

## Koç spermasının dondurulmasına alfa lipoik asit ve trehalozun etkisi

### Effect of alpha lipoic acid and trehalose on ram semen cryopreservation

#### ÖZET

Bu çalışmada, koç sperma sulandırıcısına farklı dozlardaki Alfa Lipoik asit (ALA) ve Trehalozun eklenerek dondurulup çözülmesinden sonra spermatozoon motilitesi, plazma membran ve akrozom bütünlüğü (PMAI), mitokondrial membran potansiyeli ve mitokondrial reaktif oksijen türleri üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. 10 adet Pırlak koçtan suni vajen kullanılarak alınan spermalar üç eşit parçaya bölünerek Alfa lipoik asit (1 mM), Trehaloz (100 mM) içeren ve hiçbir katkı maddesi içermeyen (kontrol) sulandırıcılar ile 5x10<sup>8</sup>/ml spermatozoa olacak şekilde sulandırıldı. Spermalar +4°C'de yaklaşık 2 saat ekibrasyona bırakıldı, sıvı azot buharında (-120 °C) donduruldu, 37 °C'de 30 saniyede çözülürdü. Çözülürken sperma örneklerinde motilite, 37 °C'de ısıtma tablalı faz kontrast mikroskop ile subjektif olarak, PMAI, mitokondrial membran potansiyeli ve mitokondrial reaktif oksijen türleri (MitoSOX+) flow sitometre ile değerlendirildi. En düşük motilite kontrol grubunda tespit edilirken en yüksek plazma membran akrozom bütünlüğü Trehaloz ve ALA gruplarında belirlendi (P<0,05). En düşük Hmmp ve en yüksek Lmmp değeri kontrol grubunda tespit edilirken en düşük MitoSOX+ Trehaloz grubunda belirlendi (P<0,05). Sonuç olarak; Pırlak koçlarda sezon dışı spermanın dondurulmasında ALA ve Trehalozun spermatolojik parametreleri iyileştirdiği belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Alfa Lipoik Asit, trehaloz, dondurma, çözülme, sperma

#### ABSTRACT

In this study, it was aimed to investigate the effects on spermatozoon motility, plasma membrane and acrosome integrity (PMAI), mitochondrial membrane potential and mitochondrial reactive oxygen species after freezing and thawing by adding different doses of Alpha Lipoic acid (ALA) and Trehalose to ram semen extender. Semen was collected from 10 Pırlak rams using artificial vagina, divided into three equal parts, extended with extender containing Alpha lipoic acid (1 mM), Trehalose (100 mM) and no additives (control) to contain 5x10<sup>8</sup>/ ml spermatozoa. Sperm was equilibrated about 2 hours at + 4 ° C, frozen in liquid nitrogen vapor (-120 ° C), thawed in 30 seconds at 37 ° C. Thawed sperm sample were evaluated. Subjective motility evaluated by phase contrast microscope with heating table at 37 ° C, PMAI, mitochondrial membrane potential and mitochondrial reactive oxygen species were evaluated by flow cytometer. While the lowest motility was detected in the control group, the highest plasma membrane integrity was found in the Trehalose group (P <0,05). While the lowest Hmmp and the highest Lmmp value were detected in the control group, the lowest MitoSOX+ was detected in Trehalose group. It has been determined that ALA and Trehalose improve spermatological parameters in Pırlak ram semen after freezing and thawing procedure on non-breeding season.

**Keywords:** Alpha Lipoic Acid, trehalose, freezing, thawing, semen

#### How to cite this article

Avdatek, F., İnanç, ME., Yeni, D., Güngör, Ş., Acar, A., Ata, A. (2020). Koç spermasının dondurulmasına alfa lipoik asit ve trehalozun etkisi. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 5(3), 121-127. <https://doi.org/10.31797/vetbio.811078>

#### Research Article

Fatih AVDATEK<sup>1a</sup>  
Muahmmmed Enes İNANÇ<sup>2b</sup>  
Deniz YENİ<sup>1c</sup>  
Şükrü GÜNGÖR<sup>2d</sup>  
Abuzer ACAR<sup>3e</sup>  
Ayhan ATA<sup>2f</sup>

<sup>1</sup>Department of Reproduction and Artificial Insemination, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, Turkey

<sup>2</sup>Department of Reproduction and Artificial Insemination, Faculty of Veterinary Medicine, Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Burdur

<sup>3</sup>Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, Turkey

#### ORCID-

<sup>a</sup>[0000-0003-2345-8826](https://orcid.org/0000-0003-2345-8826)

<sup>b</sup>[0000-0001-6954-6309](https://orcid.org/0000-0001-6954-6309)

<sup>c</sup>[0000-0002-9105-5677](https://orcid.org/0000-0002-9105-5677)

<sup>d</sup>[0000-0003-3460-522X](https://orcid.org/0000-0003-3460-522X)

<sup>e</sup>[0000-0002-4235-2763](https://orcid.org/0000-0002-4235-2763)

<sup>f</sup>[0000-0003-0590-5995](https://orcid.org/0000-0003-0590-5995)

#### Correspondence

Fatih AVDATEK

[favdatek@aku.edu.tr](mailto:favdatek@aku.edu.tr)

#### Article info

Submission: 16-10-2020

Accepted: 17-12-2020

Online First: 23-12-2020

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0

International License



# GİRİŞ

Spermanın dondurulması üreme devamlılığı için yaygın olarak kullanılan reprodüktif bir biyoteknolojidir. Spermanın dondurulduktan sonra çözüm sonu canlılığı ve kalitesi dondurulma sırasında kullanılan sulandırıcı bileşenlerine ve kryoprotektanlara bağlı olduğu açıktır (Salamon ve Maxwell, 2000). Koç spermasının dondurulmasında değişik sulandırıcı ve dondurma protokolleri kullanılmasına rağmen taze spermanın fertilizasyon sonuçları ile kıyaslanamamaktadır (Özmen vd., 2020). Bunun en önemli sebepleri arasında spermanın dondurulması sırasında fizyolojik sınırlardan daha yüksek düzeyde reaktif oksijen türleri (ROS) üretilerek spermanın kalitesini ve fertilizasyon yeteneğini etkilemesi gösterilmektedir (Ahmed vd., 2019, Ahmed vd., 2020). Buradan hareket ederek çalışmada trehaloz ve Alfa Lipoik Asit (ALA) kullanılarak sulandırıcı bileşenleri oluşturulmuştur.

Sulandırıcılarda kullanılan yumurta sarısı ve gliserolün olumsuz etkilerinden spermanın korunmasını sağlamak için değişik şekerler kullanılmaktadır. Bu şekerlerden dissakkarit yapısında olan trehaloz, penetre olmayan bir süperoksit dismutaz, glutatyon ve katalaz gibi antioksidan enzim aktivitesini artırarak sperma membranlarını lipit peroksidasyon ve oksidatif hasardan koruyabileceği bildirilmiştir (Iqbal vd., 2016). Ayrıca, bu koruyucu etkisini sulandırıcıların tonisitesini artırarak (Güngör vd., 2016) ve membran fosfolipitleri ile spesifik iletişim kurarak (Iqbal vd., 2018) plazma membranlarını koruduğu belirtilmektedir. Trehaloz koçlarda çözüm sonu spermada motilite, canlılık, membran ve morfolojik bütünlüğü artırdığı bildirilmektedir (Bucak ve Tekin, 2007; Uysal ve Bucak, 2009; Avdatek ve Gündoğan, 2018).

Çalışmada kullanılan bir diğer madde ALA (1,2-dithiollone-3-pentanoic acid) mitokondriler

de koenzim olarak a ketoglutarat ve piruvat dehidrogenaz aktivitelerinde önemli rol oynamaktadır (Avdatek vd., 2019). Bütün prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde sentezlenebilen antioksidan aktivitesi vasıtası ile oksidatif hasarı azaltıcı etkisi olduğu belirtilmektedir (Biewenga vd., 1997). ALA serbest radikalleri hücrelerde indirgenmiş glutatyon seviyesinin artışı ve lipit peroksidasyon seviyesinin azaltılması şeklinde bir reaksiyon göstererek normal bir antioksidan profili çizmektedir (El-Beshbishy vd., 2011).

Bu çalışmanın amacı, trehaloz ve ALA'nın koç spermasının çözüm sonu spermanın motilite, plazma membran ve akrozom bütünlüğü, mitokondrial aktivasyon ve mitokondrial reaktif oksijen türlerinin seviyesine etkisinin belirlenmesidir.

## MATERYAL VE METOT

Araştırma Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvancılık Uygulama ve Araştırma Merkezi bünyesindeki 2-3 yaşlı 10 adet Pırlak koçlarda yapıldı. Koçlar yarı açık besi şartlarında tane-kaba yem karışık olarak beslenirken su adlibitum olarak verildi. Koçlardan aşım sezonu dışında haftada iki kez elektroejakülatör yardımıyla alındı. Her bir koçtan alınan nativ spermalar makroskobik ve mikroskobik yönden muayene edilerek, normospermi (%80 motilite,  $5 \times 10^8$ /ml yoğunluk, sperma miktarı en az 0,5 ml) değerleri gösteren ejakülatlar birleştirildi. Birleştirilen ejakülatlar daha sonra 3 eşit gruba bölünerek (split ejakulat); biri kontrol grubu olarak ayrıldı, tris yumurta sarısı sulandırıcısı (TYS) ile sulandırıldı (Avdatek ve Gündoğan, 2018) diğer gruplar alfa lipoik asit (1 mM) ve trehaloz (100 mM) içeren TYS solüsyonu ile ml'de  $5 \times 10^8$  olacak şekilde sulandırıldı. Çalışmadaki sulandırıcı grupları ile sulandırılan spermaların sıcaklığı +4 °C'ye düşürüldükten sonra 2 saat ekilibrasyonda tutuldu. Ekilibrasyon süresi sonunda payetler sıvı azot buharında -120°C'de 15 dakikada dondurulduktan sonra sıvı azot içinde saklandı.

Sıvı azot içerisinde saklanan payetler, her deney grubu için 37°C'deki su banyosunda 30 saniye çözdürüldü. Çözdürme sonrası motilite faz kontrast mikroskopta incelenirken, plazma membran-akrozom.bütünlüğü değerlendirilmesi (PMAI) için FITC-PNA/PI, mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi, yüksek mitokondriyal aktivasyon (HMMP) amacıyla JC-1/PI floresan boyaması, mitokondri tarafından üretilen reaktif oksijen türlerinin belirlenmesinde MitoSOX Red/PI floresan boyamaları ile flow sitometri cihazında (Beckman Culture, Cytotflex®) değerlendirildi.

### **Motilite**

Motilite muayenesi; ısıtmalı tablalı (37°C) faz-kontrast mikroskopta (x400) (Nicon Eclips E600) 7 farklı mikroskop sahası incelenerek yapıldı. Muayene ortalamaları alındı ve motilite sonucu subjektif olarak, (%) belirlendi (Avdatek ve Gündoğan, 2018).

### **Flow sitometri analizleri**

Flow sitometri analizleri Cytotflex Flow sitometri (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) ile yapıldı. Sperma örnekleri 488 nm (50 mW laser output)'lik tek lazer ve üç renkli 525 ±40, 585±42, 610±20 nm filtreler ile değerlendirildi.

Çalışma solüsyonları 100 µg/mL fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA [L7381], 2.99 mM propidium iodide (PI, [L7011, molecular probes, Invitrogen],0,153mM 5,5',6,6'-tetrachloro 1,1'3,3'-tetramethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1, T3198, molecular probes, Invitrogen) ve 5 mM MitoSOX Red (M36008, molecular probes, Invitrogen) DMSO ile hazırlanarak 0.22 µM Millipore Millex CV filtrelerden geçirildikten sonra 30 µL porsiyonlara ayrılarak -20 °C'de saklandı.

### **Plazma membran ve akrozom bütünlüğünün değerlendirilmesi (PMAI)**

Çift boyama yönteminin kullanıldığı, FITC-PNA/PI boyamada, spermada akrozom ve plazma membran bütünlüğü değerlendirildi. 5 µL FITC-PNA (100 µg/mL) ve 3 µL PI (2.99 mM) 492 µL fosfat buffer solüsyonuna (PBS) eklendi, daha sonra 10 µL sperma süspansiyonu bu karışıma eklenerek finalde 5x10<sup>6</sup> sperm/mL konsantrasyonunda olacak şekilde sulandırıldı. Sperma örnekleri 37 °C'de 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildi. Debris (sperma olmayan alanlar) kapı alınarak uzaklaştırıldı. Plazma membran ve akrozom bütünlüğünün değerlendirilmesi (PMAI) CytExpert 2.3 software (Beckman Coulter) analizi ile gerçekleştirildi.

### **Mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi**

Spermada Mitokondriyal membrane potansiyeli JC-1 boyaması ile yapıldı. 10 µL JC-1 (0.153 mM) 490 µL PBS solüsyonuna eklendi, daha sonra 10 µL sperma bu karışıma eklenerek finalde 5x10<sup>6</sup> sperm/mL konsantrasyonunda olacak şekilde sulandırıldı. Sperma örnekleri 37 °C'de 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildi. Debris (sperma olmayan alanlar) kapı alınarak uzaklaştırıldı, Yüksek mitokondriyal aktivasyon (YMA, HMMP) ve düşük mitokondriyal aktivasyon (DMA, LMMP) CytExpert 2.3 software (Beckman Coulter) analizi ile gerçekleştirildi.

### **Mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin seviyesinin belirlenmesi**

Spermada Mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin seviyesi MitoSOX Red/PI boyaması ile yapıldı. 5 µL MitoSOX Red (5 mM) ve 3 µL PI (2.99 mM) 492 µL PBS solüsyonuna eklendi, daha sonra 10 µL sperma süspansiyonu bu karışıma eklenerek finalde 5x10<sup>6</sup> sperm/mL konsantrasyonunda olacak şekilde sulandırıldı. Sperma örnekleri 37 °C'de 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildi. Debris (sperma olmayan alanlar) kapı alınarak uzaklaştırıldı, MitoSOX+ (mitokondriyal reaktif oksijen türleri seviyesi)

CytExpert 2.3 software (Beckman Coulter) analizi ile gerçekleştirildi.

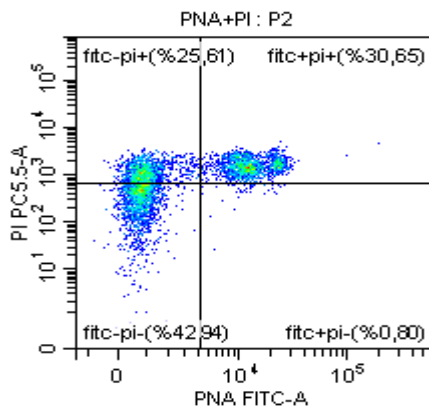
### İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin önemlilik testlerinden önce, tüm değişkenler parametrik test varsayımlarından normallik yönünden Shapiro Wilks test ile, varyansların homojenliği yönünden ise Levene's testi ile incelendi. Normal dağılan değişkenler arası farklılığın istatistiksel açıdan kontrolü tek varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı. Gruplar arası farklılığın anlamlı çıktığı değişkenler için ileri aşama (post-hoc) testi olarak Duncan testi'nden yararlanıldı. Tüm istatistiksel analizler minimum %5 hata payı ile incelendi. SPSS 22.0 paket programından yararlanıldı.  $P < 0,05$  düzeyi anlamlı olarak kabul edildi. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi.

**Tablo 1.** Alfa lipoik asit ve Trehaloz ile dondurulan koç spermalarının çözüm sonu spermatolojik parametre (%) değerleri. Pmai: Plazma membran ve akrozom bütünlüğü, Hmmp: High mitochondrial membran potential (Yüksek mitokondrial membran potansiyeli), Lmmp: Low mitochondrial membran potential (Düşük mitokondrial membran potansiyeli), MitoSOX+ mitokondrial reaktif oksijen türleri seviyesi

Grup	Motilite	PMAI	HMMP	LMMP	MitoSOX+
Kontrol	36.87 $\pm$ 9.61 <sup>a</sup>	24.08 $\pm$ 2.75 <sup>a</sup>	10.01 $\pm$ 1.26 <sup>a</sup>	89.99 $\pm$ 1.26 <sup>a</sup>	88.83 $\pm$ 3.99 <sup>c</sup>
Alfa Lipoik Asit (1 mM)	51.25 $\pm$ 6.40 <sup>b</sup>	35.03 $\pm$ 1.97 <sup>b</sup>	22.79 $\pm$ 2.14 <sup>b</sup>	77.20 $\pm$ 2.14 <sup>b</sup>	73.61 $\pm$ 9.03 <sup>b</sup>
Trehaloz (100 mM)	51.25 $\pm$ 7.90 <sup>b</sup>	35.28 $\pm$ 1.57 <sup>b</sup>	23.67 $\pm$ 2.82 <sup>b</sup>	76.32 $\pm$ 2.82 <sup>b</sup>	68.73 $\pm$ 2.93 <sup>a</sup>
p	*	*	*	*	*

a-b-c:Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar istatistiksel olarak farklıdır ( $p < 0,05$ ).



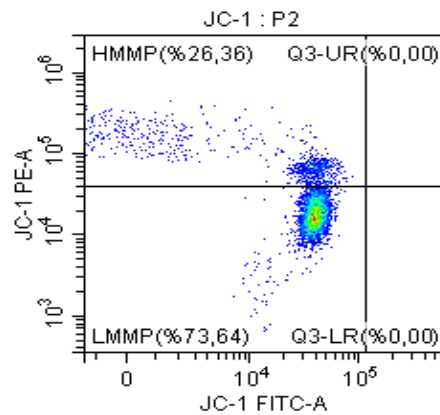
**Şekil 1.** Pırlak Koçlarda Çözüm sonu plazma membran akrozom bütünlüğünün flow sitometrik analizi FITC-PI-: Plazma membran ve akrozom sağlam, FITC+PI-: Plazma membran sağlam, akrozom hasarlı FITC-PI+: Plazma membran hasarlı, akrozom sağlam FITC+PI+: Plazma membran ve akrozom hasarlı

### Etik Beyan

Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından (AKÜHADYEK) B.30.2. AKÜ.0.9Z.00.00/10 numaralı kararı ile onaylanmıştır.

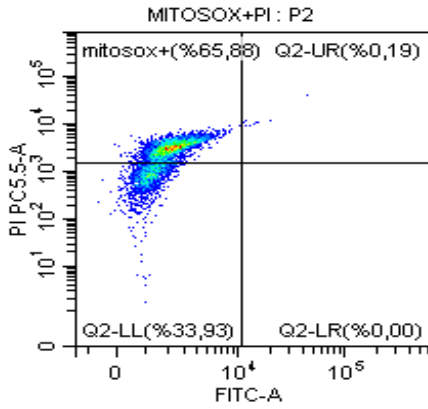
### BULGULAR

Yapılan çalışmada en düşük motilite kontrol grubunda tespit edilirken en yüksek plazma membran ve akrozom bütünlüğü Trehaloz ve ALA gruplarında belirlendi ( $p < 0,05$ ) (Tablo 1). En düşük HMMP ve en yüksek LMMP değeri kontrol grubunda tespit edilirken mitokondrilerde ölçülen en düşük ROS değeri (MitoSOX+) Trehaloz grubunda belirlendi ( $p < 0,05$ ) (Şekil 1, 2, 3).



**Şekil 2.** Pırlak Koçlarda Çözüm sonu mitokondrial membran potansiyelinin flow sitometrik analizi Hmmp: High mitochondrial membran potential (Yüksek mitokondrial membran potansiyeli), Lmmp: Low mitochondrial membran potential (Düşük mitokondrial membran potansiyeli)





**Şekil 3.** Pırlak Koçlarda Çözüm sonu mitokondrial reaktif oksijen türleri seviyesinin flow sitometrik analizi MitoSOX+: mitokondrial reaktif oksijen türleri seviyesi

## TARTIŞMA

Spermanın dondurma prosedürü düşük sıcaklıklarda hücrelerde hasarlara ve ozmotik değişikliklere sebep olmaktadır (Keskin vd., 2020). Dondurma sırasında hücrelerin zarar görmesi sonucu hücre yapısında fertilizasyonu etkileyecek değişikliğe sebep olarak spermanın fertilizasyon kapasitesini düşürecektir (Nishizono vd., 2004). Soğuk hasarı ayrıca, plazma ve akrozomal membranı etkileyerek ROS üretimine sebep olur (Salamon ve Maxwell, 1995). ROS ürünlerinin ise, proteinlere, lipitlere ve hücre DNA'sına zarar verici etkileri bulunmaktadır. ROS'ların oluşturduğu bu olumsuz durumu azaltmak için hücrelerin antioksidan savunma mekanizması bulunmaktadır ve bu durum belirli bir dengede devam etmektedir (Aitken, 1989). Ancak, mevcut antioksidan savunma sistemi dondurma-çözdürme prosedürü ile bozularak oksidatif hasar ve serbest radikallerin toksik etkisine sebep olmaktadır (Bucak vd., 2015). Bu sebepten dolayı araştırmacılar oksidatif hasarı ve serbest radikallerin toksik etkisini azaltmak için sulandırıcılara çeşitli antioksidan maddeler katılmaktadır. Avdatek ve vd., (2019) Merinos koçlarda yaptığı çalışmada ALA'nın kontrol grubuna göre motilitesi çözüm sonu daha yüksek tespit edilmiştir. Ayrıca, Başpınar vd., (2011) farklı oranlarda ALA kullanarak koç spermasını dondurduklarında 1 mM ALA'nın kontrol grubuna göre olumlu sonuçlar verdiği

tespit edilmiştir. Çözüm sonu en düşük motilite kontrol grubunda tespit edilirken plazma membran bütünlüğü açısından ALA grubunun kontrol grubunda belirlenmesi yukarıdaki çalışmaları destekler nitelikte olduğu görülmektedir. ( $p < 0,05$ ).

Güngör ve ark. (2016) ise 50 mM; trehaloz kullanarak çözüm sonu koç spermasında motilite açısından kontrol grubu ile bir farklılık tespit edilememesine rağmen mitokondrial aktivite ve akrozom bütünlüğünde olumlu etkiler belirlenmiştir. Yapılan birçok koç spermasının dondurulma çalışmasında ise trehalozun çözüm sonu sperma kalitesini artırdığı belirlenmiştir (Bucak vd., 2007; Jafaroghli vd., 2011; Cirit vd., 2013; Özmen vd., 2020). Yapılan çalışmada ise motilite, plazma membran bütünlüğü ve mitokondrial aktivite parametrelerinde ALA ve trehaloz gruplarının kontrol grubuna göre üstün olması açısından benzerlik göstermektedir. PMAI akrozomda önemli enzimleri bulundurması, HMMP ise mitokondral aktivasyonun göstergesi olması açısından önemlidir. Yapılan çalışmada yüksek mitokondrial aktivasyonun motilite ile paralel sonuçlar vermesi üretilen ATP enerjisinin spermatozoonun hareket özellikleri (motilite sonuçları) ile örtüştüğünü göstermektedir.

MitoSOX red, spermada mitokondrial süperoksit indikatörü olarak reaktif oksijen türlerini belirleyen floresan bir boya özelliğini taşımaktadır (Kotwicka vd., 2016). Yapılan çalışmada en yüksek mitoSOX + kontrol grubunda, en düşük ise Trehaloz grubunda tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). MitoSOX sonuçları ile motilite ve plazma membran/akrozom bütünlüğü sonuçları birlikte değerlendirildiğinde paralel sonuçların tespit edilmesi kullanılan ALA ve trehaloz antioksidanlarının oksidatif stresi azaltarak lipid peroksidasyonu düşürdüğünü ve çözüm sonu spermatolojik parametreleri iyileştirdiğini göstermektedir.

### SONUÇLAR

Sonuç olarak; Pırlak koçlarda sezon dışı permanın dondurulmasında ALA ve Tehalozun spermatolojik parametreleri iyileştirdiği belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçların in vivo denemeler yapılarak desteklenmesi gerektiği ve böylelikle sahada spermanın dondurularak çözüm sonu kullanımının artırılabilceği sonucuna varılmıştır.

### AÇIKLAMALAR

Yazar, bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

### KAYNAKLAR

**Ahmed, H., Jahan, S., Khan, A., Khan, L., Khan, B.T., Ullah, H., Riaz, M., Ullah, K. (2020).** Supplementation of green tea extract (GTE) in extender improves structural and functional characteristics, total antioxidant capacity and in vivo fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Theriogenology*, 145, 190-197.

**Ahmed, H., Jahan, S., Salman, M.M., Ullah, F. (2019).** Stimulating effects of Quercetin (QUE) in tris citric acid extender on post thaw quality and in vivo fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Theriogenology*, 134, 18-23.

**Aitken, R.J., Clarkson, J.S., Fishel, S. (1989).** Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biology of Reproduction*, 41,183–197.

**Avdatek, F., Yeni, D. Birdane, M.K., Gündoğan, M. (2019).** Influence of Trolox and Alpha-Lipoic Acid on Post-Thawed Pırlak Ram Sperm Parameters, Oxidative Stress and DNA Damage in Non-Breeding Season. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 12(3), 363-369.

**Avdatek, F., Gündoğan, M. (2018).** Effects of some antioxidant additives on spermatological parameters, oxidative stress and DNA damage after freezing-thawing process in ram semen. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 32 (2), 135 – 142.

**Başpınar, N., Çoyan, K., Bucak, M.N., Ömür, A.D., Ataman, M.B., Akalın, P.P., Güngör, Ş., Öztürk, C. (2011).** Koç spermasının ekilibrasyon ve dondurma-çözdürme sonrası spermatolojik ve biyokimyasal parametreleri üzerine lipoik asitin etkisi. *Eurasian Journal of Veterinary Science*, 27 (2), 87-92.

**Biewenga, G., Haenen, G.R.M.M., Bast, A. (1997).** The pharmacology of antioxidant lipoic acid. *General Pharmacology*, 29, 315-31.

**Bucak, M.N., Ateşşahin, A., Varışlı, Ö., Yüce, A.A., Tekin, N., Akçay, A. (2007).** The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology*, 67, 1060–1067.

**Bucak, M.N., Tekin N. (2007).** Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research*, 73(1), 103-108.

**Bucak, M.N., Ataman, M.B., Başpınar, N., Uysal, O., Taşpınar, M., Bilgili, A., Ozturk, C., Gungor, Ş., İnanç, M.E., Akal, E. (2015).** Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. *Andrologia*, 47, 545–552.

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

**El-Beshbishy, H., Bahashwan, S., Ali, H.A.A., Fakher H. (2011).** Abrogation of cisplatin-induced nephrotoxicity in mice by alpha lipoic acid through ameliorating oxidative stress and enhancing gene expression of antioxidant enzymes. *European Journal of Pharmacology*, 668, 278–284.

**Güngör, Ş., Aksoy, A., Yeni, D., Avdatek, F., Öztürk, C., Ataman, M. B., Çoyan, K., Bucak, M.N., Başpınar, N., Peker Akalın, P. (2016).** Combination of cysteamine and lipoic acid improves the post-thawed bull sperm parameters. *Kocatepe Veterinary Journal*, 9(2), 88-96.

**Uysal, O., Bucak, M.N. (2009).** The role of different trehalose concentrations and cooling rates, n freezing of ram semen. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 56, 99-103.

**Iqbal, S., Andrabi, M.A.A., Durani, A.Z., Ahmad, N. (2016).** Trehalose improves semen antioxidant enzymes activity, post-thaw quality, and fertility in Nli Ravi Buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, 85, 954-959.

**Iqbal, S., Naz, S., Ahmed, H., Andrabi, S.M.H. (2018).** Cryoprotectant effect of trehalose in extender on post-thaw quality and in vivo fertility of Water Buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Andrologia*, e12794.

**Jafaroghli, M., Khalili, B., Farshad, A., Zamiri, M. J. (2011).** The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. *Small Ruminant Research*, 96, 58–63.

**Keskin, N., Erdoğan, C., Bucak, M.N., Öztürk, A.E., Bodu, M., İli, P., Başpınar, N., Dursun, Ş. (2020).** Cryopreservation Effects on Ram Sperm Ultrastructure. *Biopreservation and Biobanking*. 18(5), 441-448. Doi: [10.1089/bio.2020.0056](https://doi.org/10.1089/bio.2020.0056)

- Kotwicka, M., Skibinska, I., Jendraszak, M., Jendraszak, P. (2016).** 17 $\beta$ -estradiol modifies human spermatozoa mitochondrial function in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 14,50.
- Nishizono, H., Shioda, M., Takeo, T., Irie, T., Nakagata, N. (2004).** Decrease of fertilizing ability of mouse spermatozoa after freezing and thawing is related to cellular injury. *Biology of Reproduction*, 71(3), 973–978.
- Özmen, M. F., Cirit, Ü., Arıcı, R., Demir, K., Kurt, D., Pabuccuoğlu, S., Ak, K. (2020).** Evaluation of synergic effects of iodixanol and trehalose on cryosurvival of electroejaculated ram semen. *Andrologia*, 52(9), e13656.
- Salamon, S., Maxwell, W.M.C. (1995).** Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science*, 38(1), 1-36.
- Salamon, S., Maxwell, W. M. (2000).** Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62, 77–111.