

RESEARCH ARTICLE

J Res Vet Med. 2024; 43 (1) 46-54
DOI:10.30782/jrv.m.1420188

Arı Sperması (*Apis mellifera anatoliaca*) ve İnsülin Etkileşiminin Soya Lesitini Temelli Kriyoprezervasyon Sulandırıcılarında Flow Sitometrik Olarak incelenmesi

● Mehmed Berk TOKER^{1*}, ● Ahmet AKTAR¹, ● Selvinar SEVEN ÇAKMAK^{2,3},
● İbrahim ÇAKMAK^{2,4}, ● Mustafa AKKAŞOĞLU¹, ● Selim ALÇAY¹

1 Bursa Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Bursa - Türkiye.

2 Bursa Uludağ Üniversitesi, Arıcılık Geliştirme-Uygulama ve Araştırma Merkezi, Bursa - Türkiye.

3 Ankara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı Ankara - Türkiye.

4 Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Anabilim Dalı, Bursa - Türkiye.

Received 17-01-2024 Accepted 27-03-2024

Özet

Gen havuzlarının istenen yönde gelişimine katkıda bulunan üreme kontrolü, spermanın dondurması ile alakalı biyoteknolojik yöntemleri önemli bir noktaya koymaktadır. Sperma dondurmaya yönelik çalışmalar özellikle memelilerde yoğun olarak çalışılmış olmasına rağmen, arı sperması açısından başlangıç aşamasındadır. İnsülinin seminal plazmada bulunduğu ve çeşitli sperma parametreleri üzerine etkilerinin olduğu güncel çalışmalarla desteklenmiştir. Ayrıca, soya lesitini uzun süredir, özellikle yumurta sarısına alternatif, güvenilir bir kaynak olarak sperma dondurma sulandırıcılarında tercih edilen maddelerden biridir. Bu çalışma, soya lesitini (%2) temelli arı sperma dondurma sulandırıcılarına farklı dozlarda insülin (5, 10 ve 15 IU dozda) eklenmesi sonucunda elde edilecek sonuçların, flow sitometri veya mikroskopik incelemeler aracılığıyla önemli sperma parametreleri üzerindeki etkileri değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Cinsel olgunluğa ulaşmış arılardan elde edilen örnekler bireysel farklılığı engellemek adına birleştirildi (pooling). Dondurma işlemi, üç doz insülin destekli ve bir insülin içermeyen kontrol grubu olacak şekilde düzenlendi ve yöntem planlandığı şekilde uygulandı. Dondurulup çözülen örnekler; motilite, plazma membran (hipo-osmotik şişme testi) ve DNA bütünlüğü (TUNEL testi) değerlendirmelerine, floresan ataçmanı olan bir faz kontrast mikroskobu kullanılarak gerçekleştirildi. Ayrıca, akrozomal bütünlük (PNA-FITC), nitrik oksit seviyeleri (DAF-2/DA) ve mitokondriyal membran potansiyeli (JC-1), bir flow sitometri cihazı aracılığıyla araştırıldı. Beklendiği gibi, tüm sperma parametreleri dondurma işleminin doğası gereği etkilendi, ancak insülin eklenmiş çalışma grupları, kontrol grubuna kıyasla pozitif yönde bir istatistiksel farkı ortaya koyamadı. Bu sonuçlar ışığında, soya lesitini temelli arı sperması dondurma sulandırıcılarında kullanılan insülin takviyesinin tercih edilen dozlarda kullanılmasının, yardımcı biyoteknolojik yöntemler aracılığıyla daha yüksek verimli arı kolonileri elde edilmesi ve arı ürünleri konusunda ülke veriminin istenilen düzeye çıkarılması konusunda olumlu bir etkiye sahip olmadığı tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: *Apis mellifera anatoliaca*, Arı sperması, Flow-sitometri, İnsülin, Soya lesitini, Sperma dondurma

Flow Cytometric Examination of The Interaction Between Drone Sperm (*Apis Mellifera Anatoliaca*) and Insulin in Soybean Lecithin-Based Cryopreservation Extenders Abstract

This study was conducted to evaluate the effects of different doses of insulin (5, 10, and 15 IU) added to soybean lecithin-based drone sperm freezing extenders on sperm parameters through flow cytometry or microscopic examinations. Samples obtained from sexually mature bees were pooled to eliminate individual variation. The freezing process was organized with three insulin-supplemented doses and one insulin-free control group, and the method was implemented as planned. Thawed samples were evaluated for motility, plasma membrane (hypo-osmotic swelling test), and DNA integrity (TUNEL assay) using a phase-contrast microscope with fluorescent attachment. Additionally, acrosomal integrity (PNA-FITC), nitric oxide levels (DAF-2/DA), and mitochondrial membrane potential (JC-1) were investigated using a flow cytometer. As expected, all sperm parameters were affected by the freezing process inherently, however, the insulin-supplemented experimental groups did not demonstrate a statistically significant positive difference compared to the control group. In light of these results, it was determined that the use of insulin supplementation, in preferred doses, in soybean lecithin-based drone sperm cryopreservation extenders did not have a positive effect on achieving higher productive honeybee colonies and elevating the country's yield in bee products through auxiliary biotechnological methods as desired.

Anahtar Kelimeler: *Apis mellifera anatoliaca*, Drone sperm, Flow-cytometer, Insulin, Soybean lecithin, Sperma cryopreservation

* Corresponding author: Mehmed Berk Toket, Bursa Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, 16059, Bursa/Türkiye. Tel: +90 224 2941350, e-posta: berktoker@uludag.edu.tr

Giriş

Son yıllarda iklim değişikliği, tarımda kullanılan böcek ilaçları ve çeşitli patojenler gibi çoklu faktörlere bağlı olarak arı popülasyonunun azaldığı bildirilmektedir. Bu nedenle, arıcılıkta biyoteknolojik yöntemlerin kullanımı ve genetik materyalin uzun vadeli korunması hayati öneme sahiptir (1). Yaygın olarak karşılaşılan hastalıklar nedeniyle genetik kaynakların kaybolması, arı spermasının dondurulması ve saklanması önemin, artmaktadır (2). Sperma dondurma yöntemiyle arı genetik kaynaklarının korunması, hem üreticiler hem de ülke tarım ve hayvancılık faaliyetleri için önemli bir yere sahiptir (3). Arıcılıkta temel amaç, yüksek verimli ve dayanıklı koloniler elde etmektir. Bu hedefe ulaşmada, erkek genetik materyal, dişi genetik materyal kadar etkilidir. Genetik olarak uygun ve spermatolojik olarak kalifiye erkek arılarla çiftleşemeyen ana arılar, gerekli miktarda sperma depolayamamakta ve bu durum sonucunda nispeten daha kısa bir üreme yaşamına sahip olmaktadır (4). Arı spermasının başarıyla dondurulması, üstün genetik özelliklerin korunmasına yardımcı olarak belirli ırklar ve hatlardan istenilen özelliklerin geniş çapta yayılmasına destek olmaktadır (5).

Sperma dondurma yönteminde kullanılan sulandırıcılar, hücreleri süreç boyunca koruma amacı taşıyan çeşitli içeriklere sahiptir ve hücreleri fiziksel ve kimyasal stres etkenlerinden korumaktadırlar. Bunlar arasında bir enerji kaynağı olarak karbonhidratlar, soğuk şokunu önlemek için yüksek moleküler ağırlıklı koruyucu maddeler, osmotik basınç ve pH'ı dengelemek için iyonik veya non-iyonik kaynaklar ve bakteriyel kontaminasyonu önlemek için bir veya daha fazla antibiyotik kaynağı bulunmaktadır (6).

Hücre dondurma sürecini yüksek başarı ile yürütmek amacıyla çeşitli kriyoprotektan maddeler (7, 8), antioksidanlar (9, 10), çeşitli kimyasallar (11, 12) ve muhtelif protein kaynakları (13, 14) ile çalışmalar gerçekleştirilmiş ve sperma dondurma başlığında muhtelif başarılar elde edilmiştir. Arı spermasının dondurulmasında kullanılan sulandırıcıların çeşitlendirilmesi, çözündürme sonrası dönemde hücrelerin daha başarılı olmasına destek vermekte ve çok daha güçlü kolonilerin oluşturulmasına yardımcı olmaktadır (15).

Bitkisel kaynaklı soya lesitini temel sulandırıcı kaynağı olarak son yıllarda kullanılmaktadır. Soya lesitini bulanan düşük yoğunluklu lipoproteinler, sperma membranlarını dondurma süreçlerinde korumaktadır (13, 16). Yumurta sarısında da bulunan düşük yoğunluklu lipoproteinlerden olan fosfatidilkolinlerin, dondurma-çözündürme

süreçlerindeki etkisi bilinmektedir. Aynı bileşenin soya lesitininde de bulunması sebebiyle, yaygın olarak kullanılan yumurta sarısından kaynaklanması olası bulaşmaların ve çeşitli hastalıkların taşınmasının önlenmesi amacıyla da soya lesitini kullanmanın önemi güncel çalışmalarda vurgulanmaktadır (17,18).

İnsülin, çift zincirden oluşan (sırasıyla 21 ve 30 amino asitten oluşan α ve β zincirleri) bir protein olup, memeli spermasının enerji metabolizmasında görev yapmaktadır. İnsülin, seminal plazmaya salgılanarak NADPH üretimine yol açmakta, bu da spermanın kapasitesini ve otkrin metabolizmasına etki etmektedir (19, 20). İnsülin, sperma motilitesini glikoz ve lipid metabolizmasına katılarak etkilemekte; aynı zamanda memeli spermasının plazma membranı ve akrozomu üzerinde de etkilerini göstermektedir (21, 22). İnsülin ayrıca memeli sperma motilitesi ve kapasitesini üzerinde de artırıcı rol oynamakta ve füzyon olayını desteklemektedir (19, 20, 23). Araştırmalar insülin reseptörlerinin, akrozom reaksiyonunu artırdığını ve motilite ile mitokondriyal aktivite üzerine memelilerde pozitif etkilerde bulunduğunu göstermektedir (22, 24, 25). İnsülinin sperma dondurma sulandırıcılarına eklenmesine dair önceki yıllarda memelilerde gerçekleştirilen çalışmalarda, plazma ve akrozom membran bütünlüğüne etkide bulunduğu, hücre metabolizma artışına destek olduğu, sperma DNA hasarının azalmasına (25), ve spermanın fertilizasyon kapasitesinin artırılmasına destek olduğu (20, 24) gösterilmiştir.

Bu çalışmanın temel amacı, zengin düşük yoğunluklu lipopolisakkarit (LDL) kaynağı olan soya lesitini ile hazırlanan arı sperma dondurma sulandırıcılarına çeşitli dozlarda insülin eklenmesinin muhtemel etkilerini araştırmaktır. Bu amaçla, arı spermasının çözündürme sonrası zaman noktasında motilite, plazma membran bütünlüğü, akrozom bütünlüğü, mitokondriyal membran potansiyeli, nitrik oksit üretimi ve DNA bütünlüğü parametreleri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir.

Materyal ve Metot

Kimyasallar

Kimyasallar, makalede başka bir şekilde belirtilmediği sürece Merck KGaA (Darmstadt, Almanya) tarafından temin edilmiştir. 4,5-Diaminofluorescein-2/diasetat (DAF-2/DA), Genaxxon Bioscience (Biberach, Almanya) şirketine temin edilmiştir.

Deneyde kullanılan hayvanlar ve spermanın elde edilmesi

Sağlıklı, yüksek verimli ve güçlü koloniler, *Apis mellifera anatoliaca* erkek arıları üretimi için seçildi. Arılar, Nisan ve

Haziran ayları arasında Bursa Uludağ Üniversitesi Arıcılık Geliştirme-Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (AGAM) bulunan beş koloniden elde edildi. Sperma elde etme işlemi, en az 14 günlük yaşta ve cinsel olgunluğa erişmiş olan erkek arılardan, en az beş çalışma günü olacak şekilde, thorax bölgesine baskı ve abdomen bölgesine masaj uygulanarak gerçekleştirildi (26). Arı spermasının toplanması amacıyla Schley enjektörü kullanıldı ve işlem stereo mikroskop (Nikon SMZ1000 - Nikon Co., Tokyo, Japonya), altında gerçekleştirildi. Her arıdan yaklaşık olarak 1 µL semen edildi ve bireyler arasındaki varyasyonları en aza indirmek için, semen örnekleri ortalama hacim 150 µL olacak şekilde bir araya getirildi (pooling).

Çalışma grupları ve sperma sulandırıcıları

Çalışma, soya lesitini içeren sulandırıcılara eklenen dört farklı insülin dozunun arı spermasına ait parametrelerde gerçekleştireceği değişiklikleri tespit etmek amacıyla yapılmıştır. İnsülin lispro (Humalog, Lilly, İtalya), değişen dozlarda (5 IU, 10 IU ve 15 IU) sulandırıcılara eklenmiştir. Ayrıca, insülin ilavesi olmadan bir kontrol grubu da oluşturulmuş ve deneye dahil edilmiştir. 5 IU (I5), 10 IU (I10) ve 15 IU (I15) insülin dozları, 3 mL sulandırıcıya eklenerek gruplar oluşturulmuştur. Sulandırıcı içeriği; 82,21 mmol sodyum sitrat, 24,87 mmol sodyum bikarbonat, 5,34 mmol potasyum klorür, 0,82 mmol amoksisilin, 1,59 mmol katalaz, %10 dimetil sülfoksit (DMSO) ve %2 soya lesitini içerecek şekilde hazırlanmıştır (15).

Spermanın dondurulması ve çözündürülmesi

Çalışma günlerinde elde edilen sperma örnekleri dört eşit parçaya bölündü ve sulandırma işlemi, insülin içeren veya içermeyen sulandırıcılar kullanarak yaklaşık olarak 100×10^6 (spermatozoa/mL) konsantrasyon olacak şekilde gerçekleştirildi. Takiben, elde edilen çalışma gruplarına ait örnekler soğuma işlemine tabi tutularak sıcaklığı 60 dakika içinde 5°C'a kadar yavaşça düşürüldü. Çalışma payetleri, 5°C sıcaklıkta 120 dakika boyunca ekilibrasyona bırakıldı. Süre sonunda, 0,25 mL hacmindeki payetlere (IMV, L'Aigle, Fransa) önceden çekilmiş olan sulandırılmış sperma örnekleri dondurma işlemine tabi tutuldu. Dondurma işlemi, sıvı azot buharı kullanan ve soğuma eğrisi önceden tespit edilmiş bir dondurma kabininde gerçekleştirildi. Süre sonunda tüm payetler sıvı azota doldurulmuş bir tanka yerleştirilerek dondurma işlemi tamamlandı. Spermatojik analizleri gerçekleştirmek adına, her çalışma grubundan en az üç payeti, 37°C sıcaklıktaki su banyosunda 30 saniye süre ile çözündürmek yolu ile işaret edilen yöntemler uygulandı (27).

Spermanın değerlendirilmesi

Çözündürme sonrası dönemde gerçekleştirilen spermatolojik parametrelerin incelenmesi, sperma motilitesi, plazma membranının fonksiyonel bütünlüğü (hipoosmotik şişme testi - HOST), akrozomal bütünlük (fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin - PNA-FITC), nitrik oksit (NO) seviyeleri (DAF-2/DA), mitokondriyal membran potansiyeli tespiti (5,58,6,68-tetra-chloro-1,18,3,38-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide - JC-1) ve DNA bütünlüğü (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling - TUNEL) tespiti yöntemleri ile tamamlanmıştır. Tüm analizler ve değerlendirmeler aynı araştırmacı tarafından gerçekleştirilmiştir.

Mikroskop incelemeleri

Motilite değerlendirilmesi, ısıtıcı tablası (37°C) olan bir faz kontrast mikroskobu (Olympus BX51-TF – Olympus Optical Co., Ltd., Japonya) (400x büyütme) kullanılarak gerçekleştirildi (28). Plazma membran fonksiyonel bütünlüğünün incelenmesi, arı spermasının kıvrılmış kuyruklarının oranının tespiti yapılarak gerçekleştirildi. 10 µL hacmindeki bir sperma örneği, 100 mOsm osmolariteye sahip bir HOST çözeltisi ile (distile su litresi başına 9 g fruktoz ve 4,9 g sodyum sitrat içeren) 37°C sıcaklıkta 30 dakika boyunca inkübe edildi. Ardından, en az 200 sperma hücresi faz kontrast mikroskobu (Olympus BX51-TF – Olympus Optical Co., Ltd., Japonya) kullanılarak analiz edildi ve kıvrılmış kuyruklara sahip spermatozoaların varlığı kaydedildi (29).

DNA bütünlüğünün değerlendirmesi, TUNEL tekniğini kullanarak gerçekleştirildi ve bunun için In Situ Cell Death Detection Kit with fluorescein (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kullanıldı. Üreticinin talimatlarına bazı değişiklikler yapılarak yönergeler takip edildi (30). Sonuçların elde edilmesi amacıyla DNA parçalanmasına sahip hücrelerin, sağlam olan hücrelere oranı dikkate alındı ve yüzdelik bir sonuç elde edildi.

Flow sitometri incelemeleri

Çalışmanın flow sitometri analizlerindeki ölçümler, 480 nm uyarı dalga boyu ve 525/30 nm, 585/42 nm ve 690/50 nm emisyon dalga boyları kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Cytoflex flow sitometri - Beckman Coulter, Fullerton, CA, ABD). Bu ölçümlerin kaydedilmesi amacıyla CytExpert sürüm 2.4 kullanılmıştır. Sperma hücrelerini, artık hücre popülasyonundan ayırmak için ileri (Forward scatter - FSC) ve yan (Side scatter - SSC) saçılma yöntemi uygulandıktan sonra, analiz edilen sperm hücrelerinin ortalama florasan yoğunluğu ölçülmüştür. Her deney, 10.000 sperm hücresinin değerlendirilmesini içermiştir.

Akrozom bütünlüğünün değerlendirilmesi, fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA) ve propidyum iyodür (PI) içeren çift boyama yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu prosedürde, 5 µL FITC-PNA ve 3 µL PI, 492 µL'lik seyreltilmiş bir sperma çözeltisine eklenmiştir (31).

“Sperm mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) durumunun değerlendirilmesi, lipofilik katyon 5,5',6,6'-tetrachloro1,1',3,3'-tetramethylbenzimidazolylcarbocyanine iyodür (JC-1)” ve propidyum iyodür (PI) ile gerçekleştirilmiştir. Bu teknik, yüksek veya düşük mitokondriyal membran potansiyeli koşullarında belirgin floresan özellikleri sergilemektedir. Özellikle, yüksek mitokondriyal membran potansiyeli koşullarında turuncu floresan sinyal üretirken, düşük mitokondriyal membran potansiyeli koşullarında yeşil floresan sinyal gözlemlenmektedir. Bu deney için, 10 µL JC-1 ve 3 µL PI, 487 µL'lik seyreltilmiş bir sperma çözeltisine eklenmiştir (31).

Nitrik oksit (NO) varlığı ve miktarının belirlenmesi, DAF-2DA/PI boyama yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Protokol, seyreltilmiş bir sperma çözeltisi içeren 492 µL'ye 5 µL DAF-2DA (10 µM) ve 3 µL PI eklenerek hazırlanmış ve flow sitometrik analiz gerçekleştirilmiştir (31).

İstatistiksel analiz

Çalışma verilerinin analizi analizinde SPSS (SPSS 20.0 Windows - SPSS, Şikago, IL, ABD) kullanılmıştır. Ortalama ve ortalamanın standart hatası (SEM) analiz sonucu elde edilmiş ve istatistiksel anlamlılık düzeyi 0,05 olarak kabul edilmiştir. Veri dağılımının normalliğini test etmek için Shapiro-Wilk testi kullanılmıştır. Sperma parametreleri, normalite testine göre ya Kruskal-Wallis ve ardından Mann-Whitney U testi veya One-way ANOVA ve ardından post-hoc Tukey testi kullanılarak analiz edilmiş ve istatistiksel anlamlılık düzeyi açısından değerlendirilerek sonuçlar ifade edilmiştir.

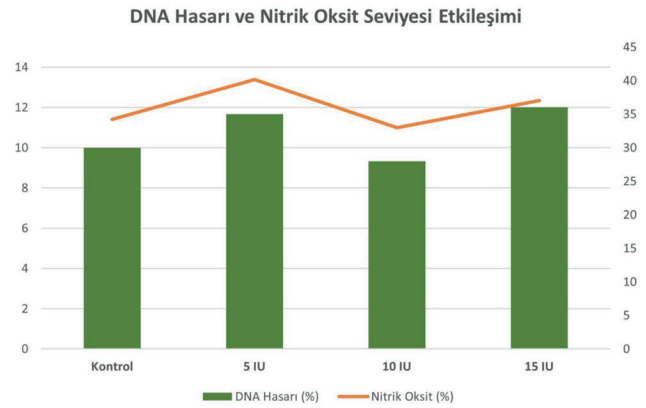
Sonuçlar

Dondurma-çözdürme işlemlerini takip eden süreçte gerçekleştirilen motilite değerlendirmelerinde, insülin eklenmemiş kontrol grubunun diğer çalışma gruplarına göre sayısal olarak daha yüksek bir motilite oranına ulaştığı tespit edildi. I10 grubunun kontrol ile benzer istatistiksel anlam düzeyinde sonuçlara ulaştığı ve aralarında bir fark bulunmadığı tespit edildi ($P>0,05$). I5 ve I15 gruplarında gerçekleştirilen motilite muayeneleri sonucunda insülin eklenmemiş kontrol grubuna oranla istatistiksel anlam düzeyinde fark oluşturacak şekilde daha düşük değerler elde ettiği tespit edildi ($P<0,05$).

Plazma membran fonksiyonel bütünlüğü açısından gerçekleştirilen HOST testi sonuçlarında da kontrol grubunun en yüksek değere ulaştığı tespit edildi. I10 grubunun, kontrol grubu ile benzer istatistiksel anlam düzeyinde olduğu ve fark elde edemediği görüldü ($P>0,05$). Bu testin sonucunda I5 ve I15 grupları kontrol grubuna kıyasla daha düşük plazma membran fonksiyonel bütünlüğü sonucu sundular.

Akrozomal bütünlüğün tespitinde kullanılan PNA-FITC yönteminin sonuçlarına göre, I10 ve I15 grupları kontrol grubuna göre daha düşük sonuçlara ulaştılar ancak istatistiksel anlam düzeyinde fark oluşturacak bir fark ortaya koyamadılar ($P<0,05$). Bulunan bu sonuçların aksine I5 grubu, çalışmada yer alan diğer tüm gruplardan istatistiksel anlam düzeyinde fark yaratacak miktarda düşük bir akrozomal bütünlük sonucu gösterdi ($P>0,05$).

Hücresel antioksidan becerilerinin sergilenmesi açısından önemli bir parametre olan nitrik oksit miktarının ölçüm testlerinin sonucunda sayısal değer olarak en iyi sonucu I10 grubu elde etti ($33,00\pm 1,52$) (Şekil 1). Bu sonuç istatistiksel anlam düzeyi olarak kontrol grubundan ayıramadı ($P>0,05$). Çalışmada yer alan diğer iki deneme grubu olan I5 ve I10 kontrol grubundan daha yüksek değerler ortaya koyarak koruyuculuk anlamında bir fark ortaya çıkartamadılar.



Şekil 1. Çözdürme sonrası dönemde insülin dozuna bağlı DNA hasarı ve Nitrik Oksit seviyesi etkileşimi

İnsülin içeren deneme grupları arasında mitokondriyal membran potansiyeli açısından en yüksek değeri kontrol grubu $72,68\pm 1,16$ ile elde etti (Tablo 1). Bu sonuçlar ile I10 ve I15 grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel fark bulunmazken ($P>0,05$), I5 grubu ile istatistiksel anlam düzeyinde bir fark olacak şekilde ($P<0,05$) ayrıştı.

Tablo 1 – Çözdürme sonrası dönemde insülin eklenerek dondurulmuş arı spermasına ait parametreler

	Motilite (%)	HOST (%)	PNA-FITC (%)	NO (%)	JC1 (%)	TUNEL (%)
Kontrol	55,00±2,89 ^a	71,33±0,93 ^{bc}	70,01±1,22 ^a	34,24±1,10 ^{bc}	72,68±1,16 ^a	10,00±0,58 ^{ab}
5 IU	38,33±3,63 ^b	64,33±1,59 ^b	56,60±2,97 ^b	40,14±1,38 ^b	49,85±3,17 ^b	11,67±0,88 ^{bc}
10 IU	50,00±3,82 ^{bc}	70,67±2,42 ^a	65,90±2,49 ^a	33,00±1,52 ^a	71,86±3,22 ^a	9,33±0,44 ^b
15 IU	43,33±3,63 ^{bc}	66,67±2,46 ^{bc}	63,81±3,06 ^a	37,04±2,39 ^{bc}	63,08±5,57 ^a	12,00±0,58 ^c

Tabloda sunulan değerler ortalama ± ortalamanın standart hatası (SEM) olarak ifade edilmiştir.

a, b ve c: Aynı kolonda, farklı üst karakterlere ait sonuçlar arasında istatistiksel fark bulunmaktadır (P<0,05).

Tabloda sunulan değerler ortalama ± ortalamanın standart hatası (SEM) olarak ifade edilmiştir.

a, b ve c: Aynı kolonda, farklı üst karakterlere ait sonuçlar arasında istatistiksel fark bulunmaktadır (P<0,05).

DNA bütünlüğünün incelendiği TUNEL testinin sonucunda, I10 grubu tüm gruplara kıyasla sayısal olarak daha düşük bir değer sergileyerek, dondurma süreçlerinde DNA üzerine olası hasarları en iyi koruyan grup olarak kaydedildi. Elde edilen bu değer, insülin eklenmiş diğer çalışma gruplarına kıyasla istatistiksel anlam düzeyinde fark yaratsa da (P<0,05) kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir sonuç elde edilemedi (P>0,05).

Tartışma ve Sonuç

Spermanın dondurulması, genetik materyalin korunmasını sağlamak açısından önemli bir rol oynamaktadır. Ancak, dondurma-çözme sürecinin sperma hücrelerinin fertilizasyon yeteneğini olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir (32, 33). Bu olumsuz etkiler, sperm hücrelerinin canlılığında ve hareketliliğinde azalmayla beraber plazma ve akrozomal membran bütünlüklerinde bir düşüş ile kendini göstermektedir (26). Ayrıca, sperma kalitesinin azalması, kraliçelerin üreme niteliklerinin azalmasına sebep olur, bu durum da koloni kayıplarında önemli bir faktör olarak rol oynamaktadır (34).

Motilite, sperma hücrelerinin kraliçe spermatekasına göçünde ve fertilizasyonda önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle motilite, memelilerde olduğu gibi arı spermasının kalitesini değerlendirmek için en yaygın kullanılan spermatolojik parametrelerden biri olarak kullanılmaktadır (35). İnsülin metabolizmasındaki bozuklukların, insanlarda sperma motilitesi ve gonadal fonksiyonlar üzerinde negatif etkileri bulunmaktadır (24). Ayrıca, insülin, glikoliz ve oksidatif fosforilasyona katılarak karbonhidrat ve lipid metabolizması süreçlerinde önemli bir rol oynamaktadır (21, 36). Ayrıca, daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda da insülinin, farklı hayvanlarda ve insanlarda motilite açısından koruyucu olduğu gösterilmiştir (21, 22, 25). Güncel çalışmanın motilite sonuçlarının diğer çalışmalarla (22, 37) uyumlu olmamasının sebebinin, kullanılan sulandırıcıda insülin metabolizmasına etki edecek ve motilite üzerine etkili olacak bir içerik bulunmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Hipozmotik şişme testi (HOST) ile plazma membran bütünlüğünün değerlendirilmesi, güvenilirlik, doğruluk ve mali olarak uygunluk nedeniyle en sık kullanılan sperma parametrelerinden birisi olarak değerlendirilmektedir (22, 38). Sperm hücrelerinin membran bütünlüğü ve motilite arasındaki doğal bağlantı yönteminin yaygın olarak kullanılması yol açmaktadır (39, 40). Sperma dondurma işlemi sırasında meydana gelen soğuk şoku, kristalleşme, osmotik stres ve lipid peroksidasyon gibi olaylar, membran geçirgenliği ve bütünlüğü üzerinde olumsuz etkilere sahiptir. Bu nedenle, hücre hasardan kaçınmak için dondurma işlemi sırasında bütünlüğün korunması son derece önemlidir (15, 26). Gerçekleştirilen çalışmada kullanılan I10 grubu, diğer dozlara kıyasla plazma membran bütünlüğünü daha fazla korumuş olsa da, kontrol grubu ile koruma oranları arasında bir fark tespit edilmemiştir. Elde edilen bu bulgu, memeli hayvanlarda daha önce gerçekleştirilen çalışmaların sonuçları ile benzerlik göstermemektedir (21, 22, 41). Güncel çalışmada kullanılan insülin dozlarının, memeli hayvanların aksine, arı spermasının hücre membranlarında yeterli koruyuculuğu sağlayacak eşik düzeyine ulaşmamasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu bilgi, Capello ve ark. (42) tarafından gerçekleştirilen çalışmanın sonuçları ile de desteklenmektedir.

Akrozomal enzimler, fertilizasyon süreçlerinde çok önemli bir role sahiptir ve akrozomal bütünlük, sperma hücrelerinin fertilite yeteneğinin bir göstergesi olarak hizmet etmektedir (43). Hücrelerin dondurulması esnasında, önceden gerçekleşen kapasitasyonu takiben akrozom reaksiyonunu indüklenir (44); bu sebeple de akrozomal bütünlük spermanın değerlendirilmesinde kilit bir faktördür (45). İnsülinin insan spermatozoidlerinde kolesterol salınımı ve akrozom reaksiyonu ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (42). Mevcut çalışma, arı sperması dondurma sulandırıcılarına eklenen 10 ve 15 IU dozdaki insülinin kontrol grubu ile benzer istatistiksel anlam düzeyinde akrozomal bütünlük değerlerine ulaştığını göstermiştir. Akrozomal bütünlüğün, akrozom reaksiyonunun ve dolayısıyla fertilitenin ana bileşenidir (26) ve insülinin etkisini değerlendiren önceki yayınlar (hayvan veya insan spermatozoitleri üzerinde) bu sonucu desteklemektedir (22, 24, 37). Dondurma solüsyonlarına insülin ilavesinin arı spermasının akrozomal bütünlük açısından destekleyici sonuçlara ulaşmamasının sebebinin daha önceden gerçekleştirilen ve güncel çalışma ile benzer sonuçlar bulan bir çalışmada (21) da ifade edildiği üzere, yüksek dozlarda kullanılan insülinin akrozomal yapı üzerine olası pozitif etkilerinin güncel çalışmada kullanılan dozlarla yakalanamadığı düşünülmektedir.

Dondurma işlemi sırasında yüksek düzeylerdeki ATP

mevcudu, sperma hücrelerinin bu süreçlerin sonucunda daha yüksek bir yaşama olasılığına sahip olmalarını sağlamaktadır. Bu durum da artan fertilité sonuçları ile erkek gamet hücrelerinin temel hedefine ulaşmada katkıda bulunan daha yüksek canlılık oranlarına ulaşılmasına destek olmaktadır (46). Memeli sperma hücrelerinde, mitokondrilerin aktive edilmesinin, sperma motilitesinin artması ve hücrelerin yaşam ömrünün uzaması gibi olumlu etkileri olduğu gözlemlenmiştir. Öte yandan, arı sperması, hücrelerin enerji sentezini sürdürmede rol oynayan mitokondri türevlerini içermektedir (35). Mevcut çalışmada, insülin gruplarından elde edilen (PI boyama sonucunda canlı olduğu tespit edilmiş hücrelerde) mitokondriyel membran potansiyeli sonuçlarının kontrol grubundan daha üstün olmayan sonuçlar elde ettiğini göstermiştir. Arı spermasının dondurulması süreçlerinde, sulandırıcılara insülin eklenmesinin enerji metabolizmasına etkilerine dair çalışma bulunmaması, memelilerde tespit edilen pozitif etkilerin aksine, bu alanda derinlemesine gerçekleştirilecek araştırmalara ihtiyaç duymaktadır.

Sperma dondurma işlemi, serbest radikallerin ortaya çıktığı ve hücrelerin membranını hedef alan ve beraberinde lipid peroksidasyonuna karşı duyarlılığını artıran bir oksidatif stres kaynağını ortaya çıkartmaktadır (47, 48). Nitrik oksit (NO), üreme süreçlerini de içeren çeşitli fizyolojik olaylarda önemli roller oynayan önemli bir moleküldür. Özellikle, spermatogenezis, ereksiyon, folikül olgunlaşması ve ovulasyon gibi fonksiyonlarla ilişkili olduğu bilinmektedir (49-51). İnsülinin, son zamanlarda antioksidan etkileri memeli dokularında gösterilmiştir (52). Gerçekleştirilen çalışmada, çözdürme sonrası dönemde, I10 grubu nitrik oksit seviyeleri sayısal değer bakımından kontrol grubundan daha iyi sonuçlar sunmuş olsa da insülin eklenmiş gruplar, kontrol grubundan istatistiki manada pozitif yönde ayrılmamıştır. Literatürde bu bilgiye yönelik kaynak varlığı Onder ve ark. (22) boğa spermasının dondurulması konusunda gerçekleştirdikleri çalışma haricinde kısıtlıdır. Anılan araştırmacılar da, güncel çalışma ile benzer olmayan sonuçlara ulaşmıştır. İnsanlarda gerçekleştirilen ve Lampiao ve du Plessis, 2008 (40) tarafından yürütülen çalışmada ise, mevcut çalışma sonuçları ile benzer olan ve insülin varlığının nitrik oksit seviyelerini artırdığını işaret eden sonuçlar elde edilmiştir.

Spermanın dondurulması işlemleri sırasında DNA hasarını en aza indirmek, başarılı bir genetik bilgi transferi ve fertilizasyon sonucu için önemlidir. Sperma DNA bütünlüğü, hücrelerin fonksiyonunda kritik bir rol oynamaktadır. DNA bütünlüğünün değerlendirilmesi, ciddi hasar görmüş hücreleri doğru bir şekilde tanımlamak açısından

önem arz etmektedir (53). Gerçekleştirilen çalışmada I10 grubu sayısal değer olarak en düşük DNA hasarına sahip olsa da, hiçbir çalışma grubu kontrol grubu ayrışacak istatistiki ve koruyucu nitelikli bir sonuç elde edememiştir. Gerçekleştirilen literatür incelemelerinde, insülinin arı sperması sulandırıcılarına eklenmesi ile DNA bütünlüğünü değerlendiren bir çalışmaya da rastlanamamıştır. Diğer yandan, Shokri ve ark. (25), insan spermasında insülinin DNA bütünlüğü üzerindeki olumlu etkilerini tespit ettikleri çalışmayı yayınlamıştır. Bu bilginin, çalışmamızda insülin ile DNA bütünlüğü arasındaki etkileşim hakkında bulgulara katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, arı spermasının dondurulmasında kullanılan soya lesitini temelli sulandırıcılara insülin eklenmesinin, spermanın değerlendirilmesinde kullanılan çeşitli parametreler üzerine kontrol grubu ile benzer sonuçta etkiler yarattığı tespit edilmiştir. Geçmiş yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü etkileşiminin fertilité ve çeşitli biyolojik süreçlere etkisi araştırılmış bu etkileşimin down-regülasyonunun üreme becerisinde azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir (54). Güncel çalışmanın sonuçlarının bu etkileşimden kaynaklandığı düşünülmektedir. Arı spermasının, dondurulmasının dahi güncel bir konu olması ve bu alanda daha başarılı sonuçlar etmek açısından gerçekleştirilmesi gereken çalışmaların artırılması gerektiği gerçeği kaçınılmaz bir olgudur. Mevcut çalışmada soya lesitini temelli sulandırıcılara insülin eklenerek elde edilen sonuçların, spermatolojik parametrelere pozitif yönlü katkıları olmasa da, bu amaç doğrultusunda alana bir bakış kazandıracığı düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından TGA – 2022 - 718 proje numarası ile desteklenmiştir.

References

1. Henry LC, Álvaro D rebolledo, Karen C medina, Jorge V rodríguez, Francisco E valente. Effect of egg yolk on sperm cryopreservation of drone (*Apis mellifera*). *Abanico Vet.* 2019;9(December):1-11. doi:10.21929/abavet2019.921
2. Stankus T. A review and bibliography of the literature of honey bee colony collapse disorder: A poorly understood epidemic that Clearly Threatens the successful pollination of billions of dollars of crops in America. *J Agric Food Inf.* 2008;9(2):115-143. doi:10.1080/10496500802173939

3. Gül A, Şahinler N, Onal AG, Hopkins BK, Sheppard WS. Effects of diluents and plasma on honey bee (*Apis mellifera* L.) drone frozen-thawed semen fertility. *Theriogenology*. 2017;101:109-113. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.06.020
4. Woyke J, Jasinski Z. Influence of Age of Drones on the Results of Instrumental Insemination of Honeybee Queens. *Apidologie*. 1978;9(3):203-212. doi:10.1051/apido:19780304
5. Cobey SW. Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. *Apidologie*. 2007;38(4):390-410. doi:10.1051/apido:2007029
6. Alçay S, Üstüner B, Çakmak İ, Çakmak S, Nur Z. Effects of Various Cryoprotective Agents on Post-Thaw Drone Semen Quality. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2015;21(1):31-35. doi:10.9775/kvfd.2014.11515
7. Almadaly EA, Tawfik FS, El-Kon II, Heleil BA, Fatouh ESM. Effect of different cryoprotectants on the post-thaw sperm characteristics and in vivo fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Slov Vet Res*. 2019;56(February):541-551. doi:10.26873/SVR-792-2019
8. Tonieto RA, Goularte KL, Gastal GDA, Schiavon RS, Deschamps JC, Lucia T. Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. *Small Rumin Res*. 2010;93(2-3):206-209. doi:10.1016/j.smallrumres.2010.05.003
9. Abdelkader F Ben, Kairo G, Bonnet M, Barbouche N, Belzunces LP, Brunet JL. Effects of clothianidin on antioxidant enzyme activities and malondialdehyde level in honey bee drone semen. *J Apic Res*. 2019;58(5):740-745. doi:10.1080/00218839.2019.1655182
10. Kulaksiz R, Daskin AD. In vitro evaluation of Saanen buck semen frozen in different extenders supplemented with various antioxidants. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*. 2010;57:151-156. doi:10.1501/Vetfak_0000002369
11. Borsuk G, Kozłowska M, Anusiewicz M, Paleolog J. *Nosema ceranae* changes semen characteristics and damages sperm DNA in honeybee drones. *Invertebr Surviv J*. 2018;15:197-202.
12. Ciereszko A, Wilde J, Dietrich GJ, et al. Sperm parameters of honeybee drones exposed to imidacloprid. *Apidologie*. 2017;48(2):211-222. doi:10.1007/s13592-016-0466-2
13. Toker MB, Alçay S, Gokce E, Ustuner B. Cryopreservation of ram semen with antioxidant supplemented soybean lecithin-based extenders and impacts on incubation resilience. *Cryobiology*. 2016;72(3):205-209. doi:10.1016/j.cryobiol.2016.05.001
14. Alçay S, Toker MB, Onder NT, Gokce E. Royal jelly supplemented soybean lecithin-based extenders improve post-thaw quality and incubation resilience of goat spermatozoa. *Cryobiology*. 2017;74:81-85. doi:10.1016/j.cryobiol.2016.11.011
15. Taylor MA, Guzmán-Novoa E, Morfin N, Buhr MM. Improving viability of cryopreserved honey bee (*Apis mellifera* L.) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios. *Theriogenology*. 2009;72(2):149-159. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.02.012
16. Forouzanfar M, Sharafi M, Hosseini SM, et al. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*. 2010;73(4):480-487. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.10.005
17. Vidal AH, Batista AM, da Silva ECB, et al. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. *Small Rumin Res*. 2013;109(1):47-51. doi:10.1016/j.smallrumres.2012.07.022
18. Aktar A, Alçay S. L-Karnitin İlave Edilmiş Sulandırıcıların Dondurma-Çözdürme Sonrası Teke Spermasının Spermatolojik Parametleri Üzerine Etkisi. *J Res Vet Med*. 2022;41(1):37-42. doi:10.30782/jrv.999299
19. Andò S, Aquila S. Arguments raised by the recent discovery that insulin and leptin are expressed in and secreted by human ejaculated spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol*. 2005;245(1-2):1-6. doi:10.1016/j.mce.2005.09.011
20. Pinto SCC, Souza FA, Arruda RP, et al. Impact of adding different concentrations of IGF-I and insulin to the semen extender on bull sperm quality post-cryopreservation. *Arq Bras Med Vet e Zootec*. 2023;75(5):771-786. doi:10.1590/1678-4162-12946
21. van Tilburg MF, de Oliveira RV, Gadelha CRF, et al. Effects of insulin on sperm cell quality in ram semen cooled at 5°C. *Semin Agrar*. 2021;42(6):3802-3812. doi:10.5433/1679-0359.2021v42n6Supl2p3803
22. Önder NT, Gökdemir T, Kiliç MC, et al. Insulin and Bull Sperm Interactions During Cryopreservation. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2023;29(4):401-405. doi:10.9775/kvfd.2023.29623
23. Aquila S, Gentile M, Middea E, Catalano S, Andò S. Autocrine regulation of insulin secretion in human ejaculated spermatozoa. *Endocrinology*. 2005;146(2):552-557. doi:10.1210/en.2004-1252
24. Lampiao F, Du Plessis SS. Insulin and leptin enhance human sperm motility, acrosome reaction and nitric oxide production. *Asian J Androl*. 2008;10(5):799-807. doi:10.1111/j.1745-7262.2008.00421.x
25. Shokri S, Ebrahimi SM, Ziaei-pour S, Nejatbakhsh R.

- Effect of insulin on functional parameters of human cryopreserved sperms. *Cryobiology*. 2019;87(February):68-73. doi:10.1016/j.cryobiol.2019.02.002
26. Alçay S, Cakmak S, Cakmak I, et al. L-carnitine supplemented extenders improve post-thawing quality of honey bee drone (*Apis mellifera*) spermatozoa[1]. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2021;27(4):489-493. doi:10.9775/kvfd.2021.25756
 27. Alçay S, Çakmak S, Çakmak İ, et al. Drone semen cryopreservation with protein supplemented TL-hepes based extender. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2019;25(4):553-557. doi:10.9775/kvfd.2018.21311
 28. Nur Z, Seven Çakmak S, Çakmak İ, et al. Effects of Trehalose Supplementation on Post-Thaw Sperm Quality of Honey Bee Drones. *Online J Anim Feed Res*. 2020;10(5):191-196. doi:10.51227/ojafr.2020.27
 29. Alçay S, Cakmak S, Cakmak I, et al. Successful cryopreservation of honey bee drone spermatozoa with royal jelly supplemented extenders. *Cryobiology*. 2019;87(October 2018):28-31. doi:10.1016/j.cryobiol.2019.03.005
 30. Wegener J, May T, Kamp G, Bienefeld K. A successful new approach to honeybee semen cryopreservation. *Cryobiology*. 2014;69(2):236-242. doi:10.1016/j.cryobiol.2014.07.011
 31. Gürler H, Malama E, Heppelmann M, et al. Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*. 2015;86(2):562-571. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.02.007
 32. Nur Z, Zik B, Ustuner B, Sagirkaya H, Ozguden CG. Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. *Theriogenology*. 2010;73(9):1267-1275. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.12.007
 33. Alçay S, Toker MB, Gökçe E, Önder NT, Üstüner B, Nur Z. Long term incubation resilience of post-thaw ram semen diluted with lecithin-based extender supplemented with bovine serum albumin. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2019;25(3):291-297. doi:10.9775/kvfd.2018.20843
 34. Çakmak İ. Beekeeping and Recent Colony Losses in Turkey. *Uludağ Arıcılık Derg*. 2016;16(1):31-48. doi:10.31467/uluaricilik.379276
 35. Yániz JL, Silvestre MA, Santolaria P. Sperm quality assessment in honey bee drones. *Biology (Basel)*. 2020;9(7):1-16. doi:10.3390/biology9070174
 36. Baumgard LH, Hausman GJ, Sanz Fernandez M V. Insulin: Pancreatic secretion and adipocyte regulation. *Domest Anim Endocrinol*. 2016;54:76-84. doi:10.1016/j.domaniend.2015.07.001
 37. Önder NT, Gökdemir T, Kılıç MC, Yıldız S, Öztürkler Y. Effects of Insulin Lispro on Ram Semen Cryopreservation. *Kocatepe Vet J*. 2023;10:204-212. doi:10.30607/kvj.1347383
 38. Vazquez JM, Martinez EA, Martinez P, Garcia-Artiga C, Roca J. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology*. 1997;47(4):913-922. doi:10.1016/S0093-691X(97)00046-0
 39. Fraser L, Gorszyczaruk K, Strzerek J. Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality. *Reprod Domest Anim*. 2001;36(6):325-329. doi:10.1046/j.1439-0531.2001.00310.x
 40. Yániz J, Palacín I, Vicente-Fiel S, Gosalvez J, López-Fernández C, Santolaria P. Comparison of membrane-permeant fluorescent probes for sperm viability assessment in the ram. *Reprod Domest Anim*. 2013;48(4):598-603. doi:10.1111/rda.12132
 41. Önder NT, Gökdemir T, Kiliç MC, Yildiz S, Öztürkler Y. Effects of Insulin Lispro on Ram Semen During Cryopreservation. *Kocatepe Vet J*. 2017;10:204-212. doi:10.30607/kvj.
 42. Cappello AR, Guido C, Santoro A, et al. The mitochondrial citrate carrier (CIC) is present and regulates insulin secretion by human male gamete. *Endocrinology*. 2012;153(4):1743-1754. doi:10.1210/en.2011-1562
 43. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*. 2000;60-61:481-492. doi:10.1016/S0378-4320(00)00099-3
 44. Neild DM, Gadella BM, Chaves MG, Miragaya MH, Colenbrander B, Agüero A. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology*. 2003;59(8):1693-1705. doi:10.1016/S0093-691X(02)01231-1
 45. Ustuner B, Gokce E, Toker MB, et al. Effect of sperm pooling with seminal plasma collected in breeding or nonbreeding season on Saanen goat sperm cryosurvival. *Andrologia*. 2018;50(4). doi:10.1111/and.12968
 46. Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci*. 1995;37(3-4):185-249. doi:10.1016/0378-4320(94)01327-I
 47. Sharafi M, Zhandi M, Shahverdi A, Shakeri M. Beneficial effects of nitric oxide induced mild oxidative stress on post-thawed bull semen quality. *Int J Fertil Steril*. 2015;9(2):230-237.
 48. Ball BA. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in

- the horse. *Anim Reprod Sci.* 2008;107(3-4):257-267. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.04.014
49. Ortega Ferrusola C, González Fernandez L, Macías García B, et al. Effect of cryopreservation on nitric oxide production by stallion spermatozoa. *Biol Reprod.* 2009;81(6):1106-1111. doi:10.1095/biolreprod.109.078220
50. Herrero MB, Gagnon C. Nitric oxide: A novel mediator of sperm function. *J Androl.* 2001;22(3):349-356. doi:10.1002/j.1939-4640.2001.tb02188.x
51. Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum Reprod Update.* 1998;4(1):3-24. doi:10.1093/humupd/4.1.3
52. Monnier L, Hanefeld M, Schnell O, Colette C, Owens D. Insulin and atherosclerosis: How are they related? *Diabetes Metab.* 2013;39(2):111-117. doi:10.1016/j.diabet.2013.02.001
53. López-Fernández C, Fernández JL, Gosálbez A, et al. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals. III. *Ram. Theriogenology.* 2008;70(6):898-908. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.04.055
54. Corona M, Velarde RA, Remolina S, et al. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(17):7128-7133. doi:10.1073/pnas.0701909104