAYMAZ
İÖ HADYİK Başkanı

Prof. Dr. Meltem YALTIKIR
Öye

Prof. Dr. Ufuk ÇAKATAY
Öye

Prof. Dr. Mustafa Oral ÖNCÜL
Öye

Doç. Dr. Alper OKYAR
Öye

Doç. Dr. Aygül EKİCİ
Öye

Doç. Dr. Uğur AKSU
Öye

Yrd. Doç. Dr. Altan ARMUTAK
Öye

Yrd. Doç. Dr. Aydın ÇEVİK
Öye

Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ
Öye

Dr. Barak OLGUN
Mak.Yük. Müh
Öye

Avukat Selma DEMİR
Öye

İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı İ.Ö. Veteriner Fakültesi Dekanlık Katı A 221 no.lu
Oslo Avcılar -İSTANBUL TEL : (0 212) 493 90 90 / 17011 E-MAIL: hayyeta@istanbul.edu.tr

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

Koç Spermasının Dondurulmasında Sulandırıcılara Çiçek Balı ve Çam Balı İlavesinin Spermatolojik Özelliklere Etkisi

ORIJINALLIK RAPORU

% 12	% 6	% 3	% 10
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%5
2	Submitted to Uludag University Öğrenci Ödevi	%1
3	acikerisim.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
4	Submitted to Fatih University Öğrenci Ödevi	%1
5	veteriner.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	www.kkgm.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
8	sabe.klu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Hüseyin	Soyadı	Yüksel
Doğ.Yeri	Lefkoşa/K.K.T.C.	Doğ.Tar.	09.03.1990
Uyruğu	K.K.T.C.	TC Kimlik No	21656845760
Email	huseyinyuksel1358@gmail.com	Tel	0 534 055 13 58

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi – Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Dölerme ve Sun'i Tohumlama Bölümü	2019 (devam ediyor)
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2012
Lisans	İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2012
Lise	Girne-19 Mayıs Türk Maarif Koleji	2007

İş Deneyimi

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Veteriner Hekim/İşletme sahibi	Kolay Çiftlik Veteriner Sağlık ve Danışmanlık Hizmetleri A.Ş.	2019 – Devam etmekte
2.	Ürün Müdürü	Dollvet Aşı İlaç Biyolojik Madde Üretimi Sanayi ve Tic. A.Ş.	2018 - 2019
3.	Pazarlama Sorumlusu İzin	Atmaca İlaç San.	2016-2018
4.	Veteriner Hekim	Ada Veteriner Polikliniği	2013-2016

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	63	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	74,39572	72,08582	62,62175
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi
Adobe Acrobat Reader	Çok iyi

Yayınları/Tebliğleri/Sertifikaları/Ödülleri

SCI, SSCI, AHCI İndekslerine Giren Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Enginler, S. Ö., Sandal, A. İ., Erzengin, Ö. M., Yüksel, H., Ertürk, E., Doğan, N., Baran, A., (2014). Effects of Gestation Type and Parity on Uterus Involution in Saanen Does. *Animal Health Prod and Hyg* 3(1), 288 – 293.

Sertifikalar

1. Sığırlarda Recto-Vaginal Metotla Sun'i Tohumlama Sertifikası. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Hayvancılık Genel Müdürlüğü (2015).

