

## Koç Spermalarının Dondurulmasında Oksidatif Stres Üzerine Trolox ve Taurinin Etkisi

*Effects of Trolox and Taurin on Oxidative Stress During Ram Semen Cryopreservation*

Deniz YENİ<sup>1\*</sup>, Şükrü GÜNGÖR<sup>2</sup>, Fatih ADVATEKİ<sup>1</sup>, Muhammed Enes İNANÇ<sup>2</sup>,  
Umut TAŞDEMİR<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, Türkiye  
<sup>2</sup>Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Burdur, Türkiye  
<sup>3</sup>Aksaray Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Aksaray, Türkiye

**Öz:** Bu çalışmada Pırlak koç spermalarının üreme mevsimi dışında dondurulmasında sperma sulandırıcısına eklenen antioksidan özelliğe sahip trolox ve taurinin çözüm sonu spermatolojik parametreler üzerine etkisinin ortaya konması amaçlandı. Bu amaçla 10 baş Pırlak koçtan haftada iki kez olacak şekilde suni vajen yardımı ile spermalar toplandı. Normospermik özellik gösteren numuneler birleştirilerek sırası ile kontrol, 1 mM Trolox ve 50 mM Taurin grupları oluşturuldu. Gruplar +4° C'de 2 saat ekilibrasyon işlemi sonrası, 0,25 ml'lik payetlere çekildikten sonra -120° C sıvı azot buharında dondurularak, sıvı azot içerisinde saklandı. Çözüm sonu spermatolojik değerlendirmelerden; motilite subjektif yöntem ile, plazma membran bütünlüğü (PMAI), yüksek mitokondriyal aktivite düzeyi (HMMP) ve mitokondriyal oksidatif hasar düzeyi (MITOSOX<sup>+</sup>) flow sitometrik yöntem ile incelendi. Çözüm sonu motilite oranı 1 mM Trolox (%50,00±3,89) ve 50 mM Taurin (%60,62±2,57) gruplarında kontrol (35,00±2,11) grubuna yüksek elde edildi (p<0,05). Taurin 50 mM (%32,42±0,72) çözüm sonu en yüksek PMAI oranı ile kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli bulundu (p<0,05). Antioksidan ilave edilen gruplarda HMMP değerleri kontrol grubuna göre yüksek bulunurken, mitokondriyal oksidatif hasar düzeyi en düşük grup Taurin 50 mM olarak belirlendi (p<0,05). Sonuç olarak Pırlak koç spermalarının sezon dışı dondurulmasında sulandırıcıya ilave edilen Trolox ve Taurinin çözüm sonu motilite, HMMP parametreleri bakımından olumlu etkileri olabileceği kanısına varılırken 50 mM Taurin ilavesinin spermanın dondurulması sonucu oluşan oksidatif stres üzerine koruyucu etkinliğinin olduğu belirlendi

**Anahtar Kelimeler:** Flow Sitometre, Koç Spermaları, Kriyoprezervasyon, Oksidatif Stres, Taurin, Trolox

**Abstract:** In this study, it was aimed the investigate the effects on Pırlak ram spermatological parameters added sperm extender which antioxidant properties of Trolox and Taurin. For this aim semen was collected with the aid of artificial vagina twice a week from 10 Pırlak ram. Semen which were normospermic pooled and occurred three group; control, 1 mM Trolox, 50 mM Taurin. Groups were equilibrated about 2 hours at + 4 ° C, frozen in liquid nitrogen vapor (-120 ° C), stored in liquid nitrogen. Pos-thawed spermatological examinations; motility was recorded subjectively, plasma membrane integrity (PMAI), high mitochondrial membrane potential (HMMP) and mitochondrial oxidative damage level (MITOSOX<sup>+</sup>) were evaluated by flow cytometer. Post-thawed motility ratio was higher in 1 mM Trolox (%50.00±3.89) and 50 mM Taurin groups compared the control (35.00±2.11) group (p<0.05). Taurin 50 mM (%32.42±0.72) was highest PMAI ratio and it was significantly important with control group (P<0.05). HMMP levels were higher in antioxidant groups when compared the control group and also lowest mitochondrial oxidative damage level was seen in the 50 mM Taurin (P<0.05). Finally, when freezing of Pırlak ram semen in the out of breeding season Trolox and Taurin which were added the semen extender was ameliorating effect on post thaw motility and HMMP levels. Behind this Taurin 50 mM gave the best preventive effect on oxidative damage.

**Keywords:** Flow Cytometer, Ram Sperm, Cryopreservation, Oxidative Stress, Taurine, Trolox.

\*Corresponding author : Deniz YENİ

e-mail : dyeni@aku.edu.tr

Geliş tarihi / Received: 20.10.2020

Kabul tarihi / Accepted: 01.12.2020

## Giriş

Koyunculuk endüstrisi ülkemizde son yıllarda artan kırmızı et ihtiyacını karşılamak amacıyla gelişim göstermektedir. Bu amaçla ülkemize farklı ülkelerden ırklar getirilmekte ve etçi tip sürüler oluşturulmaya çalışılmaktadır. Hayvan ithalatı zor ve çevre adaptasyonu isteyen bir süreç olarak belirtilmektedir. Buna karşın üstün verim özelliklerine sahip koçların spermasının dondurularak suni tohumlama uygulaması ile ıslah çalışmalarının yapılması koyunculuk endüstrisinde fayda sağlayabilecek geliştirilmeye açık bir alandır. Ancak koç spermasının uzun süreli saklanması ile ilgili araştırmalar gerek ülkemizde gerekse dünyada boğa spermasının dondurulmasına kıyasla standardize edilememiştir. Bu sebeple koyunlarda suni tohumlama uygulaması da sınırlı kalmaktadır (O'Hara ve ark., 2010). Koç sperması dondurma-çözdürme işlemi yüksek oranda canlılık kaybına ve sonucunda motilite oranının azalmasına neden olmaktadır (Watson, 2000). Koyunculuk endüstrisinde dondurulmuş sperma ile başarılı gebelik oranlarının elde edilebilmesinin ön koşulu olarak spermanın optimal şekilde dondurulması gerekmektedir (Roca ve ark., 2006). Koç spermasının dondurulmasında başarının artırılması amacıyla çeşitli antioksidatif özellikli maddelerin sperma sulandırıcısına eklenmesi son zamanlarda yoğun bir şekilde araştırma konusu olmuştur (Kulaksız ve Daşkın, 2007; Holt, 2000; Avdatek ve ark., 2018).

Sığır safrasından izole edilmiş olan taurin, tiyol içeren aminoasit olarak bildirilmiştir. Taurinin,  $Ca^{+2}$  akışını düzenleme, detoksifikasyon, ozmoregülasyon ve membran stabilizasyonu gibi faaliyetlerde rol aldığı ifade edilmektedir (Kendler, 1989). Vücutta hücre bütünlüğünü koruması, oksidan-antioksidan dengesi ve direncini artırması gibi özellikleri ile bir antioksidan olarak destekleyici ve koruyucu etkileri önemli bulunmaktadır (Parcell, 2002). Taurinin boğa ve koç spermasına eklenerek yapılan çalışmalarda motilite, akrozom bütünlüğü üzerine koruyucu etkinliği olduğu bildirilmektedir (Chen ve ark., 1993; Uysal ve ark., 2000; Bucak ve ark., 2007).

Vitamin E (troloks) hücre membranında zincir kırıcı antioksidan olarak görev yapan yağda

çözünen bir antioksidan olarak ifade edilmektedir. Spermatozoon konsantrasyonu ve motil hücre oranı üzerine olumlu etkisi bulunmaktadır. Spermatozoanın yaşam gücünün artırılmasında lipid peroksidasyon seviyesini düzenleyerek etkin rol oynamaktadır. Oksidatif strese karşı spermatozayı koruyucu özelliğe sahiptir (Akiyama 1999). En etkin formu alfa-tokoferol olarak bilinmektedir. Alfa-tokoferolün en önemli görevi serbest oksijen radikallerinin ataklarına karşı membran lipidlerindeki doymamış yağ asitlerini korumaktır (Rice ve Kennedy 1988). Vitamin E lipid peroksidasyonu engellemek amacıyla lipid peroksili ve alkoksil radikalini nötralize etmektedir (Agarwal ve ark., 2003). Lipofilik bir antioksidan olan Vit. E hücre membranında bulunur bu sayede membran stabilitesinin sağlanmasına yardım ettiği bildirilmektedir (Özden ve ark., 2009).

Çalışmamızda Pırlak koç spermasının dondurulmasında sulandırıcıya eklenen trolox ve taurinin çözüm sonu spermatozoa motilitesi, membran bütünlüğü, mitokondriyal aktivite düzeyi ile oksidatif stres düzeyine olan etkilerinin ortaya konması amaçlandı.

## Gereç ve Yöntem

Araştırma Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvancılık Uygulama ve Araştırma Merkezi bünyesindeki 2-3 yaşlı 10 baş Pırlak koç kullanılarak yapıldı (AKÜHADYEK-03-10). Hayvanlar yarı açık besi şartlarında tane-kaba yem karışık olarak beslenirken su adlibitum olarak verildi. Koçlardan sperma aşım sezonu dışında haftada iki kez suni vajen yardımıyla alındı. Her bir koçtan alınan nativ spermalar makroskobik ve mikroskobik yönden muayene edilerek, normospermi (%80 motilite,  $2 \times 10^9$ /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 trolox (1 mM) ve taurin (50mM) içeren TYS solüsyonu ile ml'de  $400 \times 10^6$  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 bütünlüğünün 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 MitoSOXRed/PI floresan boyamaları ile flowsitometri cihazında (BeckmanCulture, Cytoflex®) değerlendirildi.

### **Motilite**

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

### **Flowsitometri analizleri**

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

Çalışma solüsyonları 100 µg/mL fluorescein isotiocyanate-conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA [L7381], 2.99 mM propidium iodide (PI, [L7011, molecular probes, Invitrogen], 0.153 mM 5,5',6,6'-tetrachloro1,1',3,3' tetramethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1, T3198, molecular probes, Invitrogen) ve 5 mM MitoSOXRed (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 of 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 (HMMP) ve düşük mitokondriyal aktivasyon (LMMP) CytExpert 2.3 software (BeckmanCoulter) analizi ile gerçekleştirildi.

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

Spermada Mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin seviyesi MitoSOX Red/PI boyaması ile yapıldı.

5 µL MitoSOXRed (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 (BeckmanCoulter) analizi ile gerçekleştirildi.

### **İstatistiksel Analiz**

Elde edilen verilerin önemlilik testlerinden önce, tüm değişkenler parametrik test varsayımlarından

normallik yönünden ShapiroWilks 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 hata olarak verildi.

**Tablo 1.** Trolox ve Taurin ile dondurulan koç spermasının çözümü sonu spermatolojik parametre (%) değerleri.

Grup	Motilite	PMAI	HMMP	MitoSOX+
Kontrol	35,00 $\pm$ 2,11 <sup>a</sup>	24,20 $\pm$ 3,41 <sup>a</sup>	11,88 $\pm$ 1,59 <sup>a</sup>	87,33 $\pm$ 2,74 <sup>a</sup>
1mM Trolox	50,00 $\pm$ 3,89 <sup>b</sup>	31,17 $\pm$ 2,38 <sup>ab</sup>	17,55 $\pm$ 0,82 <sup>b</sup>	74,97 $\pm$ 0,90 <sup>a</sup>
50 mMTaurin	60,62 $\pm$ 2,57 <sup>c</sup>	32,42 $\pm$ 0,72 <sup>b</sup>	24,25 $\pm$ 1,08 <sup>c</sup>	73,22 $\pm$ 1,00 <sup>b</sup>
P	*	*	*	*

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

## Tartışma

Koç spermasının kriyoprezervasyonu sürecinde soğuk şokuna karşı göstermiş olduğu hassasiyet sonucu spermatozoa üzerindeki hasarı artırarak çözümü sonu in vivo ve in vitro özellikleri üzerine olumsuz etki vermektedir. Bunun oluşumunu engellemek ya da azaltmak amacıyla araştırmacılar sulandırıcıya koruyucu ve antioksidan özellikli çeşitli maddelerin eklenmesi üzerine çalışmalar yapmaktadır. Doymamış yağ asitlerini yüksek oranda barındıran koç sperma membranı reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu lipid peroksidasyona (LPO) karşı hücreyi oldukça duyarlı hale getirmektedir. Spermanın dondurulma çözdürülme sürecinde membranda gelişen faz değişimi hücrenin fiziksel ve biyokimyasal (oksidatif stres) olarak hasar görmesine neden olmaktadır. Oluşan oksidatif stres ve meydana gelen sitotoksik aldehitler spermatozoanın hasar görmesine ve normospermik özelliklerini kaybetmesine sebep olmaktadır (Aitken ve ark., 1994; Baumber ve ark., 2000). Motil hareket 3 temel prensibe bağlıdır: Fiziksel bütünlük, enerji ve regülasyon. Gözlenen hareketin düzenlenmesinde spermatozoonun orta

## Bulgular

Elde edilen sonuçlara göre antioksidan eklenen gruplarda çözümü sonu spermatozoa motilitesi ve HMMP düzeyi bakımından kontrol grubuna göre üstünlük sağlarken en yüksek motilite ve HMMP oranı taurin eklenen grupta elde edildi ( $p < 0,05$ ). Taurin 50 mM grubunda çözümü sonu PMAI değeri en yüksek bulunurken oksidatif hasar düzeyi en düşük grup olarak kontrol ve trolox 1 mM grubuna göre önemli bulundu ( $p < 0,05$ , Tablo1).

kısımındaki flagellar ve prinsipal bölge sağlamaktadır. Motil hareket flagellar kısımdan, hiperaktivasyon ise prinsipal kısımdan kontrol edilmektedir (Suarez ve ark., 2007). Orta kısımda görülen bu kontrol mekanizması doymamış yağ asitleri ve doymuş protein kanalları sebebiyle ROS ve sonucunda oluşan LPO'ya karşı son derece duyarlı kılmaktadır. Sulandırıcıya eklenen aminosit yapıda tiyol bileşiği olan taurinin bu yapı üzerine kalkan oluşturarak koruyucu özellik gösterdiğine dair çalışmalar bulunmaktadır (Uysal 2000; Bucak ve ark., 2007). Aynı şekilde zincir kırıcı özellikte olan trolox spermanın dondurulma sürecinde sperma motilitesi üzerine koruyucu özellik gösterdiği bildirilmektedir (Avdatek ve ark., 2019). Elde edilen sonuçlara göre sulandırıcıya eklenen trolox ve taurinin çözümü sonu motilite üzerine kontrol grubuna göre üstünlük sağladığı belirlenmiş olup araştırmacılar ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Spermatozoa aktivitesinin yüksek olması yüksek mitokondiyal yapıya sahip olduğunun göstergesidir. Bu yapıların kabiliyeti ATP ihtiva eden enzimler ile doğru orantılı olarak faaliyet göstermektedir. Sulandırıcıya eklenen trolox ve taurin ile bu yapıların desteklendiği elde edilen sonuçlar ile belirtilirken 50 mM dozunda

eklenen taurinin mitokondriyel aktivitede oksidatif dekarboksilasyon metabolizmasına koenzim görevi üstlenerek ATP seviyesinin korunmasında en yüksek düzeyde etki yapmıştır. Elde edilen bu sonuç Bucak ve ark., 2007; Bandy ve ark., 2017 ile benzerdir.

Spermanın muhteviyatında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) gibi enzimatik oksidantlar içermektedir. Ortamda gerçekleşen ROS üretimi ve eliminasyonu arasındaki denge ve ROS'un spermatozoa üzerindeki olumsuz etkileri bu şekilde minimize edilmeye çalışılmaktadır. Ancak spermanın sulandırılması anında başlayan dondurulma sürecine kadar geçen süreçte bu denge ROS lehine bozulmakta ve antioksidan kapasite yetersizliği ortaya çıkmaktadır (de Lamirande ve ark., 1997; O ve ark 2006). Sulandırıcıya eklenen antioksidanlar sayesinde ROS'un etkinliği azaltılıp hücrenin geri dönüşümsüz olarak maruz kaldığı etkilerden korunması amaçlanmaktadır. Bu amaçla çalışmada antioksidan özellikle olan trolox ve taurin çözüm sonu oksidatif stres düzeyinde anlamlı şekilde etki gösterdiği taurin 50 mM en yüksek koruyuculu sağladığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuç Bucak ve ark., 2007, Bandy ve ark., 2017 ve Avdatek ve ark., 2019 ile benzer şekilde olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, üreme mevsimi dışında Pırlak koç spermasının dondurulmasında trolox ve taurinin çözüm sonu spermatojistik parametreleri üzerine olumlu etki yaptığı, Taurin 50 mM dozunun üstün antioksidatif özellik göstererek motilite, yüksek mitokondriyal aktivite ve oksidatif stres üzerine daha iyi sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçların daha iyi anlaşılabilmesi ve endüstriyel olarak koç spermasının dondurulmasının yaygınlaştırılması amacıyla in vivo denemeler yapılarak desteklenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

## Kaynaklar

**Agarwal, A., Saleh, R.A., Bedarwy, M.A., 2003.** Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Sterility*, 79: 829–843.

**Aitken, J., Krausz, C., Buckingham, D., 1994.** Relationships between biochemical markers for residual

sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions. *Molecular Reproduction and Development*, 39: 268–279.

**Akiyama, M., 1999.** In vivo scavenging effects of ethyl cysteine on reactive oxygen species in human semen. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi*, 90: 421–428.

**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.

**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 Veterinary Journal*, 12 (3):363-369.

**Avdatek, F., Yeni, D., Gündoğan, M., 2018.** Merinos Koçlarda Spermaya Katılan Antioksidanların Kısa Süreli Saklama Sırasında Spermatojistik Parametreler ve DNA Hasarı Üzerine Etkileri. *Kocatepe Veterinary Journal*, 11(2):7-8.

**Bandy, M.N., Lone, F.A., Rasool, F., Rashid, M., Shikari, A., 2017.** Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation. *Cryobiology*, 74:25-30.

**Baumber, J., Ball, B.A., Gravance, C.G., Medina, V., Daviesmorel, M.C.G., 2000.** The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *Journal of Andrology*, 21:895-902.

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

**Chen, Y., Foote, R.H., Brockett, C.C., 1993.** Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology*, 30:423-431.

**De Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., Gagnon, C., 1997.** Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of Reproduction*, 2:48-54.

**Holt, W.V., 2000.** Fundamental aspects on sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53:47-58.

**Kendler, B.S., 1989.** Taurine: An overview of its role in preventive medicine. *Prevent Medicine*, 18: 79.

**Kulaksiz, R., Daşkın, A., 2007.** Teke spermasının kısa ve uzun süreli saklanması. Veteriner Hekimler Derneği Dergisi, 78 (4):51-56.

**O, W.S., Chen, C., Chow, P.H., 2006.** Male genital tract antioxidant enzymes and the inability to preserve sperm DNA integrity. Molecular and Cellular Endocrinology, 250:80-83.

**O'Hara, L., Hanrahan, J.P., Richardson, L, Donovan, A., Fair, S., Evans, A.C., Lonergan, P., 2010.** Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. Theriogenology, 73 (4):541-549.

**Özden, S., Catalgol, B., Gezcinci, S., Arda, P., Bolkent, S., Alpertunga, B., 2009.** Methiocarb-induced oxidative damage following subacute exposure and the protective effects of vitamin E and taurine in rats. Food and Chemical Toxicology, 47:1676-1684.

**Parcell, S., 2002.** Sulfur in human nutrition and applications in medicine. Alternative Medicine Review, 7:22-24.

**Rice, D., Kennedy, S., 1988.** Vitamin E: function and effects of deficiency. British Veterinary Journal, 144:482-492.

**Roca, J., Hernandez, M., Carvajal, G., Vazquez, J.M., Martinez, E.A., 2006.** Factors influencing boar sperm cryosurvival. Journal of Animal Science, 84:2692-2699.

**Suarez, S., Marquez, B., Harris, T.P., Schimmenti, J.C., 2007.** Different regulatory systems operate in the midpiece and principal piece of the mammalian sperm flagellum. Society of Reproduction and Fertility, 65: 331-334.

**Uysal, O., Kinet, H., Çevik, M., Çetinkaya, S., 2000.** Fertility obtained from frozen ram semen with different extenders containing varied antioxidants. Ankara Üniversitesi Veteriner Dergisi, 47:177-189.

**Watson, P.F. 2000.** The Causes of Reduced Fertility with Cryopreserved Semen. Animal Reproduction Science, 60: 481-492.