

RESEARCH ARTICLE

J Res Vet Med. 2022; 41 (1) 37-42
DOI:10.30782/jrv.999299

L-Karnitin İlave Edilmiş Sulandırıcıların Dondurma-Çözdürme Sonrası Teke Spermasının Spermatolojik Parametleri Üzerine Etkisi

Ahmet Aktar^{1*}, Selim Alçay¹

1Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama A.D., Görükle Kampüsü, Bursa

Received 22-09-2021 Accepted 04-01-2022

Özet

Bu çalışmada, L-karnitin (LC) dondurma-eritme sonrası teke sperması üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amaçlandı. Ergin tekelerden elde edilen sperma örnekleri pooling yapıldı ve beş eşit hacme bölündü. Farklı konsantrasyonlarda LC içeren (2.5mM /5mM/ 7.5mM/ 10 mM) ve içermeyen (kontrol) sulandırıcılar ile sulandırıldı ve donduruldu. Gruplara ait spermatozoa motilitesi, plazma membran fonksiyonel bütünlüğü (HOST), akrozomal bütünlük (PSA-FITC) ve malondialdehit konsantrasyonu belirlendi. Eritme sonrası motilite değerleri; LC5 (L-karnitin 5mMol) ve LC7,5 (L-karnitin 7,5mMol) gruplarında kontrol grubuna göre daha üstün bulundu ($P<0.05$). Plazma membran bütünlüğü değerlendirildiğinde LC5 grubu kontrol grubu ve diğer LC gruplarına göre membran bütünlüğünü daha iyi koruduğu görüldü ($P<0.05$). Akrozomal bütünlük oranları LC5 ve LC7,5 gruplarında diğer tüm gruplara göre daha iyi bulundu ($P<0.05$). Malondialdehit (MDA) konsantrasyonu, membran lipid peroksidasyonunu analiz etmek için kullanıldı ve eritme sonrası kontrol grubuna kıyasla LC5 grubunda daha iyi bir sonuç elde edildi ($P<0.05$). Çalışmada, sulandırıcıya LC ilave edilmesinin teke spermatolojik parametreleri üzerinde faydalı etkisi olduğu görüldü. Ayrıca, L-karnitin 5mM dozda kullanımının, diğer dozlara göre daha etkin koruma sağladığı sonucuna varılmıştır. Anahtar sözcükler: Teke, Sperma, Dondurma, L-Karnitin

Abstract

The Effect of L-Carnitine Added Extenders on Spermatological Parameters of Goat Sperma Post-Thawing

In this study, it was aimed to evaluate the effects of L-carnitine (LC) on goat spermatozoa after thawing. Sperm samples from sexually mature goat were pooled and divided into five equal volumes. Diluted with diluents added at different concentrations of LC (2.5mM /5 mM/ 7.5mM/10 mM) and without (control) and frozen. Sperm motility, plasma membrane functional integrity (HOST), acrosomal integrity (PSA-FITC) and malondialdehyde concentration of the groups were determined. Motility values post thaw; LC5 (L-Carnitin 5mMol) and LC7,5 (L-Carnitin 7,5mMol) groups had a positive effect on compared to the the control group ($P<0.05$). The plasma membrane integrity was evaluated, it was observed that the LC5 group preserved the membrane integrity better than the control group and other LC groups ($P<0.05$). Acrosome integrity rates were better in the LC5 and LC7.5 groups than in the other groups ($P<0.05$). The malondialdehyde (MDA) concentration was used to analyze the membrane lipid peroxidation and a better result was obtained in the LC5 group compared to the post-thaw control group. ($P<0.05$). The study showed that the addition of LC to the extender had a beneficial effect on goat spermatological parameters. In addition, it was concluded that the use of carnitine at a dose of 5mMol provides more effective preservation than other doses.

Keywords: Goat, Semen, Cryopreservation, L-Carnitine

* Corresponding author: Ahmet AKTAR, Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama A.D., Görükle Kampüsü, Bursa (16059), Tel: +90 224 2941350, e-posta: ahmet1889@gmail.com

Giriş

Kriyoprezervasyon, sperm metabolizmasını durma noktasına getiren reversible bir süreçtir.¹ Dondurma eritme uygulamaları esnasında soğuk şoku², buz kristalleri oluşumu ve oksidatif stres³ spermanın membran yapısını değiştirerek membran fonksiyonel bütünlüğünü² ve DNA bütünlüğünü⁴ olumsuz etkilemektedir. Ayrıca, intrasellüler enzim ve lipid salınımının artışı sonucu hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) aktivitesi artmaktadır. Bu durum lipid peroksidasyonuna sebep olarak; spermatozoon üzerinde fiziksel, biyokimyasal ve fonksiyonel hasarlar oluşturmaktadır.⁵ Bu olumsuz değişiklerin spermatolojik parametrelerde azalmaya ve spermanın fertilizasyon yeteneğinde düşmeye neden olduğu yapılan çalışmalarla bildirilmiştir.^{4,6} Spermanın dondurma başarısı; spermatozoonu korumak için çok önemli bir faktör olan sulandırıcıların bileşimine bağlıdır.^{7,8}

Sulandırıcılara ilave edilen antioksidanlar, kriyoprezervasyon sürecinden kaynaklanan lipid peroksidasyonunu kontrol altına almakta ve böylece ROS oluşumunu azaltarak spermatozoonun fertilizasyon yeteneğini korumaktadır.^{9,10} Dolayısıyla; sperma sulandırıcısına antioksidan madde ilave edilmesinin dondurma-eritme sonrası spermatolojik parametreler üzerine olumlu etkisi olabileceği düşünülmektedir.

Lesitin; hayvan hücre biyomembralarının düzenlenmesinde önemli bir etkiye sahiptir.^{11,12} Bu nedenle, bileşenlerinden biri olarak yumurta sarısının içerisinde ya da ekstraktede edilerek sek olarak sperma dondurması için kullanılır.^{7,12} Lesitin, soğuk şoku sırasında kaybedilen fosfolipidleri geri yükleyerek sperma plazma membranını korur.⁷ Birçok araştırmacı, lesitin bazlı sulandırıcılar kullanarak eritme sonrası ve inkübasyon sonrasında kabul edilebilir spermatolojik parametreleri elde etmiştir.^{7,12,13,14}

L-karnitin, lipid metabolizmasını hızlandırarak hücresel enerji üretimi için uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriyal β -oksidasyonunda önemli role sahiptir.¹⁶ Bu sayede yağ asitlerinin iç mitokondriyal membrandan mitokondri içerisine taşınmalarını sağlayarak, enerji üretiminde görev almaktadır.^{15,16} Erkek genital sisteminde L-karnitin epididimis ve spermatozoada yoğunlaşmıştır.¹⁵ Epididimiste bulunan L-karnitin miktarı kanda bulunan miktardan 2000 kat daha fazladır.¹⁷ Antioksidatif özelliği ile L-karnitin; spermatozoonu reaktif oksijen türlerine karşı korur, spermatozoonların mitokondriyal membranlarının stabilizasyonunu sağlar ve spermatozoon DNA yapısını korunmasına katkıda bulunur. Ayrıca L-karnitin,

spermatozoonun epididimiste olgunlaşmasını ve motilite yeteneğini destekler.^{18,19} L-karnitin, hücresel homeostazı koruyan, β -oksidasyon yolunu sınırlayan ve yağ asitlerinin mitokondriye taşınmasında rol oynayan endojen bir bileşiktir.^{20,21} Çeşitli hayvan türlerinde spermanın saklanması sırasında motilite, membran ve akrozomal bütünlüğün korunması için sperma sulandırıcılarına L-karnitin ilave edilmesinin olumlu etkilerinin olabileceği bildirilmiştir (insan¹⁷, horoz¹⁸, domuz²², boğa²³, kedi¹⁹, teke²⁴ ve aygır²⁵). Bu çalışmada farklı konsantrasyonlarda L-karnitin eklenmiş lesitin bazlı sulandırıcıların eritme sonrası teke spermasının motilite, plazma membran ve akrozomal bütünlüğü üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Kimyasallar

Tüm kimyasallar Sigma (St. Louis, ABD) ve Merck'ten (Darmstadt, Almanya) satın alınmıştır.

Sperma Alınması

Bursa Uludağ Veteriner Fakültesi Hayvan Sağlığı ve Hayvansal Üretim Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde aynı bakım ve beslenme şartlarında bulunan beş adet teke (3-5 yaş) kullanıldı. (Etik Kurul No: 2021-04/03) Teke sperması gün aşırı beş kez elektro-ejakülatör (Ruakura Goat Probe-Plastic Products) kullanılarak alındı. Alınan sperma ılık su banyosuna (28-32 °C) alındı ve zaman kaybetmeden laboratuvara getirildi. Faz kontrast mikroskopta (Olympus BX51) +++ kitle hareketi (0-5 ölçekte), > %75 motilite ve >1x10⁹ spermatozoon/ml konsantrasyona sahip sperma örnekleri pooling yapıldı.

Spermanın sulandırılarak dondurulması

Çalışmada Alçay ve ark.²⁶ teke spermasını dondurmada kullandıkları tek aşamalı sulandırma prosedürü [%1.5 lesitin, 223.7 mM Tris, 66.6 mM sitrik asit, 55.5 mM Fruktoz, 1mM sistein, 4.03 mM EDTA, 100.4 mM Trehaloz, 3 g/L dihidrostreptomisin ve 4g/L penisilin G] kullanıldı. Gruplar; kontrol (antioksidan içermeyen), LC 2,5 mM (LC2,5), LC 5 mM (LC5), LC 7,5 mM (LC7,5), LC 10 mM (LC10) şeklinde oluşturuldu.

Pooling yapılan sperma beş eşit hacme bölünerek her bir grup 1:7 (sperma:sulandırıcı) oranında ve nihai konsantrasyon 100x10⁶ (Spermatozoa/mL) olacak şekilde sulandırıldı. Sulandırılmış spermanın; sıcaklığı 1 saat içerisinde 5 °C'a düşürüldü ve ardından 5 °C'ta 2 saat ekilibrasyona bırakıldı. Ekilibrasyon sonrasında sperma payetlere çekildi ve her bir grup farklı renklerde polivinilpirolidol (PVP) kapatma tozları ile kapatıldı. Payetlere çekilmiş spermalar, programlanabilir sperma-embriyo dondurma makinesi (Nicol plus PC- Air Liquide, Marne-la-Vallée Cedex 3,

France) ile donduruldu.

Donmuş Spermanın Muayenesi

Eritme sonrası spermanın motilitesi, plazma membran bütünlüğü, akrozom bütünlüğü ve malondialdehide konsantrasyonu (MDA) parametreleri incelendi. Plazma membran bütünlüğü için bir hipoozmotik şişme testi (HOST), akrozom bütünlüğü için FITC-Pisum sativum aglutinin (PSA-FITC), malondialdehit konsantrasyonu (MDA) için tiyobarbitürik asit reaksiyon testi kullanıldı. Değerlendirmeler çalışma sırasında aynı kişi tarafından yapıldı.

Motilite Muayenesi

Motilite değerlendirmesi 37 °C sıcaklığa ayarlanmış ısıtıcı tablalı faz kontrast mikroskop (Olympus BX51-TF - Olympus Optical Co., Ltd., Japonya) kullanılarak x400 büyütmede incelendi ve % olarak ifade edildi.

Sperm Membran Bütünlüğünün Muayenesi

Sperm membranının fonksiyonel bütünlüğünü değerlendirilmesi 10 µL semen 100 µL 100 mOsm hipoozmotik solüsyon (9 g fruktoz + 4,9 g sodyum sitrat damıtılmış litre başına su) kullanılarak ve 37 °C'de 60 dakika inkübe edilerek yapıldı. İnkübasyondan sonrası faz-kontrast mikroskopu ile 1000x büyütmede toplam 200 spermatozom hücresi değerlendirildi. Şişmiş veya kıvrılmış kuyruklu spermatozoonlar kaydedildi.²⁷

FITC PSA ile Akrozomal Bütünlüğün Muayenesi

Sperm akrozom bütünlüğü, FITC-PSA kullanılarak değerlendirildi.²⁸ 5-10 µL yıkanmış sperma örneği (25-50x106 mL/spermatozoon) ile frotiler hazırlanarak havada kurutuldu. Kurutulmuş frotiler 4°C sıcaklıkta aseton ile 10 dakika tespit edilip karanlıkta 30 dakika FITC PSA (50 µg/ml fosfat buffer solüsyonu) ile boyandı. Ardından frotiler fosfat buffer solüsyon ile (PBS) yıkandı, gliserol ile kaplandı ve floresan mikroskop altında incelendi. Akrozom bütünlüğü için en az 200 spermatozoon değerlendirilerek sağlam olan spermatozoan oranı % olarak belirlendi.

Malondialdehit (MDA) Konsantrasyonu Tespiti

Lipid peroksidasyon indikatörü olan MDA konsantrasyonlarının tespiti için tiyobarbitürik asit reaksiyon testi kullanıldı.²⁹ 0.25 mL seyreltilmiş sperma numunesi, proteini çöktürmek için 0.25 mL soğuk %20 trikoloroasetik asit ile muamele edildi. Santrifüj sonucunda çöken protein peletlendi ve 0,25 mL süpernatant, 0,25mL %0,67 konsantrasyonda tiobarbitürik asit ile 100°C'lik bir kaynar su banyosunda 10 dakika süreyle inkübe edildi. Sıcak su banyosunda inkübasyondan sonra numune soğumaya bırakıldı. Absorbans değerleri spektrofotometre (Mannheim Boehringer Photometer 4010) kullanılarak 532 nm değer-

de ölçüldü. MDA konsantrasyonları nmol/mL olarak ifade edildi.

İstatistiksel Analiz

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak gösterildi. Normallik testi için Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Sperma parametreleri Kruskal-Wallis testi kullanılarak analiz edildi ve gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar Mann-Whitney U testi ile belirlendi. Çalışmada elde edilen tüm veriler SPSS (Windows için SPSS 23.0; SPSS, Chicago, IL, ABD) kullanılarak analiz edildi. P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Pooling yapılan taze sperma örneklerinde motilite, plazma membran bütünlüğü ve akrozomal bütünlük oranları sırasıyla ortalama 86.00±2.24, 88.80±2.17 ve 91.00±1.58 idi. Taze sperma ile karşılaştırıldığında spermatozoa kalitesi; kriyoprezervasyon işleminden olumsuz etkilenmiştir (P<0.05). Eritme sonrası spermatolojik parametreler üzerindeki L-karnitin konsantrasyonlarının etkileri Tablo 1'de gösterilmektedir.

Motilite değerleri eritme sonrası; LC5 ve LC7,5 gruplarında kontrol grubuna göre daha üstün bulunmuştur (P<0.05). Plazma membran bütünlüğü değerlendirildiğinde LC5 grubu membran bütünlüğünü kontrol grubu ve diğer LC gruplarına göre daha iyi korumuştur (P<0.05). Akrozomal bütünlük oranları LC5 ve LC7,5 gruplarında diğer tüm gruplara göre daha iyi bulunmuştur (P<0.05). LC2,5 ve LC10 grupları ile kontrol grubu akrozomal bütünlük değerleri arasında istatistiksel bir fark bulunmamaktadır. MDA değerleri ise LC5 grubunda, kontrol grubu ve diğer antioksidan gruplarına göre daha üstün olduğu görülmüştür (P<0.05) ve LC2,5, LC7,5 ve LC10 grupları arasında istatistiksel bir fark saptanmamıştır.

Tablo 1: Farklı sulandırıcı gruplarında çalışılan teke spermasının eritme sonrası parametrelerinin ortalaması.

Gruplar	Motilite (%)	HOST (%)	PSA (%)	MDA (nmol/ml)
Kontrol	50.66±4.16 ^a	59.60±4.83 ^a	75.40±3.69 ^a	5.40±0.73 ^a
LC 2,5	53.66±4.80 ^{ad}	61.66±2.58 ^a	77.46±3.41 ^a	5.06±0.59 ^{ae}
LC 5	61.66±4.49 ^b	67.73±3.05 ^b	82.06±4.25 ^b	4.00±0.53 ^b
LC 7,5	55.66±5.93 ^{cd}	64.73±3.71 ^c	80.40±3.90 ^b	4.60±0.73 ^{ce}
LC 10	54.00±5.07 ^{ac}	61.06±2.98 ^a	78.32±4.44 ^a	4.77±0.79 ^{de}

Veriler, Ortalama ± S.D. olarak verilmiştir.

Aynı satır içindeki farklı harfler gruplar arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir (P< 0.05).

Tartışma ve Sonuç

Spermanın kriyoprezervasyonu, genetik materyalin uzun süre korunmasını sağlar. Ancak dondurma işleminin sper-

manın fertilizasyon yeteneği üzerine olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir.^{4,24,30} Bu istenmeyen etkiler, spermanın canlılığını, hareketliliğini, plazma membran bütünlüğünü ve akrozomal bütünlüğü azaltır.³¹

LC; antioksidan özelliği ve anti-apoptotik aktivitesi ile spermatozoonu dondurma-eritme işlemlerinin zararlı etkilerine karşı koruyan, suda çözünür bir amino asittir. Mevcut çalışmada, sulandırıcıya LC ilavesinin eritme sonrası teke spermasının kalitesi üzerindeki etkisi değerlendirildi.²¹

Motilite, spermanın değerlendirilmesinde temel kalite parametrelerinden biridir.^{4,27} Çalışmada, sulandırıcıya LC ilave edilmesinin, teke spermasının dondurma-eritme sonrası motilite oranını arttırdığı görüldü ($P<0.05$). LC, ATP üretimi için mitokondrinin iç zarında yağ asitlerinin taşınmasını kolaylaştırır.^{15,16} Bu etkisi ile LC; teke spermasının hareketliliğini geliştirmekten sorumlu olabilir. Ayrıca çeşitli sperma sulandırıcılarıyla dondurularak saklanan spermatozoalarının motilite değerleri farklı çalışmalarda %25 ile %62 arasında değişmektedir.^{31,32,33,34} Çalışmamız, LC gruplarındaki eritme sonrası motilite değerlerinin önceki çalışmaların bulgularıyla iyi bir uyum içinde olduğunu göstermektedir.

Spermatozoon plazma membran bütünlüğü; spermatozoonun kapasitasyonu, akrozom reaksiyonunda ve sperm füzyonunda çok önemli bir etkiye sahiptir.⁶ Ancak spermatozoon plazma membran bütünlüğü kriyoprezervasyon işleminden olumsuz yönde etkilenmektedir.^{13,35,36} Söz konusu olumsuz etkiler; kriyoprezervasyon esnasında şekillenen soğuk şoku, buz kristalizasyonu, ozmotik stres ve lipid peroksidasyonunun spermatozoon membran geçirgenliği ve morfolojisini etkilemesi kaynaklıdır.^{37,38} Bu nedenle, hücrel hasarı önlemek için dondurma işlemi sırasında membran bütünlüğünü korumak çok önemlidir. HOST, spermatozoon membran işlevselliğindeki ince değişiklikleri saptamak için optimize edilmiş bir testtir.^{39,40} Çalışmamızda dondurma-eritme sonrası gruplara ait HOST değerleri incelendiğinde; sulandırıcılara antioksidan ilave edilmesinin plazma membran fonksiyonel bütünlüğü üzerine olumlu bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Çalışmada, eritme sonrası LC5 grubuna ait plazma membran fonksiyonel bütünlük değerleri, diğer gruplara göre daha yüksek bulunmuştur ($P<0.05$). Çalışmamızdaki HOST değerleri önceki çalışmalarla uyumludur.^{31,33}

Akrozom bütünlüğü; kriyoprezervasyon işleminden olumsuz yönde etkilenir ve bu olumsuz etki fertilizasyon yeteneğinde kayıplarına yol açar.^{4,6,8} Çalışmamızda, eritme sonrası LC grupları (LC2,5 ve LC10) ile kontrol grubu arasında istatistiksel bir farklılık saptanmamıştır ($P>0.05$). LC5 ve

LC7,5 grupları, akrozomal bütünlüğü hem kontrol hem de LC2,5 ve LC10 gruplarından daha yüksek oranda korumuştur ($P<0.05$). Bu sonuçlar önceki çalışmalarla uyum içerisindedir.^{31,33}

Oksidatif hasar ise, hücrelerde çoklu doymamış yağ asidinin peroksidasyonunun anahtar ürünü olan MDA seviyeleri ile değerlendirilebilir. Çalışmamızda LC5 grubundaki MDA seviyeleri kontrol grubuna göre daha düşük oksidatif hasara sahip olduğu görülmüştür ($P<0.05$).

Bu çalışmanın sonuçları, 5 mM LC içeren sulandırıcının teke sperması motilite, plazma membran ve akrozomal bütünlüğünü dondurma sırasında kontrol grubuna göre daha iyi koruduğunu göstermiştir. Sonraki çalışmalarda LC'nin fertilizasyon yeteneği üzerine odaklanılmalıdır.

Kaynakça

1. Holt WV, Penfold LM, Chenoweth P, & Lorton S. Fundamental and practical aspects of semen cryopreservation. In P. Chenoweth, & S. Lorton (Eds.), *Animal andrology: Theories and applications* (pp. 76–79). Wallingford, UK: CAB International. 2014.
2. Ortman K, Rodriguez-Martinez H. Membrane Damage during Dilution, Cooling and Freezing-Thawing of Boar Spermatozoa Packaged in Plastic Bags. *Journal of Veterinary Medicine Series A*. 1994; 41: 37-47.
3. Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C. Levels of Antioxidant Defenses Are Decreased in Bovine Spermatozoa after a Cycle of Freezing and Thawing. *Mol Reprod Dev*. 2000; 55: 282-8.
4. Nur Z, Zık B, Ustuner B, Sağırkaya H, Ozguden CG. Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. *Theriogenology*. 2010; 73: 1267-1275.
5. Watson PF. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. *J Reprod Fertil*. 1981; 62(2): 483-92.
6. Ustuner B, Alçay S, Toker MB, Nur Z, Gokce E, Sonat FA, Soylu MK. Effect of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) seminal plasma on the post-thaw quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based or egg yolk-based extender. *Animal Reproduction Science*. 2016; 164: 97–104.
7. 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; 205–209.
8. Alçay S, Gokce E, Toker MB, Onder NT, Ustuner B, Uzabacı E, Cavus S. Freeze-dried egg yolk based extenders containing various antioxidants improve post

- thawing quality and incubation resilience of goat spermatozoa. *Cryobiology*. 2016; 72(3): 269–273.
9. Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM. Prevention of oxidative stress injury to sperm. *J Androl*. 2005; 26: 654-60.
 10. Donnelly ET, McClure N, Lewis SEM. Glutathione and hypotaurine in vitro: motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. *Mutagenesis*. 2000; 15: 61-68.
 11. Gokce E, Alçay S, Gul Z. Positive effect of BSA supplemented soybean lecithin based extender on liquid storage of ram semen at 5°C. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2017; 64: 313–320.
 12. Ustuner B, Alçay S, Nur Z, Sagirkaya H, Soylu MK. Effect of egg yolk and soybean lecithin on tris-based extender in postthaw ram semen quality and in vitro fertility. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 2014; 20: 393–398.
 13. Forouzanfar M, Sharafi M, Hosseini SM, Ostadhosseini S, Hajian M, Hosseini L, Nasr-Esfahani MH. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithinbased extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*. 2010; 73: 480–487.
 14. Najafi A, Daghigh-Kia H, Dodaran HV, Mehdipour M, Alvarez-Rodriguez M. Ethylene glycol, but not DMSO, could replace glycerol inclusion in soybean lecithin based extenders in ram sperm cryopreservation. *Animal Reproduction Science*. 2017; 177: 35–41.
 15. Agarwal A, Said TM. Carnitines and male infertility. *Reproductive biomedicine online*. 2004; 8(4): 376-384.
 16. Zhou X, Liu F, Zhai SD. Effect of L-carnitine and/or L-acetyl-carnitine in nutrition treatment for male infertility: a systematic review. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 2007; 16(S1): 383-390.
 17. Shahrzad E, Zahiri S, Ghasemi F. A study of effects of L-carnitine on morphology and apoptosis in cryopreserved sperm. *Advances in Environmental Biology*. 2013; 7(9): 2126-2135.
 18. Fattah A, Sharafi M, Masoudi R. L-carnitine is a survival factor for chilled storage of rooster semen for a long time. *Cryobiology*. 2017; 74: 13-18.
 19. Manee-in S, Parmornsupornvichit S, Kraiprayoon S. L-carnitine supplemented extender improves cryopreserved-thawed cat epididymal sperm motility. *Asian-Australasian journal of animal sciences*. 2014; 27(6): 791-796.
 20. Cerolini S, Zaniboni L, Maldjian A, Gliozzi T. Effect of docosahexaenoic acid and α -tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. *Theriogenology*. 2006; 66: 877-886.
 21. Fattah A, Sharafi M, Masoudi R, Shahverdi A, Esmaeili V, Najafi A. L-Carnitine in rooster semen cryopreservation: Flow cytometric, biochemical and motion findings for frozen-thawed sperm. *Cryobiology*. 2017; 74: 148-153.
 22. Lee YJ, Lee SH, Lee E. Effects of l-carnitine during the storage of fresh semen in miniature pigs. *reproductive & developmental biology*. 2014; 38(4): 171-177.
 23. Bucak MN, Tuncer PB, Sariözkan S. Effects of antioxidants on postthawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiology*. 2010; 61(3): 248-253.
 24. Bucak MN, Sariözkan S, Tuncer PB. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Research*. 2010; 89(1): 24-30.
 25. Gibb Z, Lambourne SR, Quadrelli J. L-carnitine and pyruvate are prosurvival factors during the storage of stallion spermatozoa at room temperature. *Biology of Reproduction*. 2015; 93(4): 1-9.
 26. Alçay S, Ustuner B, Aktar A, Mulkpınar E, Duman M, Akkasoglu M, Cetinkaya M. Goat semen cryopreservation with rainbow trout seminal plasma supplemented lecithin-based extenders. *Andrologia*. 2019; 52(4).
 27. Alçay S, Toker MB, Gokce E, Ustuner B, Onder NT, Sagirkaya H. Successful ram semen cryopreservation with lyophilized egg yolk-based extender. *Cryobiology*. 2015; 71: 329-333.
 28. Alçay S, Toker B, Ustuner B, Nur Z, Sagirkaya H, Soylu MK. Investigation of relationships between dna integrity and fresh semen parameters in rams. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 2014; 20(5): 793-798.
 29. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*. 1990; 186: 407-421.
 30. Alçay S, Cakmak S, Cakmak I, Mulkpınar E, Toker MB, Ustuner B, Sen H, Nur Z: Drone semen cryopreservation with protein supplemented TL-Hepes based extender. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2019; 25(4): 553-557.
 31. Alçay S, Cakmak S, Cakmak I, Mulkpınar E, Gokce E, Ustuner B, Sen H, Nur Z: Successful cryopreservation of honey bee drone spermatozoa with royal jelly supplemented extenders. *Cryobiology*, 87, 28-31, 2019.
 32. Wegener J, Bienefeld K. Toxicity of cryoprotectants to honey bee semen and queens. *Theriogenology*. 2012;

77: 600-607.

33. Alçay S, Ustuner B, Cakmak I, Cakmak S, Nur Z. Effects of various cryoprotective agents on post thaw drone semen quality. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2015; 21: 31-35.
34. Wegener J, May T, Kamp G, Bienefeld K. New methods and media for the centrifugation of honey bee (Hymenoptera: Apidae) drone semen. *J Econ Entomol.* 2014; 107, 47-53.
35. Emamverdi M, Zhandi M, Shahneh AZ, Sharafi M, Akbari-Sharif A. Optimization of ram semen cryopreservation using a chemically defined soybean lecithin-based extender *Reprod. Dom. Anim.* 2013; 48: 899-904.
36. Najafi A, Zhandi M, Towhidi A, Sharafi M, Sharif AA, Motlagh MK. Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic effect on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender *Cryobiology.* 2013; 66: 275-282.
37. 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; 7: 149-159.
38. El-Kon I. Testing usability of bovine serum albumin (BSA) for preservation of Egyptian buffalo semen. *American-Eurasian J Agric Environ Sci.* 2011; 11: 495-502.
39. Jeyendran RS, Van Der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD: Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil.* 1984; 70: 219-228.
40. Maxwell WM, Salamon S: Liquid storage of ram semen: A review. *Reprod Fertil Dev.* 1993; 5: 613-638.