

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA
DOKTORA PROGRAMI
DR-2025-0052

TAVŞAN SPERMASININ KISA SÜRELİ SAKLANMASINDA
SERİSİNİN ANTİMİKROBİYAL ETKİSİ

GÜNEY TUZLALIOĞLU
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Melih AKSOY

AYDIN-2025

KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Anabilim dalı Doktora Programı çerçevesinde Güney TUZLALIOĞLU tarafından hazırlanan “ Tavşan Spermasının Kısa Süreli Saklanması Serisinin Antimikrobiyal etkisi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 30/07/2025

Üye (T.D.) : Prof. Dr. Melih AKSOY	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye : Prof. Dr. Ahmet CEYLAN	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye: Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye: Prof. Dr. Fatih AVDATEK	Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye: Prof. Dr. Deniz YENİ	Afyon Kocatepe Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmam süresince ilgi, desteği ve hoşgörüsünü hiçbir zaman esirgemeyen, katkıları ve akademik desteği için değerli danışmanım Prof. Dr. Melih AKSOY'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Ahmet CEYLAN, Prof. Dr. İlker SERİN, Doç. Dr. Niyazi KÜÇÜK ve Dr. Öğr. Üyesi Uğur UÇAN'a müteşekkirim. Her konuda bana yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen Dr. Sanan RAZA, Veteriner Hekim Deniz DOĞAN, Elif Öykü KILIÇ, Büşra ARABACI ve diğer lisansüstü arkadaşlarıma teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Ayrıca, yardımları ve yönlendirmeleriyle çalışmalarım bana katkı sağlayan kıymetli hocalarım Prof. Dr. Hüsnü Erbay BARDAKÇIOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Pelin KOÇAK KIZANLIK ve Dr. Öğr. Üyesi Cemil ŞAHİNER'e; mikrobiyoloji laboratuvar çalışmalarım da desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ ve Dr. Ömer Zeyyad MISIRLIOĞLU'na içten teşekkür ederim. Manevi destekleriyle her zaman yanımda olduklarını hissettiren Prof. Dr. Güneş ERDOĞAN, Prof. Dr. Hayrettin ÇETİN, Dr. Asude G. ORYAŞIN ve Dr. Öğr. Üyesi Cevdet PEKER'e minnettarım. Her zaman yardımsever yaklaşımlarıyla yanımda olan Sağlık Bilimleri Enstitüsü personellerine ve özellikle Esra ŞİMŞEK'e çok teşekkür ederim. Aydın'ı bana bir yuva gibi hissettiren, seçtiğim ailem olan sevgili arkadaşlarım Ceren ÜLKER, Ebru CAN, Hünkar Nazmi ÖZTÜRK, Yağız ALTIN'a ve uzaklarda olsalar da her zaman kalben yanımda olan Göknur ERCAN ve Şerife AŞMAN'a gönülden teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince sabırları, özverileri ve sonsuz destekleriyle bir an olsun yanımdan ayrılmayan; beni daima teşvik eden ve varlıklarıyla güç veren canım babam Hüseyin Oğuz TUZLALIOĞLU, canım annem Hülya TUZLALIOĞLU ve biricik ablalarım Bedriye T. ABAKAN ile Ayşe T. VİLDA'ya sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
RESİMLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tavşanlarda Üreme Biyolojisi	3
2.2. Tavşan Spermasının Özellikleri	4
2.3. Tavşanlardan Sperma Alımı	5
2.4. Spermanın Saklanması	6
2.4.1. Spermanın Kısa Süreli Saklanması	7
2.4.2. Spermanın Uzun Süreli Saklanması	8
2.5. Sperma Saklama Sürecinde Kontaminasyon Riskleri	9
2.6. Sperma Sulandırıcılarına Antibakteriyel Maddelerin Katılması	11
2.7. Serisin	12
2.7.1. İpek Bezinin Morfolojisi ve Serisinin Sentezi	14
2.7.2. İpek Proteinleri	16
2.7.2.1. Yapısı ve Genetiği	16
2.7.2.2. Serisin'in Biyokimyası	16
2.7.2.3. Serisinin Elde edilişi:	17
2.7.2.4. Serisinin özellikleri ve Biyomedikal Uygulamaları	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Gereç	26

3.1.1. Etik İzin ve Hayvan Materyali	26
3.1.2. Kimyasallar.....	26
3.2. Yöntem	27
3.2.1. Sperma Sulandırıcısı ve stok solüsyonu hazırlama	27
3.2.2. Deney 1.....	27
3.2.2.1. Spermanın toplanması ve işlenmesi	27
3.2.2.2. Birleştirilen örneklerin motilite açısından değerlendirilmesi	29
3.2.2.3. Çalışma Planı.....	29
3.2.2.4. Sperma Parametrelerinin Analizi.....	29
3.2.2.4.1. Motilitenin Değerlendirmesi	29
3.2.2.4.2. Membran Bütünlüğünün Belirlenmesi	30
3.2.2.4.3. Spermanın Canlılığının (ölü canlı oranının) Belirlenmesi	30
3.2.3. Deney 2.....	32
3.2.3.1. Spermanın Mikrobiyolojik Değerlendirme için Hazırlanması	32
3.2.3.2. Toplam Bakteri Sayısının Belirlenmesi.....	32
3.2.4. Deney 3.....	33
3.2.4.1. Toplam Bakteri Sayısının Belirlenmesi:.....	34
4. BULGULAR	36
4.1. Deney 1.....	36
4.1.1. Total Motilite Oranı.....	36
4.1.2. Membran Bütünlüğü Oranı.....	36
4.1.3. Ölü Spermatozoon Oranı	37
4.2. Deney 2.....	37
4.2.1. Toplam Bakteri Sayısının Oranı	38
4.3. Deney 3.....	39
5. TARTIŞMA.....	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	46
KAYNAKLAR.....	47
EKLER	69
BİLİMSEL ETİK BEYANI	70
ÖZ GEÇMİŞ.....	71

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
AgNP	: Gümüş Nanopartikülleri
ATB	: Antibiyotik
B. Mori	: Bombyx Mori
CASA	: Computer Assisted Sperm Analysis
CFU	: Koloni Oluşturan Birim
Cm	: Santimetre
G	: Gram
HADYEK	: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'
HOST	: Hipo- Osmotik Şişme Testi
kDa	: Kilodalton
kg	: Kilogram
mg	: Miligram
mM	: Milimolar
mOsm	: Miliosmol
OAT	: Oligoastenoteratozoospermi
OS	: Oksidatif Stres
°C	: Santigrat Derece
PBS	: Fosfat Tamponlu Silin
pH	: Power Of Hydrogen (Potansiyel Hidrojen)
PI	: Propidium Iodide
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
S	: Serisin
SPSS®	: Statistical Package for the Social Sciences
TBARS	: Tiyobarbütirik Asit Reaktif Madddeleri
TCG	: Tris Sitrik Asit Glikoz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. İpek kozası yapısı.....	13
Şekil 2. Serisin ve fibroinin görüntüsü	14
Şekil 3. İpek bezi bölümlerinin fotoğrafı.	15
Şekil 4. Serisinin kullanım alanları.	18
Şekil 5. Kontrol ve deney gruplarının oluşturulmasını gösteren şema.....	28
Şekil 6. Kontrol grubu ve swim up yapılan grup arasındaki bakteriyel üremenin frekansı.	39

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Suni Vajen.	28
Resim 2. Membranı sağlam ve membranı hasar görmüş spermatozoonlar.	30
Resim 3. Eosin- Nigrosin ile belirlenen ölü ve canlı spermatozoonlar.	31
Resim 4. Propidium Iodide boyası ile belirlenen ölü ve canlı spermatozoonlar.	31
Resim 5. Kontrol (a) ve Swim up (b) gruplarındaki bakteriyel kolonizasyon.....	35

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Deneylerde kullanılan TCG sulandırıcısının kompozisyonu.	27
Tablo 2. Gruplar arası total motilite oranları.	36
Tablo 3. Gruplar arası membran bütünlüğü oranları.	37
Tablo 4. Gruplar arası ölü spermatozoon oranları.	37
Tablo 5. 0. Saatte 10^{-3} sulandırmada kontrol, antibiyotik, serisin 0.1 ve serisin 0.5 gruplarında üreyen toplam bakteri sayısının logaritma 2 tabanındaki karşılıkları.	38
Tablo 6. 8. Saatte 10^{-3} sulandırmada kontrol, antibiyotik, serisin 0.1 ve serisin 0.5 gruplarında üreyen toplam bakteri sayısının logaritma 2 tabanındaki karşılıkları.	38
Tablo 7. 24. Saatte 10^{-3} sulandırmada kontrol, antibiyotik, serisin 0.1 ve serisin 0.5 gruplarında üreyen toplam bakteri sayısının logaritma 2 tabanındaki karşılıkları.	38
Tablo 8. Kontrol (Swim up yapılmayan) ve swim up yapılan gruplarda üreyen toplam bakteri sayısının logaritma 2 tabanındaki karşılıkları.	39

ÖZET

TAVŞAN SPERMASININ KISA SÜRELİ SAKLANMASINDA SERİSİNİN ANTİMİKROBİYAL ETKİSİ

Tuzlaloğlu G. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dölerme ve Suni Tohumlama Programı, Doktora Tezi, Aydın, 2025.

Amaç: Bu tez çalışmasında, tavşan spermasının kısa süreli saklanması karşılaşılan bakteriyel kontaminasyon sorununa karşı serisinin antimikrobiyal potansiyeli araştırılmıştır. Çalışmada, farklı konsantrasyonlarda serisin ilavesinin mikrobiyal yük ve spermatolojik parametreler üzerindeki etkileri incelenmiş; ayrıca seminal plazmanın bakteriyel üreme ile ilişkisi değerlendirilmiştir.

Gereç veYöntem: Çalışmada, genital muayene sonucunda herhangi bir patolojik bulguya rastlanmayan beş adet Yeni Zelanda ırkı albino erkek tavşandan, suni vajen yöntemiyle alınan sperma örnekleri kullanılmıştır. Birinci deneyde, kontrol grubu ile serisin uygulanan gruplar karşılaştırılarak serisinin sitotoksikite düzeyi analiz edilmiştir. İkinci deneyde ise, antibiyotik içeren ve içermeyen kontrol gruplarına ek olarak farklı dozlarda serisin içeren gruplar oluşturulmuş, sperma örnekleri +5°C’de Tris-sitrik asit-glikoz (TCG) sulandırıcısı içerisinde inkübe edilerek 0., 8. ve 24. saatlerde mikrobiyolojik ekimlerle bakteri üreme düzeyleri karşılaştırılmıştır. Üçüncü deneyde, spermadan seminal plazmanın uzaklaştırılması amacıyla swim-up tekniği kullanılmış, seminal plazmanın bakteriyel kontaminasyona katkısı değerlendirilmiştir.

Bulgular: Deney 1’de %0.1 ve %0.5 serisin ilavesinin sperm motilitesi, membran bütünlüğü ve canlılık üzerine anlamlı bir olumsuz etkisi bulunmamış; serisinin kısa süreli saklama koşullarında sitotoksik olmadığı belirlenmiştir ($P>0.05$). Deney 2’de serisin uygulanan gruplarda bakteri sayısında azalma görülmekle birlikte bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P>0.05$). Deney 3’te ise swim up yöntemi ile seminal plazmanın uzaklaştırılmasının bakteri üremesini anlamlı şekilde azalttığı saptanmıştır ($P<0.05$).

Sonuç: Elde edilen bulgular, serisinin antimikrobiyal etkisinin yanı sıra, uygun konsantrasyonlarda kullanıldığında sperm hücrelerine toksik etki göstermediğini ortaya koymuştur. Ayrıca, seminal plazmanın bakteriyel üreme üzerinde kayda değer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal etki, Serisin, Sitotoksik etki, Swim-up, Tavşan sperması.

ABSTRACT

THE ANTIBACTERIAL EFFECT OF SERICIN IN THE SHORT- TERM STORAGE OF RABBIT SPERM

**Tuzlaloğlu G. Aydın Adnan Menderes University Institute of Health Sciences,
Department of Reproduction and Artificial Insemination, PhD Thesis, Aydın, 2025.**

Objective: In this study, the antimicrobial potential of sericin was investigated as an alternative solution to the problem of bacterial contamination encountered during the short-term preservation of rabbit semen. Aiming to reduce dependence on conventional antibiotics, the effects of sericin added at various concentrations on microbial load were evaluated in experimental groups. Additionally, the potential cytotoxic effects of sericin on sperm parameters were examined.

Material and Methods: Semen samples were collected using the artificial vagina method from five New Zealand White male rabbits that were deemed genitally healthy. In the first experiment, the cytotoxicity level of sericin was analyzed by comparing control and sericin-treated groups. In the second experiment, in addition to control groups with and without antibiotics, groups containing different doses of sericin were formed. The semen samples were incubated at +5°C in Tris-citric acid-glucose (TCG) extender, and bacterial growth levels were compared at 0, 8, and 24 hours using microbiological culturing methods. In the third experiment, the swim-up technique was employed to remove seminal plasma from the semen samples, allowing for the assessment of its contribution to bacterial contamination.

Results: In Experiment 1, the addition of 0.1% and 0.5% sericin had no significant adverse effects on sperm motility, membrane integrity, or viability, indicating that sericin was not cytotoxic under short-term storage conditions ($P>0.05$). In Experiment 2, although a reduction in bacterial counts was observed in the sericin-treated groups, the difference was not statistically significant ($P>0.05$). In Experiment 3, however, the removal of seminal plasma by the swim-up method resulted in a significant reduction in bacterial growth ($P<0.05$).

Conclusion: The findings revealed that sericin possesses antimicrobial properties and, when used at appropriate concentrations, does not exert toxic effects on sperm cells. Moreover, seminal plasma was found to have a significant influence on bacterial growth.

Keywords: Antimicrobial activity, Cytotoxic effect, Rabbit semen, Sericin, Swim-up.

1. GİRİŞ

Suni tohumlama, en yaygın kullanılan yardımcı üreme tekniğidir . Bu nedenle evcil olan veya olmayan hayvanların ve nesli tükenmekte olan türlerin yetiştiricileri için büyük ilgi odağı haline gelmiştir. Bu en temel yapay üreme tekniği, doğal çiftleşmenin yarattığı fiziksel veya davranışsal engelleri ortadan kaldırır ve canlı hayvanların transferi olmadan popülasyonlar arasında genetik değişime araç olur. Suni tohumlamanın kabul görmesi dünya çapında büyük bir etki yaratıp sperma kryoprezervasyonu, östrus senkronizasyonu, embriyo toplanması, dondurulması ve transferi gibi işlemlerin de gelişmesini sağlamıştır. Suni tohumlama, seçilmiş bireylerin genetik materyalinin kontrolsüz çiftleşme yerine, belirli bir plan doğrultusunda kullanılmasını sağlar. Ayrıca, suni tohumlama sayesinde, istenmeyen genetik özelliklerin yayılması engellenebilir ve genetik çeşitlilik korunabilir. Bu yöntem aynı zamanda etik ve çevresel kaygıları da beraberinde getirmektedir. Dolayısıyla, suni tohumlamanın kapsamlı bir değerlendirmesi, hem ekonomik hem de toplumsal boyutlarıyla birlikte ele alınmalıdır.

Geçmişten beri birçok araştırmacı bu konularda çok sayıda araştırma yapmıştır. Fakat teknolojinin dolayısıyla da internetin olmadığı zamanlarda yapılan klasik çalışmalara ulaşmak, elektronik veya basılmış bir kaydı olmadığı için, pek mümkün değildir.

Suni tohumlamanın hayvan yetiştiricileri arasında önemli bir yere sahip olmasının birçok nedeni bulunmaktadır. Bunlardan bazıları; çiftleşme deneyimi olmayan genç hayvanların spermalarını kullanabilmek, spermayı sulandırarak daha çok hayvan dölleyip daha fazla gebelik elde edebilmek, östurusta bulunan bütün hayvanları östrus saatleri içerisinde istenilen herhangi bir zaman diliminde tohumlayabilmek, boyut ve ağırlık farkından dolayı çiftleşmede zorluk yaşayan dişi ve erkekleri kullanabilmek, veneral hastalığa sahip olan dişilerin erkek hayvanları enfekte etmesini engellemektir.

Suni tohumlama, hem büyükbaş hem de at, koyun, keçi, köpek, tavşan, kanatlı gibi hayvanlarda genetik olarak üstün canlı hayvanların genomunun hızla yayılması ve veneral hastalıkların önlenmesi için iyi bir tekniktir. Bir popülasyonda genlerin oluşturulması için, embriyo transfer teknolojisi veya doğal çiftleşme yerine daha ekonomik, basit ve başarılı bir yöntemdir (Vishwanath, 2003).

Sperma mikroskopta ilk kez 1674 yılında Nicolaas Hartsoeker ve van Leewenhoek tarafından incelenmiştir (Clarke, 2006). Suni tohumlama ise, ilk kez 18. yüzyılda İtalyan biyolog Lazzaro Spallanzani tarafından köpekler üzerinde yapılan deneylerle temelleri atılmış bir teknik olarak bilim dünyasına tanıtılmıştır (Lonergan, 2018). Daha sonra, 20. yüzyılın başlarında Ivanoff'un evcil hayvanlar ve kanatlılar üzerinde yaptığı çalışmalarla sistematik bir yöntem haline gelmiştir. Bu süreçte, özellikle genetik üstünlük taşıyan bireylerin spermatozoonlarının geniş bir coğrafyaya dağıtılmasını sağlamak amacıyla çeşitli teknikler geliştirilmiştir.

Suni tohumlama tavşanlarda koloni yönetimi için kullanışlı bir tekniktir. Tavşan yetiştirmede suni tohumlamanın uygulanması diğer türlerde olduğu gibi diğer pozitif etkilerinin yanı sıra genetik çeşitliliğe ve hızlı damızlık üretimine de olanak sağlamıştır.

Suni tohumlama uygulanmaya başlandığı yıllarda spermalar herhangi bir işleme tabii tutulmadan taze olarak kullanılmaktaydı. Fakat ilerleyen yıllarda suni tohumlamanın başarısında, spermanın toplanması ve saklanması sürecindeki teknik detayların kritik bir öneme sahip olduğu öngörülmüş ve bunun için çalışmalara başlanmıştır. Spermanın laboratuvar ortamında uygun koşullarda saklanması, hem taze hem de dondurulmuş formda kullanılmasına olanak tanımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tavşanlarda Üreme Biyolojisi

Tavşanlar, cinsel olgunluğa ulaşma süreleri bakımından, ait oldukları ırkın olgunlaşma ağırlığına bağlı olarak farklılık göstermekte olup, bu süreç genellikle 4 ile 7 ay arasında değişmektedir. Orta boyutlu ırklardan biri olan Yeni Zelanda albino tavşanları, yaklaşık 4 ile 6 ay içerisinde cinsel olgunluğa erişmektedir. Yaş ilerledikçe, dişilerin her doğumda dünyaya getirdiği yavru sayısında (Adams, 1970) ve erkeklerin sperma kalitesinde bireysel düzeyde azalmalar gözlemlenmektedir. Sütten kesilen erkek bireylerde çiftleşme davranışı sergilenmesine rağmen, epididimiste olgun spermatozoonların bulunması 4 aylık yaşa kadar gerçekleşmemektedir (Thetford ve diğerleri, 1992).

Dişi tavşanlarda düzenli östrus siklusları oluşmamakla birlikte, ovaryumlarda meydana gelen folliküler büyüme ve gerileme süreçleri, çiftleşme istekliliğinde dalgalanmalara neden olabilmektedir (Farrel ve diğerleri, 1968). Tavşanlar provoke ovulasyona sahip türler arasında yer almakta olup, ovulasyon genellikle çiftleşmeden 9 ile 13 saat sonra meydana gelmektedir. Bununla birlikte, bazı durumlarda ovulasyonun spontan olarak gerçekleştiği de rapor edilmiştir. Kedilerde ovulasyonun serviksin mekanik uyarımı sonucunda tetiklendiği bilinmekle birlikte, önceki yıllarda tavşanlarda bu mekanizmanın nasıl işlediği hakkında kesin bir bilgi bulunmamaktaydı. Ancak ilerleyen araştırmalar, tavşanlarda ovulasyonun çiftleşme sırasında ortaya çıkan nörohormonal refleks ile indüklendiğini ortaya koymuştur. Suni tohumlama uygulamalarında ise ovulasyon, hormon enjeksiyonları aracılığıyla tetiklenmektedir (Quintela ve diğerleri, 2004). Tavşanlarda ovulasyonun gerçekleşmesi için vajinal penetrasyonun gerekli olmadığı; hatta suni tohumlama sırasında yapılan vajinal uyarımın ovulasyonu indükmediği ve bu nedenle ovulasyonun gerçekleşmediği tespit edilmiştir (Staples, 1967).

Steril erkek tavşanlarla çiftleşen ya da spontan ovulasyon gösteren dişi tavşanlarda, yaklaşık 17 ile 19 gün süren yalancı gebelik vakaları gözlemlenmiştir (Lane-petfer, 1963). Tavşanlarda gebelik süresi 30 ile 33 gün arasında değişmekte olup (Hafez, 1970), üreme ömrü yaklaşık 4 yıl olarak belirlenmiştir (Carpenter ve diğerleri, 1995).

2.2. Tavşan Spermasının Özellikleri

Tavşan sperması olgun spermatozoonların yanında bazı fraksiyonlar (seminal plazma, damlacıklar, veziküller) da içermektedir. Bu fraksiyonlar çeşitli lipid kompozisyonlarına sahiptir. Spermatozoonlar fosfolipidlerin çoğunu içerirken, %49.8 oranında fosfolipidi seminal plazma, damlacıklar ve veziküller içermektedir. Spermada $811\mu\text{g}/10^9$ kolesterol bulunmaktadır, bunun da %21-23'ünü spermatozoonlar ihtiva etmektedir (Castellini ve diğerleri, 2006). Bu membran modifikasyonu canlı hücre sayısını etkilemese de tavşan spermatozoonlarının fonksiyonel özelliklerini etkilemektedir.

Spermatozoonlar farklılaşmış hücreler olduklarından dolayı kendilerine özgü bir lipid bileşimine sahiptirler.

Spermatozoonların epididimal olgunlaşma ve dişi üreme kanalından geçişleri sırasında lipid yapılarında ve membran akışkanlıklarında değişiklikler meydana gelir. Bu değişiklikler spermatozoonun zona pellucidaya penetrasyonunu ve yumurtayı dölmek için gerekli olan hiperaktivasyon, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunu sağlar.

Seminal plazmanın fizyolojik görevi erkek gametlerini dişi genital organlarına aktaran tampon bir sıvı gibi görev yapmak ve spermatozoon hareketini kolaylaştırmaktır. Seminal plazma türlere göre değişen bir hacme sahip olmakla birlikte, bütün türlerde spermatozoonlar için besin maddeleri sağlar ve hücrelerin yaşayabilmesi için uygun ortamı sağlar. Fruktöz ve sorbitol gibi spermatozoon tarafından direkt olarak kullanılabilen enerji kaynaklarını bünyesinde bulundurur. Spermatozoonların fonksiyonlarını modüle eder, spermanın olgunlaşmasında rol alarak dişi genital sisteminde kapasitasyon işlemlerinin ve gamet etkileşimlerinin kompleks basamaklarını yönlendirir. Seminal plazmanın dişi genital organında özellikle de provake ovulasyon yapan domuz, deve, tavşan gibi hayvanlarda ovulasyonun oluşumu ve pasif sperma transportunu da uyarıcı etkisi vardır.

Spermatozoon fonksiyon ve fertilizasyon yeteneğinde, seminal proteinlerin bireysel olarak veya türler arası farklılık göstermesi seminal plazmanın kompozisyonunda çeşitlilik meydana getirir. Erkek eklenti bezlerinin sayısının anatomik olarak farklılık göstermesi de fiziksel ve biyokimyasal farklılıklara neden olur.

Seminal plazmanın kompozisyonu; inorganik bileşikler, amino asitler, peptidler, düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı proteinlerden oluşur. Bu maddeler türler arasında, ejakülasyonlar arasındaki süre ve hayvanın sağlığına göre değişimler göstermektedir. Bundan

başka seminal plazmadaki doğal antioksidanlar ve diğer faydalı komponentler spermatozoonun fonksiyonları ve membran bütünlüğünün korunması için gerekli olan unsurlardır. Koç spermasında yapılan bir çalışmada seminal plazma uzaklaştırıldıktan sonra yüksek oranda sulandırılan spermatozoonun hızla öldüğü gözlemlenmiştir (Rossi ve diğerleri, 1997; Maxwell ve Johnson, 1999). Seminal plazma, spermatozoonun yaşama yeteneği ve motilitesini etkileyen çok çeşitli bileşenleri içeren karmaşık bir yapıdır. Sadece tür bazında değil, farklı fertiliteye sahip boğaların da seminal plazma proteinlerinin farklı olduğu saptanmıştır (Barrios ve diğerleri, 2000). Tavşan seminal plazması, sperm kapasitasyon sürecini engelleyen epididimal kaynaklı veziküller içerir (Ludeman ve Oliphant, 1978; Thomas ve diğerleri, 1986). İşlevi tam olarak açıklanmasa da Castellini ve diğerleri (2006) motilite, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu gibi farklı sperm fonksiyonlarını modüle eden farklı rollere sahip olabileceğini öne sürmüşlerdir. Bu veziküller ya da damlacıklar kolesterol açısından çok zengin olup muhtemelen spermatozoonları soğuk şokuna ve erken akrozom reaksiyonuna karşı korumak için sterol donörleri olarak kullanılmaktadır (Castellini ve diğerleri, 2006). Öte yandan, tavşanda kolesterol/fosfolipid oranının yüksek olması, tavşan spermatozoonlarının fertilizasyon yeteneği açısından önemlidir.

Kolesterol, fosfolipitlerin yağ zincirleri ile etkileşerek membranların akışkanlığını modüle eder ve kolesterol:fosfolipid oranı, membran akışkanlığının önemli bir belirleyicisidir (Watson, 1981; Sparr ve Aitken, 2002). Diğer evcil türlerin aksine, tavşan spermatozoon membranı 0.88:1.56 kolesterol:fosfolipid oranına sahiptir (Darin-Bennet ve White, 1977; Castellini ve diğerleri, 2006). Bu özellikler membrana daha akışkan bir yapı kazandırır (Darin-Bennet ve White, 1977), bu nedenle tavşan spermatozoonları soğuk şokuna karşı daha dirençlidir.

2.3. Tavşanlardan Sperma Alımı

Tavşanlarda sperma alımı için genellikle suni vajenler kullanılır. Bu pratik bir yöntemdir ve bu yöntemle alınan spermanın kalitesi, normal çiftleşmeyle elde edilen sperma kalitesinden çok farklı değildir.

Suni vajene ek olarak, erkeğin ejakulasyonunu gerçekleştirebilmesi için sperma alıcısının suni vajeni tuttuğu elinin üstüne koyacağı bir tavşan derisi veya dişi tavşan gerekmektedir.

Suni vajen yöntemi, doğal vajenin sıcaklık, basınç ve kayganlık özelliklerini üzerinde barındıran silindirik kauçuk boru ve içini saran lastik bir kılıftan oluşmaktadır. Bir valf aracılığı ile bu iki katman arasına konulan sıcak su ile sıcaklık, hava ile basınç ve steril bir kayganlaştırıcı veya vazelin ile kayganlık sağlanmaktadır

Hazırlanan suni vajenin sıcaklığını ölçmek için termometre kullanılmaktadır. Bunun sebebi suni vajenin fazla sıcak olması durumunda spermanın idrar ile karışmasını engellemektir (Hafez, 1970). Öte yandan sıcaklığın çok düşük olması da erkek tavşanın ejakülasyonu için yeterli olmayacaktır. Kullanılan kauçuğun giriş kısmına spermisidal olmayan kayganlaştırıcı sürülmesi gerekmektedir.

Sperma alıcısı dişi tavşanı veya tavşan derisini kolunun üstüne yerleştirmektedir. Sperma alma işlemi mutlaka erkek tavşanın kafesinde yapılmalıdır. Aksi takdirde kendi kafesinde farklı bir hayvan gören dişi, saldırgan davranışlarda bulunabilecek, farklı ortama aktarılan erkek tavşanın ise dikkati farklı şeylere kayabilecektir. Sperma alıcısına alışan deneyimli erkek tavşanlar böylelikle rahat bir şekilde sperma verecektir.

Bu şekilde doğal aşımaya teşvik edilen tavşanın penisi suni vajene yönlendirilerek ejakülasyonun gerçekleşmesi ve alınan spermanın suni vajenin ucundaki bir tüp içerisinde birikmesi sağlanmaktadır.

2.4. Spermanın Saklanması

Başarılı bir suni tohumlama için spermanın saklanması gerekmektedir. Sperma saklama, genetik çeşitliliği korumaktır. Buna ek olarak özellikle nesli tükenmekte olan türlerin genetik materyallerinin korunmasına ve gelecek nesillerde kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Sağlıklı hayvanların kontrollü bir şekilde üremeye devam etmesini sağlarken, hasta hayvanların elimine edilip diğer nesillere hastalık yaymasına engel olmaktadır. Ticari amaçla yapılan hayvancılıkta (örneğin küçükbaş ve büyükbaş hayvancılıkta) özellikle yüksek verim özelliklerine sahip hayvanların spermasının saklanıp kullanılması sürü bazında et ve süt veriminin artmasına yardımcı olmaktadır. Bunun yanı sıra bazı hayvanların kızgınlık zamanları mevsimsel olarak değişmektedir. Fakat bazı bölgelerde bazı hayvan türlerinde adaptasyonlar gerçekleşmiş ve üreme mevsimlerinin dışında da kızgınlıklar gözlemlenmiştir. Bu nedenle dişi ile çiftleşmek için ideal zamanı bekleyen erkek hayvanların spermaları belli işlemlerle saklanıp üreme mevsimi dışında da kullanılabilir.

Spermanın saklanmasıdaki temel yaklaşım spermatozoonların metabolizmasını yavaşlatmak suretiyle enerji kullanımlarını azaltmak ve böylece yaşam sürelerini uzatmaktır. Yapılan araştırmalar sonucunda spermanın saklanması için iki yöntem geliştirilmiştir. Bunlardan birincisi, spermanın sıvı şekilde kısa süreli, ikincisi ise spermanın dondurularak uzun süreli saklanmasıdır (Salamon ve Maxvell, 2000).

Spermanın işlenmesi sırasında şekillenen membran hasarları soğutma sıcaklığının özellikle 20 °C'den 5 °C'ye hızlı düşmesi sonucu soğuk şoku ve depolama sırasında spermatozoonların yaşlanmasına bağlı olarak meydana gelen değişikliklerden kaynaklanmaktadır (Paulenz ve diğerleri, 2002). Spermanın soğutulması sırasında sıcaklığın düşmesine bağlı olarak faz geçişi esnasında spermatozoonların plazma membranlarında yer alan lipidler fiziksel birtakım değişikliklere uğrayarak akışkan durumlarını yitirip, daha sert ve daha az akışkan bir hale gelirler (White, 1993). Soğutma sırasında spermatozoon membranlarında ortaya çıkan hasarların da lipidlerin yeniden düzenlenememesi veya normal dağılımlarını kazanamamaları neticesi oluşmaktadır (Buhr ve diğerleri, 1994).

Yapılan çalışmalar, spermanın kısa süreli veya uzun süreli saklanması için uygun sulandırıcıları ve prosedürleri bulma yönündedir.

2.4.1. Spermanın Kısa Süreli Saklanması

Spermanın kısa süreli saklama yöntemi erkek damızlıktan alınan spermanın birkaç gün içerisinde dondurulmadan kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Sperma alındıktan sonra gerekli makroskobik ve mikroskobik kontrolleri yapıp uygun bir sulandırıcı ile sulandırılarak genellikle 5 °C'de muhafaza edilebilmektedir. Ancak kısa süreli saklamalarda sulandırıcının kompozisyonu, sulandırma oranı, saklama ısısı ve şartlarıyla ilişkili olmaksızın, sadece saklama süresinin uzamasına bağlı olarak da spermatozoonlar zarar görebilmektedir. Saklama sırasında ortaya çıkan başlıca değişiklikler, spermatozoon motilitesinin azalması, morfolojik bütünlüğünün bozulması vb. olarak karşımıza çıkmaktadır (Aitken, 1988).

Spermanın kısa süreli saklanması sırasında hücreler lipid peroksidasyona maruz kalabilmektedir. Bunun sonucu olarak da spermatozoon motilitesi ve membran bütünlüğünde kayıplar, buna bağlı olarak da fertilité oranlarında düşmeler yaşanmaktadır (Salamon ve Maxvell, 2000). Bu olumsuz etkiler, spermanın saklanması öncesi sulandırıcılara bazı kimyasalların ilavesiyle dengelenmeye çalışılmaktadır (Bucak ve Tekin, 2007). Spermanın

soğutularak kısa süreli saklanması, dondurularak uzun süreli saklanmasından daha kolay ve ucuz bir yöntemdir.

2.4.2. Spermanın Uzun Süreli Saklanması

Sperma belirli işlemlere tabii tutulup dondurulduktan sonra -196 °C'de yıllarca saklanmaktadır. Dondurarak saklamada en önemli sorun, dondurulurken spermatozoonların hayatta kalma oranlarının düşmesidir (Di Iorio ve diğerleri, 2014).

Uzun süreli saklamada sulandırıcının kompozisyonu önemli bir role sahiptir. Bunun nedeni sulandırıcının spermatozoonların metabolik ihtiyaçlarını, ortamın PH'sını ve ozmotik basıncını sağlamasıdır. Dondurma ve soğutma işlemlerinde birçok sulandırıcı ve dondurma yöntemi denenmiştir.

Spermatozoonlar çoklu yağ asitlerinden zengin olduğu için oksidatif hasara karşı çok hassastırlar (Aitken ve diğerleri, 1988). Oksidatif stres spermatozoonun morfolojisine zarar vermektedir. Buna ek olarak mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna, buna bağlı olarak da spermatozoonun hareketliliğinin azalmasına ve akrozom reaksiyonunun gecikmesine veya öne alınmasına neden olmaktadır (Aitken ve Drevet, 2020).

Birçok çalışmada dondurma teknikleri, kriyoprotektanların türü ve konsantrasyonu ele alınarak tavşan spermasının kriyoprezervasyonunda sonuçların iyileştirilmesi amaçlanmıştır (Mocé ve Vicente, 2009; Nishijima ve diğerleri, 2021). Her ne kadar teknik açıdan iyileştirmeler yapılsa da farklı çalışmalarda gözlemlenen tutarsız ve değişken sonuçlar, köklü standart bir prosedürün bulunamadığını göstermiştir (Viudes- de- Castro ve Vicente, 2023; Kubovicova ve diğerleri, 2022).

Çalışmalarda çözüm sonu motilite ve canlılık için %10-60, progresif motilite için %15-35 gibi oranlar bulunmuş, bu dalgalanmalardan da uygulanan prosedürlerin tam oturmadığı kanıtlanmıştır (Mocé ve Vicente, 2009; Nishijima ve diğerleri, 2021; Viudes- de- Castro ve Vicente, 2023; Kubovicova ve diğerleri, 2022).

Spermanın dondurulması birçok hayvan türü için önemli kolaylıklar sağlamaktadır. Fakat boğa (Liu ve diğerleri, 1998), fare (Sztein ve diğerleri, 2000), domuz (Waterhouse ve diğerleri, 2006), kümes hayvanı (Long, 2006) ve tavşan (Mocé ve diğerleri, 2003) gibi çiftlik hayvanlarında spermatozoonların kriyohasarlara duyarlılıkları bireyler arasında farklılık göstermektedir. Bu farklı duyarlılıkların soğuk şokuna karşı verilen tepkiden kaynaklı olduğu

düşünülmeye reğmen bireyler arası meydana gelen bu değışik tepkilerin neden kaynaklandığı tam olarak bilinmemektedir. Boğa spermaları başarılı bir şekilde dondurulabilmiştir (Liu ve diğlerleri, 1998). Öte yandan uygun protokoller geliştirilmesine rağmen domuz (Rodriguez Martinez ve Wallgren, 2010) ve koç (Salamon ve Maxwell, 1995; Ollero ve diğlerleri, 1998) spermasında kriyohasar yoğun olarak gözlemlenmektedir.

Türler ve bireyler arasında spermatozoonlarda membran lipid kompozisyonları farklılık göstermektedir. Fakat bu durum boğa ve domuz gibi türler arası veya ırklar arası veya aynı ırktan olan farklı erkek hayvanlarda değışen çözüm sonu canlılık ve fertilitite yeteneğinde meydana gelen büyük farklılıkları açıklayabilmiş değıldir (Holt, 2000). Ayrıca dişi üreme sisteminde de türler arasında farklılıklar vardır ve başarılı bir dölleme için gerekli olan spermatozoon sayısındaki farklılıklar da donmuş spermanın dölleme yeteneğini belirlemektedir.

2.5. Sperma Saklama Sürecinde Kontaminasyon Riskleri

Suni tohumlamanın avantajlarından biri de veneral hastalıkların yayılmasını engellemektir. Her ne kadar bu teknikle dişi ve erkeklerin teması engellense de, herhangi bir patojene sahip erkek hayvanın spermasının tohumlamada kullanıp dişi hayvanı kontamine etmesi engellenememektedir (Foote, 2002). İyi koşullar sağlanmazsa spermanın özellikle toplanma ve kriyoprezervasyon işlemi sırasında kontamine olması kaçınılmaz olmaktadır (Zampieri ve diğlerleri, 2013). Bunlara ek olarak herhangi bir patojenin varlığında spermatozoonlar zarar görebilmekte (Mayer ve diğlerleri, 2001) ve bu durum sperma dondurma işlemi sırasında spermanın kalitesini olumsuz yönde etkileyebilmektedir.

Çeşitli memeli türleri arasında, spermanın hem soğutulması hem de dondurulması prosedürleri için kullanılan sulandırıcılara eklenen antimikrobiyallerin tiplerinde ve konsantrasyonlarında büyük farklılıklar vardır. Spermanın işlenmesi ve saklanması sırasında da kontaminasyon meydana gelebilmektedir. Bu durum sadece çevresel etkenlerden değıl spermaya direkt veya indirekt olarak temas edebilecek ekipmanlardan, sulandırıcıya katılacak olan sulandırıcılardan (özellikle yumurta sarısı gibi hayvansal kökenli katkı maddelerini ihtiva edenlerden) ve saklamak için kullanılan gereçlerden de kaynaklı olabilmektedir (Thibier ve Guerin, 2000). Sıvı azot, patojenleri güçlü bir şekilde dondurabilmektedir. Fakat bu durum sıvı azotu şüphelenilmeyen gizli bir kontaminasyon kaynağı yapabilmektedir. Bu yüzden çok

iyi bir şekilde payetlenmiş ve korunmuş spermanın saklanması sırasında bile dikkatli olunması gerektiği vurgulanmaktadır (Mazurova ve Krpatova, 1990).

Bazı erkek hayvanlarda herhangi bir hastalık bulunmamasına rağmen prepusyal florasında çeşitli mikroorganizmalar bulunabilmekte ve bu mikroorganizmalar ejakülasyon ve sperma toplanması sırasında spermayı kontamine edebilmektedir. Toplama ve/veya numune alma sırasında, spermanın aseptik olarak işlenmesine yönelik tüm gereksinimler karşılanırsa bile, ejakülatların mikrobiyal kontaminasyonu sıklıkla gözlemlenir (Bialenski, 2007). Son zamanlarda, androloji alanında ürogenital enfeksiyonların sperma kalitesi üzerindeki etkileri belirlenmeye çalışılmaktadır. Lökosperminin ve bakteriyosperminin erkek gametlerinin işlevi üzerine etkisi, buna bağlı olarak da ejakülatın kontaminasyonu ve ejakülatta meydana gelen bakteriyel kolonizasyonu tam açıklanamamıştır (Moretti ve diğerleri, 2009; Barraud-Lange ve diğerleri, 2011). Ürogenital enfeksiyonların çoğu asemptomatik seyretmektedir (Vilvanathan ve diğerleri, 2016). Ejakülatlarda bulunan bakterilerin tipi ve konsantrasyonu genellikle erkek üreme sistemindeki hücrelerden, bakterilerden ve onların yol açtığı hasarlardan kaynaklanmaktadır.

Bakteriyospermi spermada motilitede ani bir azalmaya yol açarak spermatozoonların adezyonuna ve aglütinasyonuna katkıda bulunur. Bakteriler, ortamdaki besinler için doğrudan rekabet ederek veya toksik metabolik ara ürünler veya endotoksinler üreterek spermatozoonlara zarar verebilmektedir (Wolff ve diğerleri, 1993; Monga ve Roberts, 1994).

Ejakülatlardaki oksidatif stres (OS) seviyesi, birkaç enfeksiyöz, kontamine edici veya kolonize edici bakteri türünün varlığı ile ilişkilendirilmiştir. Bakteriler, toksik metabolitleri ve virulent faktörleri aracılığıyla reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu uyarma yeteneğine de sahiptir (Wang ve diğerleri, 1997).

Daha önce de belirtildiği gibi mikropların sperma kalitesini etkilediği rapor edilmiştir. Bakteri varlığının morfolojik bozukluklara, akrozom ekzositozuna (Prieto-Martínez ve diğerleri, 2014), sperm aglütinasyonuna, sperm motilisinde ve membran bütünlüğünde azalmaya (Sepúlveda ve diğerleri, 2014), bu şekilde spermatozoon ömrünün azalmasına ve ortamın asiditesinin artmasına neden olabileceği kanıtlanmıştır (Althouse ve diğerleri, 2000).

Sperma kalitesini düşüren mikroorganizmalar ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Prieto-Martínez ve diğerleri, 2014). Kontamine olmuş sperma gebelik oranını azaltabilir, erken embriyonik ölüme ve/veya endometritise, istenmeyen patojenlerden

kaynaklı klinik hastalıklara ve/ veya enfeksiyonlara sebep olabilmektedir (Maes ve diğerleri, 2008).

Yirminci yüzyılın ortalarından beri, üreme biyoteknolojilerinde spermanın kalitesini arttırmak ve bakteriyel kontaminasyondan kaynaklı meydana gelebilecek hasarları azaltmak için sperma sulandırıcılarına antibiyotiklerin eklendiği rapor edilmiştir. Antibiyotikler (ATB'ler) genellikle bakteriyospermiye karşı spermatozoonları korumak için ilk tercih olan antibiyotikler için kullanılabilecek alternatif maddeler, antibiyotik direncinin ilerlemesini yavaşlatarak veya antibiyotiklerin erkek üreme hücrelerinin üzerindeki potansiyel toksik etkilerini azaltarak, depolanan spermatozoonların çözüm sonu kalitesini arttırabilir (Morrel ve Wallgren, 2014; Paulo ve diğerleri 2010).

2.6. Sperma Sulandırıcılarına Antibakteriyel Maddelerin Katılması

Memeli hayvanların sperma sulandırıcılarında özellikle bakteri hücre duvarı sentezini engelleyip, hücrenin lizisine ve ölümüne neden olan β - laktamlar (penisilin, sefalosporin) eklenmektedir (Spinosa ve diğerleri, 2006). Aminoglikozitler (gentamisin, streptomisin, amikasin), makrolidler (tylosin, spektinomisin) ve linkosamidler (linkomisin) bakteriyel protein sentezini inhibe etmektedirler (Spinosa ve diğerleri, 2006).

Öte yandan sperma soğutma veya dondurma işlemlerinde kullanılan sulandırıcılara eklenen antimikrobiyallerin tipi ve konsantrasyonları memeli türlerine göre değişmektedir. Örneğin sığır sperma teknolojisinde en çok kullanılanlar penisilin ve streptomisindir (Almqvist ve diğerleri, 1949). Arriola ve Foote (1982) at spermasında bulunan bakteri suşlarının penisilin ve streptomisine karşı dirençli olduğunu belirtmiştir. Buna ek olarak Polimiksin B (Jasko ve diğerleri, 1993) ve gentamisinin (Aurich ve Spergser, 2007) soğutulmuş at spermasının motilitesi üzerine negatif etkisinin olduğunu ispatlanmıştır (Vaillancourt ve diğerleri, 1993). Bundan farklı olarak Price ve diğerleri (2008) 15°C'de 96 saat saklanacak olan at spermasına küçük miktarda eklenen gentamisinin bakteriyel çoğalmayı azalttığı ve sperma motilitesi, hızı ve canlılığını, hiçbir antimikrobiyal ajan eklenmeyen kontrol grubuna göre geliştirdiğini rapor etmiştir.

Barbosa ve diğerleri (2010), köpek spermasının dondurulması sırasında 500 IU, 1000 IU ve 1500 IU/mL dozlarında penisilin izolatları kullanmış, fakat çözündürme sonucunda bakteriyel üremeyi engellemedikleri sonucuna varmışlardır. Bir diğer çalışmada ise Becher ve diğerleri (2013) köpek spermasında *Mycoplasma* sp. ve *Ureaplasma* sp. yayılmasını

engellemek ve mikrobiyal kontrolü sağlamak için birden çok antibiyotik kombinasyonunun kullanılmasının daha etkili olduğunu kanıtlamışlardır.

Yabani hayvanlardaki sperma saklama çalışmaları evcil hayvan çalışmalarına göre daha azdır. Johnson ve diğerleri (1998) penisilin ve gentamisin kombinasyonunun 16°C'de 24 saat tutulan koala spermasında, spermatozoonlara zarar vermeden bakteriyel üremeyi engellediğini savunmuştur.

Antimikrobiyallerin tipi ve konsantrasyonu, saklama süresi, depolama sıcaklığı, vb. değişkenler nedeniyle yapılan çalışmalar hala daha tam olarak standardize edilememiştir. Depolama sırasındaki sıcaklık da, bakteriyel yayılım için önem arz etmektedir. Örneğin atlarda (Price ve diğerleri, 2008) ve domuzlarda (Waberski ve diğerleri, 2019) hipotermik (5°C) saklama ısısının antimikrobiyal ilaçların daha az miktarda kullanımına neden olabileceği ispatlanmıştır.

Öte yandan bu maddelerin kullanımı da spermatozoonlara zarar verebilmektedir. Bu maddelerin sadece gelişigüzel kullanımı değil, küçük miktarlarda kullanımı bile bakteriyel direnç neden olabilmektedir (Morrell ve Wallgren, 2011). Bu nedenle kullanımlarını kısıtlamak gerekebilmektedir.

Resveratrol (Paulo ve diğerleri, 2010; Mojica- Villages ve diğerleri, 2014), quercetin (Wang ve diğerleri, 2017; Tvrdá ve diğerleri, 2016) ve curcumin (Tyagi ve diğerleri, 2015) 'in antibakteriyel etkilerinin olduğu daha önce gösterilmiştir. Antibiyotiklere alternatif olarak kullanılabilecek bir diğer madde ise serisindir.

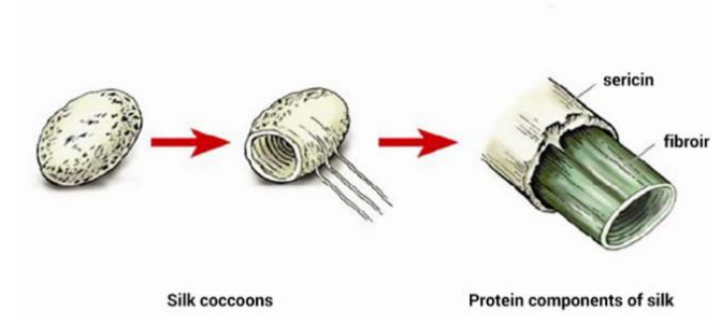
2.7. Serisin

Tarım ve tekstil sektöründeki uygulamalardan kaynaklanan ekonomik önemine ek olarak *Bombyx mori*, bilimsel araştırmalarda kullanılan ana lepidopterandır ve çok çeşitli biyolojik sorunları açıklığa kavuşturma kapasitesine sahip genetik bir kaynaktır (Mondal ve diğerleri, 2007). Son zamanlarda *B. mori*'nin kozası ve onun ana proteinleri olan fibroin ve serisinin, polimerler, biyomateryaller, kozmetik ve gıda endüstrisi alanında potansiyel kullanımı araştırma konusu olmuştur (Padol ve diğerleri, 2012; Joseph ve Raj, 2012).

Ticari ipek böcekçiliği, insanlar tarafından yapılan en eski tarımsal keşiflerden biri olarak kabul edilmektedir (Altman ve diğerleri, 2003). Tarihsel verilere bakıldığında ipek böcekçiliği 5000 yıl öncesinde Kuzey Çin'de başlamış, daha sonra doğu ve batıya yayılmıştır

(Nagaraju ve Goldsmith, 2002). Buna bağılı olarak da ticari ipekçilik, insanlık tarihindeki en eski tarımsal buluşlardan biri olarak kabul edilmektedir (Kunz ve diğlerleri, 2016). Ayrıca ipek ipliklerinin ticareti dışında birçok kültürde, geleneksel olarak doğal tedavi yöntemi olarak da uygulanmıştır (Ahsan ve diğlerleri, 2018). Uzun süre, ipekçilik alanında serisin dikkate alınmamıştır. Dünyada 400.000 ton kuru kozadan 50.000 ton serisin elde edildiğı tahmin edilmektedir (Gulrajani, 2005). Serisin çoğunlukla atık sularla atılmaktadır. Bu da, yüksek kimyasal ve biyolojik oksijen gereksinimine ve suyun kirlenmesine neden olmaktadır (Fabiani ve diğlerleri, 1996).

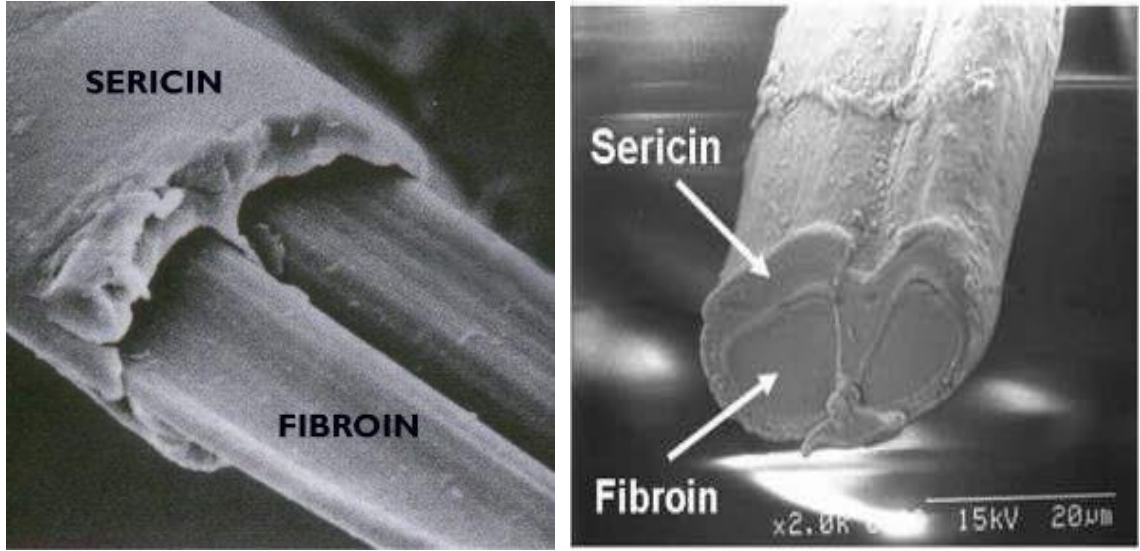
Tekstil endüstrisinde ipek kozası belirli işlemlere tabii tutulur ve serisinler, zambk giderme (degumming) adı verilen bir işlemle büyük ölçüde uzaklaştırılır. Fibroinler ise ham ipeğe dönüştürülerek birçok farklı türde iplik ve ipek kumaşın üretiminde kullanılır (Kundu ve diğlerleri, 2008; Padol ve diğlerleri, 2012).



Şekil 1. İpek kozası yapısı.

Serisin, *Bombyx mori* (*B. Mori*) adı verilen ipek böceğı tarafından üretilen bir proteindir. Yüksek miktarda serisin, fibroin ile birlikte bu böceğın beşinci larval döneminin sonunda üretilmektedir. Serisin ve fibroinin birlikte oluşturduğu bu ipek lifleri kozanın yapımında kullanılmakta ve ipek böceğine larval metamorfozdan yetişkin döneme kadar olan süreçte ideal şartları sağlamaktadır (Kundu ve diğlerleri, 2008).

Serisin, ipek ipliğini oluştururken iki fibroin lifini birleştirmek için yapıştırıcı görevi gören doğal bir polimerdir (Mondal ve diğlerleri, 2007). Bu molekül yüksek derecede hidrofiliktir ve moleküler ağırlığı 20 ile 400 kDa arasında değişmektedir. İçeriğinde esansiyel amino asitlerin de bulunduğu 18 amino asit vardır. (Aramwit ve diğlerleri, 2009; Kato ve diğlerleri, 1998; Wu ve diğlerleri, 2007).



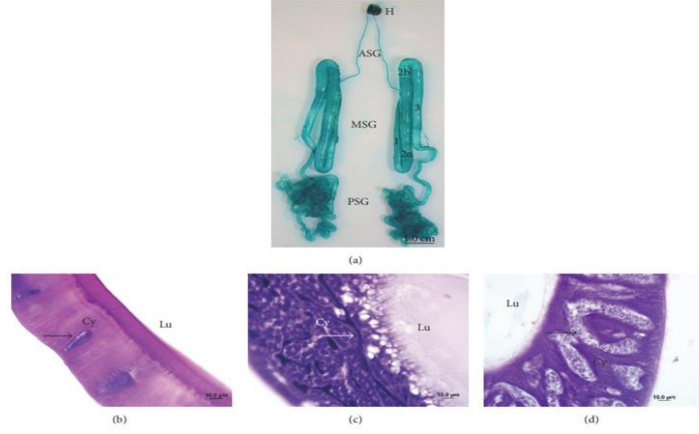
Şekil 2. Serisin ve fibroinin görüntüsü (Nagarajan ve diğerleri, 2017)

B. Mori'den ele edilen serisin yapısı, özellikleri ve biyouyumluluğu sayesinde sadece tekstil alanında değil, bilim ve sağlık alanlarında da kullanılmaktadır.

2.7.1. İpek Bezinin Morfolojisi ve Serisinin Sentezi

Serisin, *B. Mori*'nin labiyal bezlerinden sentezlenmektedir. İpek bezleri de denen bu tübüler bezler, sindirim yolunun lateroventralinde bulunup labiyal bölümden başlar ve uç kısma kadar devam eder. *B. Mori*'de bu bezler tam gelişmemiştir ve 1. Larval dönemden 4. Döneme kadar her bir dönemin sonunda az miktarda serisin sentezlenmektedir. Bu üretim, alt katmanda meydana gelen deri değişiminde, derinin onarılabilmesi için gereklidir. 5. Dönemde bezde hipertrofi, hücrelerin hacminde de bir artış meydana gelir. Yüksek miktarda ipek biyosentezi ve sekresyonuyla birlikte böceğin toplam ağırlığının %20-40'ı kadar bir ağırlık artışı görülür (Sehna ve Akai, 1990; Chapman, 1998; Dhawan ve Gopinathan, 2003).

İpek bezi tipik bir ekzokrin beze benzemektedir. Bu bez, morfolojik ve fonksiyonel farklılar göstermektedir. Bu nedenle 3 bölüme ayrılır. Ön bölüm salgılayıcı kanalı oluşturan 200 hücreden, orta bölüm 3 tip serisini salgılayan toplamı 7 cm uzunluğunda olan 300 hücreden, arka bölüm ise fibroini salgılayan 15 cm uzunluğunda 500 hücreden oluşmaktadır (Mondal ve diğerleri, 2007; Dhawan ve Gopinathan, 2003; Sorour ve diğerleri, 1990; Akai, 1983).



Şekil 3. İpek bezi bölümlerinin fotoğrafı. Ön- orta, (2a) arka- orta, (3) arka. Baş (H), (b), (c), (d) ön orta bölümlerinin farklı fotomikrografları. Sitoplazma (Cy), çekirdek (oklar), lumen (Lu).

Orta bölümün çeşitliliği nedeniyle arka bölge, serisinin fibroini saran iç katmanını salgılar. İç katmanı, daha az yoğunluktaki granüler bir yapı çevreler. Serisinin dış katmanı ise bir önceki alanda sentezlenir. Bu alan yağ kütlelerinin varlığından dolayı büyük hücrelerle karakterizedir (Akai, 1983).

İpek ipliğinde ipek bezlerinden gelen 3 yapılı serisin 2 tel fibroini çevrelemektedir (Sehna ve Akai, 1990). Çözünebilir ipek proteinlerinin, çözünmeyen ipek ipliğine dönüşüm mekanizması araştırılmıştır (Liu ve Zhang, 2014). Fibroin, glandüler lümene %15 protein yapıları bir solüsyonla salgılanır. Orta bölüme göç ettiğinde, serisinle sarılır. Kısacası fibroin, lifsel protein olarak ipeğin merkezini oluştururken, serisin, globüler protein olarak lifi sararak yapışkan bir tabaka oluşturur ve lifleri birbirine bağlar (Aramwit ve diğerleri, 2012).

Kozanın üretimi son 3 günde meydana gelir ve bu oluşum içten dışa doğru gerçekleşir. Serisin yapışkan bir özellik taşımaktadır. Koza, tek bir ipek ipliği olarak oluşur ve 900 metreden 1500 metreye kadar değişen boyut aralıkları vardır. Koza milyonlarca yıl kötü çevresel koşullar, kuşlar, böcekler ve bakteriler gibi biyolojik ajanlara karşı optimum koruma sağlamak için metamorfoz geçirmektedir. Kozanın %98' ini serisin ve fibroin meydana getirmektedir (Mondal ve diğerleri, 2007; Sehna ve Akai, 1990; Chapman, 1998; Chen ve diğerleri, 2012).

2.7.2. İpek Proteinleri

2.7.2.1. Yapısı ve Genetiği

Serisin ve fibroin 2 farklı proteindir. Fibroin, tek bir ipek lifinde fibril demetlerinin içinde mikrofibril olarak organize olur. Koza oluşum işlemi sırasında her bir ipek bezinden köken alan 2 lif, serisin katmanıyla çevrelenir ve ipek ipliğini oluşturur (Padamwar ve Pawar, 2004).

Serisin, serisin genlerinin meydana getirdiği glikoprotein ailesindendir. Kozanın ağırlığının %25-30' unu oluşturur (Sehna ve Akai, 1990; Michaille ve diğerleri, 1989).

Serisin sentezinden sorumlu Ser1, Ser2, Ser3 adında 3 gen vardır. Serisin sentezi Ser3 geni tarafından üretilir (Takasu ve diğerleri, 2007).

2.7.2.2. Serisin'in Biyokimyası

Serisin, fibroin filamentlerini bir arada tutan, protein çekirdeğinin etrafına konumlanmış (Altman ve diğerleri, 2003), yapıştırıcı özelliği bulunan tutkal benzeri bir proteindir (Padamwar ve Pawar, 2004).

Yapısal olarak, serisin rastgele sarmal ve β yapraklarından oluşan globüler bir proteindir. β yaprakları için rastgele sarmal yapısındaki değişiklikler, mekanik gerilme özelliklerine, nem emilimine ve sol-jel geçişinin gerçekleştiği sıcaklığa cevaben kolayca meydana gelir. Sıcak suda, 50–60 °C veya daha yüksek, protein çözünür hale gelir. Düşük sıcaklıklarda çözünürlük azalmakta ve rastgele sarmal yapısı beta yapraklarına dönüştürülerek bir jel oluşturmaktadır (Das, 2022; Zhu ve diğerleri, 1996).

Serisin, fibroin gibi, 18 amino asitten oluşur. Ayrıca, hidroksil, karboksil ve amino grupları gibi belirgin sayıda polar fonksiyonel gruba sahiptir, bu da çapraz bağlar oluşumunu, kopolimerizasyonu ve farklı polimerlerle birleşmeyi mümkün kılar (Rajput, 2015). Fibroinle aynı miktarda amino asit içermesine rağmen, serisin ağırlıklı olarak , arasında serin ve aspartic asitin de bulunduğu, polar amino asitlerden oluşur. Ayrıca, serisin, β -heliks veya rastgele sarmallar gibi çeşitli sekonder yapılara da sahiptir. Bu yapılar, gerilme kuvvetleri, hidrolitik bozunma ve/veya sıcaklık gibi faktörlere yanıt olarak şekil değiştirebilmektedir (Kunz ve diğerleri, 2016).

Organik bileşiminde %46.5 karbon, %31 oksijen, %16.5 azot ve %6 hidrojen vardır (Rajput ve Kumar, 2015). Biyokimyasal özellikleri serisine, biyouyumluluk, antibakteriyel aktivite, antioksidan ve nemlendirici biyolojik özellikleri de vermektedir (Aramwit ve diğerleri, 2012).

2.7.2.3. Serisinin Elde edilişi:

Serisinin ham ipekten uzaklaştırılması tamamen suda çözünürlüğüne bağlıdır (Padamwar ve Pawar, 2004). Serisin proteini *B. Mori*'nin kozasından elde edilebileceği gibi ipek bezinden de elde edilebilir. İpek imalatında geleneksel zamk giderme işlemi sırasında sabun ve deterjanlar kullanılmaktadır (Aramwit ve diğerleri, 2012). Fakat bu geleneksel yöntem, serisinde kısmi olarak hidrolize, doğal ağırlığının azalmasına ve bazı fonksiyonel özelliklerinin kaybına neden olabilmektedir (Freddi ve diğerleri, 2003).

Kozadan, amaca uygun olarak ve en iyi şekilde 4 yöntemle serisin elde edilebilmektedir. Bu yöntemler; Otoklav (yüksek sıcaklık ve yüksek basınç ile ilişkili olarak veya olmayarak), Asidik solüsyonlar (Sitrik asit solüsyonu), Alkali solüsyonlar (Sodyum karbonat solüsyonları) ve üre (Padamwar ve Pawar, 2004; Rajput ve Kumar, 2015) kullanılarak yapılmaktadır. Bu dört yöntemde de sıcaklık, zaman, kimyasal katkı maddeleri, solüsyonların konsantrasyonları değişkenlik gösterebilmektedir.

Kodama, yüksek sıcaklıkla (100 - 105°C) otoklavlanarak serisin elde edilirken, serisin molekülünde bazı değişiklikler meydana geldiğini rapor etmiştir (Kodama, 1926).

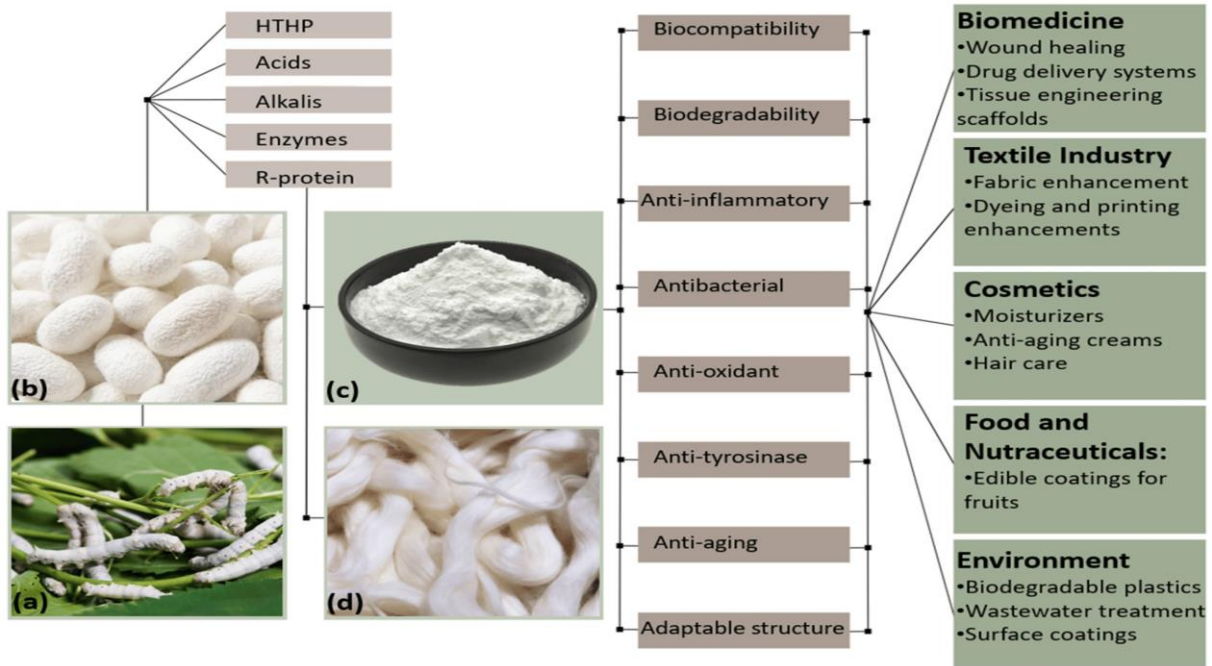
Aramwit ve diğerleri (2012) ise zamk giderme işleminin sıcaklık veya basınçla yapılmasının Ürün saflığı düşünüldüğünde avantajlı olacağını söylemiştir. Kurioka ve diğerleri (2004) asidik solüsyonla, alkali solüsyonla ve otoklavla elde edilen serisin tozunu morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre karşılaştırmış ve 3 yöntemle elde edilen tozun eşdeğer oldukları sonucuna varmıştır.

Sericin ekstraksiyonunun türü, kozanın çeşitliliği ve *B. Mori*'nin farklı suşları proteinlerin farklı büyüklüklere sahip olmasına ve buna bağlı olarak da amino asit kompozisyonlarında da değişikliklere neden olmaktadır. Amino asit kompozisyonunda meydana gelen bu farklılıklar biyolojik özellikleri etkilemektedir (Da Silva ve diğerleri, 2014).

2.7.2.4. Serisinin özellikleri ve Biyomedikal Uygulamaları

Serisinin fizyokimyasal özellikleri ve moleküler çeşitliliği, fonksiyonelliği üzerinde büyük öneme sahiptir. Bu durum da elde edilme yoluyla ilişkilidir

Serisinin biyoyumumluluğunu ve antioksidan potansiyelini kanıtlayan, hem in vivo hem de in vitro, çalışmalar yapılmıştır. Böylelikle serisinin neredeyse her alanda kullanılabilir güvenli bir madde olduğu görülmüştür.



Şekil 4. Serisinin kullanım alanları. HTHP (yüksek ısı yüksek basınç), Acids (Asitler), Alkalies (Alkaliler), Enzymes (Enzimler), R- protein.

Serisinin immunolojik etkisi:

Serisin bağışıklık sistemini aktive etmese de, fibroin liflerini kapladığı zaman, bakteriyel lipopolisakarite karşı güçlü bir makrofaj olarak yanıt vermektedir. Bu nedenle araştırmacılar, ipek liflerinin düşük inflamatuvar potansiyelini onaylayarak, biyomedikal uygulamalar için umut verici olduğunu savunmuştur (Panilaitis ve diğerleri, 2003).

Serisinin Antihiperlipidemik ve vücut yağı azaltıcı etkileri (kan lipid düzeylerini (yağlarını) düşürmeye ve vücutta biriken yağları azaltmaya yönelik etkinlikleri):

Serisinin, antihiperlipidemik ve vücut yağı azaltıcı etkileri vardır. Bu sayede obeziteye karşı potansiyel terapötik doğal bir protein olarak kullanılabilir. Yapılan bir araştırmada

serisin türevli oligopeptitlerin hem in vitro hem de in vivo olarak kolesterol düşürücü etkisi değerlendirilmesi sonucunda, bu doğal ürünün, toplam serum ve HDL dışı kolesterolü azaltırken, monolayer Caco-2 hücre hattındaki kolesterol alımını da düşürdüğü tespit edilmiştir (Lapphanichayakool ve diğerleri, 2017). Limpeanchob ve diğerleri (2010) benzer bulgular bildirmişlerdir .Öte yandan yapılan bir çalışmada yüksek yağlı diyetle obeziteye induklenen farelerde serisinin anti-obezite potansiyeli değerlendirilmiş, fakat serisinin obeziteden kaynaklı biyokimyasal ve biyometrik değişiklikleri tamamen geri döndüremediği, sadece 1000 mg/kg dışkıda lipid atılımını arttırdığı tespit edilmiştir(Kunz ve diğerleri, 2019).

Serisinin antioksidan etkisi:

Serisinin katmanlarında flavonoidler ve karotenoidlere benzeyen doğal pigmentler bulunur (Kurioka ve Yamazaki, 2002). Bu pigmentler, antioksidan ve antityrosinaz etkiye sahiptir. Serisin, senelerdir antioksidan olarak kabul edilmektedir. Serisin hidroksil, süperoksit ve DPPH serbest radikalleri üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir. Ayrıca linoleik asidin peroksidasyonu üzerindeki antioksidatif etkinliği de rapor edilmiştir (Fan ve diğerleri, 2009). Başka bir in vitro çalışmada ise, farklı ipek serisini hidrolizatları, kontrol grubuna kıyasla belirgin bir indirgeme gücü ve demir iyonu şelatlama yeteneği sergilemiştir (Fan ve diğerleri, 2010). Benzer şekilde, serisin, kedi fibroblast hücrelerinde hidrojen peroksit ile induklenen oksidatif strese karşı antioksidan etkiler göstermiştir. Bu etki, katalaz aktivitesinin azalması ve tiyobarbitürik asit reaktif maddelerinin (TBARS) düşüşü ile gözlemlenmiştir.

Aramwit ve diğerleri (2010) serisinin tek başına da yüksek antitirozinaz aktivitesinin olmasına rağmen, kozadan pigmentlerle elde edildiğinde daha yüksek bir aktiviteye sahip olduğunu kanıtlamıştır.

Li ve diğerleriadaşları (2008a; 2008b), fareler üzerinde yapılan bir araştırmada, alkolün karaciğerde ve midede meydana getirdiği zararlara karşı serisinin koruyucu bir etkisinin olduğunu saptamıştır. Deneyde kullanılan hayvanların idrarlarında yüksek alkol eliminasyonu ve kan serumlarında az miktarda alkol görülmüştür. Serisin sayesinde antioksidan enzim parametrelerinde bir değişiklik olmamış buna bağlı olarak da serisinin lipid peroksidasyonuna ve serbest radikallerin çoğalmasına karşı koruyucu etkisi olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca serisin, mide mukozasındaki hücre morfolojisini iyileştirmiş ve mitokondri bütünlüğünü korumuştur.

Serisinin antioksidan özelliğinin içerdiği polifenoller ve flavonoidlerden kaynaklı olduğu sonucuna varılmıştır.

Serisinin kozmetikte kullanımı:

Serisin, krem ve şampuan gibi kozmetik ürünlerin formülasyonunda kullanılmıştır. Böylece bu ürünlerde hidrasyon, elastikiyet sağlama, daha az tahrişle temizleme, yaşlanma önleyici ve kırışıklık karşıtı etkilerde artış meydana gelmiştir (Voegeli ve diğerleri, 1993; Singh ve diğerleri, 2011). Bu uygulamalar özellikle su emme kapasitesine sahip olan serin (% 30 ila 33) gibi hidrofilik yan grupları (% 80) olan amino asitlerin varlığından kaynaklanmaktadır. Serisin ayrıca cilt yüzeyinde yumuşak ve pürüzsüz bir film oluşturarak su kaybını önlemektedir (Patel ve Modasiya, 2011).

Kim ve diğerleri (Kim ve diğerleri, 2012) 10 hafta boyunca diyeteye eklenen % 1 serisinin epidermal hidrasyonda iyileşmeye neden olduğunu gözlemlemiştir.

Serisinin yara iyileşmesine etkisi:

Migrasyon, proliferasyon ve kollajen üretimini uyarma konusundaki yeteneği sayesinde, serisinin yaralarda iyileşmeyi sağladığı öne sürülmüştür (Aramwit ve Sangcakul, 2007; Aramwit ve diğerleri, 2009; Aramwit ve diğerleri, 2010). Aramwit ve diğerleri (2009) serisindeki amino asit metionininin, yara iyileşmesinde önemli bir yeri olan kollajen sentezindeki önemini ele almışlardır. Tsubouchi ve diğerleri serisinin yara iyileşmesindeki aktivitesinin, moleküler ağırlığına ve amino asit içeriğine bağlı olduğunu savunmuştur (Tsubouchi ve diğerleri, 2005).

Bir başka çalışmada serisinin yaralı alanda hücre göçü ve hücre çoğalması nedeniyle fibroblast popülasyonunu arttırdığı görülmüştür (Aramwit ve diğerleri, 2013).

Bazı araştırmacılar 30 kDa moleküler ağırlığına sahip serisini, tip 2 diyabetten kaynaklı korneal lezyonları olan hayvanlarda kullanmış, serisinin hasarlı bölge üzerinde etkisi olduğunu ve iyileşme sürecini hızlandığını kanıtlamıştır (Nagai ve diğerleri, 2009a; 2009b; Nagai ve Ito, 2013).

Serisinin antibakteriyel ve fizikokimyasal özelliklerini iyileştirmek amacıyla, çeşitli yöntemler, malzemeler ve formülasyonlar kullanılarak serisin bazlı kompozit ürünlerin tasarımı geniş çapta araştırılmıştır. Bu bağlamda, ipek serisin ve gümüş nanopartiküllerle (AgNP'ler) fonksiyonelleştirilmiş sodyum aljinat içeren yenilikçi bir yarı-penetran hibrit hidrojel üretilmiş ve yara tedavisinde uygulanmıştır. Hidrojel, 50 saat sonra fosfat tamponlu salin (PBS) tutma oranının %5'in üzerinde olduğu, %32 şişme oranı gösterdiği, etkili antibakteriyel aktivite sergilediği ve hayvan deneylerinde ameliyattan sonraki 12. günde yara büzülme oranının %99 olduğu gözlemlenmiştir (Tao ve diğerleri, 2021).

Başka bir çalışmada, emprenye yöntemiyle sentezlenen serisin/agaroz (50:50) jel yüklü lizozimin, kendine özgü özellikleri sayesinde yara iyileşmesini desteklediği bulunmuştur. Bu özellikler arasında mükemmel su tutma kapasitesi, *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerine karşı üstün antimikrobiyal aktivite ve normal hücreler üzerinde hiçbir toksisite göstermemesi yer almaktadır (Yang ve diğerleri, 2018).

Serisinin antitümöral etkisi:

Kanser hastalarında uygulanan kemoterapi işlemi hem sağlıklı hücrelere hem de neoplastik hücrelere etki ettiği için yüksek sitotoksositeye sahiptir (Cheok, 2012). Bu yüzden serisin gibi biyouyumluluğa ve düşük toksisiteye sahip olan yeni antitümöral ajanlar araştırma konusu olmuştur.

Yapılan bir çalışmada serisinle tedavi edilen hücreler, belirgin hücre canlılığı göstererek hücre zarının bütünlüğünü onarmış, serisinin kanser tedavisinde kullanılabilirliği vurgulamıştır (Jagtapb ve Khayed, 2016). Bir başka çalışmada ise serisinin oksidatif stres ve iltihaplanma yanıtlarını kontrol ederek cilt tümörlerine karşı koruyucu potansiyeli rapor edilmiştir (Zhaorigetu ve arjk, 2003).

Bazı araştırmacılar kolon tümörüne sahip hayvanların diyetine %30 oranında serisin katmıştır. 115 gün boyunca serisin tüketiminin vücut ağırlığı ve gıda tüketimi üzerine bir etkisinin olmadığı, kolonda bulunan adenomların etkisinde bir azalma olduğu görülmüştür (Zhaorigetu ve diğerleri, 2001). Sasaki ve diğerleri (2000) deney hayvanlarının diyetinde %3 serisini 5 hafta boyunca kullanmış ve benzer etkiler tespit etmiştir.

Zhaorigetu ve diğerleri (2001) da kolon kanseri olan hayvanlara 28 gün boyunca diyetlerinde %3 serisin vermiştir. Araştırmacılar serisinin sindirilemediğini bu nedenle de güçlü antioksidan etkiye sahip sindirilmemiş serisinin kolonda düşük oksidatif strese ve organda düşük tümör oluşumuna neden olduğunu saptamıştır.

Bir başka çalışmada ise deri tümörlerinde serisin 2.5 mg dozda topikal olarak uygulanmış ve uygulama yapılmayanlara göre tümör görünümünü 1 hafta geciktirdiği görülmüştür (Zhaorigetu ve diğerleri, 2003).

Serisinin metabolik etkileri:

- **Gastrointestinal sistemde:** Antioksidan potansiyeli ve hidrofilik özelliği dikkate alınarak, serisinin gastrointestinal sistemde kullanımı araştırılmıştır. Serisin kullanımı, çinko (% 41), demir (% 41), magnezyum (% 21) ve kalsiyum iyonlarının (% 17) emilimine neden olarak bu elementlerin biyoyararlanımını arttırmıştır. Fakat, bu elementlerin serum konsantrasyonunu ve idrarla atılımını değiştirmemiştir (Sasaki ve diğerleri, 2000a). Sindirilmemiş serisin sahip olduğu hidroksil ve karboksil grupları sayesinde gastrointestinal kanalda bu iyonların çözünmesini arttırmıştır (Sasaki ve diğerleri, 2000b).

Sasaki ve diğerleri (Sasaki ve diğerleri, 2000a) konstipasyona sahip hayvanların diyetlerine 14 gün boyunca %4 serisin katmıştır. Vücut ağırlığında ve gıda tüketiminde değişiklik yaratmayan bu durum, fekal su içeriğinin artmasına neden olmuştur.

Okazaki ve diğerleri (2011), serisinin yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanların bağırsak lümeni üzerindeki etkisini değerlendirmiştir. Sonuç olarak serisinin kolon kanseri ve ülseratif kolit oluşumunu azaltmada olumlu etkiler gösterdiği gözlemlenmiştir.

- **Dolaşım ve bağışıklık sisteminde:** Beslenmeyle kazanılan peptitler, fizyolojik fonksiyonları ayarlamak için önemlidir (Hong ve diğerleri, 2008). Onsa-ard ve diğerleri (2013), özellikle 5 kDa' nın altındaki oligopeptitlere sahip serisinin, doza bağlı olan geçici etkisinin arter duvarının düz kasının vazodilatasyonunu ve gevşemesini teşvik eden hipotansif bir potansiyele sahip olduğunu rapor etmiştir. Araştırmacılar, serisinin oligopeptitlerinin kalsiyum kanallarında bloke ederek kas gevşemesine yol açan antagonistik bir etkisinin olabileceğine inanmaktadır. Yapılan çalışmalar serisinin vasküler modulator olduğunu kanıtlamıştır.

Tamada ve diğerleri (2004) serisinin antikoagülan potansiyelini araştırmış ve yüksek moleküler kısımlarının yüksek antikoagulant aktiviteye sahip olduğunu bulmuştur. Serisinin bu aktivitesinin heparinden 1/10 ile 1/20 kat daha iyi olduğu tahmin edilmektedir.

- **Lipit metabolizması ve obezitede:** Okazaki ve diğerleri (2010) yüksek yağlı diyetlerle beslenen hayvanlarda serisinin lipit ve karbonhidrat metabolizması üzerine etkisini incelemiştir. 5 hafta boyunca diyetlerine %4 serisin ilave edilen hayvanların vücut ağırlığında, gıda tüketiminde ve vücut yağ indeksinde bir değişiklik olmamıştır. Fakat serumlarındaki kolesterol, trigliserit, serbest yağ asitleri, fosfolipit gibi parametrelerde azalma görülmüştür. Serisin, karaciğerdeki trigliseritleri ve lipojenik enzimleri azaltmış, serum adinopektinini %64 oranında arttırmış ve glukoz toleransını iyileştirmiştir.

Serisin ilavesi, yüksek yağlı diyetlerden kaynaklanan metabolik sendrom durumlarında yararlı bir role sahiptir (Li ve diğerleri, 2008).

Limpeanchob ve diğerleri (2010) serisinin bağırsaktaki kolesterol emilimini azalttığını rapor etmiştir.

Serisinin klinik açıdan bu kadar yararlı olmasının, içerdiği amino asitlerinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Ali ve Sarasa, 2011)

Serisinin hipoglisemi ve bununla ilişkili komplikasyonlara etkisi:

Song ve diğerleri (2015), serisinin testiküler büyüme hormonu/insülin benzeri büyüme faktörü-1 eksenini üzerindeki etkisini tip 2 diyabet sıçan modeli üzerinde incelemiş, sonuç olarak, serisinin spermatogenez performansını iyileştirdiği ve üreme sistemini diyabetin olumsuz etkilerine karşı koruduğunu gözlemlemişlerdir.

Song ve diğerleri (2013), diyabetis mellitusa sahip hayvanlara 35 gün boyunca oral olarak olarak serisin (2.4 g/ kg) vermiştir. Deneyin sonunda kandaki glikoz seviyesinin düştüğü görülmüştür.

Serisin sadece biyolojik bir ajan olarak değil aynı zamanda gıda endüstrisinde geleneksel olarak kullanılan plastik filmlerin de yerine kullanılabilecek bir maddedir (Teramoto ve diğerleri, 2008).

Serisinin kriyoprezervasyonda kullanımı:

Kriyoprezervasyon işlemine maruz kalan spermatozoonların dondurma ve çözülme ortamlarına antioksidanlar gibi farklı maddeler eklenerek iyileştirmeler amaçlanmıştır. Antioksidanlar, serbest radikalleri temizleyerek diğer moleküllerdeki oksidatif stresleri azaltma yeteneğine sahip moleküllerdir. Bu maddeler, spermatozoonların dondurma ve çözülme süreçlerinde oluşabilecek oksidatif stresten korunmasına yardımcı olarak, sperm kalitesini arttırabilmektedirler . Serisin, memeli ve böcek hücrelerine serbest radikal temizleme ve antioksidan aktivitesini sahip yeni bir alternatif olarak rapor edilmiştir (Sasaki ve diğerleri, 2005).

Deneyisel çalışmalar, serisinin lipid peroksidasyonunu baskılamak (Takahashi ve diğerleri, 2005; Kato ve diğerleri, 1998), hücre ölümünü engellemek (Takahashi ve diğerleri, 2003) ve çeşitli oksidatif strese karşı koruma sağlamak gibi faydalı etkilerini doğrulamıştır (Sasaki ve diğerleri, 2005). Ayrıca, serisinin birçok memeli hücresinde, insan hepatositleri (Miyamoto ve diğerleri, 2010) adacık hücreleri (Ohnishi ve diğerleri, 2012), yağ dokusu kök

hücreleri (Miyomoto ve diğerleri, 2012), sığır embriyosu (Isobe ve diğerleri, 2013) ve manda spermatozoonları (Kumar ve diğerleri, 2015) gibi hücrelerde kriyoprezervasyon başarısıyla kullanımı belgelenmiştir. Serisinin antioksidan kapasitesi, oosit (Aghaz ve diğerleri, 2016) ve embriyo (Aghaz ve diğerleri, 2016a; Aghaz ve diğerleri, 2016b) dahil olmak üzere birkaç diğer hücre tipinde de gösterilmiştir.

Yapılan bir çalışmada %5 serisinin, insan spermalarının dondurulup çözülmesi sırasında oluşan dondurma hasarlarını baskılayabileceği tespit edilmiştir. Ancak yine aynı çalışmada, serisin ilavelerinin düşük konsantrasyonlarında (%0.5 ve %1), sperm hareketliliği, canlılığı ve DNA fragmentasyon indeksi (DFI) açısından kontrol grubu ile anlamlı bir fark bulunmadığı ve mevcut sonuçlarla uyumlu olarak, Wu ve diğerleri 2007, serisin konsantrasyonu arttıkça serbest radikal temizleme aktivitesinin doza bağlı olarak arttığı rapor edilmiştir (Aghaz ve diğerleri, 2020).

Öte yandan Sasaki ve diğerleri (Sasaki ve diğerleri, 2005) sadece memeli hücreleri değil aynı zamanda böcek hücreleri için de %1 serisin ilave edilen ortamların kriyoprezervasyon için evrensel bir ortam olarak kullanılmasını önermektedir.

Bir diğer çalışmada ise Toyosawa ve diğerleri (2007) serisin bazı kriyoprezervasyon solüsyonlarının PBS içinde %0.5 maltoz, %0.3 glutamin, % 0.3 prolin ve %10 DMSO içeren sulandırıcıların diğer serum içermeyen sulandırıcılara oranla kriyoprezervasyondan sonra çözüm sonrası parametrelere bakıldığında daha iyi olduğunu bildirmiştir.

Isobe ve diğerleri (2013), dondurma ortamına serisin katılmış in vitro döllenmiş embriyoları başarıyla dondurmuşlardır.

Kumar ve diğerleri (2015), manda sperması sulandırıcısına %0.25- 0.5 serisin eklenmesinin dondurulup çözündürülmüş spermada spermatozoonların oksidatif strese dayanıklılığını artırarak sperm kalitesini arttırdığını göstermiştir. Ayrıca Ting- Tang Cao ve diğerleri (2017), serisinin hücre kültürü ve kriyoprezervasyon için serum yerine geçebilecek yeni bir katkı maddesi olarak kullanılabileceğini rapor etmiştir.

Tsujimoto ve diğerleri (2001), serisinin serin açısından zengin olduğunu bu yüzden yüksek kriyoprotektif bir etki gösterdiğini savunmuştur.

Serisinin antibakteriyel etkisi:

Bazı böcekler ve salgıları, geleneksel tıpta 2000 yılı aşkın süredir hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Son zamanlarda modern bilimsel çalışmalarda, böceklerden elde edilen bazı maddelerde antibakteriyel etkilerin de olduğu tespit edilmiştir. Böceklerden elde edilen çok sayıda madde ve bileşik, yeni ilaçların keşfi için önemli kaynaklar olarak incelenmiştir (Feng ve diğerleri, 2009). *Bombyx Mori* de salgılarından yararlanılan böceklerden biridir. Pandiarajan ve diğerleri (2011), kozanın dış katmanından elde edilen ekstraktın antibakteriyel etkisini araştırmış ve bu maddenin *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi mikroorganizmaların büyümesini engellediğini kanıtlamıştır. Jassim ve Al Saree (2010), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* gibi bazı patojen bakterileri izole etmiş ardından serisinin bu patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitesini test edip, serisin proteininin iyi antimikrobiyal özelliklere sahip olduğu sonucuna varmışlardır. Senakoon ve diğerleri (2009) ise, serisinin antibakteriyel aktivitesi olduğunu, gram negatif (*Escherichia coli*) ve gram pozitif (*Staphylococcus aureus*) bakteri modelleri üzerinde gözlemlemişlerdir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Etik İzin ve Hayvan Materyali

Sunulan tez çalışması Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (HADYEK) 24.08.2023 tarihli ve 64583101/2023/123 sayılı izin alınarak, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi.

Bu çalışmada sperma vericisi olarak fertilitesi bilinen, genital organlarında herhangi bir patolojik bulgu olmayan, reproduktif olgunluğa erişmiş, 2-5 yaşlı, 2.5-5 kg canlı ağırlıktaki toplam 5 adet sağlıklı Yeni Zelanda ırkı albino erkek tavşan kullanılmıştır.

Tavşanlar, doğal havalandırmalı bir ortamda, her biri ayrı ayrı 70x50x35 cm boyutlarında tel kafeslerde tutulmuştur. Deney süresince tüm tavşanlara standart gün ışığı (12-14 saat) sağlanmıştır. Ayrıca, oda sıcaklığı 16-28°C arasında sabit tutulmuş ve tavşanlara temiz su ve ticari yem ad libitum verilmiştir. Tavşanlar, dişi uyarıcı tavşanlar (teaser does) kullanılarak yapılan uygun sperma toplama eğitiminden sonra seçilmiş ve yalnızca yüksek kaliteli sperma üretenler bu araştırmada kullanılmıştır. Hayvanların bakım ve beslenmeleri Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları ünitesinde, laboratuvar çalışmaları ise yine aynı Fakülte'deki Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Deneylerin sonunda hiçbir hayvana ötenazi yapılmamıştır.

3.1.2. Kimyasallar

Bu çalışmada eozin, nigrosin, tris, sitrik asit, glikoz, fruktoz, Propidium iodide (PI) boyası ve serisin (Sigma, Aldrich, lot#S5201) kimyasal olarak kullanılmıştır. Deneysel amaçlar için kullanılan tüm kimyasallar, Sigma Aldrich (St. Louis, MO, ABD) Türkiye distribütöründen temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Sperma Sulandırıcısı ve stok solüsyonu hazırlama

Sperma sulandırmak için temel sulandırıcı olarak TCG (Tris, sitrik asit ve glikoz) hazırlanmıştır. Hazırlanan sulandırıcı 45mm por çapına sahip filtrelerden geçirilmiştir. Deney gruplarında kullanılacak olan serisin de TCG kullanılarak hazırlanmıştır. Ayrıca bir deney grubunda streptomisin ve penisilin- G kombinasyonu kullanılmıştır. Hazırlanan solüsyonların PH değeri 7.14 osmolariteleri ise 299 mOsm/kg olacak şekilde ayarlanmıştır (Boiti ve diğerleri, 2025). Deneylerde kullanılan sulandırıcılar ve solüsyonlar taze olarak hazırlanmış ve +4°C’de muhafaza edilmiştir.

Tablo 1. Deneylerde kullanılan TCG sulandırıcısının kompozisyonu.

Bileşenler	Konsantrasyonları
Tris	310 mM
Sitrik Asit	100 mM
Glikoz	80 mM
Antibiyotik	100 mg/100ml Streptomisin ve 10.000 IU /10ml Penisilin-G
PH	7.14
Ozmotik basınç	299

Bu çalışma ardışık 3 deney çerçevesinde yürütülmüştür. Bu deneylerden birincisi serisinin antimikrobiyal etkisini belirlemek için, ikincisi ise antimikrobiyal aktivitesi değerlendirilen serisinin spermatozoonlar üzerine sitotoksik etkisinin mevcut olup olmadığını, üçüncü deney ise tavşanlarda lipid damlacıklarından zengin seminal plazmanın bakteriyel üremeye etkisini belirlemek için yapılmıştır.

3.2.2. Deney 1

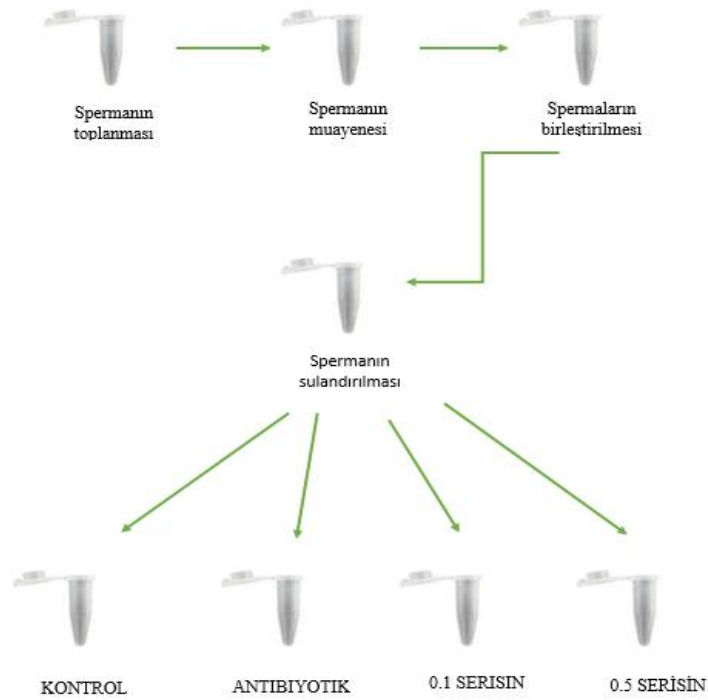
3.2.2.1. Spermanın toplanması ve işlenmesi

Bu işlem Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi bünyesindeki Deney Hayvanları Ünitesinde gerçekleştirilmiştir. Tekrarlama varyasyonunu azaltmak için yapılan her çalışma aynı saatlerde ve aynı kişiler tarafından yapılmıştır. Çalışmalar sırasında erkek hayvanlardan haftada iki kez sperma toplanmıştır. Sperma toplama işlemi uyarıcı bir dişi tavşanın varlığında, suni vajenle yapılmış olup, her hayvanda farklı vajenler kullanılmıştır.

Bunun amacı sperma toplama işlemi süresince ejakülatın herhangi mikrobiyal kontaminasyonunu engellemektir. Suni vajenin sıcaklığı 45°C'ye (düşük sıcaklıklarda hayvanlarda ejakülasyon gerçekleşmemesi, yüksek sıcaklık ise spermanın idrarla kontaminasyonuna neden olduğundan) ayarlanmış, gerekli kayganlık ve basınç sağlanmıştır. Alınan spermalar ependorflara aktarılarak 37°C su bulunduran termoslarla laboratuvara getirilmiştir. Toplama işleminden sonra erkek eklenti bezlerinden gelen jel ayrılıp, sperm makroskopik ve mikroskopik olarak incelenmiştir. Motilite muayenesi sonucunda %55 ve üzerinde motil olan sperma örnekleri birbiriyle birleştirilmiştir



Resim 1. Suni Vajen.



Şekil 5. Kontrol ve deney gruplarının oluşturulmasını gösteren şema.

3.2.2.2. Birleştirilen örneklerin motilite açısından değerlendirilmesi

Spermalar lam lamel arasına yerleştirilmiş, motilite, şekil ve oranları ısıtma tablalı bir mikroskopta ,10x objektifte, bilgisayar destekli sperm analiz cihazı (CASA) yardımı ile belirlenmiştir.

3.2.2.3. Çalışma Planı

Birleştirilen spermalar, TCG sulandırıcısı ile toplam hacmi yaklaşık 1 ml ve sperma yoğunluğu 50 milyon/ml ($50M\text{ ml}^{-1}$) olacak şekilde sulandırılmıştır.

Daha sonra sulandırılmış sperma 4 eşit gruba (250 μl) bölünmüştür:

- İlk ve ikinci grup kontrol grubu olarak bırakılmıştır.
- Diğer iki gruba ise sırasıyla %0.1 g/ml (2.5 μl) ve %0.5 g/ml (12.5 μl) oranından serisin eklenmiştir (%10 stok çözeltisi, 100 mg/ml).
- Hiçbir katkı maddesi içermeyen birinci grup inkube edilmeden incelenmiştir.
- Yine hiçbir katkı maddesi içermeyen ikinci grup ve %0.1 ve %0.5 oranında serisin içeren üçüncü ve dördüncü grup ise 2 saat 37°C'lik su banyosunda inkubasyona bırakıldıktan sonra incelenmeye alınmıştır.

3.2.2.4. Sperma Parametrelerinin Analizi

Deney süresi boyunca sperma parametreleri kaydedilmiştir. İncelenen parametreler: Hareketlilik (motilite), Canlılık (Ölü- Canlı spermatozoon oranı), Plazma membranının bütünlüğü (hipo-osmotik şişme testi, HOST)'dür.

Bu çalışma için her bir test en az beş tekrar edilmiştir.

3.2.2.4.1. Motilitenin Değerlendirmesi

Bütün grupların motilitesinin analizi için, ısısı ayarlanabilen bir tabla ve kamerayla donatılmış bir faz kontrast mikroskop (Olympus, CX41, Japonya) kullanılmıştır. Hücre motilitesi, şekil ve oranlarını belirlemek için CASA sisteminden (SCA® - Sperm Class Analyzer, Microptic S.L., Viladomat, Barselona, İspanya) yararlanılmıştır . Gruplara ayrılmış spermalardan mikropipet yardımı ile 3 μL örnek alınmış ve önceden ısıtılmış cam lam üzerine

damlatılıp bir lamel ($18 \times 18 \text{ mm}^2$) ile kapatılmıştır. CASA Sistemi, tavşan türüne özgü sperma büyüklük ve hareketlilik özelliklerine göre ayarlanmıştır. Analizler sırasında, lam üzerinde rastgele seçilen en az beş alan incelenmiş, en az 200 hücre sayılmıştır (her alanda $100 \text{ sperm}/\times 10$ büyütme). Bu örneklerin tamamının ortalama değerleri hesaplanmıştır.

3.2.2.4.2. Membran Bütünlüğünün Belirlenmesi

Bu amaçla HOS (Hypoosmotic Swelling) testi uygulanmıştır. Bu amaçla (Ducci ve diğerleri, 2002) tarafından belirtilen yöntemden yararlanılmıştır. Sperma örneklerinden $25 \mu\text{l}$ alınarak, 100 mOsm/l 'ye ayarlanmış $475 \mu\text{l}$ fruktoz solüsyonu içerisinde 15 dakika inkübe edilmesinden sonra preparatlar hazırlanmıştır. Hazırlanan preparatlardan toplam 200 hücre sayılmış, kuyruğu kıvrık hücreler membran bütünlüğü sağlam, kuyruğu düz hücreler ise membran bütünlüğü bozulmuş hücre olarak değerlendirilmiştir.



Resim 2. Membranı sağlam ve membranı hasar görmüş spermatozoonlar.

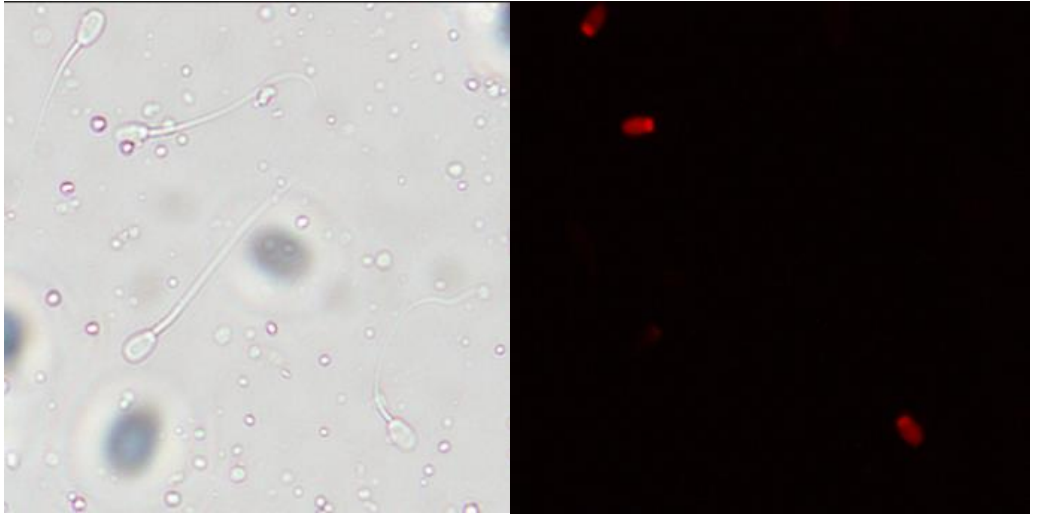
3.2.2.4.3. Spermanın Canlılığının (ölü canlı oranının) Belirlenmesi

Spermanın ölü canlı oranının belirlenmesi hem eosin- nigrosine (Ducci ve diğerleri, 2002) ile hem de Crissman ve Steinkamp (1973) tarafından tanımlanan PI (Propidium iodide) floresan boyası ile yapılmıştır. Eosin – nigrosinle boyama yapılırken bir lam üzerinde $3 \mu\text{l}$ sperma, $3 \mu\text{l}$ eosin- nigrosinle karıştırılmış ve farklı bir lama froti çekilip bakılmıştır.. Boya alan hücreler ölü, yarı boya alan ve hiç boya almayan hücreler ise canlı kabul edilmiştir. Bir

diğer boyama yöntemi olan PI boyama için ise karanlık bir odada 37°C’ deki 50 µl sulandırılmış sperma bir ependorfa alınıp, üzerine 2.5µl PI (200µg/ml) boyası konulmuş ve 5 dakikalık inkubasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda 5µl fiksatif ilave edilerek hücrelerin fikzasyonları sağlanmıştır. Solüsyondan alınan 2 µl fikze edilmiş ve floresan boya ile boyanmış numune, ölü-canlılık yönünden florasan ataçmanlı faz-kontrast mikroskop yardımıyla değerlendirilmiştir. Buna göre baş kısmı kırmızı renk alanlar ölü , baş kısmı kırmızı renk almayanlar ise, canlı olarak sınıflandırılmıştır. Hazırlanan preparatlardan en az 200 hücre sayılmıştır.



Resim 3. Eosin- Nigrosin ile belirlenen ölü ve canlı spermatozoonlar.



Resim 4. Propidium Iodide boyası ile belirlenen ölü ve canlı spermatozoonlar.

3.2.3. Deney 2

3.2.3.1. Spermanın Mikrobiyolojik Değerlendirme için Hazırlanması

Serisinin antimikrobiyal etkisini belirlemek için sperma toplama işleminden analizin sonucuna kadar olan süreçte kullanılacak bütün ekipmanlar (falcon tüp, ependorf, pipet ucu, mezür, beher, suni vajen, vb.) sterilize edilmiştir. Daha önce de belirtildiği gibi sperma toplama işlemi suni vajenle yapılmış olup, her hayvanda farklı steril, vajenler kullanılmıştır. Alınan spermalar steril ependorflara aktararak 37°C su bulunduran termoslarla laboratuvara getirilmiştir. Toplama işleminden sonra erkek eklenti bezlerinden gelen jel ayrılıp, sperma makroskopik ve mikroskopik olarak incelenmiştir. Motilite muayenesi sonucunda %55 ve üzerinde motil olan sperma örnekleri birbiriyle birleştirilip 1:14 oranında TCG ile sulandırıldıktan sonra biri kontrol grubu olmak üzere 4 eşit (3500µL) kısma ayrılarak birinci gruba hiçbir kimyasal madde ilavesi yapılmamıştır. 2. Gruba 14.5 µL antibiyotik kombinasyonu (100 mg/100ml Streptomisin ve 10.000 IU /10ml Penisilin-G) eklenirken, 3. ve 4. gruba 35 µL ve 175 µL serisin (%0.1g/ml ve %0.5 g/ml) ilaveleri yapılmıştır. Daha sonra +5°C’de inkübasyona bırakılan spermaların 0, 12. ve 24. saatlerinde yapılan ekimlerle, bakterilerin üreme oranlarına, üreme hızlarına ve koloni sayılarına bakılmıştır.

3.2.3.2. Toplam Bakteri Sayısının Belirlenmesi

Toplam bakteri sayısını belirlemek amacıyla yüzeye yayma yöntemi kullanılmıştır (Quinn ve diğerleri, 2011). Bu yöntem aşağıdaki adımlar izlenerek gerçekleştirilmiştir:

I. Agar Plaklarının Hazırlanması:

Steril petri kaplarına, bakteri gelişimini destekleyen uygun bir besiyeri (örneğin, Triptik Soy Agar (TSA)) dökülerek oda sıcaklığında katılaşması sağlanmıştır.

II. Aşamalı Seyreltme:

Numunenin doğru bir bakteri sayısı vermesi için seri seyreltmeler yapılmıştır (örneğin, 1:10, 1:100, 1:1000). Seyreltmeler, örneğin bakteriyel yoğunluğunun ölçülebilir seviyeye getirilmesi açısından kritik öneme sahiptir (Pelczar et al., 1993).

III. Örnek Ekimi:

Hazırlanan seyreltmelerden 0.1 mL’lik bir hacim steril pipet kullanılarak agar yüzeyine damlatılmıştır.

IV. Yayma İşlemi:

Steril bir cam yayma çubuğu yardımıyla sıvı, agar yüzeyine eşit şekilde yayılmıştır. Her kullanım öncesinde çubuğun sterilizasyonu, alkolde bekletilerek alevde yakılması ile sağlanmıştır. Bu işlem, çapraz kontaminasyonu önlemek için önemlidir (ISO 7218, 2007).

V. İnkübasyon:

Petri kapları, bakteri türünün ihtiyaç duyduğu sıcaklık ve süre boyunca (genellikle 37°C'de 24 saat) inkübe edilmiştir.

VI. Koloni Sayımı:

İnkübasyon sonrasında agar yüzeyinde oluşan koloniler sayılmıştır. Sayım sonucu, ilgili seyreltme faktörüne göre birim hacimdeki bakteri yoğunluğu CFU/mL (koloni oluşturan birim/mL) cinsinden hesaplanmıştır (APHA, 2012).

*Aralarında aşırı ve büyük farklar olan değerlerde geometrik ortalama alınmaktadır. Bu yüzden sonuçlar logaritma 2 tabanına göre hesaplanmıştır.

3.2.4. Deney 3

Swim Up tekniği: Tavşan seminal plazması, spermatozoonların dişi üreme kanalındaki davranışına etki edebilecek, lipid yapısında ve çeşitli büyüklüklerde partiküller içermektedir. Swim up tekniği sperma hücrelerini ayırmak için kullanılan standart yöntemlerden biridir. Bu teknikte, normal morfolojiye ve yüksek dölleme potansiyeline sahip önemli miktarda aktif spermatozoon hücresi diğer hücrelerden ve seminal plazmadan ayrılabilir (Paasch ve diğerleri, 2007). Bu deney tavşan sperması içerisinde bulunan seminal plazma kökenli lipid damlacıklarının swim up tekniğiyle ayrılmasının spermanın bakteriyel yükü üzerine olan etkisinin araştırılması için planlanmıştır.

Seminal plazmanın bakteriyel üremeye etkisini belirlemek için sperma toplama işleminden analizin sonucuna kadar olan süreçte kullanılacak bütün ekipmanlar (falcon tüp, ependorf, pipet ucu, mezür, beher, suni vajen, vb.) sterilize edilmiştir. Daha önce de belirtildiği gibi sperma toplama işlemi suni vajenle yapılmış olup, her hayvanda farklı steril, vajenler kullanılmıştır. Alınan spermalar steril ependorflara aktararak 37°C su bulunduran termoslarla laboratuvara getirilmiştir. Motilite muayenesi sonucunda %55 ve üzerinde motil olan spermalar birbiriyle karıştırılarak bir havuz oluşturulmuştur. Daha sonra 2 deney grubuna ayrılmıştır. Birinci grup için 45 derece olarak açıldırılmış 15 ml'lik falcon tüp içerisine 4 ml TCG sulandırıcısı konulmuş daha sonra tüpün dibine 500 µl sperma konulmuştur, öte yandan

ikinci grup için ise 15 ml'lik falcon tüp içerisine 500 µl sperma konulup üzerine kademeli olarak 4 ml TCG konulmuştur. 2 saatlik inkubasyon süresinden sonra ilk deney grubu için hazırlanan spermanın üstünden 250 µl, diğer deney grubu için hazırlanan spermanın homojenizasyon amaçlı pipetaj işleminden sonra içerisinden 250 µl sperma örneği alınıp ekimler yapılmıştır. Yukarıda deney 2'de de belirtildiği gibi ekimler şu adımlar izlenerek gerçekleştirilmiştir:

3.2.4.1. Toplam Bakteri Sayısının Belirlenmesi:

Toplam bakteri sayısını belirlemek amacıyla yüzeye yayma yöntemi kullanılmıştır (I. Agar Plaklarının Hazırlanması:

Steril petri kaplarına, bakteri gelişimini destekleyen uygun bir besiyeri (örneğin, Triptik Soy Agar (TSA)) dökülerek oda sıcaklığında katılaşması sağlanmıştır.

II. Aşamalı Seyreltme:

Numunenin doğru bir bakteri sayısı vermesi için seri seyreltmeler yapılmıştır (örneğin, 1:10, 1:100, 1:1000). Seyreltmeler, örneğin bakteriyel yoğunluğunun ölçülebilir seviyeye getirilmesi açısından kritik öneme sahiptir (Pelczar et al., 1993).

III. Örnek Ekimi:

Hazırlanan seyreltmelerden 0.1 mL'lik bir hacim steril pipet kullanılarak agar yüzeyine damlatılmıştır.

IV. Yayma İşlemi:

Steril bir cam yayma çubuğu yardımıyla sıvı, agar yüzeyine eşit şekilde yayılmıştır. Her kullanım öncesinde çubuğun sterilizasyonu, alkolde bekletilerek alevde yakılması ile sağlanmıştır. Bu işlem, çapraz kontaminasyonu önlemek için önemlidir (ISO 7218, 2007).

V. İnkübasyon:

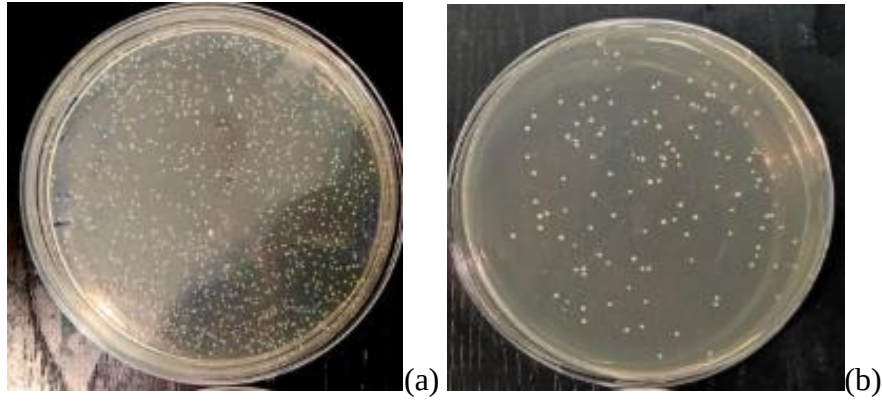
Petri kapları, bakteri türünün ihtiyaç duyduğu sıcaklık ve süre boyunca (genellikle 37°C'de 24 saat) inkübe edilmiştir.

VI. Koloni Sayımı:

İnkübasyon sonrasında agar yüzeyinde oluşan koloniler sayılmıştır. Sayım sonucu, ilgili seyreltme faktörüne göre birim hacimdeki bakteri yoğunluğu CFU/mL (koloni oluşturan birim/mL) cinsinden hesaplanmıştır (APHA, 2012).

Quinn et al., 2011). Bu yöntem aşağıdaki adımlar izlenerek gerçekleştirilmiştir:

*Aralarında aşırı ve büyük farklar olan değerlerde geometrik ortalama alınmaktadır. Bu yüzden sonuçlar logaritma 2 tabanına göre hesaplanmıştır.



Resim 5. Kontrol (a) ve Swim up (b) gruplarındaki bakteriyel kolonizasyon.

4. BULGULAR

4.1. Deney 1

Deney 1'in sonuçları, tavşan spermasının 37°C'de 2 saat inkübasyonu ile ilgilidir. 2 saatlik inkubasyon sonucunda sperma kalitesi parametreleri kontrol edilmiş ve sperma hareketliliği, canlılığı ve membran bütünlüğüne ait sonuçlar kaydedilmiştir. Bu deneyin temel amacı çalışmada kullanılan dozlardaki (%0.1 ve %0.5) serisinin tavşan spermatozoonları üzerine olabilecek toksik etkilerinin izlenmesidir.

4.1.1. Total Motilite Oranı

Kontrol grubu (hiçbir kimyasal madde eklenmemiş sulandırıcı ile sulandırılmış sperma) ile serisin gruplarının (sulandırılıp farklı dozlarda serisin ilave edilen sperma) sperm motilite özellikleri üzerindeki etkisi Tablo 2'te sunulmuştur. Sulandırma işleminden sonraki 2. saatte sperma total motilitesi açısından kontrol ve serisin grupları (%0.1 ve %0.5) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($P > 0.05$).

Tablo 2. Gruplar arası total motilite oranları.

	N	Mean %	%95 Güven aralığı alt-üst sınırlar
saat 0	9	60,0±4,01	50,7-69,2
kontrol	9	40,1±5,13	28,3-52,0
serisin 0,1	9	47,7±5,28	35,6-59,9
serisin 0,5	9	48,5±4,82	37,3-59,6
P	0,052		

4.1.2. Membran Bütünlüğü Oranı

İnkube edilen (2 saat) spermalarda membran bütünlüğü oranları kontrol ve serisin gruplarında sırasıyla 27,2± 3,26 , 27,2± 3,26 ve 26,7± 2,86 olarak bulunmuştur (Tablo 3). Kontrol ve serisin grupları arasında bu parametreler yönünden istatistiksel bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$).

Tablo 3. Gruplar arası membran bütünlüğü oranları.

	N	Mean %	%95 Güven aralığı alt-üst sınırlar
Saat 0	9	35,0±2,82	28,4 -41,5
Kontrol	9	27,2±3,26	19,7-34,8
Serisin 0.1	9	27,2±3,26	20,0-38,7
Serisin 0.5	9	26,7±2,86	20,1-33,3
P	0,288		

4.1.3. Ölü Spermatozoon Oranı

Kontrol grubu ile serisin gruplarının ölü spermatozoon oranları Tablo 6’da sunulmuştur. Sulandırma işleminden sonraki 2. saatte ölü spermatozoon oranları kontrol ve serisin gruplarında (%0.1 ve %0.5) sırasıyla 16,3± 1,47, 18,6± 1,30 ve 15,9± 1,35 olarak bulunmuş, kontrol ve serisin grupları arasında bu parametre yönünden anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($P > 0.05$) (Tablo 4).

Tablo 4. Gruplar arası ölü spermatozoon oranları.

	N	Mean	%95 Güven aralığı alt-üst sınırlar
Saat 0	9	13,6±1,50	10,2-17,1
Kontrol	9	16,3±1,47	12,9-19,7
Serisin 0.1	9	18,6±1,36	15-5-21,8
Serisin 0.5	9	15,9±1,35	12,8-19,0
P	0,125		

4.2. Deney 2

Deney 2'ye ait örneklerle ilişkin sonuçlar aşağıda sunulmuştur. Üç farklı zaman diliminde (0, 8 ve 24 saat) kontrol ve serisin gruplarına ait sperma örneklerine ekim yapılmış ve üreyen toplam bakteri sayılarına ait veriler kaydedilmiştir.

4.2.1. Toplam Bakteri Sayısının Oranı

0 (Tablo 5), 8 (Tablo 6) ve 24 (Tablo 7) saatlerde yapılan ekimler sonucunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir($P>0.05$).

Tablo 5. 0. Saatte 10^{-3} sulandırmada kontrol, antibiyotik, serisin 0.1 ve serisin 0.5 gruplarında üreyen toplam bakteri sayısının logaritma 2 tabanındaki karşılıkları.

	N	Mean	%95 Güven aralığı alt-üst sınırlar
Kontrol	13	6,4±0,48	5,5 -7,3
Antibiyotik	13	6,3±0,35	5,6-7,1
Serisin 0.1	13	6,3±0,65	4,9-7,8
Serisin 0.5	13	5,8±0,53	4,6-7,0
P	0,817		

Tablo 6. 8. Saatte 10^{-3} sulandırmada kontrol, antibiyotik, serisin 0.1 ve serisin 0.5 gruplarında üreyen toplam bakteri sayısının logaritma 2 tabanındaki karşılıkları.

	N	Mean	%95 Güven aralığı alt-üst sınırlar
Kontrol	13	6,2±0,56	4,9 -7,4
Antibiyotik	13	6,5±0,57	5,3-7,8
Serisin 0.1	13	7,0±0,26	6,4-7,6
Serisin 0.5	13	6,7±0,20	6,2-7,1
P	0,590		

Tablo 7. 24. Saatte 10^{-3} sulandırmada kontrol, antibiyotik, serisin 0.1 ve serisin 0.5 gruplarında üreyen toplam bakteri sayısının logaritma 2 tabanındaki karşılıkları.

	N	Mean	%95 Güven aralığı alt-üst sınırlar
Kontrol	13	6,2±0,53	5,0 -7,4
Antibiyotik	13	5,4±0,34	4,6-6,1
Serisin 0.1	13	5,5±0,39	4,7-6,4
Serisin 0.5	13	6,1±0,24	5,6-6,6
P	0,391		

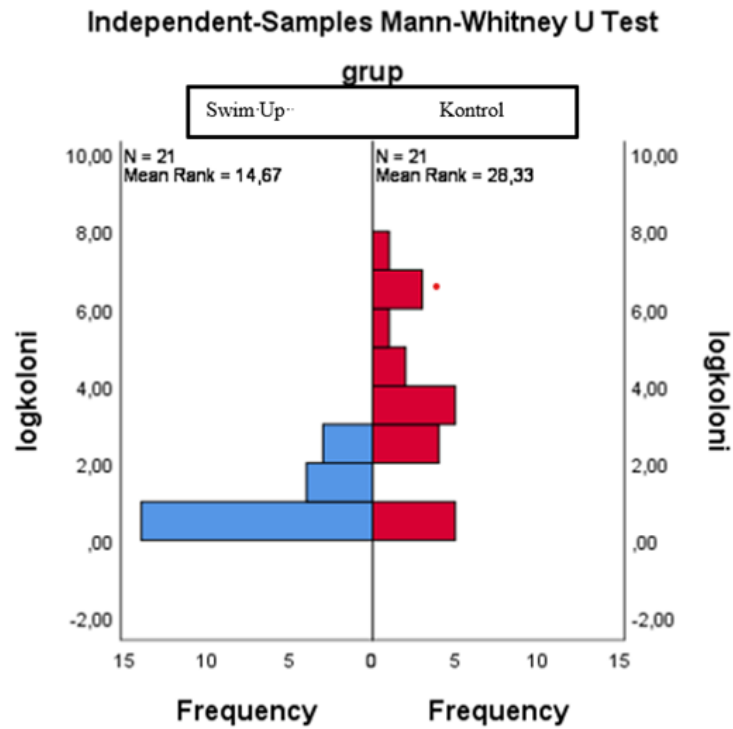
4.3. Deney 3

Deney 3'ün sonuçları, tavşan spermasına 37°C'de 2 saat süresince swim up uygulanarak seminal plazma ve içerisindeki partiküllerin çöktürülmesinin bakteriyel üremeye olan etkisi ile ilgilidir. 2 farklı gruba ait (swim up yapılan ve yapılmayan) sperma örneklerine ekim yapılmış ve üreyen toplam bakteri sayılarına ait veriler kaydedilmiştir (Şekil 6).

Kontrol ve swim up gruplarında gruplar karşılaştırıldığında, spermanın swim up tekniği kullanılarak seminal plazmadan filtre edilmesi sonucu bakteriyel üremenin kontrol grubuna göre daha az olduğu gözlemlenmiştir ($P>0.05$) (Tablo 8).

Tablo 8. Kontrol (Swim up yapılmayan) ve swim up yapılan gruplarda üreyen toplam bakteri sayısının logaritma 2 tabanındaki karşılıkları.

	N	Mean %	%95 Güven aralığı alt-üst sınırlar
Kontrol	21	5,9±0,69	4,48-7,37
Swim up	21	1,8±0,50	0,82-2,91
P	0,00		



Şekil 6. Kontrol grubu ve swim up yapılan grup arasındaki bakteriyel üremenin frekansı.

5. TARTIŞMA

Suni tohumlama yıllardır en çok kullanılan bir üreme biyoteknolojisidir. Suni tohumlamanın uygulanmaya başlandığı ilk yıllarda taze sperma kullanılmış olsa da daha sonra erkek hayvanlardan elde edilen spermaların sulandırılıp, saklanıp kullanılması yaygın hale gelmiştir. Hem kısa süreli hem de uzun süreli saklama sırasında sperma sulandırıcılarına belirli koruyucu maddeler eklenmektedir. Bunların amacı spermatozoonlara uygun bir ortam oluşturup yaşayabilirliklerini arttırmaktır. Suni tohumlamanın faydalarından biri de herhangi bir hastalığa sahip hayvanların üreme amacıyla birbirleriyle temasını, buna bağlı olarak da hastalıkların yayılmasını engellemesidir. Sperma örneklerinin ve hayvanların kullanılmadan önce ve sonra hastalıklar yönünden test edilmesi gerekir. Aksi halde suni tohumlama hastalıkların yayılmasına yol açan bir yöntem haline gelebilir.

Sperma kalitesini çevresel ve/ veya endojen faktörler etkileyebilmektedir. Bakteriyel kontaminasyon tohumlama yapılan dişilerde enfeksiyona ya da hastalıklara neden olmaktadır. Dişi üreme sistemi, doğal çiftleşmeyle gelen çoğu bakteriyi elimine edebilecek doğal savunma mekanizmasına sahiptir. Fakat suni tohumlama yapıldığında, sperma dişi üreme sisteminde fizyolojik olmayan bir yere (örneğin serviksin önüne) bırakılabilmektedir (Morrel ve Wallgren, 2014).

Bakteriyel kontaminasyon sadece tohumlanan dişileri değil erkek üreme hücrelerini de etkilemektedir. Bakteriler, sperma sulandırıcılarında bulunan besin maddeleri için spermatozoonlar ile doğrudan yarışarak veya toksik metabolik yan ürünler ve endotoksinler üreterek sperma kalitesini olumsuz yönde etkiler (Oghbaei ve diğerleri, 2020). Spermada bulunan herhangi bir bakteri popülasyonu, sperma canlılığında ve hareketliliğinde azalmaya yol açarken, erken akrozom reaksiyonuna ve spermatozoon aglunitasyonuna da sebep olur. Hijyen koşulları sağlansa bile sperma işleme sırasında bile kontaminasyon meydana gelebilmektedir (Althouse, 2008). Bu nedenlerden ötürü Avrupa mevzuatı (Avrupa Konseyi Direktifi EU-2019/ 6), mikrobiyal üremenin önüne geçmek için, suni tohumlamada kullanılacak spermalara belirli dozlarda antibiyotik katılmasını zorunlu kılmaktadır.

Genellikle bu maksatla kullanılan antibiyotik (ATB) dozları, terapötik dozlardan daha düşüktür. Ayrıca birden fazla antibiyotik kullanıldığında bile spermatozoonlar üzerinde toksik etki olmadan antibakteriyel etki sağlanabilmektedir (Gloria ve diğerleri, 2014). Fakat bu subterapötik dozlar bile hayvanlarda antimikrobiyal direnç neden olabilmektedir. Bu yüzden

ATB'lere alternatif maddeler ve/ veya çözümler aranmaktadır. Bunlar arasında sperma işleme sürecinde bakterilerin fiziksel olarak uzaklaştırılması ve antimikrobiyal etkiye sahip antibiyotik olmayan maddelerin kullanılması yer almaktadır. Yıllardır ATB'lere alternatif maddeler aranmaktadır. Örneğin nar suyu ekstraktının sperma saklama işlemi sırasında kullanılması bakterilere karşı antimikrobiyal etki gösterirken (Duman ve diğerleri, 2009), sperma parametreleri üzerinde de olumlu etki göstermektedir (El-Sheshtawy ve diğerleri, 2016). Bir diğer çalışmada zerdeçal ekstraktının *Staphylococcus aureus* üzerindeki etkisi incelenmiştir (Teow ve diğerleri, 2016). Merati ve Farshad (2020) ise zencefil ekstraktının dondurulup çözündürülmüş koç epididimal sperma kalitesini ve fertilitatesini arttırdığını gözlemlemiştir. Bunlardan farklı olarak Cojkic ve diğerleri (2023) sperma sulandırıcısına nar, zencefil ve zerdeçal eklenmesinin özellikle 24. saatten sonra motiliteyi olumsuz yönde etkilediğini rapor etmiştir. Bunlardan farklı olarak doğal bir ürün olan balın, güçlü antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu (Zoheir ve diğerleri, 2015) ve içerdiği glukoz ve fruktoz sayesinde spermatozoonlar için iyi bir enerji kaynağı olduğu öne sürülmüştür (Al-Waili, 2004).

Sperma sulandırıcılarına antibiyotikler yerine eklenebilecek bir diğer madde ise serisindir. Serisin; *B. Mori* adı verilen ipek böceğinin kozasından elde edilmektedir. İpek böceğinin metamorfoz süreci boyunca dış etkenlerden (yağmur, rüzgar, mantar, bakteri, böcek, vb.) ipek kozası korumaktadır. Buna bağlı olarak da ipek kozasını oluşturan ipliğin ana elementlerinden serisinin dış etkenlerle karşılaşan ilk katman olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada serisinin spermatozoonlar üzerindeki sitotoksik etkisine, spermadaki bakteriyel yüke etkisine ve seminal plazmanın bakteri koloni oluşumu üzerine etkisine bakılan 3 farklı deney yapılmıştır.

Deney 1:

Bu çalışmadaki ilk deneyde; serisinin farklı konsantrasyonlarının (%0.1 ve %0.5) tavşan spermatozoonları üzerindeki potansiyel sitotoksik etkileri incelenmiştir. Bu deneyler sonucunda elde edilen bulgular, farklı dozlarda kullanılan serisin konsantrasyonlarında spermatozoonların total motilite (%), membran bütünlüğü (%) ve canlılık oranları üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını göstermiştir ($P > 0.05$). Bu sonuçlara bakılarak, kısa süreli inkubasyona bırakılan serisin eklenmiş spermalarda bulunan spermatozoon hücrelerinde, toksik bir etki görülmediği ve serisinin güvenle kullanılabileceği sonucuna varılmaktadır.

Bu bulgular, literatürde yer alan ve serisinin hücrelerde biyouyumlu bir ajan olduğunu gösteren çalışmalarla paralellik göstermektedir. Örneğin Raza ve diğerleri (2024) sulandırıcılarına farklı dozlarda serisin eklenip 4°C ve 15 °C’de saklanan spermaların üç günlük süre boyunca progresif ve toplam motilitesini koruduğunu rapor etmiştir. Bir başka çalışmada ise Sasaki ve diğerleri (2005), kriyoprezervasyon ortamında serisinin serbest radikalleri temizleme özelliğine sahip olmasından dolayı memeli ve böcek hücrelerinde hücre canlılığını koruyabildiğini bildirmiştir. Buna benzer olarak; Reddy ve diğerleri’ları (2018) sperma sulandırıcısına %0.25 serisin ilavesinin, oksidatif hasarı azaltarak dondurup çözündürme sonrası sperma kalitesini arttırdığını savunmuştur. Benzer biçimde insan sperması dondururken sulandırıcılara %2.5 ve %5 oranında serisin eklenmesinin spermadaki total motiliteyi ve canlılığı artırırken DNA parçalanmasını azalttığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Aghaz ve diğerleri, 2020). Bunlara ek olarak Ting-Ting Cao ve diğerleri, serisinin hücre kültürü ve kriyoprezervasyon ortamları için potansiyel yeni bir katkı maddesi olabilecek niteliklere sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, Kumar ve diğerleri (2015) da serisinin spermatozoonlar üzerinde olumlu etki gösterdiğini bildirmiştir. Fakat bu çalışmalarla bizim çalışmamız arasında farklı olarak spermatolojik parametreler üzerinde serisinin olumlu bir etkisinin görülmemesinin tavşan sperm hücrelerinin kendine özgü fizyolojik ve plazma membran yapısıyla ilgili farklılıklardan kaynaklı olabilir. Bu bağlamda, tavşan spermasında, diğer türlerden farklı fizyolojik fonksiyonları ve farklı seminal plazma bileşimiyle kısa veya uzun süreli saklama işlemi için her zaman zor bir örnektir.

Sonuç olarak, Deney 1’de elde edilen bulgulara bakarak serisinin sperma işleme süreçlerinde biyolojik anlamda güvenli bir yardımcı madde olabileceği açık bir şekilde görülmektedir. Bu durum, serisinin antimikrobiyal etkisini araştırdığımız deney 2’de elde edilen sonuçların yorumlanması için temel teşkil etmektedir.

Deney 2:

Bu çalışmadaki ikinci deneyde ise; serisinin, herhangi bir kontaminasyon ve/ veya hastalık sonucu spermada meydana gelen bakteriyel üreme üzerindeki antibakteriyel etksi incelenmiştir. Farklı zamanlarda (0., 8. ve 24. saat) yapılan bakteri ekimi sonuçlarına göre, %0.1 ve %0.5 serisin içeren gruptaki koloni sayıları, antibiyotik içeren grupla benzerdir. Serisin uygulanan grupta koloni sayılarında sayısal bir azalma görülmesine rağmen, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Deney 1’in tartışma kısmında bahsedildiği gibi serisin, farklı özelliklerine dayandırılarak birçok sperma işleme çalışmasında kullanılmıştır. Fakat spermadaki antibakteriyel özelliğinin incelendiği hiçbir çalışma henüz

literatürde mevcut değildir. Bu çalışmada sulandırılmış sperma örneklerinde antibakteriyel etki göstermemiş olsa da farklı uygulama alanlarında yapılan çalışmalarda serisinin antibakteriyel etkisi gözlemlenmiştir. Örneğin; Gümüş nanoparçacıklarıyla (AgNP) modifiye edilmiş serisin/agar kompozit bir film hazırlayan Wang ve diğerleri'ları (2018) serisin içeren bu kompozit filmin *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerine karşı kuvvetli bir antibakteriyel etki gösterdiğini belirlemiştir. Buna benzer olarak, Nain ve diğerleri (2019) S-AgNP'lerin *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis* gibi antibiyotiklere dirençli mikroplara karşı güçlü antimikrobiyal etkinlik gösterdiğini rapor etmiştir. Farklı ipek kozalarından elde edilebilen serisinin, çeşitli patojenlere karşı (bakteri, mantar vs.) mükemmel bir antibakteriyel etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bu güçlü antibakteriyel aktivite nedeniyle Wang ve diğerleri (2020) serisinin yara iyileşmesi özelliğini de kapsayan tıbbi amaçlı kumaşlara eklenerek kullanılabileceğini ve bu ürünlerde koruyucu madde olarak yer alabileceğini öne sürmüştür. Senakoon ve diğerleri'ları (2009) ise yaptığı bir çalışmada gram negatif (*Escherichia coli*) ve gram pozitif (*Staphylococcus aureus*) bakteri suşlarına karşı serisinin antinbakteriyel etkisi olduğunu gözlemlemiştir. Bunlardan farklı olarak Rocha ve diğerleri (2017) ise serisinin hem antioksidan hem de antibakteriyel etkisinin göz önünde bulundurarak, gıda ve biyofarmasötik alanlarında da iyi bir katkı maddesi olabileceğini savunmaktadır. Bir başka çalışmada ise yara iyileşmesi için, serisin bazlı hidrojeller kullanılmış ve serisinin steril gazlı bezlere nazaran granülasyon dokusunun oluşumunu hızlandırdığı görülmüştür. Tüm bunların yanında aynı çalışmada serisinin *Escherichia coli* bakterisinin hücre zarı bütünlüğünü bozarak çoğalmasını engellediği de rapor edilmiştir. Bu bulgular ışığında serisinin gıda, tekstil, klinik tıp alanlarında uygulanabilirliği yüksek ve gelecek çalışmalar için umut vaat eden bir madde olabileceği düşünülmektedir (Xue ve diğerleri, 2016). Öte yandan Kaur ve diğerleri (2014) serisinin *Escherichia coli* üzerinde herhangi bir antibakteriyel etki göstermediğini savunmaktadır. Buna karşın Jassim ve Al-Saree (2010) ise çalışmalarında *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* bakterilerini izole etmiş ve serisinin bu bakterilerin gelişimini engellediğini gözlemiştir. Bundan dolayı ipek serisininin tıbbi uygulamalarda kullanılabileceğini tıbbi bandajlar, ağız gargaraları, antibakteriyel sabunlar ve diş macunları üretmenin mümkün olabileceğini belirtmiştir. Bunlara ek olarak Aprilia ve diğerleri (2022) serisinin özellikle *Staphylococcus aureus*'a karşı çok kuvvetli antimikrobiyal etki gösterdiğini rapor etmiştir.

Yukarıda da belirtildiği gibi sunulan çalışma bulgularına bakıldığında, serisin eklenen ve +4°C'de kısa süreli saklanan sperma örneklerinde bakteriyel üremede herhangi bir düşüş

olmadığı gözlemlenmiştir. Ortam koşulları (inkubasyon süresi, besiyeri, vb.), kullanım alanının farklılığı, serisinin saflık derecesi, serisinin kullanılan formu ve kullanım dozu, kullanılan materyalin farklılığı (tekstil, hayvan sperması, gıda, vs.) ve kontaminantın farklılığı bu çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmesine neden olabilir.

Deney 3:

Bu çalışmadaki 3. deneyde ise, diğer türlerden farklı olarak, tavşan spermasındaki seminal plazmada bulunan lipid damlacıklarının swim up yöntemi ile uzaklaştırılmasının bakteriyel yük ve üremeye etkisi incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda swim up uygulanan numunelerdeki bakteriyel üremenin kontrol grubuna kıyasla daha az olduğu gözlemlenmiş ve bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P < 0.05$).

Yapılan birçok çalışmada swim up yönteminin, normal morfolojiye ve yüksek dölleme kapasitesine sahip spermatozoonların ayrıştırılıp, seçilmesine olanak sağladığı rapor edilmiştir. Örneğin; Manna ve diğerleri (2020), yaptığı bir çalışmada OAT (Oligoastenoteratozoospermi) hastalarında, bu yöntem sayesinde elde edilen spermatozoonların , birbiri ardına toplanan 2 ejakülattaki spermatozoonlardan daha iyi DNA bütünlüğü, hareketlilik ve morfolojiye sahip spermatozoonlar sağlayabileceğini öne sürmüştür. Ayrıca swim up yöntemi uygulanan spermalarda, diğer fiziksel ayrıştırma metotlarına göre, DNA hasarının daha az ve progresif motilite oranının daha yüksek olduğu gözlemlenen çalışmalar bulunmaktadır (Amano ve diğerleri, 2023; Raad ve diğerleri; 2021). Handzhiyska ve diğerleri (2024) ve Charles ve diğerleri (2024) ise bu teknik kullanılarak elde edilen spermatozoonlarla IVF yapılmasının daha olumlu sonuçlar sağladığını belirtmiştir.

Yukarıda belirtilen tüm bu olumlu sonuçlara ek olarak swim up tekniğinin bakteriyel üremeyi azalttığını rapor eden çalışmalar da mevcuttur. Şöyle ki; Abeysundara ve diğerleri (2013) yaptığı bir çalışmada, gebelik oranında artışa veya azalmaya neden olmamasına rağmen, swim up gibi tekniklerin spermadaki bakterileri temizlemede etkili olduğunu öne sürmüştür. Ayrıca Henkel ve diğerleri (2003), bu tekniğin bakterilerin yanında lökositler ve virusler gibi sperma dışı bileşenlerin de elimine edilip yüksek kaliteli bir sperma elde edilmesi için uygun olduğunu vurgulamıştır. Buna ek olarak Nicholson ve diğerleri (2000), bu tekniğin diğer sperma filtrasyon tekniklerine göre bakteri eliminasyonunda daha etkili olduğunu belirtmiştir.

Bu deneydeki bulgulara bakılarak seminal plazmanın bakteriyel kontaminasyona yol açabilecek kaynaklardan biri olabileceği ve tavşan spermasında filtrayon amacıyla uygun olabileceği sonucuna varılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak; bu çalışmadaki 3 deneyin bulguları ortak olarak değerlendirildiğinde, serisinin tavşan sperması üzerinde sitotoksik bir etkisinin olmadığı, sperma işleme sürecinde, özellikle tavşan spermasının kısa süreli saklama koşullarında, antibakteriyel etkisinin sınırlı olabileceği sonucuna varılmıştır. Ortamın pH'sı, kontaminantın tipi, sıcaklık, serisinin elde ediliş yöntemi gibi etkenler bu sonuçları etkileyen en önemli faktörlerdendir. Özellikle swim up gibi filtrasyon tekniklerinin sperma işleme sürecinden önce uygulanmasının gerek antibakteriyel etkili ajanların gerekse sulandırıcılara eklenen diğer koruyucu maddelerin etkisini arttırabileceği düşünülmektedir. Serisinin farklı hayvan türlerinin spermalarıyla ve/veya farklı saklama şartlarında ve/veya başka doğal antimikrobiyal ajanlarla sinerjik etki sağlayabileceği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abey Bandara, P. K., Dissanayake, D. M. A. B., Wijesinghe, P. S., Perera, R. R. D. P. ve Nishad, A. A. N. (2013). Efficacy of two sperm preparation techniques in reducing non-specific bacterial species from human semen. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 6(2), 152-157.
- Adams, C. E. (1970). Ageing and reproduction in the female mammal with particular reference to the rabbit. *Journal of Reproduction and Fertility, Supplement Number 12*, 1–16.
- Aghaz, F., Hajarian, H. ve KaramiShabankareh, H. (2016). In vitro culture medium (IVC) supplementation with sericin improves developmental competence of ovine zygotes. *Reproductive Biology*, 16(1), 87-90.
- Aghaz, F., Hajarian, H. ve Shabankareh, H. K. (2016). Enhanced in vitro developmental competence of sheep embryos following sericin supplementation of the in vitro maturation and in vitro culture media. *Small Ruminant Research*, 136, 257-260.
- Aghaz, F., Khazaei, M., Vaisi-Raygani, A. ve Bakhtiyari, M. (2020). Cryoprotective effect of sericin supplementation in freezing and thawing media on the outcome of cryopreservation in human sperm. *The Aging Male*, 23(5), 469–476. doi.org/10.1080/13685538.2018.1529156
- Ahsan, F., Ansari, T. M., Usmani, S. ve Bagga, P. (2018). An insight on silk protein sericin: From processing to biomedical application. *Drug Research*, 68(6), 317–327. doi.org/10.1055/s-0043-121464
- Aitken, R. J. ve Clarkson, J. S. (1988). Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *Journal of Andrology*, 9(6), 367–376. doi.org/10.1002/j.1939-4640.1988.tb01067.x
- Aitken, R. J. ve Drevet, J. R. (2020). The importance of oxidative stress in determining the functionality of mammalian spermatozoa: A two-edged sword. *Antioxidants*, 9(2), 111. doi.org/10.3390/antiox9020111

- Akai, H. (1983). The physiology and biology of spinning in *Bombyx mori*. II. The structure and ultrastructure of the silk gland. *Experientia*, 39(5), 443–449. doi.org/10.1007/BF01965158
- Ali, M. M. ve Arumugam Sarasa, B. A. (2011). Effect of crude extract of *Bombyx mori* cocoons in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 2(2), 72–78.
- Almquist, J. O., Glantz, P. J. ve Shaffer, H. E. (1949). The effect of a combination of penicillin and streptomycin upon the livability and bacterial content of bovine semen. *Journal of Dairy Science*, 32(2), 183–190. doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(49)92025-1
- Althouse, G. C. (2008). Sanitary procedures for the production of extended semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(Supplement 2), 374–378. doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01187.x
- Althouse, G. C., Kuster, C. E., Clark, S. G. ve Weisiger, R. M. (2000). Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology*, 53(5), 1167-1176.
- Altman, G. H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R. L., Chen, J., ... Kaplan, D. L. (2003). Silk-based biomaterials. *Biomaterials*, 24(3), 401–416. doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00353-8
- Al-Waili, N. S. (2004). Investigating the antimicrobial activity of natural honey and its effects on the pathogenic bacterial infections of surgical wounds and conjunctiva. *Journal of medicinal food*, 7(2), 210-222.
- Amano, K., Oigawa, S., Ichizawa, K., Tokuda, Y., Unagami, M., Sekiguchi, M., Furui, M., Nakaoka, K., Ito, A., Hayashi, R., Tamaki, Y., Hayashi, Y., Fukuda, Y., Katagiri, Y., Nakata, M. ve Nagao, K. (2024). Swim-up method is superior to density gradient centrifugation for preserving sperm DNA integrity during sperm processing. *Reproductive Medicine and Biology*, 23(1), e12562. doi.org/10.1002/rmb2.12562
- American Public Health Association (APHA). (1926). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (Vol. 6). American public health association.

- Aprilia, L., Endrawati, Y. C. ve Arief, I. I. (2022). Antibacterial activity of *Bombyx mori* and *Samia cynthia ricini* sericin proteins against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Malaysian Journal of Microbiology*, 18, 547–554.
- Aramwit, P. ve Sangcakul, A. (2007). The effects of sericin cream on wound healing in rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(10), 2473–2477.
- Aramwit, P., Damrongsakkul, S., Kanokpanont, S. ve Srichana, T. (2010). Properties and antityrosinase activity of sericin from various extraction methods. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 55(2), 91–98. doi.org/10.1042/BA20090186
- Aramwit, P., Kanokpanont, S., De-Eknamkul, W., Kamei, K. ve Srichana, T. (2009). The effect of sericin with variable amino-acid content from different silk strains on the production of collagen and nitric oxide. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 20(9), 1295–1306.
- Aramwit, P., Kanokpanont, S., De-Eknamkul, W., Kamei, K. ve Srichana, T. (2009). The effect of sericin with variable amino-acid content from different silk strains on the production of collagen and nitric oxide. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 20(9), 1295–1306. doi.org/10.1163/156856209X453006
- Aramwit, P., Keongamaroon, O., Siritientong, T., Bang, N. ve Supasyndh, O. (2012). Sericin cream reduces pruritus in hemodialysis patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled experimental study. *BMC Nephrology*, 13, 1–11. doi.org/10.1186/1471-2369-13-119
- Aramwit, P., Palapinyo, S., Srichana, T., Chottanapund, S. ve Muangman, P. (2013). Silk sericin ameliorates wound healing and its clinical efficacy in burn wounds. *Archives of Dermatological Research*, 305(7), 585–594. doi.org/10.1007/s00403-013-1371-4
- Arriola, J. ve Foote, R. H. (1982). Effects of amikacin sulfate on the motility of stallion and bull spermatozoa at different temperatures and intervals of storage. *Journal of Animal Science*, 54(6), 1105–1110. doi.org/10.2527/jas1982.5461105x
- Aurich, C. ve Spergser, J. (2007). Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 67(5), 912–918. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.11.004

- Barbosa, C. D. C., Madeira, V. L. H., Jucá, R. P., Oliveira, Â. D., Uchoa, D. C., Pinheiro, A. D. Q. ve Silva, L. D. M. (2010). Different concentration of benzylpenicillin benzatin addition on cryopreserved canine semen using a powdered coconut water extender (ACP-106®). *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 11(1), 270–281. doi.org/10.1590/S1519-99402010000100030
- Barraud-Lange, V., Pont, J. C., Pocate, K., Kunstmann, J. M., Chalas-Boissonas, C., Ducot, B. ve Wolf, J. P. (2011). Seminal leukocytes and clinical outcomes with donor sperm insemination. *Fertility and Sterility*, 96(6), 1320–1324. doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.08.025
- Barrios, B., Pérez-Pé, R., Gallego, M., Tato, A., Osada, J., Muino-Blanco, T. ve Cebrián-Pérez, J. A. (2000). Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biology of Reproduction*, 63(5), 1531–1537. doi.org/10.1095/biolreprod63.5.1531
- Becher, A. C., Spergser, J., Aurich, C., Zottler, E., Aurich, J. E. ve Schäfer-Somi, S. (2013). Cooled storage of canine semen: In vitro effects of different concentrations of an antibiotic combination on growth of mollicutes. *Reproduction in Domestic Animals*, 48(6), 961–966. doi.org/10.1111/rda.12194
- Bielanski, A. (2007). Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. *Theriogenology*, 68(1), 1–22. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.03.025
- Boiti, C., Castellini, C., Besenfelder, U., Theau-Clément, M., Liguori, L., Renieri, T. ve Pizzi, F. (2025). Guidelines for handling of rabbit bucks and semen. *World Rabbit Science*, 13(2), 71–91.
- Bucak, M. N. ve Tekin, N. (2007). Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research*, 73(1–3), 103–108. doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.12.001
- Buhr, M. M., Curtis, E. F. ve Kakuda, N. S. (1994). Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology*, 31(3), 224–238. doi.org/10.1006/cryo.1994.1028

- Cao, T. T. ve Zhang, Y. Q. (2017). The potential of silk sericin protein as a serum substitute or an additive in cell culture and cryopreservation. *Amino Acids*, 49, 1029–1039. doi.org/10.1007/s00726-017-2396-3
- Carpenter, J. W., Mashima, T. Y., Gentz, E. J. ve Harrenstien, L. (1995). Caring for rabbits: An overview and formulary. *Veterinary Medicine*, 90(4), 340–364.4.
- Castellini, C., Cardinali, R., Dal Bosco, A., Minelli, A. ve Camici, O. (2006). Lipid composition of the main fractions of rabbit semen. *Theriogenology*, 65(4), 703–712. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.053
- Chapman, R. F. (1998). *The insects: Structure and function*. Cambridge University Press.
- Charles, D. K., Lange, M. J., Ortiz, N. M., Purcell, S. ve Smith, R. P. (2024). A narrative review of sperm selection technology for assisted reproduction techniques. *Translational Andrology and Urology*, 13(9), 2119–2133. doi.org/10.21037/tau-24-195
- Chen, F., Porter, D. ve Vollrath, F. (2012). Structure and physical properties of silkworm cocoons. *Journal of the Royal Society Interface*, 9(74), 2299–2308. doi.org/10.1098/rsif.2011.0887
- Cheok, C. F. (2012). Protecting normal cells from the cytotoxicity of chemotherapy. *Cell Cycle*, 11(12), 2227–2227. doi.org/10.4161/cc.20961
- Clarke, G. N. (2006). A.R.T. and history, 1678–1978. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 21(7), 1645–1650. doi.org/10.1093/humrep/del067
- Cojkic, A., Hansson, I., Johannisson, A. ve Morrell, J. M. (2023). Effect of some plant-based substances on microbial content and sperm quality parameters of bull semen. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3435. doi.org/10.3390/ijms24043435
- Crissman, H. A. (1973). *Cell preparation and staining for flow systems* (No. LA-UR-73-1614; CONF-731007-3). Los Alamos National Laboratory.
- Da Silva, T. L., Junior, A. D. S., Ribani, M., Vieira, M. G. A., Gimenes, M. L. ve Da Silva, M. G. (2014). Evaluation of molecular weight distribution of sericin in solutions concentrated via precipitation by ethanol and precipitation by freezing/thawing. *Chemical Engineering Transactions*, 38, 103–108. doi.org/10.3303/CET1438018

- Darin-Bennett, A. ve White, I. G. (1977). Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, 14(4), 466–470. doi.org/10.1016/0011-2240(77)90008-6
- Das, P. (2022). A review on physicochemical, structural and biomedical properties of silk worm sericin. *Current Trends in Pharmaceutical Research*, 8(2), 82–93.
- Dhawan, S. ve Gopinathan, K. P. (2003). Cell cycle events during the development of the silk glands in the mulberry silkworm *Bombyx mori*. *Development Genes and Evolution*, 213, 435–444. doi.org/10.1007/s00427-003-0343-7
- Di Iorio, M., Manchisi, A., Rocco, M., Chrenek, P. ve Iaffaldano, N. (2014). Comparison of different extenders on the preservability of rabbit semen stored at 5 °C for 72 hours. *Italian Journal of Animal Science*, 13(4), 3444. doi.org/10.4081/ijas.2014.3444
- Ducci, M., Gazzano, A., Villani, C., Cela, V., Artini, P. G., Martelli, F. ve Genazzani, A. R. (2002). Membrane integrity evaluation in rabbit spermatozoa. *European Journal of Obstetrics ve Gynecology and Reproductive Biology*, 102(1), 53–56. doi.org/10.1016/S0301-2115(01)00578-4
- Duman, A. D., Ozgen, M., Dayisoylu, K. S., Erbil, N. ve Durgac, C. (2009). Antimicrobial activity of six pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their relation to some of their pomological and phytonutrient characteristics. *Molecules*, 14(5), 1808–1817. doi.org/10.3390/molecules14051808
- El-Sheshtawy, R. I., Gamal, A. ve El-Nattat, W. S. (2016). Effects of pomegranate juice in Tris-based extender on cattle semen quality after chilling and cryopreservation. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(4), 335–339. doi.org/10.1016/j.apjr.2016.06.001
- EUR-Lex. (2019). Council Directive (EU) 2019/6. eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/LSU/?uri=CELEX:32019R0006
- Fabiani, C., Pizzichini, M., Spadoni, M. ve Zeddita, G. (1996). Treatment of waste water from silk degumming processes for protein recovery and water reuse. *Desalination*, 105(1–2), 1–9. doi.org/10.1016/0011-9164(96)00050-1
- Fan, J. B., Wu, L. P., Chen, L. S., Mao, X. Y. ve Ren, F. Z. (2009). Antioxidant activities of silk sericin from silkworm *Bombyx mori*. *Journal of Food Biochemistry*, 33(1), 74–88. doi.org/10.1111/j.1745-4514.2008.00204.x

- Fan, J. B., Zheng, L. H., Wang, F., Guo, H. Y., Lu, J. ve Ren, F. Z. (2010). Enzymatic hydrolysis of silk sericin by proteases and antioxidant activities of the hydrolysates. *Journal of Food Biochemistry*, 34(2), 382–398. doi.org/10.1111/j.1745-4514.2009.00286.x
- Farrell, G., Powers, D. ve Otani, T. (1968). Inhibition of ovulation in the rabbit: Seasonal variation and the effects of indoles. *Endocrinology*, 83(3), 599–603. doi.org/10.1210/endo-83-3-599
- Feng, Y., Zhao, M., He, Z., Chen, Z. ve Sun, L. (2009). Research and utilization of medicinal insects in China. *Entomological Research*, 39(5), 313–316. doi.org/10.1111/j.1748-5967.2009.00236.x
- Foote, R. H. (2002). The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of Animal Science*, 80(2), 1–10. doi.org/10.2527/animalsci2002.80E-Suppl_21a
- Freddi, G., Mossotti, R. ve Innocenti, R. (2003). Degumming of silk fabric with several proteases. *Journal of Biotechnology*, 106(1), 101–112. doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.09.006
- Gloria, A., Contri, A., Wegher, L., Vignola, G., Dellamaria, D. ve Carluccio, A. (2014). The effects of antibiotic additions to extenders on fresh and frozen-thawed bull semen. *Animal Reproduction Science*, 150(1–2), 15–23. doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.08.012
- Gulrajani, M. L. (2005). Sericin: A biomolecule of value. In *Souvenir 20th Congress of the International Sericultural Commission, Bangalore, India, 15–18 December 2005* (pp. 21–29).
- Hafez, E. S. (1970). Reproductive and breeding techniques for laboratory animals. *Lea and Febiger, Philadelphia, PA*.
- Handzhiyska, M., Ganeva, R., Parvanov, D., Ruseva, M., Eftimov, P., Georgieva, V., Velikova, D. ve Stamenov, G. (2024). Cumulus matrix selection leads to isolation of spermatozoa with better motility, morphology, and lower DNA fragmentation. *Reproduction ve Fertility*, 5(2), e230052. Advance online publication. doi.org/10.1530/RAF-23-0052

- Henkel, R. R. ve Schill, W. B. (2003). Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1, 108. doi.org/10.1186/1477-7827-1-108
- Holt, W. V. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53(1), 47–58. doi.org/10.1016/s0093-691x(99)00239-3
- Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Yongquan, W. ve Chi, L. (2008). The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs? *Peptides*, 29(6), 1062–1071. doi.org/10.1016/j.peptides.2008.02.005
- ISO 7218:2007. (2007). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations*. International Organization for Standardization.
- Isobe, T., Ikebata, Y., Onitsuka, T., Do, L. T. K., Sato, Y., Taniguchi, M. ve Otoi, T. (2013). Cryopreservation for bovine embryos in serum-free freezing medium containing silk protein sericin. *Cryobiology*, 67(2), 184–187. doi.org/ 10.1016/j.cryobiol.2013.06.010
- Jagtapb, S. G. ve Khyade, V. B. (2016). Effect of silk sericin from the cocoons of silk worm, *Antheraea mylitta* (L) and *Bombyx mori* (L) on hydrogen peroxide induced oxidative stress in feline fibroblasts. *American Journal of Engineering Research*, 5(11), 180–186.
- Jasko, D. J., Bedford, S. J., Cook, N. L., Mumford, E. L., Squires, E. L. ve Pickett, B. W. (1993). Effect of antibiotics on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 40(5), 885–893. doi.org/10.1016/0093-691X(93)90356-A
- Jassim, K. N. ve Al-Saree, O. J. (2010). Study of the antimicrobial activity of silk sericin from silkworm, *Bombyx mori* L. *Journal of Community Medicine ve Health Education*, 23(2), 130–133.
- Johnson, L. A., Aalbers, J. G., Willems, C. M. T., Rademaker, J. H. M. ve Rexroad Jr, C. E. (1982). Use of boar spermatozoa for artificial insemination III. Fecundity of boar spermatozoa stored in Beltsville liquid and Kiev extenders for three days at 18 °C. *Journal of Animal Science*, 54(1), 132–136. doi.org/10.2527/jas1982.541132x
- Joseph, B. ve Raj, S. J. (2012). Therapeutic applications and properties of silk proteins from *Bombyx mori*. *Frontiers in Life Science*, 6(3–4), 55–60. doi.org/10.1080/21553769.2012.760491

- Kato, N., Sato, S., Yamanaka, A., Yamada, H., Fuwa, N. ve Nomura, M. (1998). Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62(1), 145–147. doi.org/10.1271/bbb.62.145
- Kaur, J., Rajkhowa, R., Afrin, T., Tsuzuki, T. ve Wang, X. (2014). Facts and myths of antibacterial properties of silk. *Biopolymers*, 101(3), 237–245. doi.org/10.1002/bip.22323
- Kim, H., Lim, Y. J., Park, J. H. ve Cho, Y. (2012). Dietary silk protein, sericin, improves epidermal hydration with increased levels of filaggrins and free amino acids in NC/Nga mice. *British Journal of Nutrition*, 108(10), 1726–1735. doi.org/10.1017/S0007114511007306
- Kodama, K. (1926). The preparation and physico-chemical properties of sericin. *Biochemical Journal*, 20(6), 1208–1222. doi.org/10.1042/bj0201208
- Kubovicova, E., Makarevich, A. V., Balazi, A., Vasicek, J. ve Chrenek, P. (2022). Factors affecting rabbit sperm cryopreservation: A mini-review. *Zygote*, 30(1), 1–8. doi.org/10.1017/S0967199421000137
- Kumar, P., Kumar, D., Sikka, P. ve Singh, P. (2015). Sericin supplementation improves semen freezability of buffalo bulls by minimizing oxidative stress during cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 152, 26–31. doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.11.015
- Kundu, S. C., Dash, B. C., Dash, R. ve Kaplan, D. L. (2008). Natural protective glue protein, sericin bioengineered by silkworms: Potential for biomedical and biotechnological applications. *Progress in Polymer Science*, 33(10), 998–1012. doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2008.08.002
- Kunz, R. I., Brancalhão, R. M. C., Ribeiro, L. D. F. C. ve Natali, M. R. M. (2016). Silkworm sericin: Properties and biomedical applications. *BioMed Research International*, 2016, 8175701. doi.org/10.1155/2016/8175701
- Kunz, R. I., Capelassi, A. N., Alegre-Maller, A. C. P., Bonfleur, M. L., Ribeiro, L. D. F. C., Costa, R. M. ve Natali, M. R. M. (2019). Sericin as treatment of obesity: Morphophysiological effects in obese mice fed with high-fat diet. *Einstein (Sao Paulo)*, 18, eAO4876. doi.org/10.31744/einstein_journal/2020AO4876

- Kurioka, A. ve Yamazaki, M. (2002). Purification and identification of flavonoids from the yellow green cocoon shell (Sasamayu) of the silkworm, *Bombyx mori*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(6), 1396–1399. doi.org/10.1271/bbb.66.1396
- Kurioka, A., Kurioka, F. ve Yamazaki, M. (2004). Characterization of sericin powder prepared from citric acid-degraded sericin polypeptides of the silkworm, *Bombyx mori*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68(4), 774–780. doi.org/10.1271/bbb.68.774
- Lane-Petfer, W. (1963). *Animals for research: Principles of breeding and management*.
- Lapphanichayakool, P., Sutheerawattananonda, M. ve Limpeanchob, N. (2017). Hypocholesterolemic effect of sericin-derived oligopeptides in high-cholesterol fed rats. *Journal of Natural Medicines*, 71, 208–215. doi.org/10.1007/s11418-016-1050-9
- Li, Y. G., Ji, D. F., Chen, S. ve Hu, G. Y. (2008a). Protective effects of sericin protein on alcohol-mediated liver damage in mice. *Alcohol ve Alcoholism*, 43(3), 246–253. doi.org/10.1093/alcalc/agm164
- Li, Y. G., Ji, D. F., Lin, T. B., Zhong, S., Hu, G. Y. ve Chen, S. (2008b). Protective effect of sericin peptide against alcohol-induced gastric injury in mice. *Chinese Medical Journal*, 121(20), 2083–2087.
- Limpeanchob, N., Trisat, K., Duangjai, A., Tiyaboonchai, W., Pongcharoen, S. ve Sutheerawattananonda, M. (2010). Sericin reduces serum cholesterol in rats and cholesterol uptake into Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(23), 12519–12522. doi.org/10.1021/jf103157w
- Liu, X. ve Zhang, K. Q. (2014). Silk fiber—Molecular formation mechanism, structure-property relationship and advanced applications. *Oligomerization of Chemical and Biological Compounds*, 3, 69–102.
- Liu, Z., Foote, R. H. ve Brockett, C. C. (1998). Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. *Cryobiology*, 37(3), 219–230. doi.org/10.1006/cryo.1998.2117
- Lonergan, P. (2018). Review: Historical and futuristic developments in bovine semen technology. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, 12(s1), s4–s18. doi.org/10.1017/S175173111800071X

- Long, J. A. (2006). Avian semen cryopreservation: What are the biological challenges? *Poultry Science*, 85(2), 232–236. doi.org/10.1093/ps/85.2.232
- Ludeman A. ve Oliphant, G. (1978). Rabbit sperm reversible decapacitation by membrane stabilization with a highly purified glycoprotein from seminal plasma. *Biology of Reproduction*, 19(5), 1083–1094. doi.org/10.1095/biolreprod19.5.1083
- Maes, D., Nauwynck, H., Rijsselaere, T., Mateusen, B., Vyt, P., de Kruif, A. ve Van Soom, A. (2008). Diseases in swine transmitted by artificial insemination: An overview. *Theriogenology*, 70(8), 1337–1345. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.018
- Manna, C., Barbagallo, F., Manzo, R., Rahman, A., Francomano, D. ve Calogero, A. E. (2020). Sperm parameters before and after swim-up of a second ejaculate after a short period of abstinence. *Journal of Clinical Medicine*, 9(4), 1029. doi.org/10.3390/jcm9041029
- Maxwell, W. M. C. ve Johnson, L. A. (1999). Physiology of spermatozoa at high dilution rates: The influence of seminal plasma. *Theriogenology*, 52(8), 1353–1362. doi.org/10.1016/s0093-691x(99)00222-8
- Mayer, F., Weidner, W., Diemer, T., Huwe, P., Michelmann, H. W. ve Schiefer, H. G. (2001). Escherichia coli-induced alterations of human spermatozoa: An electron microscopy analysis. *International journal of Andrology*, 23(3), 178–186. doi.org/10.1046/j.1365-2605.2000.00224.x
- Mazurova, J. ve Krpatova, J. (1990). The risks of the cryopreservation of bull semen [Rizika kryokonzervace spermatu býků]. *Veterinarstvi*, 40(9), 402–404.
- Merati, Z. ve Farshad, A. (2020). Ginger and echinacea extracts improve the quality and fertility potential of frozen-thawed ram epididymal spermatozoa. *Cryobiology*, 92, 138–145. doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.12.003
- Michaille, J. J., Garel, A. ve Prudhomme, J. C. (1989). The expression of five middle silk gland specific genes is territorially regulated during the larval development of *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry*, 19(1), 19–27. doi.org/10.1016/0020-1790(89)90005-X

- Miyamoto, Y., Oishi, K., Yukawa, H., Noguchi, H., Sasaki, M., Iwata, H. ve Hayashi, S. (2012). Cryopreservation of human adipose tissue-derived stem/progenitor cells using the silk protein sericin. *Cell Transplantation*, 21(2–3), 617–622. doi.org/10.3727/096368911X605556
- Miyamoto, Y., Teramoto, N., Hayashi, S. ve Enosawa, S. (2010). An improvement in the attaching capability of cryopreserved human hepatocytes by a proteinaceous high molecule, sericin, in the serum-free solution. *Cell Transplantation*, 19(6–7), 701–706. doi.org/10.3727/096368910X508799
- Mocé, E. ve Vicente, J. S. (2009). Rabbit sperm cryopreservation: A review. *Animal Reproduction Science*, 110(1–2), 1–24. doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.08.015
- Mocé, E., Vicente, J. S. ve Lavara, R. (2003). Effect of freezing–thawing protocols on the performance of semen from three rabbit lines after artificial insemination. *Theriogenology*, 60(1), 115–123. doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01329-8
- Mojica-Villegas, M. A., Izquierdo-Vega, J. A., Chamorro-Cevallos, G. ve Sánchez-Gutiérrez, M. (2014). Protective effect of resveratrol on biomarkers of oxidative stress induced by iron/ascorbate in mouse spermatozoa. *Nutrients*, 6(2), 489–503. doi.org/10.3390/nu6020489
- Mondal, M., Trivedy, K. ve Nirmal, K. S. (2007). The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn.—A review. *Caspian Journal of Environmental Science*, 5 (2), 63-76.
- Monga, M. ve Roberts, J. A. (1994). Spermagglutination by bacteria: Receptor-specific interactions. *Journal of Andrology*, 15(2), 151–156. doi.org/10.1002/j.1939-4640.1994.tb00423.x
- Moretti, E., Capitani, S., Figura, N., Pammolli, A., Federico, M. G., Giannerini, V. ve Collodel, G. (2009). The presence of bacteria species in semen and sperm quality. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 26(1), 47–56. doi.org/10.1007/s10815-008-9283-5
- Morrell, J. M. ve Wallgren, M. (2014). Alternatives to antibiotics in semen extenders: A review. *Pathogens*, 3(4), 934–946. doi.org/10.3390/pathogens3040934

- Nagai, N. ve Ito, Y. (2013). Therapeutic effects of sericin on diabetic keratopathy in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *World Journal of Diabetes*, 4(6), 282–289. doi.org/10.4239/wjd.v4.i6.282
- Nagai, N., Murao, T., Ito, Y., Okamoto, N. ve Sasaki, M. (2009). Enhancing effects of sericin on corneal wound healing in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats as a model of human type 2 diabetes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(9), 1594–1599. doi.org/10.1248/bpb.32.1594
- Nagai, N., Murao, T., Ito, Y., Okamoto, N. ve Sasaki, M. (2009). Enhancing effects of sericin on corneal wound healing in rat debrided corneal epithelium. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(5), 933–936. doi.org/10.1248/bpb.32.933
- Nagarajan, E. I., Venkatesh, B., Govardhana Rao, C. ve Vaseem Chavhan, M. (2017). Investigation of cotton fabrics treated with sericin and cross-linking agents. *International Journal on Textile Engineering and Processes*, 3(2), 22–25.
- Nagaraju, J. ve Goldsmith, M. R. (2002). Silkworm genomics—Progress and prospects. *Current Science*, 83(4), 415–425.
- Nain, Z., Islam, M. A. ve Minnatul Karim, M. (2019). Antibiotic resistance profiling and molecular phylogeny of biofilm-forming bacteria from clinical and non-clinical environment in southern part of Bangladesh. *International Journal of Enteric Pathogens*, 7(2), 37–43. doi.org/10.15171/ijep.2019.10
- Nicholson, C. M., Abramsson, L., Holm, S. E. ve Bjurulf, E. (2000). Bacterial contamination and sperm recovery after semen preparation by density gradient centrifugation using silane-coated silica particles at different g forces. *Human Reproduction*, 15(3), 662–666. doi.org/10.1093/humrep/15.3.662
- Nishijima, K., Kitajima, S., Matsuhisa, F., Niimi, M., Wang, C. C. ve Fan, J. (2021). Strategies for highly efficient rabbit sperm cryopreservation. *Animals*, 11(5), 1220. doi.org/10.3390/ani11051220
- Oghbaei, H., Rastgar Rezaei, Y., Nikanfar, S., Zarezadeh, R., Sadegi, M., Latifi, Z., Nouri, M., Fattahi, A., Ahmadi, Y. ve Bleisinger, N. (2020). Effects of bacteria on male fertility: Spermatogenesis and sperm function. *Life Sciences*, 256, 117891. doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117891

- Ohnishi, K., Murakami, M., Morikawa, M. ve Yamaguchi, A. (2012). Effect of the silk protein sericin on cryopreserved rat islets. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, 19(4), 354–360. doi.org/10.1007/s00534-011-0415-4
- Okazaki, Y., Kakehi, S., Xu, Y., Tsujimoto, K., Sasaki, M., Ogawa, H. ve Kato, N. (2010). Consumption of sericin reduces serum lipids, ameliorates glucose tolerance and elevates serum adiponectin in rats fed a high-fat diet. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(8), 1534–1538. doi.org/10.1271/bbb.100065
- Okazaki, Y., Tomotake, H., Tsujimoto, K., Sasaki, M. ve Kato, N. (2011). Consumption of a resistant protein, sericin, elevates fecal immunoglobulin A, mucins, and cecal organic acids in rats fed a high-fat diet. *The Journal of Nutrition*, 141(11), 1975–1981. doi.org/10.3945/jn.111.144246
- 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), 1–12. doi.org/10.1006/cryo.1998.2092
- Onsa-Ard, A., Shimbhu, D., Tocharus, J., Sutheerawattananonda, M., Pantan, R. ve Tocharus, C. (2013). Hypotensive and vasorelaxant effects of sericin-derived oligopeptides in rats. *International Scholarly Research Notices*, 2013, 717529. doi.org/10.1155/2013/717529
- Paasch, U., Grunewald, S. ve Glander, H. (2007). Sperm selection in assisted reproductive techniques. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 65, 515–526.
- Padamwar, M. N. ve Pawar, A. P. (2004). Silk sericin and its applications: A review. *Journal of Scientific ve Industrial Research*, 63, 323–329.
- Padol, A. R., Jayakumar, K., Mohan, K. ve Manochaya, S. (2012). Natural biomaterial silk and silk proteins: Applications in tissue repair. *International Journal of Materials and Biomaterials Applications*, 2(4), 19–24.
- Pandiarajan, J., Cathrin, B. P., Pratheep, T. ve Krishnan, M. (2011). Defense role of the cocoon in the silk worm *Bombyx mori* L. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(21), 3203–3206. doi.org/10.1002/rcm.5213
- Panilaitis, B., Altman, G. H., Chen, J., Jin, H. J., Karageorgiou, V. ve Kaplan, D. L. (2003). Macrophage responses to silk. *Biomaterials*, 24(18), 3079–3085. doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00158-3

- Patel, R. J. ve Modasiya, M. K. (2011). Sericin: Pharmaceutical applications. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2(3), 913–917.
- Paulenz, H., Söderquist, L., Pérez-Pé, R. ve Berg, K. A. (2002). Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*, 57(2), 823–836. doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00683-5
- Paulo, L., Ferreira, S., Gallardo, E., Queiroz, J. A. ve Domingues, F. (2010). Antimicrobial activity and effects of resveratrol on human pathogenic bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(8), 1533–1538. doi.org/10.1007/s11274-010-0325-7
- Pelczar, M. J., Chan, E. C. S. ve Krieg, N. R. (1993). *Microbiology: Concepts and applications*. McGraw-Hill.
- Price, S., Aurich, J., Davies-Morel, M. ve Aurich, C. (2008). Effects of oxygen exposure and gentamicin on stallion semen stored at 5 and 15 C. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(3), 261–266. doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00888.x
- Prieto-Martínez, N., Bussalleu, E., Garcia-Bonavila, E., Bonet, S. ve Yeste, M. (2014). Effects of *Enterobacter cloacae* on boar sperm quality during liquid storage at 17 C. *Animal Reproduction Science*, 148(1–2), 72–82. doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.05.008
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., Hartigan, P., Fanning, S. ve Fitzpatrick, E. (2011). *Veterinary microbiology and microbial disease*. John Wiley ve Sons.
- Quintela, L. A., Peña, A. I., Vega, M. D., Gullón, J., Prieto, M. C., Barrio, M., ... ve Herradón, P. G. (2004). Ovulation induction in rabbit does submitted to artificial insemination by adding buserelin to the seminal dose. *Reproduction Nutrition Development*, 44(1), 79–88. doi.org/10.1051/rnd:2004015
- Raad, G., Bakos, H. W., Bazzi, M., Mourad, Y., Fakih, F., Shayya, S., Mchantaf, L. ve Fakih, C. (2021). Differential impact of four sperm preparation techniques on sperm motility, morphology, DNA fragmentation, acrosome status, oxidative stress, and mitochondrial activity: A prospective study. *Andrology*, 9(5), 1549–1559. doi.org/10.1111/andr.13038
- Rajput, S. K. ve Singh, M. K. (2015). Sericin—a unique biomaterial. *IOSR Journal of Polymer and Textile Engineering*, 2(3), 29–35. doi.org/10.9790/019X-0232935

- Raza, S., Uçan, U., Aksoy, M., Erdoğan, G., Naseer, Z. ve Khan, K. (2024). Sericin-enriched rabbit semen preservation: Implications for short-term storage quality and fertility at 4 or 15 °C. *Animals*, 14(23), 3429. doi.org/10.3390/ani14233429
- Reddy, V. S., Yadav, B., Yadav, C. L., Anand, M., Swain, D. K., Kumar, D., Kritania, D., Madan, A. K., Kumar, J. ve Yadav, S. (2018). Effect of sericin supplementation on heat shock protein 70 (HSP70) expression, redox status and post thaw semen quality in goat. *Cryobiology*, 84, 33–39. doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.08.005
- Rocha, L. K. H., Favaro, L. I. L., Rios, A. C., Silva, E. C., Silva, W. F., Stigliani, T. P., Guilger, M., Lima, R., Oliveira, J. M., Aranha, N., Tubino, M., Vila, M. M. D. C. ve Balcão, V. M. (2017). Sericin from *Bombyx mori* cocoons. Part I: Extraction and physicochemical biological characterization for biopharmaceutical applications. *Process Biochemistry*, 61, 163-177. doi.org/10.1016/j.procbio.2017.06.019
- Rodriguez-Martinez, H. ve Wallgren, M. (2010). Advances in boar semen cryopreservation. *Veterinary Medicine International*, 2010, 396181. doi.org/10.4061/2011/396181
- Rossi, T., Mazzilli, F., Sarandrea, N., Rapone, S. ve Dondero, F. (1997). The application of the differential pH method to the biochemical evaluation of seminal plasma. *Clinical Biochemistry*, 30(2), 143–148. doi.org/10.1016/S0009-9120(96)00161-0
- Salamon, S. ve Maxwell, W. M. C. (1995). Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37(3–4), 185–249. doi.org/10.1016/0378-4320(94)01327-I
- Salamon, S. ve Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 77–111. doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00155-x
- Sasaki, M., Kato, Y., Yamada, H. ve Terada, S. (2005). Development of a novel serum-free freezing medium for mammalian cells using the silk protein sericin. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 42(2), 183–188. doi.org/10.1042/BA20050019
- Sasaki, M., Yamada, H. ve Kato, N. (2000a). Consumption of silk protein, sericin elevates intestinal absorption of zinc, iron, magnesium and calcium in rats. *Nutrition Research*, 20(10), 1505–1511. doi.org/10.1016/S0271-5317(00)80031-7

- Sasaki, M., Yamada, H. ve Kato, N. (2000b). A resistant protein, sericin improves atropine-induced constipation in rats. *Food Science and Technology Research*, 6(4), 280–283. doi.org/10.3136/fstr.6.280
- Sehnal, F. ve Akai, H. (1990). Insect silk glands: Their types, development and function, and effects of environmental factors and morphogenetic hormones on them. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 19(2), 79–132. doi.org/ 10.1016/0020-7322(90)90022-H
- Senakoon, W., Nuchadomrong, S., Sirimungkararat, S., Senawong, T. ve Kitikoon, P. (2009). Antibacterial action of eri (*Samia ricini*) sericin against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Journal of Food and Agro Industry*, S222–S228.
- Sepúlveda, L., Bussalleu, E., Yeste, M. ve Bonet, S. (2014). Effects of different concentrations of *Pseudomonas aeruginosa* on boar sperm quality. *Animal Reproduction Science*, 150(3–4), 96–106. doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.09.001
- Singh, M. K., Varun, V. K. ve Behera, B. K. (2011). Cosmetotextiles: State of art. *Fibres ve Textiles in Eastern Europe*, 19(4), 27–33.
- Song, C. J., Yang, Z. J., Tang, Q. F. ve Chen, Z. H. (2015). Effects of sericin on the testicular growth hormone/insulin-like growth factor-1 axis in a rat model of type 2 diabetes. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(7), 10411–10419.
- Song, C., Miao, G., Li, J., Fu, W., Yang, Z. ve Chen, Z. (2013). Regulating effects of sericin on ECM related factors PDGF and CTGF expression in kidney of diabetes mellitus rats. *Journal of China Medical University*, 42(7), 626–630.
- Sorour, J. E. H. A. N., Larink, O., Ramadan, A. N. G. A., Shalaby, A. S. ve Osman, S. A. L. A. H. (1990). Anatomical, histological, and electron microscopical studies on the salivary glands of larvae of *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lep., Noctuidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 19(3–4), 205–220. doi.org/10.1007/s43994-023-00097-8
- Sparr, E., Hallin, L., Markova, N. ve Wennerström, H. (2002). Phospholipid-cholesterol bilayers under osmotic stress. *Biophysical Journal*, 83(4), 2015–2025. doi.org/ 10.1016/S0006-3495(02)73963-5

- Spinosa, H. D. S., Górnjak, S. L. ve Bernardi, M. M. (2006). *Farmacologia aplicada à medicina veterinária* (4th ed.). Manole.
- Staples, R. E. (1967). Behavioural induction of ovulation in the oestrous rabbit. *Reproduction*, 13(3), 429–435. doi.org/10.1530/jrf.0.0130429
- Sztejn, J. M., Farley, J. S. ve Mobraaten, L. E. (2000). In vitro fertilization with cryopreserved inbred mouse sperm. *Biology of Reproduction*, 63(6), 1774–1780.
- Takahashi, M., Tsujimoto, K., Kato, Y., Yamada, H., Takagi, H. ve Nakamori, S. (2005). A sericin-derived peptide protects SF9 insect cells from death caused by acute serum deprivation. *Biotechnology Letters*, 27, 893–897.
- Takahashi, M., Tsujimoto, K., Yamada, H., Takagi, H. ve Nakamori, S. (2003). The silk protein, sericin, protects against cell death caused by acute serum deprivation in insect cell culture. *Biotechnology Letters*, 25, 1805–1809.
- Takasu, Y., Yamada, H., Tamura, T., Sezutsu, H., Mita, K. ve Tsubouchi, K. (2007). Identification and characterization of a novel sericin gene expressed in the anterior middle silk gland of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(11), 1234–1240.
- Tamada, Y., Sano, M., Niwa, K., Imai, T. ve Yoshino, G. (2004). Sulfation of silk sericin and anticoagulant activity of sulfated sericin. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 15(8), 971–980.
- Tao, G., Cai, R., Wang, Y., Zuo, H. ve He, H. (2021). Fabrication of antibacterial sericin based hydrogel as an injectable and mouldable wound dressing. *Materials Science and Engineering: C*, 119, 111597.
- Teow, S. Y., Liew, K., Ali, S. A., Khoo, A. S. B. ve Peh, S. C. (2016). Antibacterial action of curcumin against *Staphylococcus aureus*: a brief review. *Journal of Tropical Medicine*, 2016(1), 2853045.
- Teramoto, H., Kameda, T. ve Tamada, Y. (2008). Preparation of gel film from *Bombyx mori* silk sericin and its characterization as a wound dressing. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(12), 3189–3196.

- Thetford, C. R., Morrell, J. M. ve Cockle, S. M. (1992). TRH-related peptides in the rabbit prostate complex during development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, 1115(3), 252–258.
- Thibier, M. ve Guerin, B. (2000). Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 233–251.
- Thomas, T. S., Wilson, W. L., Reynolds, A. B. ve Oliphant, G. (1986). Chemical and physical characterization of rabbit sperm acrosome stabilizing factor. *Biology of Reproduction*, 35(3), 691–703.
- Toyosawa, T., Sasaki, M., Kato, Y., Yamada, H. ve Terada, S. (2007, January). Development of a novel serum-free cryopreservative solution. In *Cell Technology for Cell Products: Proceedings of the 19th ESACT Meeting, Harrogate, UK, June 5–8, 2005* (pp. 225–231). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Tsubouchi, K., Igarashi, Y., Takasu, Y. ve Yamada, H. (2005). Sericin enhances attachment of cultured human skin fibroblasts. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69(2), 403–405.
- Tsujimoto, K., Takagi, H., Takahashi, M., Yamada, H. ve Nakamori, S. (2001). Cryoprotective effect of the serine-rich repetitive sequence in silk protein sericin. *The Journal of Biochemistry*, 129(6), 979–986.
- Tvrda, E., Tušimová, E., Kováčik, A., Paál, D., Libová, L. ve Lukáč, N. (2016). Protective effects of quercetin on selected oxidative biomarkers in bovine spermatozoa subjected to ferrous ascorbate. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(4), 524–537. doi.org/10.1111/rda.12714
- Tyagi, P., Singh, M., Kumari, H., Kumari, A. ve Mukhopadhyay, K. (2015). Bactericidal activity of curcumin I is associated with damaging of bacterial membrane. *PLoS ONE*, 10(3), e0121313.
- Vaillancourt, D., Guay, P. ve Higgins, R. (1993). The effectiveness of gentamicin or polymyxin B for the control of bacterial growth in equine semen stored at 20 °C or 5 °C for up to forty-eight hours. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 57(4), 277–208.

- Vilvanathan, S., Kandasamy, B., Jayachandran, A. L., Sathiyarayanan, S., Tanjore Singaravelu, V., Krishnamurthy, V. ve Elangovan, V. (2016). Bacteriospermia and its impact on basic semen parameters among infertile men. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2016, 2614692.
- Vishwanath, R. (2003). Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology*, 59(2), 571–584. [doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01241-4](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01241-4)
- Viudes-de-Castro, M. P. ve Vicente, J. S. (2023). Trends in rabbit insemination extenders for fresh and frozen semen: A review. *World Rabbit Science*, 31(2), 109–116.
- Voegeli, R., Meier, J., Blust, R. ve Hofsteter, R. (1993). Sericin silk protein: Unique structure and properties. *Cosmetics and Toiletries*, 108(12), 101–108.
- Waberski, D., Luther, A. M., Grünther, B., Jäkel, H., Henning, H., Vogel, C. ve Weitze, K. F. (2019). Sperm function in vitro and fertility after antibiotic-free, hypothermic storage of liquid preserved boar semen. *Scientific Reports*, 9(1), 14748.
- Wang, A., Fanning, L., Anderson, D. J. ve Loughlin, K. R. (1997). Generation of reactive oxygen species by leukocytes and sperm following exposure to urogenital tract infection. *Archives of Andrology*, 39(1), 11–17.
- Wang, H. Y., Zhao, J. G. ve Zhang, Y. Q. (2020). The flavonoid-rich ethanolic extract from the green cocoon shell of silkworm has excellent antioxidation, glucosidase inhibition, and cell protective effects in vitro. *Food ve Nutrition Research*, 64, 10.29219/fnr.v64.1637. doi.org/10.29219/fnr.v64.1637
- Wang, Y., Cai, R., Tao, G., Wang, P., Zuo, H., Zhao, P., Umar, A. ve He, H. (2018). A novel AgNPs/Sericin/Agar film with enhanced mechanical property and antibacterial capability. *Molecules*, 23(7), 1821. doi.org/10.3390/molecules23071821
- Wang, Z., Zhai, D., Zhang, D., Bai, L., Yao, R., Yu, J., ... ve Yu, C. (2017). Quercetin decreases insulin resistance in a polycystic ovary syndrome rat model by improving inflammatory microenvironment. *Reproductive Sciences*, 24(5), 682–690.
- Waterhouse, K. E., Hofmo, P. O., Tverdal, A. ve Miller, R. R. (2006). Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction*, 131(5), 887–894.

- Watson, P. F. (1981). The effects of cold shock on sperm cell membranes. In *Effects of low temperatures on biological membranes* (pp. 189–218).
- White, I. G. (1993). Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: A review. *Reproduction, Fertility and Development*, 5(6), 639–658.
- Wolff, H., Panhans, A., Stolz, W. ve Meurer, M. (1993). Adherence of *Escherichia coli* to sperm: A mannose mediated phenomenon leading to agglutination of sperm and *E. coli*. *Fertility and Sterility*, 60(1), 154–158.
- Wu, J. H., Wang, Z. ve Xu, S. Y. (2007). Preparation and characterization of sericin powder extracted from silk industry wastewater. *Food Chemistry*, 103(4), 1255–1262.
- Xue, R., Liu, Y., Zhang, Q., Liang, C., Qin, H., Liu, P., Wang, K., Zhang, X., Chen, L. ve Wei, Y. (2016). Shape changes and interaction mechanism of *Escherichia coli* cells treated with sericin and use of a sericin-based hydrogel for wound healing. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(15), 4663–4672. doi.org/10.1128/AEM.00643-16
- Yang, M., Wang, Y., Tao, G., Cai, R., Wang, P., Liu, L., ... ve He, H. (2018). Fabrication of sericin/agarose gel loaded lysozyme and its potential in wound dressing application. *Nanomaterials*, 8(4), 235.
- Zampieri, D., Santos, V. G., Braga, P. A., Ferreira, C. R., Ballottin, D., Tasic, L., ... ve Tata, A. (2013). Microorganisms in cryopreserved semen and culture media used in the in vitro production (IVP) of bovine embryos identified by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS). *Theriogenology*, 80(4), 337–345.
- Zhaorigetu, S., Sasaki, M., Watanabe, H. ve Kato, N. (2001). Supplemental silk protein, sericin, suppresses colon tumorigenesis in 1,2-dimethylhydrazine-treated mice by reducing oxidative stress and cell proliferation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(10), 2181–2186.
- Zhaorigetu, S., Yanaka, N., Sasaki, M., Watanabe, H. ve Kato, N. (2003). Silk protein, sericin, suppresses DMBA-TPA-induced mouse skin tumorigenesis by reducing oxidative stress, inflammatory responses and endogenous tumor promoter TNF- α . *Oncology Reports*, 10(3), 537–543.

- Zhu, L. J., Arai, M. ve Hirabayashi, K. (1996). Sol-gel transition of sericin. *The Journal of Sericultural Science of Japan*, 65(4), 270–274.
- Zoheir, K. M. A., Harisa, G. I., Abo-Salem, O. M. ve Ahmad, S. F. (2015). Honey bee is a potential antioxidant against cyclophosphamide-induced genotoxicity in albino male mice. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(3), 973–981

EKLER

Ek 1:



T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(AYDIN ADÜ-HADYEK)



Aydın 24/05/2023

Oturum : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (2023-Y) VIII. Oturum
Sayı : 64581/01/2023-23
Proje Başlığı : Tavşan spermisinin kısırsız ve sızdırılmasında serisinin anti mikrobiyal etkisi
Proje : Melih AKSOY
Yürütücüsü
Proje Ekibi : Güney TUZLAL (ÖĞÜ.)

Bu çalışmanın hiçbir bölümünde
insan embriyosu ve fütüsü kullanılmıyır.
insan embriyosu ve fütüsü dokularının kullanılmıyır.
Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılmıyır.
Hayvan Çalışması
insanlarda araştırma
insan olmayan primatların kullanılmıyır
Transgenik hayvanların kullanılmıyır
Hayvanlarda genetik modifikasyon önerilmemiştir.

Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır.

Prof. Dr. Murat SARIERLER
Başkan

Prof. Dr. M. Dincer BİLİR
Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Tahir DÖST
Üye

Prof. Dr. İsmail SÖNMEZ
Üye

Prof. Dr. Serkan BAKIRCI
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Selma KARARSLAN
Üye

Dr. Öğr. Üyesi A. Önder ESTÜNDAG
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Ayhan KOC GELTEKİN
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Asude GİLECE ÖRYAŞIN
Sor. Vet. Hek. Üye

Hidayet YAMAN
Serbest Vet. Hek. Üye

Öğr. Öğr. Dr. Mehmet C. TÖRK AŞKIN
Sor. Vet. Hek. Üye

Senay TEKİNBAŞ HAYTAP
Üye

Bu rapor sadece Aydın Menderes Üniversitesinde yapılacak çalışmalar için geçerlidir.

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

“ Tavşan spermasının kısa süreli saklanması serisinin antimikrobiyal etkisi ” başlıklı Doktora tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Güney TUZLALIOĞLU
Öğrencinin Adı ve Soyadı

ÖZ GEÇMİŞ

Soyadı, Adı : TUZLALIOĞLU Güney
Uyruk : K.K.T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Kıbrıs / 11.04.1994
Telefon : 0 533 844 6063
E-posta : guney11.tuzlalioglu@gmail.com
Yabancı dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	Devam ediyor
Y. Lisans	-	
Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	2017

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2020	Alltech Veteriner Kliniği	Veteriner Hekim
2021	Egevet Kıbrıs LTD.	Veteriner Hekim
2021	EU Project (Technical input and analysis in the area of animal health in the northern part of Cyprus)	Lab. Teknisyeni
2022	EU Project (Technical input and analysis in the area of animal health in the northern part of Cyprus)	Lab. Teknisyeni
2023	EU Project (Support in the area of animal health in the northern part of Cyprus)	Saha Hekimi
2025	EU Project (Technical input and analysis in the area of animal health in the northern part of Cyprus)	Lab. Teknisyeni