

Koç spermasının kısa süreli saklanması katkı maddelerinin etkisi

Effect of additives on short-term storage of ram semen

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, kısa süreli saklanan koç spermasının (24 saatlik aralıklarla) 72 saate kadar spermatolojik parametreler üzerine etkilerini araştırmaktır. Çalışmada % motilite, canlılık ve akrozom bütünlüğü verileri değerlendirildi. Çalışmada her koçtan (4 baş Merinos koçu) alınan dört ejakülat kullanıldı. Ejakülatlar pooling yapıldıktan sonra eşit hacimli yedi parçaya bölündü. Çalışma grupları, tris bazlı sulandırıcıya eklenen resveratrol (2 ve 4 mM), troloks (2 ve 4 mM), BSA (3 ve 6 mg/ml) ve kontrol olmak üzere oluşturuldu. Sulandırılan örnekler 72. saate kadar 4°C de muhafaza edildi. Spermatozoa motilitesi, canlılık ve akrozom bütünlüğü 0, 24, 48 ve 72. saatte değerlendirildi. Motilite muayenesi faz kontrast ataçmanlı mikroskopta 400X lük büyütmede, canlılık ve akrozom bütünlüğü ise floresan mikroskop ile değerlendirildi. Çalışmanın 72. saatinde, BSA (3 ve 6mM) grupları motilite (53,75±2,50%; 55,00±4,08%) ve akrozom bütünlüğü (53,70±3,39%; 57,10±4,68%) değerlendirmelerinde kontrol grubu (43,75±2,50%; 46,53±3,58) ile istatistiksel farklılık (p<0,05) gösterdi. Troloks (4mM) grubunda (67,22±3,71%), tüm gruplara kıyasla 72. saatte en yüksek canlılık sonucuna ulaşılmış ayrıca kontrol grubu (46,53±3,53) ile istatistiksel farklılık (p<0,05) belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda koç sperma sulandırıcısına eklenen BSA ve troloksun koç spermasının kısa süreli saklamasında faydalı olduğu ve spermatolojik parametreler üzerine koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: BSA, kısa süreli saklama, trehaloz, troloks

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of short-term stored ram semen (24-hour intervals) on spermatological parameters up to 72 hours. In the study, % motility, viability and acrosome integrity were evaluated. In this study four ejaculates from each ram (four merino rams) were used. The ejaculates were divided into seven equal-sized pieces after pooling. The study groups were formed as resveratrol (2 and 4 mM), trolox (2 and 4 mM), BSA (3 and 6 mg/ml) and control added to tris-based diluent. Diluted samples were stored at 4 °C until 72 hours. Spermatozoa motility, viability and acrosome integrity were evaluated at 0, 24, 48 and 72 hours. Motility examination was evaluated with phase contrast microscope at 400X magnification, vitality and acrosome integrity were evaluated with fluorescent microscope. At the 72nd hour of the study, the BSA (3 and 6mM) groups were assessed for motility (53,75 ± 2,50%; 55,00 ± 4,08%) and acrosome integrity (53,70 ± 3,39%; 57,10 ± 4,68%) in the control group (43,75 ± 2,50%; 46,53 ± 3,58%) and statistical difference (p <0,05). In the Trolox (4mM) group (67,22 ± 3,71%), the highest viability was achieved at 72 hours compared to all groups, and a statistical difference (p <0,05) was determined with the control group (46,53 ± 3,53). As a result of the study, it was determined that BSA and trolox added to ram semen extender were beneficial in the short-term storage of ram semen and had a protective effect on spermatological parameters.

Keywords: BSA, short term storage, trehalose, Trolox

How to cite this article

Öztürk, C., Dursun Ş., Bulut, G., Kardeşin T. (2021). Effect of additives on short-term storage of ram semen. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(1), 22-28. <https://doi.org/10.31797/vetbio.833211>

Research Article

Caner ÖZTÜRK^{1a}

Şükrü DURSUN^{2b}

Gaye BULUT^{2c}

Tahir KARAŞAHİN^{3d}

¹Department of Reproduction and Artificial Insemination, Faculty of Veterinary Medicine Aksaray University, Aksaray, Turkey

²Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Veterinary Medicine, Aksaray University, Aksaray, Turkey

³Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Aksaray University, Aksaray, Turkey

ORCID-

^a[0000-0003-0566-0684](https://orcid.org/0000-0003-0566-0684)

^b[0000-0002-2453-3464](https://orcid.org/0000-0002-2453-3464)

^c[0000-0003-4500-1958](https://orcid.org/0000-0003-4500-1958)

^d[0000-0003-2358-0389](https://orcid.org/0000-0003-2358-0389)

Correspondence

Caner ÖZTÜRK

canerozturkvt@gmail.com

Article info

Submission: 13-12-2020

Accepted: 23-03-2021

Online First: 07-04-2021

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

Suni tohumlama uygulaması, evcil hayvanlarda genetik ıslah için en yaygın ve etkili yetiştirme tekniğidir. Koçlarda, spermanın soğutulmuş kısa süreli saklanması, dondurulmuş-çözülmüş spermadan daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Koç spermasının dondurularak saklanması, soğutma ile karşılaştırıldığında sperma motilitesini, canlılığını ve fertilitate yeteneğini olumsuz etkilemektedir (O'Hara vd., 2010; Mata-Campuzano vd., 2014). Bununla birlikte, tohumlama için soğutulmuş saklanan spermanın etkili kullanımı, depolama süresinin artmasıyla motilite, membran ve akrozom bütünlüğünün azalması nedeni ile birkaç gün ile sınırlıdır (Gürler vd., 2016; Ledesma vd., 2016).

Bu hasarlar antioksidan sistemlerin değişmesi ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) artmasının sonucudur (Bilodeau vd., 2001; Said vd., 2010). ROS genellikle oksidatif fosforilasyondaki enzimatik reaksiyonlar sırasında açığa çıkar ve bu enzimatik reaksiyonlar hücrenin enerji ihtiyacının karşılanabilmesi için gerekmektedir (Valko vd., 2007; Tremellen, 2008). Spermatozoadaki yüksek oksidatif stres, plazma membranındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna yol açar ve bu da sperm morfolojisinde değişikliklerin sebebidir (da Silva Maiavd., 2010).

Sperm ve seminal plazmadaki antioksidan sistem ROS'u temizlemek için yeterli değildir. Koç sperma sulandırıcılarına uygun antioksidanların eklenmesi, oksidatif stresi azaltmaya ve soğutarak saklama sırasında spermatozoayı ROS'tan korumaya katkıda bulunmaktadır (Bucak ve Tekin, 2007; Sarıözkan vd., 2009).

Resveratrol (3, 4', 5-trihydroxy-trans-stilbene) kırmızı üzümlerin kabuğundan elde edilen antiproliferatif ve antioksidan özellikte

bir fitoaleksindir. Resveratrol inflamatuvar olaylarda düzenleyici rol oynar ayrıca antioksidan özelliğinin yanında lipit ve lipoprotein metabolizmasında düzenleyici etkisi bulunmaktadır. (Jang vd., 1997, Uguralp vd., 2005). Sulandırıcılara resveratrol eklenmesi, ROS üretimini azaltmak ve çözüm sonrası sperma antioksidatif savunma sistemini iyileştirmek için aktive edilmiş protein kinaz fosforilasyonunu teşvik etmektedir. Bu lipid peroksidasyonunu azaltarak spermatozoayı ROS hasarına karşı korumaktadır (Zhu vd., 2019).

Troloks (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid) vitamin E nin suda çözünür analogudur (Giulivi ve Cadenas, 1993). Hücre geçirgen ve suda çözünen bir antioksidan olan troloks oksidatif stres ve apoptozise karşı koruyucu özellik göstermektedir (Minaei vd., 2012). Troloks'un insan sperması üzerine yapılan çalışmalarda çözüm sonu bazı spermatolojik parametrelerde olumlu etki gösterdiği bildirilmektedir (Taylor vd., 2009; Minaei vd., 2012).

Sığır serum albümini (BSA), yüksek üretim maliyetleri ve karmaşık üretim teknolojisi gerektiren yaygın bir sperma koruyucu ajandır. Çalışmalar, BSA'nın plazma membranında ROS'un neden olduğu lipid peroksidasyonunu azaltabileceğini ve plazma zarını etkin bir şekilde koruyabildiğini bildirmiştir (Zhang vd., 2015; Diaz-Jimenez vd., 2018).

Sulandırılmış ve soğutulmuş koç sperması, eğer tohumlama kısa bir süre içinde yapılacaksa, dondurulmuş spermaya alternatif bir seçenektir. Bunun nedeni sperma hücresi üzerine zarar verici etkiler bu yöntemde dondurulmuş çözülmüş spermaya göre daha düşük seviyede gözlenmektedir. Sunulan çalışmanın amacı, 4 ° C'de 72 saat süre ile saklanan sperma üzerine sulandırıcıya eklenen katkı maddelerinin koç sperma parametreleri üzerindeki etkisini araştırılmasıdır.

MATERYAL VE METOT

Hayvanlar ve spermanın alınması

Bu çalışmada 4 baş yetişkin Merinos koçtan (3 yaşlı) alınan sperm örnekleri kullanılmıştır. Aksaray ilinde yetiştiriciye ait koçlar kullanılmıştır. Hayvanlar sağlıklı ve tek tip optimal şartlarda beslenmeye tabi tutulmakta idi. Ejakülatlar haftada iki kez suni vajen yardımı ile toplanmıştır.

Spermanın sulandırılması

Sperma örnekleri 4 tekrarlı olarak toplandı. Ejakülatlardan en az %70 motilite ve ml de 2×10^9 spermatozoa olanlar kullanıldı. Sperma sulandırıcısı olarak Tris bazlı sulandırıcı (297.58 mM tris, 82.66 mM fruktoz, 96.32 mM sitrik asit, %15 yumurta sarısı, pH: 6.8) kullanıldı. Hayvanlardan alınan ejakülatlar yedi eşit parçaya bölündü ve 37°C 'de resveratrol (2ve 4 mM), troloks (2 ve 4 mM), BSA (3 ve 6 mg/ml) ve kontrol (katkı maddesi kullanılmayan) içeren sulandırıcılar ile sulandırıldı.

Motilite muayenesi

Sperma motilite muayenesi için, az miktarda sperma 37°C 'de tutulan bir su banyosunda değerlendirme için 10 dk dengelendi. Sperma motilite muayenesi 37°C 'deki ısıtma tablası bulunan faz kontrast ataçmanlı mikroskopta 400x lük büyütme ile subjektif olarak yapıldı. Lam-lamel arasına alınan bir damla sperma numunesi en az 5 mikroskop sahasına bakılarak yapıldı. Sahalardaki motilite değerlerinin ortalaması (%) motilite oranı olarak kaydedildi.

Sperm canlılığı

Sperma canlılığı Gungor vd. (2017) nin yöntemi ve SYBR-14 / PI Moleküler Prob: L 7011 Invitrogen, Carlsbad, CA kullanılarak belirlendi. Sperma Tris stok solüsyonu ile 1:3 oranında seyreltildi ardından 30 µl seyreltilmiş sperma 6 µl SYBR-14 ve 2.5 µl PI ile karıştırıldı. Örnek hafifçe karıştırıldı, karanlıkta 37°C 'de 20

dakika inkübe edildi ve işlemi sonlandırmak için 10 µl Hancock solüsyonu eklendi. Lam üzerine 2.5 µl 'lik bir numune damlatılarak lamel ile kapatıldı. En az 200 sperma hücresi canlılığı değerlendirmek için floresan mikroskop altında 400 büyütmede incelendi. Kırmızı renk alan hücreler ölü, yeşil renk ise canlı olarak kabul edildi.

Akrozom bütünlüğü

Sperm akrozom bütünlüğü, Arachis hypogaea (L7381 FITC-PNA, Invitrogen) ile ve Gungor vd. (2017) tarafından belirlenen yöntemle değerlendirildi. Sperma örneklerinden 60 µl, 10 µl FITC-PNA ve 2.5 µl PI ile karıştırıldı. Örnekler karanlıkta 37°C 'de 20 dakika inkübe edildi ve işlemi sonlandırmak için 10 µl Hancock solüsyonu eklendi. Sperm akrozom bütünlüğünü belirlemek için floresan mikroskop (Carl Zeiss Axioscope 5) altında 400 x büyütmede en az 200 hücre incelendi. Parlak yeşil renk veren sperm hücrelerinin hasarlı olduğu kabul edilirken, boyamamış kırmızı renkli olanlar bozulmamış olarak kabul edildi.

Veri analizi

Elde edilen değerlerin önemlilik testlerinden önce, tüm değişkenler parametrik test varsayımlarından normallik yönünden Shapiro Wilks test ile, varyansların homojenliği yönünden ise Levene's testi ile incelendi. Elde edilen veriler ortalama \pm standart hata ortalaması (ortalama \pm SEM) olarak sunuldu. Tüm sonuçlar varyans analizine (ANOVA) göre ve Duncan'ın gruplar arasındaki farklarına göre analiz edildi. Sonuçlardan $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi. Analizler SPSS 21 paket programı ile yapıldı.

BULGULAR

Gruplar arası saatlere göre motilite (%) değerleri incelendiğinde 0. Saatte istatistiksel bir farklılık görülmez iken 24. saatte troloks (2mM), 48 ve 72. saatlerde BSA (6mg/ml) kontrol grubu ile istatistiksel farklılık ($p < 0,05$)

Koç spermasının saklanması

göstererek en yüksek koruyucu etkili grup olmuştur (Tablo 1). Tablo 2 de belirtildiği gibi sperma canlılık değerleri incelendiğinde en iyi koruyucu etkiyi tüm saatlerde troloks (2mM) grubu sağlamıştır. Elde edilen sonuçlar 24. Saatten itibaren istatistiksel olarak kontrol grubu ile farklılık ($p<0,05$) göstermektedir.

Akrozom bütünlüğü yönünden gruplar karşılaştırıldığında (Tablo 3) 0. saatte gruplar arasında istatistiksel farklılık görülmez iken diğer saatlerde BSA 6 mg/ml grubu kontrol grubu ile istatistiksel farklılık oluşturacak düzeyde en yüksek koruyucu etki gösteren grup olmuştur.

Tablo 1. Merinos koç spermasının 5 °C'de saklama süreleri için motilite değerleri (%).

GRUP	0 saat	24 saat	48 saat	72 saat
Resveratrol 2 mM	82,50±5,00	75,00±4,08 ^{ab}	55,00±4,08 ^c	48,75±2,50 ^{bc}
Resveratrol 4 mM	80,00±4,08	72,50±2,89 ^{ab}	58,75±2,50 ^{bc}	45,00±4,08 ^{bc}
Troloks 2 mM	83,75 ±2,50	76,25±2,50 ^a	62,50±2,89 ^{ab}	51,25±4,79 ^{ab}
Troloks 4 mM	81,25 ±2,50	71,25±2,50 ^{ab}	61,25±4,79 ^{ab}	52,50±6,45 ^a
BSA 3 mg/ml	85,00±4,08	72,50±2,89 ^{ab}	65,00±4,08 ^a	53,75±2,50 ^a
BSA 6 mg/ml	85,00±2,87	73,75±2,50 ^{ab}	66,25±2,50 ^a	55,00±4,08 ^a
Kontrol	77,50±2,89	70,00±4,08 ^b	53,75±2,50 ^c	43,75±2,50 ^c
p	-	*	*	*

(* $p<0,05$).

Tablo 2. Merinos koç spermasının 5 °C'de saklama süreleri için canlılık değerleri (%).

GRUP	0 saat	24 saat	48 saat	72 saat
Resveratrol 2 mM	82,83±2,02	71,30±5,54 ^b	63,83±4,32 ^b	52,53±4,82 ^b
Resveratrol 4 mM	83,40±1,32	76,23±4,71 ^{ab}	68,00±3,72 ^b	62,03±5,11 ^a
Troloks 2 mM	83,37±3,38	73,38±3,02 ^{ab}	63,75±2,02 ^b	55,25±0,93 ^b
Troloks 4 mM	84,63±0,84	79,13±1,87 ^a	73,20±1,68 ^a	67,22±3,71 ^a
BSA 3 mg/ml	84,20±1,53	78,55±2,16 ^a	72,95±1,66 ^a	65,08±1,62 ^a
BSA 6 mg/ml	84,30±2,94	78,15±2,38 ^a	73,12± 3,30 ^a	66,73±3,56 ^a
Kontrol	82,07±1,56	70,98±4,51 ^b	63,40±4,19 ^b	49,12±4,93 ^b
p	-	*	*	*

(* $p<0,05$).

Tablo 3. Merinos koç spermasının 5 °C'de saklama süreleri için akrozom bütünlüğü değerleri (%).

GRUP	0 saat	24 saat	48 saat	72 saat
Resveratrol 2 mM	77,30±4,64	64,75±5,40 ^{ab}	54,53±2,63 ^{ab}	53,02±0,88 ^{bc}
Resveratrol 4 mM	76,90±1,61	66,98±6,55 ^{ab}	54,65±2,72 ^{ab}	51,08±3,37 ^{bc}
Troloks 2 mM	79,73±2,18	67,58±6,25 ^{ab}	56,20±2,52 ^{ab}	53,18±3,94 ^{ab}
Troloks 4 mM	77,43±2,86	65,30±3,60 ^{ab}	55,90±2,56 ^{ab}	52,68±2,22 ^{ab}
BSA 3 mg/ml	79,63±2,21	66,85±2,03 ^a	56,70±5,57 ^{ab}	53,70±3,39 ^{ab}
BSA 6 mg/ml	81,60±1,67	72,03±3,80 ^{ab}	60,50±6,58 ^a	57,10±4,68 ^a
Kontrol	77,10±4,43	62,03±5,21 ^b	51,28±3,72 ^b	46,53±3,53 ^c
p	-	*	*	*

(* $p<0,05$).

TARTIŞMA

Reaktif oksijen türleri, sperm kapasitasyonu, akrozom reaksiyonu, hiperaktivasyon ve sperm-oosit füzyonuna aracılık eden hücreler arası sinyal sistemleri fizyolojik rol oynar (Baumber vd., 2003). Bununla birlikte, spermatozoa tarafından aşırı ROS üretimi plazma zarına zarar verir ve böylece sperm hareketliliği, metabolik aktivite ve canlılık azalır (Ball vd., 2001).

Sunulan çalışmada, sulandırıcıya eklenen BSA ve troloksun kısa süreli saklama sırasında motilite, canlılık ve akrozom bütünlüğü parametrelerini koruyucu yönde etkilediği görülmüştür.

Sığır serum albüminin (BSA) koç sperması donma-çözülme sonu sperma motilitesi, plazma membran ve akrozomu bütünlüğünü üzerine koruyucu etki gösterdiği belirtilmektedir (Uysal ve Bucak, 2007). Çalışmamızda spermatolojik parametreler üzerine BSA gruplarının koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir ($p < 0,05$). Benzer şekilde araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda, koç (Matsuoka vd., 2006) ve bufalo (El-Kon, 2011) sperması üzerine BSA'nın spermatolojik parametreleri koruduğu belirlenmiştir. Çalışmamızdan farklı olarak Sarıözkan vd., (2013) yaptıkları çalışmada tavşan spermasında BSA eklenen sulandırıcının ilk 48 saatte kontrol ile karşılaştırıldığında motilite değerinde kontrol grubu ile farklılığa rastlanmamış ($p > 0,05$), 72 saatte ise benzer şekilde faydalı bulunmuştur. Sunulan çalışma ile önceki çalışmalar benzer sonuçlar göstermiştir.

Troloks, suda çözünürlüğe sahip bir E vitamini (α tocopherol) türevidir ve yüksek konsantrasyonlarda kullanılabilir (Mata-Campuzano vd., 2014). Önceki çalışmalarda Troloks un, fizyolojik sıcaklıklarda nispeten uzun inkübasyonlarda bile radikal bir temizleyici olarak yüksek bir etkinliğe sahip olduğu (Domínguez-Rebolledo vd., 2009) ve koç sperması kriyoprezervasyonu için olumlu sonuçlar veren önemli bir katkı maddesi olduğu

(da Silva Maia vd., 2010) belirlenmiştir. Troloks'un insan sperması üzerine yapılan çalışmalarda çözüm sonu bazı spermatolojik parametrelerde olumlu etki gösterdiği araştırmacılar tarafından belirtilmektedir (Taylor vd., 2009; Minaei vd., 2012). Sperma hücresinde ROS üretiminin büyük oranda sulandırıcı içerisinde ve dondurma çözündürme işlemleri sırasında gerçekleştiğini ve dondurma işlemi sırasında kullanılan troloks un oksidatif stres oluşumunu kontrol edici özelliği olduğu belirtilmektedir (da Silva Maia vd., 2010). Troloksun koç spermasında kinematik parametreleri, plazma ve mitokondriyal yapıyı koruduğu Silva vd. (2013), domuzlarda sperma kalitesini arttırdığı Brzezińska-Ślebodzińska vd. (1995), çözüm sonu motilite ve mitokondriyal membran potansiyelini üzerine pozitif etkisi olduğu Peña vd. (2003) tarafından belirtilmiştir.

Resveratrol, in vitro koşullarda reaktif oksijen türlerinin (ROS) zayıf yakalayıcısı olmasına rağmen in vivo olarak güçlü bir antioksidan işlevi göstermektedir. Resveratrol'in in vivo antioksidan özelliği nitrik oksit sentezini artırma yeteneği ile güç kazanmaktadır. Burada in vivo antioksidan olarak, nitrik oksit süperoksidi yakalama yeteneğine sahiptir. Resveratrol biyolojik sistemlerde bulunan antioksidanların hücre içi konsantrasyonlarının sürekliliğini de sağlamaktadır (De La Lastra ve Villegas, 2007). Resveratrolün insan spermasında oksidatif stresi azalttığı, motiliteyi arttırıp membran bütünlüğünü koruduğu Garcez vd. (2010), DNA hasarını düşürdüğü Branco vd. (2010), sağlıklı ratlara motilite ve anormal sperma oranı üzerine etkisi olmadığını Ourique vd. (2013), tarafından belirtilmiştir. Sunulan çalışmamızda resveratrol grupları kontrol grubu ile farklılık oluşturmamış ve 72. saatte koç sperması üzerine koruyucu etki göstermediği görülmüştür. Kısa süreli olarak saklanan aygır sperması incelemesinde resveratrol grubunun motilite, SYBR-PI ve FITCH-PI oranlarında kontrol grubuna kıyasla daha iyi koruyuculuk göstermiştir Giaretta vd.

(2014). Sunulan çalışma ile farklı sonuçlar oluşmasının doz farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

SONUÇ

Sunulan çalışmada, sperma sulandırıcısına eklenen resveratrol, troloks ve BSA'nın kısa süreli saklanan koç spermaları üzerine motilite, canlılık ve akrozom bütünlüğü parametrelerinde koruyucu etki gösterdiği belirlendi. Çalışma sonunda 72. saatte motilite, canlılık ve akrozom bütünlüğü için en yüksek koruyuculuğa BSA (6 mg/ml) grubunda ulaşılmıştır.

TEŞEKKÜR / AÇIKLAMALAR

Etik beyan: Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan çalışma için Etik Kurul izni alınmıştır (Tarih/No: 2018/441).

Çıkar çatışması: Yazarlar, bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedirler.

KAYNAKLAR

- Ball, B. A., Medina, V., Gravance, C. G., & Baumber, J. (2001).** Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 C. *Theriogenology*, 56(4), 577-589.
- Baumber, J., Sabeur, K., Vo, A., & Ball, B. A. (2003).** Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 60(7), 1239-1247.
- Bilodeau, J. F., Blanchette, S., Gagnon, C., & Sirard, M. A. (2001).** Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, 56(2), 275-286.
- Branco, C. S., Garcez, M. E., Pasqualotto, F. F., Erdtman, B., & Salvador, M. (2010).** Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. *Cryobiology*, 60(2), 235-237.
- Brzezińska-Ślebodzińska, E., Ślebodziński, A. B., Pietras, B., & Wieczorek, G. (1995).** Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biological trace element research*, 47(1-3), 69-74.
- Bucak, M. N., & Tekin, N. (2007).** Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research*, 73(1-3), 103-108.

- da Silva Maia, M., Bicudo, S. D., Sicherle, C. C., Rodello, L., & Gallego, I. C. S. (2010).** Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. *Animal Reproduction Science*, 122(1-2), 118-123.
- De La Lastra, C. A., & Villegas, I. (2007).** Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society Transactions*, 35(5), 1156-1160.
- Diaz-Jimenez, M., Dorado, J., Ortiz, I., Consuegra, C., Pereira, B., Gonzalez-De Cara, C. A., Aguilera R., Mari G., Mislei B., Love C. C., & Hidalgo, M. (2018).** Cryopreservation of donkey sperm using non-permeable cryoprotectants. *Animal reproduction science*, 189, 103-109.
- Domínguez-Rebolledo, Á. E., Fernández-Santos, M. R., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Garde, J. J., & Martínez-Pastor, F. (2009).** Washing increases the susceptibility to exogenous oxidative stress in red deer spermatozoa. *Theriogenology*, 72(8), 1073-1084.
- El-Kon, I. (2011).** Testing usability of bovine serum albumin (BSA) for preservation of Egyptian buffalo semen. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 11(4), 495-502.
- Garcez, M. E., dos Santos Branco, C., Lara, L. V., Pasqualotto, F. F., & Salvador, M. (2010).** Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. *Fertility and sterility*, 94(6), 2118-2121.
- Giaretta, E., Bucci, D., Mari, G., Galeati, G., Love, C. C., Tamanini, C., & Spinaci, M. (2014).** Is resveratrol effective in protecting stallion cooled semen? *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(11-12), 1307-1312.
- Giulivi, C., & Cadenas, E. (1993).** Inhibition of protein radical reactions of ferrylmyoglobin by the water-soluble analog of vitamin E, Trolox C. *Archives of biochemistry and biophysics*, 303(1), 152-158.
- Gungor, S., Ozturk, C., & Omur, A. D. (2017).** Positive effects of trehalose and cysteine on ram sperm parameters. *Veterinarni medicina*, 62(5), 245-252.
- Gürler, H., Malama, E., Heppelmann, M., Calisici, O., Leiding, C., Kastelic, J. P., & Bollwein, H. (2016).** Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*, 86(2), 562-571.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., Fong, H. H., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C., & Pezzuto, J. M. (1997).** Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275(5297), 218-220.
- Ledesma, A., Fernández-Alegre, E., Cano, A., Hozbor, F., Martínez-Pastor, F., & Cesari, A. (2016).** Seminal plasma proteins interacting with sperm surface revert capacitation indicators in frozen-thawed ram sperm. *Animal reproduction science*, 173, 35-41.

- Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Tamayo-Canul, J., López-Uruña, E., de Paz, P., Anel, L., Martínez-Pastor F., & Alvarez, M. (2014).** Refrigerated storage of ram sperm in presence of Trolox and GSH antioxidants: Effect of temperature, extender and storage time. *Animal reproduction science*, 151(3-4), 137-147.
- Matsuoka, T., Imai, H., Kohno, H., & Fukui, Y. (2006).** Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development*, 52(5), 675-683.
- Minaei, M. B., Barbarestani, M., Nekoonam, S., Abdolvahabi, M. A., Takzare, N., Asadi, M. H., Hedayatpour A., & Amidi, F. (2012).** Effect of Trolox addition to cryopreservation media on human sperm motility. *Iranian journal of reproductive medicine*, 10(2), 99.
- O'Hara, L., Hanrahan, J. P., Richardson, L., Donovan, A., Fair, S., Evans, A. C. O., & 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.
- Ourique, G. M., Finamor, I. A., Saccol, E. M., Riffel, A. P., Pês, T. S., Gutierrez, K., Gonçalves, P.B.D., Baldisserotto, B., Pavanato M. A., & Barreto, K. P. (2013).** Resveratrol improves sperm motility, prevents lipid peroxidation and enhances antioxidant defences in the testes of hyperthyroid rats. *Reproductive Toxicology*, 37, 31-39.
- Peña, F. J., Johannisson, A., Wallgren, M., & Martinez, H. R. (2003).** Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Animal reproduction science*, 78(1-2), 85-98.
- Said, T. M., Gaglani, A., & Agarwal, A. (2010).** Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive biomedicine online*, 21(4), 456-462.
- Sariözkan, S., Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Ulutaş, P. A., & Bilgen, A. (2009).** The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology*, 58(2), 134-138.
- Silva, S. V., Soares, A. T., Batista, A. M., Almeida, F. C., Nunes, J. F., Peixoto, C. A., & Guerra, M.M.P. (2013).** Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. *Animal reproduction science*, 137(1-2), 37-44.
- Taylor, K., Roberts, P., Sanders, K., & Burton, P. (2009).** Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. *Reproductive Biomedicine Online*, 18(2), 184-189.
- Tremellen, K. (2008).** Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Human reproduction update*, 14(3), 243-258.
- Uguralp, S., Usta, U., & Mizrak, B. (2005).** Resveratrol may reduce apoptosis of rat testicular germ cells after experimental testicular torsion. *European Journal of Pediatric Surgery*, 15(5), 333-336.
- Uysal, O., & Bucak, M. N. (2007).** Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. *Acta Veterinaria Brno*, 76(3), 383-390.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
- Zhang, X., Li, X., & Xia, L. (2015).** Expression of a thermo-alkaline lipase gene from *Talaromyces thermophilus* in recombinant *Pichia pastoris*. *Biochemical Engineering Journal*, 103, 263-269.
- Zhu, Z., Li, R., Fan, X., Lv, Y., Zheng, Y., Hoque, S. A., Wu D., & Zeng, W. (2019).** Resveratrol improves boar sperm quality via 50AMP-activated protein kinase activation during cryopreservation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-15.