

KOÇ SPERMASININ KISA SÜRELİ SAKLANMASINDA ANTİOKSİDANLARIN ETKİSİ (Effect of antioxidants on the liquid storage of ram semen)

Mustafa Numan BUCAK¹

Necmettin TEKİN²

Recai KULAKSIZ²

1. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü- Lalahan Ankara
2. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Sun'ı Tohumlama Anabilim Dalı-Ankara

Geliş Tarihi : 20.03.2007

Kabul Tarihi : 21.09.2007

ÖZET

Sunulan çalışmanın amacı, koç spermasının +5°C'ta kısa süreli saklanması antioksidanların taurin, glutatyon (GSH) ve trehalozun etkisini araştırmak olmuştur. Çalışmada üç baş ergin Akkaraman koçundan alınan ejakülatlar kullanılmıştır. Ejakülatlar yetiştirme mevsiminde sun'ı vajen kullanılarak haftada iki kez toplanmıştır. Alınan ejakülatlar birleştirildikten sonra dört eşit kısma bölünerek taurin (50 mM), glutatyon (5 mM), trehaloz (50 mM) içeren ve antioksidan içermeyen (kontrol) sulandırıcıyla sulandırılmıştır. Sulandırılan sperma numuneleri, +5°C'ta kısa süreli saklamanın 0., 24. ve 30. saatlerde spermatozoa motilitesi, anormal spermatozoa oranı , HOS-test sonucu ile pH yönünden değerlendirilmiştir. Çalışmada, koç spermasının kısa süreli saklanması antioksidanların spermatojik parametrelerden motiliteyi etkilemediği, trehalozun 30. saatte en iyi korumayı (%50.7±5.1) sağladığı görülmüştür. En düşük anormal spermatozoa oranını in vitro saklamanın 0. saatinde 50 mM taurin ve trehaloz (%7.1±1.1 ve %7.8±0.7) vermesine rağmen (P<0.01), saklamanın 24. ve 30. saatlerinde gruplar arasında istatistiksel farklılık görülmemiştir. Spermatozoon plazma membran bütünlüğünün korunmasında kısa süreli saklamanın 24. ve 30. saatlerinde 50 mM trehaloz (%60.0±1.2 ve %58.1±1.8) en yüksek sonuçları vermiştir (P<0.01). Sperma pH değeri ise saklama süresi boyunca glutatyon içeren numunelerde, diğerlerine göre daha düşük çıkmıştır (P<0.01). Sonuç olarak, koç spermasının +5°C'ta kısa süreli saklanması sulandırıcıyla ilave elden antioksidanların spermatozoon yaşamı üzerinde önemli katkılar sağladığı kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Antioksidan, koç sperması, spermanın saklanması.

ABSTRACT

The aim of this study was to search for the effects of antioxidants taurine, GSH and trehalose on liquid storage of ram semen at +5°C. Ejaculates obtained from three mature Akkaraman rams were used in this study. Ejaculates were collected using an artificial vagina twice a week during the reproductive season. After pooling, each pooled ejaculate was split into four equal aliquots and diluted with extender with taurine 50 mM, GSH 5 mM, trehalose 50 mM and no additives. Diluted semen samples was evaluated in point of spermatozoa motility, percent abnormal spermatozoa, HOS-test result and pH at +5°C for 0, 24 and 30 hours of liquid storage. It was observed that antioxidants were not effective on motility during storage at +5°C for 0. and 24. hours of storage. but trehalose provided the best protection (50.7±5.1%) for 30. hour. While taurin 50 mM ve trehaloz 50 mM gave the lowest rates (7.1±1.1% ve 7.8±0.7%) of abnormal spermatozoa at 0. hour (P<0.01), Statistical difference did not exist among the groups for 24 and 30. hours of storage. Trehalose 50 mM gave the highest results (60.0±1.2% ve 58.1±1.8%) at integrity of spermatozoon plasma membrane at 24 and 30 hours (P<0.01). Semen pH value was lower in samples with glutathione than other groups during storage period (P<0.01). Consequently, it was observed that antioxidants added to extender provided the important contributions on spermatozoon survival at +5°C for liquid storage of semen.

Key words: Antioxidants, ram semen, semen storage.

GİRİŐ

Koyun yetiştiriciliğinde suni tohumlama yöntemiyle döleme, spermanın ana damızlık koç sürülerinden diğer entansif/eks-tansif sürülere hızlı ve kolay gönderilebilmesi açısından önemli yere sahiptir. Dondurulmuş

ve çözdürülmüş koç spermayla yapılan servikal tohumlamalarda fertilitte oranının düşük ve sınırlı olması, araştırmaları spermanın kısa süreli saklanması üzerinde yoğunlaştırmıştır. (27, 35).

Spermanın +5°C'ta kısa süreli saklanması sırasında, spermatozoon motilitesinde ve membran bütünlüğünde kayıplar ve DNA kırıklı spermatozoa oranında artışlar, bunların sonucu olarak fertilité oranlarında düşmeler yaşanmaktadır (12, 18). Spermatozoon membra n fosfolipitlerinde gelişen lipit peroksidasyonu ve bunun sonucu olarak ortaya çıkan serbest oksijen radikallerin ROS: süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksi radikali) oluşturduğu yıkımlara bağlı olabilmektedir. Ayrıca koç spermasında ölü spermatozoa tarafından üretilen serbest radikaller, lipit peroksidasyonuna bağlı olarak membra n fosfolipitlerindeki 'bis allylic methylene' grupların oksidatif saldırılara uğramasına öncülük etmektedir (25, 31). Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşılık, spermatozoon tarafından kontrollü ve spontan salınımları spermatozoon kapasitasyonu, krozo m reaksiyonu ve oosit penetrasyonunda önemli olmaktadır (4, 6, 17, 27). Sperma, ortamda gelişen lipit peroksidasyonunu dengelemek ve serbest radikallerin aşırı üretimini/salınımını önlemek için bazı antioksidanları (taurin, katalaz, glutatyon vb.) içermektedir. Ancak, spermadaki endojen antioksidatif kapasite spermanın kısa süreli saklanması nı yeterli gelmemektedir (7).

Ay gırlarda glutatyon, katalaz, askorbik asit (7, 11) ve taurinin (21), kedi (8) ve tavşanlarda (3) taurinin, koçlarda süperoksit dismutaz, katalaz (26), ergotiyonin (37) ve trehalozun (24) sperma sulandırıcılarına ilavesinin spermanın kısa süreli saklanması nı serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerine karşı koyduğu, spermatozoonun yaşa m süresini, motilitesini ve membra n bütünlüğünü koruduğu gösterilmiştir. Ayrıca, koç ve tekelerde yapılan bazı çalışmalarda sulandırıcılara katılan tiol bileşikleri (sistein, sisteamin, taurin) nin dondurma/çözdürme sonrası spermatozoa motilitesini (14, 16) ve

dölverimini artırdığı (32), glutatyon ve süperoksit dismutazın sığı r oositlerinin in vitro maturasyonuna ve embriyonik gelişimine katkı sağladığı (33) belirtilmiştir.

Bu çalıştı rımda, koç spermasının +5°C' de kısa süreli saklanması nı esnasında sulandırıcıya katılan taurin, glutatyon ve trehalozun başlı ca spermatolojik parametrelere etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Hayvan materyali ve spermanın alınması

Bu çalıştı rımda 2-3 yaşlı 3 ergin Akkaraman koçundan alınan spermalar kullanılmıştır. Koçların bakı m ve beslemesi Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliğinde standart yetiştirme koşullarında yapılmıştır. Sperma, yetiştirme mevsiminde (sonbahar) suni vajen yardımıyla haftada iki kez alınmıştır. Alınan ejakülatlardan uygun özellik (sperma yoğunluğu $\geq 3 \times 10^9$ spermatozoa/ml; motilite ≥ 90 ; anormal spermatozoon oranı ≤ 10) gösterenler miks haline getirilerek spermanın kısa süreli saklanması nı sulandırılmak üzere işleme alınmıştır.

Spermanın sulandırılması ve değerlendirilmesi

Bu çalıştı rımda ejakülatların sulandırılması nı Tris sulandırıcı (3.63 gr tris, 0.50 gr fruktoz, 1.99 gr sitrik asit, 14 ml yumurta sarısı/100 ml distile su - pH: 6.8) kullanılmıştır. Yapılan miks ejakülat 4 eşit hacme bölünerek taurin (50 mM), glutatyon (5 mM), trehaloz (50 mM) içeren ve antioksidan içermeyen Tris sulandırıcıyla ml'de yaklaşık 4×10^8 spermatozoa olacak şekilde sulandırılmıştır.

Farklı antioksidan içeren içeren ve içermeyen numuneler, +5°C'ta 0., 24. ve 30. saatlerde olmak üzere spermatozoa motilitesi, anormal spermatozoa oranı, hipoozmotik şişme

testi (HOS-test) ve pH yönünden değerlendirilmiştir. Spermatozoa motilitesi 37°C'ta ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopun 100x büyütmesinde lam-lamel arasına alınan bir damla sperma numunesinde en az 4 mikroskop sahasına bakılarak yapılmıştır. Sahalardaki motilite değerlerinin ortalaması motilite oranı olarak kaydedilmiştir. Anormal spermatozoa oranı Hancock sıvısına alınan sperma numunesinin faz kontrast mikroskopun immersiyon objektifinde lam-lamel arasına alınan bir damlasında spermatozoa baş, orta, kuyruk ve akrozom kısmı anomalilerin % olarak tespit edilmesiyle belirlenmiştir. Plazma membranının fonksiyonel bütünlüğünün belirlenmesi için HOS-test uygulanmıştır. HOS-test, hipoozmotik sıvının 300 µl'sininin 30 µl sperma numunesiyle karıştırılarak 37°C'ta bir saat bekletilmesiyle yapılmıştır. Bu karışımdan yapılan frotide faz kontrast mikroskopun 400x büyütmesinde toplam 400 spermatozoa sayılmış, bunlardan kıvrık ve şişmiş kuyruğa sahip

olanlar % olarak ifade edilmiştir. Sperma numunelerinin pH'sı dijital pH metre ile ölçülmüştür.

İstatiksel analiz

İstatistiksel analizde 7 farklı uygulamadan elde edilen verilerin ortalamaları kullanılmıştır. Farklı grupların karşılaştırılmasında Varyans analizi, aralarında önemli farklılık bulunan ikiden fazla grubu karşılaştırmak için de Duncan testi uygulanmıştır. Farklılığın $P<0.01$ düzeyde olması önemli kabul edilmiştir.

BULGULAR

Koç spermasının kısa süreli saklanması (0. ve 24. saatte) antioksidanların spermatozoa motilitesi üzerinde etkili olmadığı, trehalozun 30. saatte diğer gruplara göre en iyi korumayı (%50.7±5.1, $P<0.05$) sağladığı gözlenmiştir (Tablo1).

Tablo 1. Koç spermasının kısa süreli saklanmasından elde edilen motilite oranları (%)

Gruplar	0. saat	24. saat	30. saat
GSH 5 mM	83.5±1.4	57.1±3.0 ^c	38.5±2.6 ^{abc}
Taurin 50 mM	76.4±3.7	41.4±5.8 ^{ab}	35.0±4.0 ^{ab}
Trehaloz 50 mM	82.1±2.8	58.5±6.5 ^c	50.7±5.1 ^c
Kontrol	82.1±3.0	50.7±5.6 ^{bc}	40.7±3.3 ^{bc}
ÖD	-	**	*

ÖD : Önemlilik değeri (n: 7) a,b,c : Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir
 (** : $P<0.01$ * : $P<0.05$). - : Gruplar arası farklılık önemli değildir ($P>0.05$)

Anormal spermatozoa oranı bakımından 0. saatte 50 mM taurin ve trehaloz en düşük oranları (%7.1±1.1, %7.8±0.7, $P<0.01$) verir-

ken, antioksidanların saklamanın ilerleyen sürelerinde istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmadığı görülmüştür (Tablo 2).

Tablo 2. Koç spermasının kısa süreli saklanmasından elde edilen anormal spermatozoa oranları (%)

Gruplar	0. saat	24. saat	30. saat
GSH 5 mM	10.7±1.5 ^{bc}	11.5±3.4	13.4±2.9
Taurin 50 mM	7.1±1.1 ^a	10.8±0.9	13.3±3.7
Trehaloz 50 mM	7.8±0.7 ^{ab}	10.1±1.7	12.1±0.9
Kontrol	11.8±1.5 ^c	12.4±3.3	14.6±1.1
ÖD	**	-	-

ÖD : Önemlilik değeri (n: 7) a,b,c : Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir
 (** : $P<0.01$ - : Gruplar arası farklılık önemli değildir ($P>0.05$)

Hipoozmotik şişme testi (HOS-test) yönüyle, saklamanın 24. saatinde tüm antioksidan içeren gruplar, 24. ve 30. saatte ise sadece trehaloz içeren grup (%60.0±1.2 ve

%58.1±1.8), diğer gruplara göre önemli oranda spermatozoon plazma membran bütünlüğü sağlamıştır (Tablo3, P<0.01).

Tablo 3. Koç spermalarının kısa süreli saklanmasından elde edilen HOS-test sonuçları (%)

Gruplar	0. saat	24. saat	30. saat
GSH 5 mM	69.5±0.8	52.7±1.6 ^b	34.7±2.2 ^{ab}
Taurin 50 mM	68.4±2.7	46.5±1.0 ^{ab}	38.8±3.2 ^b
Trehaloz 50 mM	64.7±3.0	60.0±1.2 ^c	58.1±1.8 ^d
Kontrol	71.8±2.4	43.5±3.9 ^a	39.1±1.7 ^{bc}
ÖD	-	**	**

ÖD : Önemlilik değeri (n: 7) a,b,c : Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir
(** : P<0.01 - : Gruplar arası farklılık önemli değildir (P>0.05)

Tablo 4'te görüldüğü gibi, PH değerinin antioksidan içeren gruplarda kontrol gruplarına göre düşük çıkmasının yanında, GSH içeren grupların diğerlerine nazaran daha

düşük sonuçlar verdiği görülmüş, istatistiki olarak önemi vurgulanmıştır (Tablo 4, P<0.01).

Tablo 4. Koç spermalarının kısa süreli saklanmasından elde edilen pH değerleri

Gruplar	0. saat	24. saat	30. saat
GSH 5 mM	5.9±0.1 ^a	5.7±0.1 ^a	5.76±0.1 ^a
Taurin 50 mM	6.8±0.0 ^{cd}	6.9±0.0 ^{cd}	6.59±0.1 ^c
Trehaloz 50 mM	6.4±0.1 ^b	6.5±0.1 ^b	6.63±0.0 ^c
Kontrol	6.9±0.1 ^d	6.9±0.0 ^d	7.00±0.0 ^d
ÖD	**	**	**

ÖD : Önemlilik değeri (n: 7) a,b,c : Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir
(** : P<0.01 - : Gruplar arası farklılık önemli değildir (P>0.05)

TARTIŞMA VE SONUÇ

Spermatozoon plazma membranı doymamış yağ asitince zengin olduğundan lipid peroksidasyonuna karşı son derece duyarlıdır. Bu nedenle, spermanın kısa süreli saklanmasında gelişen lipid peroksidasyonunun yarattığı oksidatif yıkım, membran bütünlüğü kayıplarına, motilite ve fertilitede düşüslere neden olmaktadır (3, 5, 25). Bu olumsuz etkiler, spermanın saklanması öncesi sulandırıcılara bazı antioksidanların ilavesiyle dengelenmektedir (26).

Glutatyon, thiol bileşiği olarak spermatozoon yapısında ve genital kanalda bulunmakta ve serbest oksijen radikallerinin yol

açtığı yıkımı azaltmada rol almaktadır (11, 22). Yapılan çalışmalarda, insan spermalarının kısa süreli saklanmasında yapılan çalışma sonucuna benzer olarak glutatyonun koruyucu etkinlik sağlamadığı görülmüş (19), fakat domuz spermalarında canlılık ve fonksiyonel bütünlüğü koruduğu gösterilmiştir (20). Antioksidan özelliğiyle taurin spermatozoon metabolizması, kapasitasyonu, motilitesi ve fertilitesinde rol almakta (10, 18), bu değişimlerde taurinin ozmoregülatörük aktivitesi de önemli rol oynamaktadır (29, 36). Yapılan çalışma taurinin spermatozoon morfolojisi ve plazma membran bütünlüğü üzerinde önemli katkısının olduğunu

göstermesinin yanında, aygır (21), kedi (8) ve tavşanlarda (3) taurinin spermatozoon motilitesini korumadaki etkinliği önemli bulunmuştur. Antioksidanların düşük dozlarda kullanılmalarında oluşacak spermatozoon üzerindeki koruyucu etkinliği, yüksek dozda kullanıldıklarında (34), spermatozoon metabolizması için gerekli olan serbest radikal oluşumunu engelleyebileceğini düşündürerek, olası antioksidatif etkilerini durduracağı ve toksik etkilere neden olacağı kanısını doğurmaktadır.

Spermanın +5°C'de kısa süreli saklanması işlemi, spermanın dondurulması esnasında gelişen kristalleşmenin yarattığı ozmotik ve mekanik stresin etkilerini gidermekte, donma işlemine nazaran membran fosfolipitleriyle tepkime veren serbest radikallerin oluşum oranını belirgin oranda düşürerek serbest radikal kaynaklı yıkımı hafifletmekte, fakat önleyememektedir. Bu çalışmadaki verilere benzer şekilde, Merinos ve sakız koçu spermasının +5°C'de kısa süreli saklanmasında bazı antioksidanların spermatozoon üzerinde koruyucu etkiler gösterdiği belirtilmiştir (15, 26). Bu benzer sonuçlar, koçlarda farklı ırktan spermalarının antioksidanlardan olumlu etkilendiğini göstermektedir.

Trehalozun direk antioksidan yapıda olmayan özelliğiyle, spermatozoon membranında ozmoregülatörük ve antiperoksidatif etkinlik gösterdiği belirtilmiştir. Etki mekanizması tam olarak ortaya konulmamasına rağmen, spermadaki endojen glutasyon (GSH) tüketimini azalttığı ve ortamda oluşan serbest radikalleri temizlediği yapılan bazı çalışmalarda gösterilmiştir (2, 9). Trehalozun koç spermasının kısa süreli saklanmasında spermatozoon parametreleri üzerinde koruyucu etkinlik gösterdiği (24), bu çalışmayla da ortaya konmuştur ($P < 0.01$).

Spermatozoon membranının fonksiyonel bütünlüğünü belirleyen HOS-test sonuçlarının yüksek olması ($\%50 \leq$), motilite ve in vivo/

vitro fertilité parametreleriyle yakından ilişkilendirilmektedir (23, 28, 30). Berger ve Parker (13) ise HOS-test sonuçlarının fertilitéyle ilişkisinin olmadığını belirtmiştir. Sunulan çalışmada 24 saatlik saklama sonrası antioksidanların plazma membran bütünlüğünü koruduğu hos test sonuçlarıyla gösterilmiştir.

Kısa süreli saklanan numunelerdeki antioksidanların pH değerlerinde düşümlere neden olduğu ve bu düşüşün spermatozoon parametreleri üzerinde olumlu yaptığını düşündürmektedir. Bunun aksine, Acott ve Carr (1) pH'daki düşüşün spermatozoon motilitesinde dönüşümlü/dönüşümsüz kayba neden olduğunu belirtmiştir.

Sonuç olarak, çalışmada kullanılan antioksidanların koç spermasının kısa süreli saklanmasında kullanılabileceği kanısına varılmıştır. Ancak, spermaya katılan antioksidanların spermadaki endojen antioksidatif kapasitenin azalmasına ve lipit peroksidasyonuna bağlı olarak gelişen membran ve DNA yıkımları üzerindeki etkinliklerinin in vitro/vivo parametreler açısından araştırılmasına gereksinim duyulmalıdır.

KAYNAKLAR

1. **Acott TS, Carr DW** (1984) *Inhibition of Bovine Spermatozoa By Caudal Epididymal Fluid: II. Interaction of PH and A Quiescence Factor*. Biol Reprod, 30: 926-935.
2. **Aisen E, Quintana M, Medina V, Morello H, Venturino A** (2005) *Ultramicroscopic and Biochemical Changes in Ram Spermatozoa Cryopreserved With Trehalose-Based Hypertonic Extenders*. Cryobiology, 50: 239-249.
3. **Alvarez JG, Storey BT** (1983) *Taurine, Hypotaurine, Epinephrine and Albumin Inhibit Lipid Peroxidation in Rabbit Spermatozoa and Protect Against Loss of Motility*. Biol Reprod, 29: 548-555.
4. **Alvarez JG, Storey BT** (1984) *Assessment of Cell Damage Caused by Spontaneous Lipid Peroxidation in Rabbit Spermatozoa*. Biol Reprod, 30: 833-841.
5. **Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT** (1987) *Spontaneous Lipid Peroxidation and Production of Hydrogen Peroxide and Superoxide in Human Spermatozoa: Superoxide Dismutase As A*

Major Enzyme Protectant Against Oxygen Toxicity. J Androl, 23: 338-348.

6. Alvarez JG, Storey BT (2005) *Differential Incorporation of Fatty Acids Into and Peroxidative Loss of Fatty Acids From Phospholipids of Human Spermatozoa.* Mol Reprod Dev, 42: 334-346

7. Aurich JE, Schönherr U, Hoppe H aurich C (1997) *Effect of Antioxidants on Motility and Membrane Integrity of Chilled-Stored Stallion Semen.* Theriogenology, 48: 185-192.

8. Baran A, Demir K, Şahin E, Evecen M, Bacınoğlu S, Alkan S, İleri K (2004) *Kedi Spermasınının Taurinli ve Taurinsiz Sulandırıcılarda Kısa Süreli Soğukta Saklanması.* 3. Ulusal Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Kongresi, Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Derneği, Antalya, Türkiye, s. 60.

9. Bakás LS and Disalvo EA (1991) *Effect of Ca²⁺ on The Cryoprotective Action of Trehalose.* Cryobiology, 28: 347-353.

10. Barnett DK, Bavister BD (1992) *Hypotaurine Requirement for In Vitro Development of Golden Hamster One-Cell Embryos Into Morulae and Blastocysts, and Production of Term Offspring From In Vitro-Fertilized Ova.* Biol Reprod, 47: 297-304.

11. Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MCG (2000) *The Effect of Reactive Oxygen Species on Equine Sperm Motility, Viability, Acrosomal Integrity, Mitochondrial Membrane Potential and Membrane Lipid Peroxidation.* J Androl, 21: 895-902.

12. Beconi M, Afrachino M, Schang L, Beorlegui N (1991) *Influence of Antioxidants on SOD Activity in Bovine Sperm.* Biochem Int, 23: 545-553.

13. Berger T, Parker K (1989) *Modification of The Zona-Free Hamster Ova Bioassay of Boar Sperm Fertility and Correlation With In Vivo Fertility.* Gamete Res, 22: 385-397.

14. Bucak MN, Ateşşahin A, Varışlı Ö, Yüce 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.

15. Bucak MN, Tekin N (2007) *Protective Effect of Taurine, Glutathione and Trehalose on The Liquid Storage of Ram Semen.* Small Rum Res, Basımda.

16. Bucak MN, Uysal O (2007) *The Role of Antioxidants in Freezing of Saanen Goat Semen.* Indian Vet J, Basımda.

17. De Lamirande E, Gagnon C (1992) *Reactive Oxygen Species and Human Spermatozoa. I. Effects on The Motility of Intact Spermatozoa on Sperm Axonemes.* J Androl, 13: 68-378.

18. De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama, H, Gagnon, C (1997) *Reactive Oxygen Species and Sperm Physiology.* Rev Reprod, 2: 48-54.

19. Donnelly ET, McClure N, Lewis SE (2000) *Glutathione And Hypotaurine In Vitro: Effects On Human Sperm Motility, DNA Integrity and Production of Reactive Oxygen Species.* Mutagenesis, 15: 61-68.

20. Funahashia H, Sano T (2005) *Select Antioxidants Improve The Function of Extended Boar Semen Stored At 10°C.* Theriogenology, 63: 1605-1616.

21. Ijaz A, Ducharme R (1995) *Effect of Various Extenders and Taurine on Survival of Stallion Sperm Cooled To 5°C.* Theriogenology, 44: 1039-1050.

22. Irvine DS (1996) *Glutathione As A Treatment For Male Infertility.* Rev Reprod, 1: 6-12.

23. Jeyendran RS, Van Der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo, BG, Zaneveld, LJD (1984) *Development of An Assay To Assess The Functional Integrity of The Human Sperm Membrane and Its Relationship To Other Semen Characteristic.* J Reprod Fertil, 70: 219-228.

24. López-Sáaz A, Ortiz N, Gallego L, Garde JJ (2000) *Liquid Storage (5°C) of Ram Semen in Different Diluents.* Arch Androl, 44: 155-164.

25. Maxwell WMC, Salamon S (1993) *Liquid Storage of Ram Semen: A Review.* Reprod Fertil Dev, 5: 613-38.

26. Maxwell WMC, Stojanov T (1996) *Liquid Storage of Ram Semen in The Absence of Some Antioxidants.* Reprod Fertil Dev, 8: 1013-1020.

27. Maxwell WMC, Watson PF (1996) *Recent Progress in The Preservation of Ram Semen.* Anim Reprod Sci, 42: 55-65.

28. Neild D, Chavez M, Plores N, Mora M, Beconi, M, Agüero, A (1999) *Hypoosmotic Test in Equine Spermatozoa.* Theriogenology, 51: 721-727.

29. Ozaha H, Gould KG (1982) *Protective Effect of Taurine From Osmotic Stres on Chimpanze Spermatozoa.* Arch Androl, 9: 121-126.

30. Pérez-Llano B, Lorenzo JL, Yenes P, Trejo A, Garcia-Casado PA (2001) *Short Hypoosmotic Swelling Test For The Prediction of Boar Sperm Fertility.* Theriogenology, 56: 387-398.

31. Upreti GC, Jensen K, Munday R, Duganzich DM, Vishwanath R, Smith JF (1998) *Studies on Aromatic Amino Acid Oxidase Activity in Ram Spermatozoa: Role of Pyruvate As An Antioxidant.* Anim Reprod Sci, 51: 275-287.

32. Uysal O, Kinet H, Çevik M, Çetinkaya S (2000) *Değişik Antioksidan İçeren Farklı Sulandırıcılarla Dondurulmuş Koç Spermalarından Elde Edilen Dölverimi.* Ankara Üniv Vet Fak Derg, 47: 177-189.

33. Uysal O, Akçay E, Tekin N (2003) *Effects of Glutathione and Superoxide Dismutase on In Vitro Maturation, Fertilization and Culture of Bovine Oocytes.* Indian Vet J, 80: 758-762.

34. Uysal O, Bucak MN, Yavaş İ, Varışlı Ö, Gürcan İS (2005) *Evaluation of Ram Sperm Frozen With Various Taurine Concentrations*. Indian Vet J, 82: 1059-1061.

35. Salamon S, Maxwell WMC (1995) *Frozen Storage of Ram Semen. II. Causes of Low Fertility After Cervical Insemination and Methods of Improvement*. Anim Reprod Sci, 38: 1–36.

36. Schaffer S, Takahashi, K, Azuma J (2000): *Role of Osmoregulation in The Actions of Taurine*. Amino Acids, 19: 527-546.

37. Yıldız Ş (2004) *Koç Spermalarının Farklı Antioksidan İçeren Sulandırıcılarla Kısa Süreli (+5°C) Saklanması*. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.