

КРАТКИЙ ОБЗОР СОВРЕМЕННЫХ ДОБАВОК К РАЗБАВИТЕЛЯМ СПЕРМЫ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ СЕМЕНИ БАРАНОВ К ЗАМОРАЖИВАНИЮ

Йи. ОЗТЕРКЛЕР, У.Ц. АРИ

К числу наиболее важных причин, по которым искусственное осеменение в овцеводстве распространено не столь широко, как при разведении крупного рогатого скота, относится то, что сперма барана очень чувствительна к повреждениям при замораживании, вследствие чего при цервикальном осеменении в сравнении с лапароскопическим не может быть достигнута оптимальная оплодотворяемость. В течение последних 60 лет проводились многочисленные исследования по поиску идеальной модели для замораживания спермы баранов, тестировались различные методы, прилагались большие усилия. Одно из направлений, которое в последние годы развивается особенно интенсивно, — поиск добавок к разбавителям спермы, используемым при ее криоконсервации, которые способны повысить устойчивость сперматозоидов барана к окислительному стрессу, сопровождающему замораживание и оттаивание. Мы обобщили сведения по этой проблеме, полученные в исследованиях последних 16 лет (2000-2016 годы), рассмотрев прежде всего те добавки, которые демонстрируют лучшие показатели по сравнению с остальными при криоконсервации спермы барана. В качестве потенциальных криопротекторов изучены в основном следующие секретируемые продукты и вещества, а также их синтезируемые аналоги: семенная жидкость и содержащиеся в ней протеины, тиоловые соединения, ферменты антиоксидантной системы, сахара, жирные кислоты и витамины. Однако краткий анализ этих исследований и полученных данных показывает, что необходимо продолжить разработку инновационных технологий, базирующихся на применении новых криозащитных компонентов и их комбинаций в разных дозах, чтобы установить идеальный стандартный протокол для процедуры криоконсервации семени баранов. Далее в производственных испытаниях потребуются подтвердить практическую применимость этих добавок, так как следует убедиться, что результаты научных опытов по введению в среду-разбавитель различных веществ, повышающих устойчивость сперматозоидов барана к образованию кристаллов льда при замораживании, могут быть масштабированы в пределах отрасли. Для этого нужно сравнить количество активных сперматозоидов в спермодозе при применении таких добавок, прогнозируемое на основании лабораторных тестов, с данными по частоте зачатий и ягнениям при искусственном осеменении такой спермой.

Ключевые слова: сперма барана, добавки, устойчивость к замораживанию, разбавители.

Базовые технологии, связанные с замораживанием спермы, доказали эффективность и преимущества в молочном скотоводстве, но их применение в овцеводстве не обеспечило какого-либо заметного прогресса. По существу это происходит вследствие двух причин: первая заключается в неустойчивости спермы барана к криоконсервации, вторая обусловлена физиологическими и анатомическими особенностями продвижения сперматозоидов в репродуктивном тракте самки. То, что замораживание и оттаивание спермы барана вызывает значительные генетические нарушения и повреждения мембраны, известно давно (1). Так как результативность оплодотворения при цервикальном осеменении существенно ниже, чем при лапароскопическом, искусственное осеменение с применением замороженной спермы не стало в овцеводстве распространенной практикой (2). Кроме того, расходы на криоконсервацию спермы баранов почти в 20 раз выше аналогичных затрат при хранении бычьей спермы (3). В настоящее время внимание исследователей сфокусировано на подборе состава среды, оценке свойств *in vivo* и эффективности различных криопротекторов, антиоксидантов и специальных добавок при криоконсервации (4).

Анализируя публикации по этой проблеме, мы пришли к выводу, что в специальной литературе за последние 16 лет не удается обнаружить исчерпывающих сведений, касающихся исследований замороженной спермы барана. В 2000-х годах ученые были в основном сосредоточены на по-

иске добавок, обеспечивающих репарационные процессы в мембранах и усиление подвижности сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением в образцах криоконсервированной спермы. Судя по всему, с 2000-х годов до настоящего времени базовые разбавители, применяемые для замораживания семени баранов, мало изменились, тогда как число различных добавок к ним, протестированных за этот период, велико.

Цель нашей работы — обобщить сведения о тех добавках к разбавителям для криоконсервации, описанных в литературе за период с 2000 по 2016 год, которые положительно влияют на репродуктивные характеристики спермы барана после замораживания и оттаивания.

Семенная жидкость и ее белковые компоненты (semen plasma proteins, SPPs). Роль семенной жидкости в таких репродуктивных технологиях, как замораживание спермы и определение пола, уже доказана, и исследователи пришли к согласованному мнению, что ее добавление в среду для криоконсервации положительно сказывается на подвижности и морфологических характеристиках сперматозоидов после оттаивания (5, 6). Более того, представляет интерес тот факт, что такой эффект при замораживании и оттаивании проявляется только в семенной жидкости барана, тогда как в бычьей семенной жидкости его не обнаружили (7).

При применении только семенной жидкости либо при ее сочетании с другими компонентами, такими как олеиновая или линолевая кислота, витамин Е и др., защитный эффект наблюдают не только в свежей сперме, но и после ее замораживания и оттаивания, следовательно, SPPs в сочетании с олеиновой или линолевой кислотами, витамином Е обеспечивают постоянное функционирование супероксидсмутазы — одного из ключевых ферментов в системе антиоксидантной защиты (6). Тем не менее, знаний для идентификации и синтеза таких протеинов с желательными свойствами все еще недостаточно, и требуются исследования, которые позволят преодолеть имеющиеся затруднения биологического характера (8).

Антиоксиданты. Поскольку у сперматозоида по сравнению с соматической клеткой содержание ненасыщенных жирных кислот в мембране высокое, они предрасположены к окислительному стрессу, вследствие чего содержимое и мембрана этих половых клеток крайне чувствительны к холодовому шоку. Более того, у сперматозоидов отсутствуют механизмы восстановления, которые предотвращают повреждение клеток, вызываемые активными формами кислорода. Антиоксиданты, в основном присутствующие в семенной жидкости, обладают ограниченным протективным эффектом (9, 10). Антиоксиданты используются не только для защиты целостности мембраны половых клеток, но также для предотвращения повреждения мембран у эмбрионов и в ооцитах, которые подвергаются депрессивному действию перекисного окисления липидов и образующихся активных форм кислорода (11).

Тиоловые соединения. Известно, что вещества тиоловой природы способны выполнять функцию «мусорщика» в отношении цитоксинов и активных форм кислорода, эффекты которых проявляются на клеточном уровне (12). В последние годы тиоловые соединения, такие как l-эрготионеин (LE), цистеин и N-ацетилцистин, достаточно часто становились предметом исследования. Показано, что тиолы благоприятно влияют на устойчивость спермы барана к образованию кристаллов льда при замораживании (13-18).

Цистеин. Цистеин относится к тиоловым соединениям, оказывающим защитный эффект при окислительном стрессе, которому подвергаются половые клетки спермы барана в процессе криоконсервации. Добавление

цистеина в среду для замораживания спермы повышает подвижность сперматозоидов и активность каталазы (14).

N-ацетилцистин (NAC). NAC, который служит предшественником при внутриклеточном синтезе SH-глутатиона, редко становился объектом исследования в связи с проблемой замораживания спермы барана (17, 18).

Ферменты антиоксидантной системы. Энзиматические антиоксиданты защищают клетки, предотвращая повреждения клеточной мембраны под действием образующихся в клетке активных форм кислорода. К ним относятся супероксиддисмутаза (SOD), каталаза, глутатионпероксидаза (GPx) и глутатионредуктаза (GR) (19).

Некоторые исследователи заявляют, что введение в разбавитель каталазы (20), SH-глутатиона (GSH), SOD (21, 22), GPx и Tempol или Tempol как имитаторов SOD (23) улучшало качество спермы барана в образцах, подвергшихся замораживанию и оттаиванию.

Неэнзиматические антиоксиданты и сахара (трегалоза и сахароза). Синтетические антиоксиданты или пищевые добавки, например витамины и минеральные вещества, BSA (bovine serum albumin, бычий сывороточный альбумин), трегалоза, витамин С, витамин Е, цинк, цистеин, таурин, гипотаурин, глутатион и пр. рассматриваются как антиоксиданты неферментной природы (19). По некоторым данным, BSA, цистеин, ликопин (24), трегалоза, таурин, цистеамин, гиалуронан (24) и сочетание сахарозы и тригалозы (25) при добавлении в разбавители для замораживания позволяли получить удовлетворительный процент подвижных, жизнеспособных сперматозоидов с сохраненной структурой акросомальной мембраны.

Лецитин. Несмотря на то, что механизмы действия лецитина как стабилизатора при замораживании и оттаивании спермы неясны, сообщается, что он и другие липидные добавки защищают и стабилизируют фосфолипидную мембрану сперматозоида, повышая его устойчивость к замораживанию. В некоторых работах показано, что 1,5 % соевого лецитина либо его комбинация с некоторыми соединениями при добавлении к разбавителям обеспечивают улучшение сперматологических показателей (подвижности, жизнеспособности и целостности мембраны половых клеток) по сравнению с результатами применения гиалуроновой кислоты (НА) (26) и яичного желтка (27) и могут рассматриваться в качестве криопротектора, альтернативного яичному желтку (28). Несмотря на то, что желток, как было выявлено (29), все же имеет преимущество, лецитин может быть использован вместо него. У бахтиярских овец при разведении образца спермы средой, содержащей 1 % лецитина, 20 % яичного желтка и 7 % глицерола, сперматологические показатели оказались самыми высокими, и был сделан вывод о возможности замены яичного желтка лецитином (30).

Жирные кислоты (FA). Длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты (long-chain polyunsaturated fatty acids, LCP-UFA) ряда ω -3 обеспечивают приемлемую стабилизацию клеточной мембраны за счет поддержания текучести и пластичности, поэтому обогащение среды полиненасыщенными жирными кислотами (polyunsaturated fatty acids, PUFA) повышает число, подвижность и оплодотворяющую способность сперматозоидов у млекопитающих (31).

Жирные кислоты, например олеиновая и линолевая (ω -3 FA), используются в экспериментах как агенты, способствующие противодействию оксидативному стрессу на субклеточном уровне, вызываемым им повреждениям и повышению выживаемости спермы после замораживания и оттаивания. Предполагается, что защитным эффектом при криоконсервации спермы барана могут обладать олеиновая или линолевая кислоты в

Варианты добавок, предлагаемых для криоконсервации спермы бараны, и сперматологические показатели образцов после замораживания-оттаивания (по данным литературы)

Исследование	Базовый разбавитель	Добавка	Доза	Подвижность		Доля, %			
				1	2	3	4	5	6
Aisen et al., 2002	TCFY10+G $\underline{3}$	Trehalose	100 мМ	65				50	
Baran et al., 2004	TCGz	SP	7,5 %	30			56 AA		56
Uysal et al., 2007	TCFY10	GSSG	5 мМ	60		78	3 AA	65	10
	TCFY10	BSA	20 мг/мл	51		78	4 AA	55	12
	TCFY10	Cystein	10 мМ	59		73,5	3 AA	41	19,2
	TCFY10	Likopen	800 мкг	57,2		70,5	7 AA	49	16,3
Bucak et al., 2007	TCFY10	Taurine	25 мМ	63,0		73,0	6 AA	44,0	23,7
Bucak et al., 2008	TCFY10+G $\underline{5}$	Cystein	5 мМ	61,0		27	10 AA	48	30
Marti et al., 2008	SMY+G7+Galactose 112 мМ	+SPP+ol-lin+vit E + 2 мМ	4 мг+25 мМ+	48,8		36,3		27,0	
Anghel et al., 2009	TCGzY20+G $\underline{5}$	Cystein	5 мМ	60		60		60	12
	TCGzY20+G $\underline{5}$	Cystein	10 мМ	72		70		68	17
Uysal et al., 2009	TCGzY15+G $\underline{5}$	Trehalose	100 мМ	72,0		74,5		66,1	28,7
Forouzanfar et al., 2010	TCFY20+G7	Lechitin	1 %	51,9		48,1			
Maia et al., 2010	TGzY	Catalase	50 мкг	69-75	27-30				
Silva et al., 2011	TCFY20+G $\underline{5}$	SOD	100 МЕ/мл	58,4	9,4		33,5		
	TCFY20+G $\underline{5}$	GSH	2 мМ	49,45	9,19		32		
Succu et al., 2011	TCFY20+G $\underline{4}$	Melatonin	1 мМ	45,9	31	68,7			
Silva et al., 2012	TCFY20	Glycerol	5 %		49,2		33,3		
	TCFY20	EG	3 %		41,7		39,8		
Silva et al., 2012	TCFY20+G $\underline{5}$	Vit E	120 мкМ	80	14		55	45	
Ari et al., 2012	SMEGsY10+G $\underline{5}$	LE	10 мМ		23	27,1	30	37,1	
Towhidi et al., 2013	Andromed	Vit E+ ω -3-FA +1 мг/мл	0,1 мМ+	37	33	35			3
Das Graças et al., 2013	TCGsY20	MF	3 %	38					77 N
	TCGsY20	Glycerol	5,3 %	50					84 N
Motamedi-Mojdehi et al., 2014	TCFY20+G $\underline{3}$	CLC	1,5 мг	45				32	
Santiani et al., 2014	SMFY5+G7	Tempo	1 мМ	52			41		
Šterbenc et al., 2014	TCFY20+G14	Equex	0,75 %	78	26	88		60	
Najafi et al., 2014	TCFY20+G7	SL	1,5 %	53	56			45	
Emamverdi et al., 2014	TY20	SL	1,5 %	56	26	39		51	
Mata et al., 2015	TES-TCF+G4	SL	3,5 %	52			28 AA		
Talebiyan et al., 2015	TCGsY25+G7	FAAH	0,025 МЕ/мл	66	27 Fast				
Yıldız et al., 2015	SMEGsY10G $\underline{5}$	LE	10 мМ	26		27	49 AA	29	52
Panyaboriban et al., 2015	TCFY15G $\underline{5}$ + +0,5 % Equex	Trehalose+ +Sucrose	30 мМ	79		84	82		
Nalley et al., 2016	TCF	Y-Omega 3	20 %				60		
Câmara et al., 2016	TY10G6	Catalase							
An et al., 2016.	TY20G7	GPx	5 МЕ/мл	40	23	36	37	50	72

Примечание. 1 и 2 — общая подвижность и доля клеток с прямолинейно-поступательным движением, %, 3 — жизнеспособные, 4 — с нормальной акросомальной мембраной, 5 — по данным гипоосмотического теста, 6 — аномалии. T — Трис-HCl, C — лимонная кислота, F — фруктоза, Gs — глюкоза, Y — яичный желток, G — глицерол, SM — обезжиренное молоко, GSSG — окисленный глутатион, BSA — бычий сывороточный альбумин, SP — семенная жидкость, SPP+ol-lin — белки семенной жидкости и олеиновая или линолевая кислота, SOD — супероксиддисмутаза, GSH — SH-глутатион, EG — этиленгликоль, MF — метилформамид, LE — L-эрготионеин, ω -3-FA — жирные кислоты, CLC — комплекс циклодекстрина с холестерином, SL — соевый лецитин, FAAH — гидролаза амидов жирных кислот, NAC — N-ацетилцистеин, AA — аномалии акросом, N — нормальные акросомы. Подчеркнуты концентрации глицерола и желточного белка, которые повышены относительно стандартной базовой среды. Остальные обозначения и подробное описание см. в основном тексте статьи.

сочетании с витамином E и SPPs (6). Ожидается, что подобное свойство проявляют метанандаимид (metha-anandamide), амидаза (fatty acid amide hydrolase, FAAH, гидролаза амидов жирных кислот) и ω -3 FA (32).

Витамины. В настоящее время считается доказанным, что в качестве добавок к разбавителям спермы витамин E (31, 33), витамин C (34-38) и витамин B₁₂ (39, 40) повышают сперматологические показатели, предотвращая повреждения половых клеток активными формами кислорода.

Гормоны. Имеются сообщения о связи между гормональным профилем и поврежденностью сперматозоидов (41, 42). В проанализированных нами публикациях мы не нашли исследований по прямому введению

гормонов в состав среды для замораживания с целью повышения сохранности сперматозоидов. Исключение составляет одна работа, в которой изучали эффект мелатонина. Было установлено, что добавка мелатонин (1 мМ) достаточно успешно влияет на улучшение общей подвижности, увеличение доли клеток с прямолинейно-поступательным движением, на внутриклеточное содержание АТФ, сохранность ДНК и в особенности на повышение жизнеспособности сперматозоидов. Кроме того, при применении 1 мМ отмечали улучшение развития эмбрионов *in vitro* (43).

Другие вещества. В качестве альтернативных криопротекторов тестируют и другие вещества и их сочетания с разными концентрациями глицерола в разбавителе с целью повышения эффективности криоконсервации спермы барана (33, 44, 45).

Известно, что Equex — один из детергентов (поверхностно-активных веществ) — способен стабилизировать клеточную мембрану, защищать ее от повреждений и клеточной интоксикации после замораживания и оттаивания спермы. Проведенные исследования показали, что применение Equex STM® (0,75 %) приводит к улучшению сперматологических показателей (подвижность, жизнеспособность, целостность мембраны) и предотвращению фрагментации ДНК в сравнении с аналогичными параметрами в контрольном образце. Более того, в двух исследованиях при сравнении метилформамида (MF) и этиленгликоля (EG) с глицеролом (G) наблюдали преимущество глицерола по обеспечению выживаемости при замораживании (44) перед добавками MF и EG (33), однако к эффекту глицерола в концентрации 5 % приближалось действие EG в концентрации 3 %. В то же время сочетание 3 % глицерола и комплекса циклодекстрина с холестерином (cholesterol-loaded cyclodextrin, CLC, 1,5 мг/120×10⁶ сперматозоидов) в среде для разбавления лучше повышало сперматологические показатели по сравнению с другими вариантами совместного применения этих компонентов, несмотря на снижение жизнеспособности под воздействием глицерола (45).

Данные о влиянии разных добавок на замороженно-оттаянную сперму представлены в таблице. Как видно, в большинстве исследований в качестве базового разбавителя использована среда на основе Трис-буфера с яичным желтком и глицеролом. Обращает на себя внимание тот факт, что некоторые результаты очень незначительны, тогда как другие весьма высоки. Не следует игнорировать то обстоятельство, что подобные различия могут зависеть от природы и дозы примененной добавки, вида использованного базового разбавителя (46), а также метода замораживания (47), типа криозащитного агента (33), метода глицеролизации и концентрации глицерола (48), а также особенностей барана и сезона отбора спермы (49, 50).

Таким образом, мы лишь кратко описали те добавки, применение которых связано с положительным эффектом при криоконсервации спермы барана, чувствительной к замораживанию. В современных условиях не вызывает сомнений, что прогресс в технологиях криоконсервации и методах анализа, например оценки кинетических параметров, определения генетических, митохондриальных и мембранных нарушений в сперматозоидах, позволит более существенно продвинуться в изучении воздействия различных добавок на устойчивость семени к замораживанию. В то же время, поскольку эффект антиоксидантов и добавок на свойства оттаянных спермиев неодинаков, выбор таких добавок не может быть случайным. Дизайну эксперимента должна предшествовать детальная проработка многих аспектов действия используемых агентов во избежание нежелательных эффектов при применении криоконсервации, так как механизмы

этих процессов и участия в них криозащитных агентов очень сложны. Криоконсервация спермы барана — тонкая процедура, требующая изучения в многофакторных экспериментах. Хотя затраченные усилия уже дали хорошие результаты в лабораторных тестах, метод, обеспечивающий достаточную оплодотворяемость при цервикальном искусственном осеменении, еще не разработан. Необходимо дальнейшее изучения пока что не известных аспектов влияния криозащитных агентов и поиск их сочетаний и доз для установления идеального протокола криоконсервации семени барана. Далее в производственных испытаниях потребуются подтвердить практическую применимость этих добавок, так как следует убедиться, что результаты научных опытов по введению в среду-разбавитель различных веществ, повышающих устойчивость сперматозоидов барана к образованию кристаллов льда при замораживании, могут быть масштабированы в пределах отрасли. Для этого нужно сравнить количество активных сперматозоидов в спермодозе при применении таких добавок, прогнозируемое на основании лабораторных тестов, с данными по частоте зачатий и ягнениям при искусственном осеменении такой спермой.

*Department of Reproduction & Artificial Insemination,
Clinical Sciences Section, Veterinary Faculty,
Kafkas University,
36000, Kars, Turkey,
e-mail: yavuzozturkler@hotmail.com*

*Поступила в редакцию
30 декабря 2016 года*

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2017, V. 52, № 2, pp. 242-250

ADDITIVES USED IN EXTENDERS TO IMPROVE THE FREEZABILITY OF RAM SEMEN IN RECENT YEARS: a mini review

Y. Öztürkler, U.Ç. Ari

*Department of Reproduction & Artificial Insemination, Clinical Sciences Section, Veterinary Faculty, Kafkas University, 36000, Kars, Turkey, e-mail yavuzozturkler@hotmail.com (corresponding author);
The authors declare no conflict of interests
Received December 30, 2016*

doi: 10.15389/agrobiology.2017.2.242eng

Abstract

One of the most important reasons why artificial insemination does not spread as much in cattle as sheep is that ram sperm is highly fragile against cryodamage and consequently the optimum fertility results can not be obtained from cervical inseminations compared to laparoscopic insemination. To establish an ideal ram sperm freezing model, many studies have been carried out for more than 60 years and various methods have been tested by making great efforts. One of the topics where these tests have been done intensively in recent years are additives used in freezing extenders in order to increase the tolerance of sperm against oxidative stress in frozen-thawed ram semen. In this review, covering the studies carried out between the years 2000-2016, we have mostly compiled the additives used in ram semen freezing media which have given better results compared to others supplements. It is understood that, usually, seminal plasma and proteins, thiol compounds, enzymatic antioxidants, sugars, fatty acids and vitamins have been studied as additive agents in recent years. As a result, this review suggests us that further studies are needed to explore the novel techniques and new additives, and their combinations should be tested in different doses in order to install an ideal cryopreservation template for ram semen. Furthermore, even though addition of various compounds to freezing media have improved freezability of ram semen in experimental conditions, anyway these results must be confirmed in field studies. Therefore, the value of sperm which potential fertility is predicted from laboratory survey must be compared with conception or lambing rates.

Keywords: ram semen, additives, freezability, extender.

REFERENCES

1. Quinn P.J., White I.G., Cleland K.W. Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *J. Reprod. Fertil.*, 1969, 18: 209-220.
2. King M.E., McKelvey W.A.C., Dingwall W.S., Matthews K.P., Gebbie F.E.,

- Mylne M.J.A., Stewart Robinson J.J. Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen-thawed semen with or without oxytocin administration. *Theriogenology*, 2004, 62: 1236-1244 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.01.009).
3. Woelders H., Hiemstra S.J. The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. *Cryobiology*, 2011, 63(3): 316-317 (doi: 10.1016/j.cryobiol.2011.09.042).
4. Rodríguez-Martínez H. Sperm biotechnologies in domestic species: state of the art. *Anim. Reprod.*, 2013, 10(3): 268-276.
5. Baran A., Ak K., Ileri I.K., Soylu M.K. Effects of adding bull seminal plasma to ram semen extenders on post-thaw spermatozoa motility and morphology. *Indian Vet. J.*, 2004, 81(7): 780-783.
6. Marti E., Marti J.I., Muino-Blanco T., Cebrian-Perez J.A. Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. *J. Androl.*, 2008, 29: 4 (doi: 10.2164/jandrol.107.003459).
7. Leahy T., de Graaf S.P. Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing. *Reprod. Domest. Anim.*, 2012, 47(4): 207-213 (doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02077.x).
8. de Graaf S.P., Leahy T., Marti J., Evans G., Maxwell W.M.C. Application of seminal plasma in sex-sorting and sperm cryopreservation. *Theriogenology*, 2008, 70(8): 1360-1363 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.07.012).
9. Alvarez J.G., Storey B.T. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.*, 1995, 42(3): 334-346 (doi: 10.1002/mrd.1080420311).
10. Arı U.Ç., Öztürkler Y. Oxidative stress during long and short term storage of sperm and usage of antioxidant. *Türkiye Klinikleri J. Reprod. Artif. Insemin.-Special Topics*, 2015, 1(3): 16-21.
11. Öztürkler Y., Yıldız S., Güngör Ö., Pancarcı M., Kaçar C., Arı U.Ç. The effects of L-ergothioneine and L-ascorbic acid on in vitro maturation and embryonic development in sheep oocytes. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 2010, 16: 757-763.
12. Bansal A.K., Bilaspuri G.S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*, 2011, 2011: Article ID 686137 (doi: 10.4061/2011/686137).
13. Uysal O., Bucak M.N. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. *Acta Vet. Brno*, 2007, 76(3): 383-390 (doi: 10.2754/avb200776030383).
14. Bucak M.N., Ateşşahin A., Yüce A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Ruminant Res.*, 2008, 75: 128-134 (doi: 10.1016/j.smallrumres.2007.09.002).
15. Anghel A., Zamfirescu S., Coprean D., Sogorescu E. The effects of cysteine, bovine serum albumin and vitamin E on the qualitative parameters of frozen-thawed ram semen. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 2009, 14(2): 97-103.
16. Ari U.Ç., Kulaksız R., Öztürkler Y. Freezability of Tushin ram semen extended with goat or cow milk based extenders. *Reprod. Domest. Anim.*, 2011, 46(6): 975-979 (doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01769.x).
17. Ari U.Ç., Kulaksız R., Öztürkler Y., Lehimcioğlu N.C., Yıldız S. Effect of N-acetylcysteine (NAC) on post-thaw semen quality of Tushin rams. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 2016, 22(6): 883-887.
18. Yıldız S., Öztürkler Y., Ari U.Ç., Lehimcioğlu N.C., Atakişi E., Kulaksız R. The effects of L-ergothioneine, N-acetylcystein and cystein on freezing of ram semen. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 2015, 21(1): 81-86.
19. Agarwal A., Gupta S., Sharma R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2005, 3: 28 (doi: 10.1186/1477-7827-3-28).
20. Maia Mda S., Bicudo S.D., Sicherle C.C., Rodello L., Gallego I.C. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. *Anim. Reprod. Sci.*, 2010, 122(1-2): 118-123 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.08.004).
21. Silva S.V., Soares A.T., Batista A.M., Almeida F.C., Nunes J.F., Peixoto C.A., Guerra M.M. In vitro and in vivo evaluation of ram sperm frozen in tris egg-yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced glutathione. *Reprod. Domest. Anim.*, 2011, 46(5): 874-881 (doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01758.x).
22. Ari U.Ç., Kulaksız R., Yıldız S., Lehimcioğlu N.C., Öztürkler Y. Effects of antioxidants in glutathione redox cycle on freezability of ram semen (Proc. 18th Annual Conference of the ESDAR, Helsinki, Finland, 2014). Abstracts. *Reprod. Domest. Anim.*, 2014, 49(suppl. 3): 54 (doi: 10.1111/rda.12391). Available https://www.researchgate.net/publication/278870707_Effect_of_antioxidants_in_glutathione_redox_cycle_on_freezability_of_ram_semen. Accessed March 31, 2017.
23. Santiani A., Evangelista S., Sepúlveda N., Risopatrón J., Villegas J., Sánchez R. Addition of superoxide dismutase mimics during cooling process prevents oxida-

- tive stress and improves semen quality parameters in frozen/thawed ram spermatozoa. *Theriogenology*, 2014, 82(6): 884-889 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.07.002).
24. Bucak M.N., Ateşşahin A., Varışlı Ö., Yücel A., Tekin N., Akçay A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology*, 2007, 67(5): 1060-1067 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.12.004).
 25. Panyaboriban S., Suwimonteerabutr J., Phutikanit N., Swangchan-Uthai T., Tharasanit T., Techakumphu M. Effect of various combinations of sugar supplementation in the extender on frozen-thawed ram semen quality and fertility. *Thai. J. Vet. Med.*, 2015, 45(2): 229-237.
 26. Najafi A., Najafi M.H., Zanganeh Z., Sharafi M., Martinez-Pastor F., Adeldust H. Cryopreservation of ram semen in extenders containing soybean lecithin as cryoprotectant and hyaluronic acid as antioxidant. *Reprod. Domest. Anim.*, 2014, 49(6): 934-940 (doi: 10.1111/rda.12405).
 27. Emamverdi M., Zhandi M., Shahneh A.Z., Sharafi M., Akhlaghi A., Motlagh K.M., Dadkhah F., Davachi N.D. Flow cytometric and microscopic evaluation of post-thawed ram semen cryopreserved in chemically defined home-made or commercial extenders. *Animal Production Science*, 2015, 55(4): 551-558 (doi: 10.1071/AN13215).
 28. Mata-Campuzano M., Álvarez-Rodríguez M., Álvarez M., Tamayo-Canul J., Anel L., de Paz P., Martínez-Pastor F. Post-thawing quality and incubation resilience of cryopreserved ram spermatozoa are affected by antioxidant supplementation and choice of extender. *Theriogenology*, 2015, 83(4): 520-528 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.10.018).
 29. Üstüner B., Alçay S., Nur Z., Sagirkaya H., Soylu M.K. Effect of egg yolk and soybean lecithin on tris-based extender in post-thaw ram semen quality and in vitro fertility. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 2014, 20(3): 393-398 (doi: 10.9775/kvfd.2013.10248).
 30. Forouzanfar M., Sharafi M., Hosseini S.M., Ostadhosseini S., Hajian M., Hosseini L., Abedi P., Nili N., Rahmani H.R., Nasr-Esfahani M.H. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 2010, 73(4): 480-487 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.10.005).
 31. Towhidi A., Zeinoaldini S., Ardebili R., Davachi N.D., Nasiri A.H. Combined ω -3 fatty acids and α -tocopherol supplementation improved the ovine sperm cryosurvival. *Iranian Journal of Biotechnology*, 2013, 11(4): 238-243 (doi: 10.5812/ijb.14469).
 32. Talebiyan R., Amidi F., Samini M., Mirshokraei P., Dehkordi S.H. Effect of met-anandamide on prevention of hyperactivation, cryo-capacitation and acrosome reaction in ram semen cryopreservation. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 2015, 21(4): 545-551 (doi: 10.9775/kvfd.2014.12897).
 33. da Silva E.C.B., Cajueiro J.F. de P., Silva S.V., Guerra M.M.P. Ethylene glycol and acetamide cryoprotectants on in vitro viability of thawed ram spermatozoa. *Ciência Rural*, 2012, 42(6): 1083-1088 (doi: 10.1590/S0103-84782012005000027).
 34. Chinoy N.J. Ascorbic acid levels in mammalian tissues and its metabolic significance. *Comp. Biochem. Physiol. A. Comp. Physiol.*, 1972; 42(4): 945-952 (doi: 10.1016/0300-9629(72)90400-8).
 35. Buettner G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1993, 300(2): 535-543 (doi: 10.1006/abbi.1993.1074).
 36. Fraja C.D., Motchnik P.A., Shinegana M.K., Helbock H.J., Jacob R.A., Ames B.N. Ascorbic acid protects against oxidative DNA damage in human sperm. *PNAS USA*, 1991, 88(24): 11003-11006 (doi: 10.1073/pnas.88.24.11003).
 37. Yıldız S., Daşkın A. Koç spermasının farklı antioksidan içeren sulandırıcılarla kısa süreli saklanması. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 2004, 10(2): 155-159.
 38. Hamedani M.A., Tahmasbi A., Naserian A., Ahangari Y.J. Influence of added vitamin S on chilled and frozen-thawed ram sperm cryopreserved in tris extender. *International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences*, 2015, 4(9): 5848-5859.
 39. Hamedani M.A., Tahmasbi A.M., Ahangari Y.J. Effects of vitamin supplementation on the quality of Ovine spermatozoa. *Open Veterinary Journal*, 2013, 3(2): 140-144.
 40. Cai J.G., Sun S.Q., Wang L.G., Gu H.J. The effect of adding vitamin B₁₂ in sperm diluter on quality of bull's straw frozen sperm. *J. Liaoning Agricult. Coll.*, 2004, 6: 10-11.
 41. Appasamy M., Muttukrishna S., Pizzey A.R., Ozturk O., Groome N.P., Serhal P., Jauniaux E. Relationship between male reproductive hormones, sperm DNA damage and markers of oxidative stress in infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 2007, 14(2): 159-165 (doi: 10.1016/S1472-6483(10)60783-3).
 42. Bellanti F., Matteo M., Rollo T., de Rosario F., Greco P., Vendemia G. Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: impact of estrogen therapy. *Redox Biology*, 2013, 19(1): 340-346 (doi: 10.1016/j.redox.2013.05.003).
 43. Succu S., Berlinguer F., Pasciu V., Satta V., Leoni G.G., Naitana S. Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. *Journal of Pineal Research*, 2011, 50(3): 310-318 (doi: 10.1111/j.1600-079X.2010.00843.x).

44. Das Graças C.P., Lim A.in P.G., Fidelis A.A.G., Cardoso J.R., Blume H., Mondadori R.G. Metil-formamida na criopreservação de sêmen ovino [Methyl-formamide in ram semen cryopreservation]. *Ciênc. anim. bras.*, 2013, 14(4): 481-487 (doi: 10.5216/cab.v14i4.17835).
45. Motamedi-Mojdehi R., Roostaei-Ali Mehr M., Rajabi-Toustanî R. Effect of different levels of glycerol and cholesterol-loaded cyclodextrin on cryosurvival of ram spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.*, 2014, 49(1): 65-70 (doi: 10.1111/rda.12225).
46. Gil J., Söderquist L., Rodríguez-Martínez H. Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology*, 2000, 54(1): 93-108 (doi: 10.1016/S0093-691X(00)00328-9).
47. Anel L., de Paz P., Álvarez M., Chamorro C.A., Boixo J.C., Manso A., González M., Kaabi M., Anel E. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen. *Theriogenology*, 2003, 60(7): 1293-1308 (doi: 10.1016/S0093-691X(03)00140-7).
48. Öztürkler Y., Ak K., Ileri I.K. Koç spermasının yoğun gliserollü sulandırıcılarda dondurulması. *Istanbul Univ. Vet. Fak. Derg.*, 1999, 25(2): 399.
49. Öztürkler Y., Ak K., Ileri I.K. The effect of season on post thaw spermatological properties in Kivırcık rams. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 1997, 3(1): 73-79.
50. Frazão Sobrinho M., Castelo Branco M.A., Sousa A. Júnior, Nascimento I.M.R., Mota L.H.C.M., Carvalho Y.N.T., Ferreira S.B., Costa D.N.M., Moraes F.J. Júnior, Souza J.A.T. Características do sêmen de carneiros Dorper, Santa Inês e sem padrão racial definido, pré e pós-congelação, nos períodos chuvoso e seco [Characteristics of the semen of Dorper, Santa Ines and undefined breed sheep, pre- and post-freezing, in the rainy and dry period]. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 2014, 66(4): 969-976 (doi: 10.1590/1678-6465).