



Kısa Süreli Saklanan Tavşan Spermasının Spermatolojik Parametreleri Üzerine Taxifolinin Etkileri*

Selcan SEVİM¹, Serpil SARIÖZKAN²

¹Sulusaray İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü, Tokat-TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dölerme Suni Tohumlama ve Androloji Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Serpil SARIÖZKAN; E-mail: serpilsariozkan@erciyes.edu.tr; ORCID: 0000-0001-5224-2341

Atıf yapmak için: Sevim S, Sariözkan S. Kısa süreli saklanan tavşan spermasının spermatolojik parametreleri üzerine taxifolinin etkileri. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2020; 17(2): 164-172.

Özet: Bu çalışmanın amacı, tavşan spermasının kısa süreli saklanması süresince (0., 6., 12., ve 24. saat) taxifolinin spermatolojik parametreler üzerine etkisini araştırmaktır. Araştırmada sperma vericisi olarak sekiz adet ergin Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı. Sperma suni vajen yardımıyla haftada üç kez alındı. Tavşanlardan alınan ejakulatlar 37°C'de değerlendirildikten sonra karıştırıldı. Sperma örnekleri dört ayrı gruba ayrıldı. Daha sonra sperma numuneleri Tris (K-Tris), Tris+10 µl taxifolin (10 TT), Tris+100 µl taxifolin (100 TT) ve Tris+500 µl taxifolin (500 TT) ile sulandırıldı. Sulandırılmış sperma numuneleri 4°C'de 24 saat süreyle kısa süreli saklandı. Saklama süresinin ardından bazı spermatolojik parametreler (motilite, akrozom anomali oranı, toplam anormal spermatozoa oranı ve HOST) yönünden analiz edildi. Deneysel çalışmalar 10 kez tekrar edildi. Çalışmanın sonucunda, tüm deneysel gruplarda 24. saat sonunda anormal spermatozoa oranında artış ve plazma membran bütünlüğü ile motilite oranında düşme saptandı. Kontrol grubu verileriyle karşılaştırıldığında 100 TT grubu 6. (%82.50), 12. (%80) ve 24. (%77.50) saatlerde istatistiki olarak en yüksek motilite oranını verdi (P<0.001). Kısa süreli saklamanın 24. saatinde 100 µl taxifolin ilavesinin diğer gruplara kıyasla akrozomal morfolojik yapının bütünlüğünü istatistiki açıdan önemli derecede koruduğu ve akrozom anomalisi oranı (%7) ile toplam spermatozoa anomali oranını (%8.50) düşürdüğü ve plazma membran bütünlüğünü de istatistiki olarak önemli derecede koruduğu saptandı (P<0.001). Sonuç olarak, 100 µl taxifolin ilavesinin tavşan spermasının kısa süreli saklanmasında etkin koruyucu bir rol oynadığı tespit edildi.

Anahtar kelimeler: Antioksidan, kısa süreli saklama, spermatolojik parametreler, tavşan, taxifolin

The Effects of Taxifolin on Spermatological Parameters of Liquid Stored Rabbit Semen

Summary: The aim of this study was to investigate the effect of taxifolin on spermatological parameters of rabbit semen during liquid storage (0, 6, 12, and 24th h). In this study, eight adult New Zealand male rabbits were used as semen donors. Semen was taken with the aid of artificial vagina three times a week. Ejaculates collected from bucks were evaluated and pooled at 37°C. Semen samples were divided into four groups then were diluted with Tris (K-Tris), Tris + 10 µl taxifolin (10 TT), Tris + 100 µl taxifolin (100 TT) and Tris + 500 µl taxifolin (500 TT). The diluted semen samples were liquid stored at 4°C up to 24th h. After the storage period, some spermatological parameters (the percentage of motility, acrosome - total spermatozoa abnormality and HOST) were analyzed. Experimental studies were replicated 10 times. As a result of the study, the percentage of abnormal spermatozoa increased and plasma membrane integrity and motility rate decreased at the end of 24th h in all experimental groups. When compared to the control group data, 100 µl taxifolin addition gave the highest motility rate at 6th (82.50%), 12th (80%) and 24th (77.50%) hour (P <0.001). At the 24th hour of liquid storage, 100 µl taxifolin addition was found to protect statistically significantly the integrity of acrosomal structure and plasma membrane compared to other groups. In addition, it was determined that the percentage of acrosome (7%) and total spermatozoa abnormality (8.50%) was low in the 100 TT group when compared to other groups (P <0.001). In conclusion, it was found that addition of 100 µl taxifolin plays effective protective role on short-term storage of rabbit semen.

Key words: Antioxidant, liquid storage, rabbit, spermatological parameters, taxifolin

Giriş

Tavşanlar biyoteknolojik araştırmalarda yaygın şekilde kullanılan bir laboratuvar hayvanı modelidir. Fareler ve ratlar gibi diğer laboratuvar hayvanlarında ötanazi sonrası epididimal sperma-

nın alınmasının aksine tavşanlar, suni vajene uyum sağlarlar ve ötanazi edilmeksizin sperma almaya elverişlidir. Bu sayede tavşanlar spermatozoa çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir (Hafez, 1970). Soğutulmuş ya da dondurulmuş-çözdürülmüş spermanın canlılık ve kalite değerleri, saklama periyodu süresince şekillenen soğuk hasarından olumsuz etkilenmektedir. Bu olumsuz durum spermanın suni tohumlamadaki başarısını düşürebilmektedir. Soğutulmuş

Geliş Tarihi/Submission Date : 04.02.2020

Kabul Tarihi/Accepted Date : 05.05.2020

* Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2018-8224 numaralı proje kapsamında desteklenmiş ve aynı başlıklı Yüksek Lisans tezinden özetlenmiştir.

ya da dondurulmuş-çözdürülmüş sperma ile elde edilen fertilitite oranları, taze spermanınki ile karşılaştırıldığında oldukça düşük bulunmaktadır. Bu durum araştırmacıları halen en uygun saklama koşullarını (uygun ısı, süre, sperma sulandırıcısı, antioksidan ve membran stabilizatör katkı maddeleri vs.) araştırmaya yöneltmiştir. Son yıllarda özellikle sperma sulandırıcılarına antioksidan ilavesi ve olumlu etkileri ile ilgili çalışma yapılmaktadır (Avdatek ve ark., 2018). Spermanın soğutulması, dondurulması-çözdürülmesi sırasında oluşan soğuk şoku; spermatozoa motilitesi, canlılığı, deoksiribonükleik asit (DNA) ve membran bütünlüğü ve fertilizasyon yeteneği üzerinde geri dönüşümsüz hasarlar meydana getirmektedir. Soğutma veya dondurma/çözdürme sonrası şekillenen lipid peroksidasyon, anormal spermatozoaya yol açmaktadır. Bu olaydaki ana neden spermatozoon membranlarının doymamış yağ asidince zengin olması, yüksek oksijen yoğunluğunun etkisiyle oksidatif stres ve peroksidatif atıkların şekillenmesi ve sonuçta da serbest oksijen radikalleri (ROS) açığa çıkarak spermatozoanın ölümüne yol açmasıdır (Garrido ve ark., 2004). Spermanın dondurulması-çözdürülmesi esnasında meydana gelen ROS, düşük yoğunlukta; hiperaktivasyon, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu gibi spermatolojik fonksiyonların meydana gelmesinde önemli rol oynamaktadır. Ancak, yüksek yoğunlukta ROS, spermatolojik fonksiyonları olumsuz etkileyerek infertiliteye neden olabilmektedir (Aitken ve Baker, 2004). Fizyolojik olarak spermada ROS ürünlerinin oluşumu ve detoksifikasyonu arasında denge bulunmaktadır. Gerek seminal plazmada gerekse spermatozoada ROS ürünlerinin detoksifikasyonunda görevli glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GPO), süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidan sistemleri mevcuttur. Ancak, bu doğal savunma mekanizması spermanın sulandırılması, soğutulması, dondurulması-çözdürülmesi işlemleri sırasında zarar görmekte ve ROS ürünleri spermatozoada geri dönüşümsüz hasarlar meydana getirmektedir (Bilodeau ve ark., 2000). Spermanın soğutulması ile dondurulması-çözdürülmesi işlemleri esnasında oluşan membran-lipit faz değişimi, osmotik-mekanik stres ve ROS, spermatozoa membran proteinlerinde denaturasyona, hücre organellerinde yapısal deformasyona, DNA'da kırılmalara ve hücrelize yol açmaktadır (Saleh ve Agarwal, 2002). Bu olumsuz durumun sperma sulandırıcılarına

değişik antioksidanların ilavesiyle azaltılabildiği ve çözüm sonu spermatozoa parametrelerini iyileştirdiği bildirilmektedir (Sarıözkan ve ark., 2009). Taxifolin (3,5,7,3,4-pentahydroxy flavanone veya dihydroquercetin), flavonoidlerin alt sınıfı olan flavanones grubundandır ve güçlü bir flavonoiddir. Turunçgiller ve soğan bol miktarda taxifolin içermektedir (Rice-Evans ve ark., 1996). Taxifolinin güçlü bir antioksidan ve anti-radikal aktiviteye sahip olduğu, ayrıca gıda ve farmasötik ürünlerdeki lipid peroksidasyonunun en aza indirgenmesi veya önlenmesi, zehirli oksidasyon ürünlerinin oluşmasının geciktirilmesi, beslenme kalitesinin korunması ve raf ömrünün uzatılması gibi alanlarda kullanılabilirliği de bildirilmiştir (Topal ve ark., 2016). Gupta ve ark. (1971), yaptıkları bir çalışmada, taxifolinin albino sıçanlarda inflamasyonun eksudatif ve proliferatif fazları üzerinde kuvvetli antienflamatuar etkinliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir. Zhang ve ark. (2019), çeşitli organlarda ve özellikle kardiyovasküler sistemde toksiteye yol açan yapay bir kirletici olan di-2-ethylhexyl phtalatenin tavuklarda kardiyomiyositler üzerinde oluşturduğu toksik etkiyi taxifolinin antagonize ederek azalttığını rapor etmişlerdir. Yapılan diğer çalışmada, taxifolinin serum lipid düzeyini dengeleyip normal seviyelere getirmesi suretiyle antienflamatuar etkisi, kardiyovasküler sistem üzerine olumlu etkisi ve ROS'un uyardığı oksidatif strese bağlı şekillenen kanser vakalarında güçlü antioksidan etkileri rapor edilmiştir (Kuang ve ark., 2017).

Yapılan literatür taramalarında antioksidan etkinliği pek çok farklı çalışmada kanıtlanmış olan taxifolin maddesinin sperma sulandırıcılarına eklenmesine ve spermanın saklanması sürecinde olası olumlu antioksidatif etkinliğine yönelik bir çalışma yapılmadığı görülmüştür. Bu nedenle mevcut çalışmamızda sperma sulandırıcısına antioksidan olarak taxifolini ekleyerek tavşan spermasının +4 °C'de saklanması süresince etkilerini incelemek, tavşan spermasının kısa süreli saklanması en uygun sperma sulandırıcısı geliştirebilmek, taxifolinin beklenen olası koruyucu etkileri sebebiyle diğer türlerde spermanın saklanabilirliği üzerine bir model oluşturabilmek ve sonraki çalışmalar için literatüre katkı sağlayabilmek amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hayvan materyali

Bu çalışmaya Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından (EÜHADYEK, 13.12.2017 tarih ve 17/132 sayı) onay verildi. Çalışmada sperma donörü olarak ergin sekiz adet Yeni Zelanda ırkı erkek tavşan kullanıldı. Çalışma, erkek tavşanlardan suni vajen tekniği ile alınan spermalarda yürütüldü. Ergin erkek tavşanlar bireysel kafeslerinde Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (DEKAM) uygulanan rutin bakım-besleme koşulları olan 12 saat aydınlık/12 saat karanlık, 22-24°C oda ısısı ve % 55-60 nisbi nem oranına sahip ortamda barındırıldı. Ticari tavşan yemi (Optima Yem, Bolu-Türkiye) ve taze içme suyu ile *ad libitum* besleme yapıldı.

Spermanın alınması

Çalışmada kullanılacak ergin erkek tavşanlardan haftada üç kez suni vajen yardımıyla sperma alındı. Alınan spermaların mikroskopik kontrolleri yapıldıktan sonra bireysel farklılıkları elimine edebilmek amacıyla kitle hareketi 3 ve üstü (0-5 skala), motilitesi %70 ve üstü, yoğunluğu 300×10^6 spermatozoa/ml özelliklerine sahip olan ejakulatlar birleştirildi. Bu çalışmada 10 adet miks edilmiş ejakulat kullanıldı. Her bir miks edilmiş ejakulat deneme gruplarına ayrıldı.

Spermanın sulandırılması ve deneysel grupların oluşturulması

Çalışmada spermanın sulandırılması amacıyla Tris sulandırıcısı (313.8 mM Tris, 103.1 mM sitrik asit ve 33.3 mM glukoz) kullanıldı. Her bir grup 30×10^6 spermatozoa/ml olacak şekilde sırasıyla kontrol, 10 µl, 100 µl ve 500 µl dozda taxifolin (Sigma T4512) içeren Tris sulandırıcısı ile sulandırıldı. Spermanın sulandırılmasını takiben Kontrol (Tris sulandırıcısı) (T), 10 µl Taxifolin+ Tris (10TT), 100 µl Taxifolin+Tris (100TT), 500 µl Taxifolin+Tris (500TT) grupları oluşturuldu. Sulandırılmış sperma örnekleri +4 °C' de buzdolabına bırakılmıştır. Ardından 0., 6., 12. ve 24. saatlerin sonunda spermatolojik analizlerden; spermatozoa motilite oranı, akrozomal ve toplam anomali oranı ve plazma membran bütünlüğü analiz edildi.

Spermatolojik analizler

Spermatozoa motilite oranı: Spermatozoa motilite oranı, lam üzerine alınan 10 µl sperma üzerine lamel kapatılarak 37 °C ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopta 400'lük büyütmede subjektif yolla tespit edilmiştir. Beş farklı mikroskop sahasında motilite oranı (%) değerlendirildi. Alınan tüm değerlerin ortalaması o numunenin motilite oranı olarak kabul edildi (Roca ve ark., 2000).

Anormal spermatozoa oranı: Spermatozoa akrozom ve toplam anomali oranı tespiti amacıyla her bir numuneden alınan 3 damla sperma 1 ml Hancock solüsyonu içine eklendi. Karışımdan alınan 1 damla lam üzerine alınıp üstüne lamel kapatılarak faz-kontrast mikroskopta 1000'lik büyütmede toplam 200 hücre sayılarak test edildi (Schafer ve Holzman, 2000).

Hypo-osmotic swelling test (HOST) oranı: Spermatozoa plazma membran bütünlüğünün test edilmesi amacıyla Hypo-Osmotic Swelling Test (HOST) kullanıldı. 300 µl HOST solüsyonu ile 30 µl sperma karıştırılarak 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Ardından karışımdan 0.2 µl lam üzerine alınarak faz-kontrast mikroskopta 400' lük büyütmede değerlendirildi. En az beş değişik mikroskop sahasında toplam 200 hücre sayılarak şişmiş ve kıvrık kuyruklu spermatozoonların tespiti yapıldı (Revell ve Mrode, 1994).

İstatistiksel analizler

Deneysel çalışmalar 10 kez tekrar edildi. Kontrol, 10 TT, 100 TT ve 500 TT deney grupları arasındaki farklılıkların önem kontrolü Kruskal Wallis ile yapıldı. Her bir deney grubuna ait 0., 6., 12., ve 24., saatleri arasındaki motilite, akrozom- total anomali ve HOST değişkenleri bakımından farklılıkların istatistiksel olarak önem kontrolleri Friedman testi ile yapıldı. Gruplar arası çoklu karşılaştırmalarda Benferroni düzeltmesi yapıldı. Verilerin tanımlayıcı istatistikleri medyan değer, 1. (%25) ve 3. (%75) çeyrekler ile gösterildi. İstatistiksel analizler NCSS 9 programı ile yapıldı. Anlamlılık seviyesi $P < 0.05$ olarak belirlendi.

Bulgular

Kısa süreli saklanan tavşan spermasının motilite ve akrozom anomali oranları üzerine taxifolinin etkileri Tablo 1'de plazma membran bütünlüğü ve spermatozoa toplam anomali oranları

üzerine etkileri Tablo 2. de gösterildi. Buna göre; saklama periyodunun ilerleyen saatlere göre deney gruplarının motilite oranları değerlendirildiğinde; K, 10 TT, 100 TT ve 500 TT grupları dâhil tüm deney gruplarında saklama periyodunun 0. saatinden 24. saatine doğru ilerlemesiyle beraber motilite oranlarında düşmeler gözlemlendi. İstatistiki önem yönünden incelendiğinde ve 0. saat verileriyle karşılaştırıldığında kontrol ve 500 TT grubunda motilite oranındaki bu düşme saklama süresinin 12. saatinde ($P<0.001$); 10 TT ve 100 TT deney grubunda ise 24. saatinde sırasıyla $P<0.01$, $P<0.05$ düzeyinde saptandı. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında ise kısa süreli saklama periyodunun 0. saatinde K, 10 TT, 100 TT ve 500 TT grupları arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($P>0.05$). Buna göre; kontrol grubu verileriyle karşılaştırıldığında deney grupları arasında

100TT grubu 6., (%82.50) 12. (%80) ve 24. (%77.50) saatlerde istatistiki olarak en yüksek motilite oranını verdi ($P<0.001$).

Akrozom anomalisi oranları değerlendirildiğinde; deney gruplarının 4°C ' de kısa süreli saklama periyodunun 0. saatinden 24. saatine doğru ilerlemesiyle beraber tüm gruplarda akrozom bütünlüğünde istatistiki açıdan önemli oranlarda bozulmalar gözlemlendi. Kontrol grubu ile Taxifolinin farklı dozlarında katıldığı deney gruplarının akrozom anomalisi oranları, saklama süresinin 0. saat verileri ile kıyaslandığında tüm deney gruplarında 12. saatten itibaren akrozom anomalisinde istatistiki açıdan önemli oranda artışların olduğu saptandı ($P<0.001$). Saklamanın son 24. saati bulguları değerlendirildiğinde ise 100 TT grubunun diğer tüm deneme gruplarına kıyasla akrozom bütünlüğünü istatistiki açıdan

Tablo 1. Tavşan spermasının kısa süreli saklanması süresince (0., 6., 12. ve 24. saatler) farklı taxifolin dozlarının motilite ve akrozom anomalisi oranları üzerine etkileri

Değişken	Grup	Saat [Medyan (%25-%75)]				P değeri (Friedman Testi)
		0. Saat	6. Saat	12. Saat	24. Saat	
Motilite oranı (%)	Kontrol	85.00 (81.25-88.75) ^a	70.00 (70.00-75.00) ^{abBC}	65.00 (60.00-65.00) ^{bcBC}	55.00 (50.00-55.00) ^{cBC}	<0.001
	10TT	85.00 (77.50-88.75) ^a	80.00 (76.25-85.00) ^{aAB}	75.00 (75.00-80.00) ^{abAB}	70.00 (66.25-70.00) ^{bAB}	<0.01
	100TT	85.00 (80.00-90.00) ^a	82.50 (80.00-85.00) ^{aA}	80.00 (80.00-80.00) ^{abA}	77.50 (75.00-80.00) ^{bA}	<0.05
	500TT	85.00 (76.25-88.75) ^a	60.00 (60.00-65.00) ^{abC}	55.00 (51.25-60.00) ^{bcC}	50.00 (50.00-50.00) ^{cC}	<0.001
	P değeri (Kruskal Wallis testi)	>0.05	<0.001	<0.001	<0.001	
Akrozom anomalisi oranı (%)	Kontrol	3.00 (3.00-3.75) ^a	6.00 (5.25-6.75) ^{abAB}	10.00 (9.25-11.75) ^{bcA}	14.50 (13.25-15.00) ^{cA}	<0.001
	10TT	3.00 (3.00-3.75) ^a	5.00 (5.00-6.00) ^{abB}	7.00 (6.25-8.00) ^{bcBC}	9.00 (9.00-10.00) ^{cAB}	<0.001
	100TT	3.00 (3.00-3.75) ^a	5.00 (4.25-5.75) ^{abB}	6.00 (5.00-7.00) ^{bc}	7.00 (6.25-8.00) ^{bB}	<0.001
	500TT	3.50 (3.00-4.75) ^a	6.50 (5.25-7.00) ^{abA}	10.00 (7.50-10.75) ^{bcAB}	14.50 (10.75-15.75) ^{cA}	<0.001
P değeri (Kruskal Wallis testi)	>0.05	<0.05	<0.001	<0.001		

A, B, C : Aynı sütunda (gruplar arası) farklı harf taşıyan veriler istatistiksel olarak farklıdır.

a, b, c : Aynı satırda (saatler arası) farklı harf taşıyan veriler istatistiksel olarak farklıdır.

Tablo 2. Tavşan spermasının kısa süreli saklanması süresince (0., 6., 12. ve 24. saatler) farklı taxifolin dozlarının plazma membran bütünlüğü (HOST) ve spermatozoa toplam anomali oranları üzerine etkileri

Değişken	Saat [Medyan (%25-%75)]				P değeri (Friedman Testi)	
	12. Saat	24. Saat	Grup	0. Saat		6. Saat
Plazma membran bütünlüğü oranı (%)	Kontrol	70.00	57.50	50.00	44.00	<0.001
		(65.50-71.00) ^a	(54.25-59.50) ^{abBC}	(46.00-52.50) ^{bcBC}	(41.25-48.75) ^{cB}	
		68.50	65.00	62.50	53.00	<0.001
		(66.00-71.00) ^a	(63.00-66.75) ^{abA}	(56.75-63.75) ^{baA}	(49.50-55.00) ^{bcAB}	
		69.50	67.00	66.00	65.00	>0.05
100TT	(66.50-73.00)	(65.25-69.75) ^A	(64.00-68.00) ^A	(61.50-67.50) ^A	<0.001	
	68.00	62.50	60.50	51.50		
	(66.25-69.75) ^a	(59.50-64.50) ^{abAB}	(58.50-61.75) ^{abAB}	(48.25-58.50) ^{bB}		
P değeri (Kruskal Wallis testi)		>0.05	<0.001	<0.001	<0.001	
Spermatozoa toplam anomali oranı (%)	Kontrol	7.00	11.50	13.50	18.50	<0.001
		(6.00-8.00) ^a	(10.00-12.75) ^{abA}	(12.25-14.75) ^{bcA}	(16.25-20.75) ^{cA}	
		7.00	7.00	9.00	12.00	<0.001
		(6.00-8.00) ^a	(6.25-8.00) ^{ab}	(8.25-10.00) ^{abB}	(9.25-13.00) ^{bBC}	
		6.50	8.00	7.50	8.50	<0.01
100TT	(6.00-7.75) ^a	(6.25-8.00) ^{abB}	(7.00-9.00) ^{abB}	(8.00-10.00) ^{bc}	<0.001	
	7.00	8.00	10.00	14.50		
	(6.00-7.75) ^a	(7.00-9.00) ^{abB}	(9.00-11.00) ^{bcB}	(14.00-16.75) ^{cAB}		
P değeri (Kruskal Wallis testi)		>0.05	<0.001	<0.001	<0.001	

^{A, B, C} : Aynı sütunda (gruplar arası) farklı harf taşıyan veriler istatistiksel olarak farklıdır.

^{a, b, c} : Aynı satırda (saatler arası) farklı harf taşıyan veriler istatistiksel olarak farklıdır.

daha iyi koruduğu saptandı (P<0.001). Gruplar arası istatistiki değerlendirilmelerde; 0. saatlerde akrozom anomalisi yönünden istatistiki bir farklılık bulunmadı (P>0.05). Kısa süreli saklamanın 24. saatine gelindiğinde 100 TT grubunun (%7) kontrol grubuna kıyasla istatistiki açıdan önemli derecede akrozomal morfolojik yapının bütünlüğünü koruduğu ve akrozom anomalisi oranının düşük olduğu saptandı (P<0.001).

Spermatozoa plazma membran bütünlüğünün test edildiği HOS test verileri değerlendirildiğinde; kısa süreli saklama periyodunun 24. saate doğru ilerlemesiyle beraber plazma membran bütünlüğünün korunmasında istatistiki farklılıklar 0. saat verileriyle karşılaştırıldığında spermatozoa plazma membran bütünlüğü oranının kontrol ve 10 TT gruplarında 12. saatten itibaren başladığı tespit edildi (P<0.001). Deney gruplarından 100 TT verileri incelendiğinde 0., 6., 12.,

ve 24. saatleri arasında plazma membran bütünlüğü oranında düşüş tespit edilmiş olsa da bu durum istatistiki olarak önemli bulunmadı (P>0.05). Taxifolinin 500 µl dozunda katıldığı 500 TT grubunda ise 0. saat verisiyle karşılaştırıldığında spermatozoa plazma membran bütünlüğündeki bozulmaların 24. saatte istatistiki olarak önemli bulunduğu belirlendi (P<0.001). Kontrol grubu ile taxifolinin farklı dozlarının kullanıldığı 10TT, 100TT ve 500TT deney gruplarına ait spermatozoa plazma membran bütünlüğü oranları arasındaki farklılıklar değerlendirildiğinde; 0. saatte deney grupları arasında istatistiki bir fark olmadığı saptandı (P>0.05). Kısa süreli saklama periyodunun 6. ve 12. saatinde 10 TT ve 100 TT gruplarının istatistiki olarak benzer HOST değerine sahip olduğu saptandı. Kontrol ve 500 TT deney gruplarına ait verilerle kıyaslandığında; belirtilen gruplara ait bu HOST

değerlerinin, istatistiki açıdan daha yüksek olduğu saptandı ($P<0.001$). Tavşan spermasının kısa süreli saklama periyodunun 24. saatinde 100 TT grubunda diğer tüm bütünlüğünün korunduğu tespit edildi ($P<0.001$).

Kontrol grubu dahil tüm deney gruplarında spermanın kısa süreli saklanması süresince ilerleyen zamanla beraber toplam spermatozoa anomali oranında istatistiki açıdan önemli oranlarda artış gözlemlendi. Tavşan spermatozoasında toplam anomali oranı kısa süreli saklama süresinin 0. saat ile 24. saat arası sürede analiz edildiğinde ve 0. saat verileriyle kıyaslandığında; K ($P<0.001$) ve 500 TT grubunda ($P<0.001$) 12. saatten; 10 TT ($P<0.001$) ve 100 TT ($P<0.01$) gruplarına ait toplam anomali oranlarının ise 24. saatten itibaren artış gösterdiği saptandı. Deney grupları arasındaki farklılıklar analiz edildiğinde; saklama süresinin 0. saatinde gruplar arasında toplam spermatozoa oranında istatistiki açıdan önemli bir farklılık olmadığı ($P>0.05$) saptandı. Saklama periyodunun 6. ve 12. saat verileri incelendiğinde ve kontrol grubu verileriyle kıyaslandığında 10 TT, 100 TT ve 500 TT gruplarında spermatozoanın normal morfolojik yapısının daha iyi korunduğu belirlendi ($P<0.001$). Kısa süreli saklama periyodunun 24. saat verileri incelendiğinde kontrol grubu verisiyle karşılaştırıldığında 10 TT ve 100 TT grubunda spermatozoa toplam morfolojik yapısının daha iyi korunduğu ve 100 TT grubunun istatistiki olarak daha düşük toplam spermatozoa anomali oranı verildiği saptandı ($P<0.001$).

Tartışma ve Sonuç

Spermanın saklanması teknikleri; spermanın sıvı halde kısa süreli saklanması ya da dondurularak uzun süreli saklanması kapsamaktadır (Tittarelli ve ark., 2006). Ancak, her iki sperma saklama tekniğinde de spermanın sulandırılması, soğutulması, dondurulması-çözdürülmesi gibi uygulanan pek çok işlem spermatozoa motilitesinde azalma, membran bütünlüğünde bozulma ile DNA hasarlı spermatozoa sayısında artış ve sonuçta fertilitede düşüş gibi geri dönüşümsüz hasarlar oluşturmaktadır (De Lamirande ve ark., 1997; Holt, 2000). Spermada oluşan bu hasarların ROS'un aşırı üretilmesinden kaynaklandığı bildirilmektedir. ROS'un membran lipidlerini oksitlemesiyle lipid peroksidasyon oluşmaktadır. Normalde spermatozoa ve seminal plazmada şekillenen lipid peroksidasyonu

dengeleyebilmek ve ROS'un kontrolsüz üretimini engelleyebilmek amacıyla kimi antioksidanlar ve antioksidatif savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Ancak, saklanma süresince spermatozoada sitoplazmanın az olmasına bağlı olarak bu savunma sistemi yeterli olamamaktadır (Agarwal ve ark., 2005). Dolayısıyla, sperma sulandırıcılarına çeşitli antioksidanlar ilave edilerek spermanın saklanması yönelik pek çok çalışma yapılmış ve olumlu sonuçlar bildirilmiştir (Zhu ve ark., 2019; Sabir ve ark., 2019).

Çalışmamızda, tavşan spermasının kısa süreli saklanması ilerleyen saklama periyodu süresince spermatozoa motilite oranı, morfolojik yapısı ve plazma membran bütünlüğü gibi önemli kimi spermatolojik parametrelerdeki değişimleri ve bu değişimler üzerine taxifolinin doza bağlı etkileri gösterildi. Yapılan çalışmada kontrol, taxifolinin farklı dozlarında kullanıldığı 10 TT, 100 TT ve 500 TT grupları dâhil tüm deney gruplarında tavşan spermasının 4°C'de kısa süreli saklanması sırasında saklama süresinin 0. saatten 24. saate doğru ilerlemesiyle beraber istatistiki açıdan önemli motilite oranlarında düşmeler, akrozom ve plazma membran bütünlüğü ile toplam morfolojik yapıda bozulmalar gözlemlendi. Bu durum, spermatozoa mitokondri yapılarının bozulmasıyla beraber enerji üretiminde sorunların oluşmasına bağlanabilmektedir. Spermatozoa motilitesi için gereken enerji çok sayıda bulunan mitokondriyalarda sağlanmaktadır. Spermatozoanın fonksiyon bozukluklarında serbest oksijen düzeyi oldukça artmaktadır ki bu durum mitokondriaların da çalışmasını bozarak motilite gibi pek çok spermatozoa fonksiyonlarını geri dönüşümsüz hasara uğratmaktadır (Agarwal ve ark., 2014).

Çalışmada deney grupları arasında 100 TT grubunun 6., (%82.50), 12. (%80) ve 24. (%77.50) saatlerde istatistiki olarak en yüksek motilite oranını verdiği ve daha etkin koruma sağladığı saptanmıştır. Bu durum, spermanın soğutulmasıyla birlikte metabolizmasının yavaşlamasına aynı zamanda sperma sulandırıcısına eklenen taxifolinin doza bağlı olarak güçlü antioksidatif etki göstermesine bağlanabilmektedir. Saklama periyodunun 24. saatinde 100 TT grubundaki motilite oranı (%77.50) Sarıözkan ve ark. (2013) ve (2014)'nın farklı antioksidan maddeler katarak yaptıkları tavşan spermasının kısa süreli saklanması çalışmalarının 24. saat verilerine benzerlik göstermektedir. Belirtilen çalışmalarda

antioksidan etkinliğe sahip maddeler sperma sulandırıcılarına katılmış ve antioksidan katkı maddelerinin etkisiyle ilgili gruplarda tavşan spermasının kısa süreli saklanması sonrasında motilite oranlarının ilerleyen zamana karşı daha iyi korunduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızın 10 TT ve 100 TT gruplarında tavşan spermasının 24 saatlik kısa süreli saklama periyodu sonunda motilitede yüksek oranların elde edilmesi taxifolinin özellikle spermanın soğutulması sürecinde şekillenen soğuk şokunun uyardığı ROS'u önleyebilmesine bağlanabilmektedir. Taxifolin, flavanone grubu içinde yer alan güçlü antioksidan etkili bir maddedir (Rice-Evans ve ark., 1996). Flavonoidler, antioksidan etkilerini metal iyonlarını bağlayarak ve serbest radikallerin oluşmasına neden olan enzimatik reaksiyonları inhibe ederek göstermektedir (Cotelle, 2001). Yapılan çalışmalarda bir çeşit flavanoid olan taxifolinin antioksidatif etkinliği, redüksiyon, ROS'u temizleme yeteneği ve metal şelatlama aktivitelerine sahip olduğu gösterilmiştir (Topal ve ark., 2016). Dolayısıyla, çalışmamızın sonucu, taxifolinin soğuk şokunun etkisiyle aşırı üretilen ROS'un oluşturduğu oksidatif strese karşı antioksidan kimliğiyle savunma sergilediği ve metal iyonlarını bağlamak suretiyle lipidlerin oksidasyonunu engelleyebildiği ve serbest radikallerin oluşmasında görevli enzim sistemlerini inhibe edebildiği bilgisiyyle paralellik göstermektedir (Sunil ve Xu, 2019).

Gruplar arası değerlendirmede saklama süresinin 24. saatinde 10 TT ve 100 TT grubunda akrozomal yapı bütünlüğü ve spermatozoa toplam morfolojik yapısının daha iyi korunduğu ve 100 TT grubunun istatistiki olarak daha düşük akrozomal ve spermatozoa toplam anomali oranı verdiği saptanmıştır.

Diğer evcil hayvanların aksine tavşan seminal plazması yüksek kolesterol/fosfolipid oranı ve düşük doymamış/doymuş yağ asidi oranına sahiptir. Bu durum membran yapısına orta düzeyde akışkanlık kazandırırken çevresel strese karşı daha güçlü dayanıklılık sağlamaktadır (Castellini ve ark., 2006). Her ne kadar tavşan spermatozoasının membran yapısı lipid bileşeni soğuk şokuna karşı direnç sağlasa da yapılan pek çok çalışmada spermanın soğutulması sırasında ilerleyen zamanla birlikte tavşan spermatozoonu morfolojik yapısında ve fonksiyonlarında bozulmaların oluştuğu bildirilmiştir (Rosato

ve laffaldano, 2011). Çalışmamızın sonucu, kısa süreli saklamanın 24. saatinde spermatozoonun akrozom, baş ve kuyruk morfolojik yapısında hasarların olması yönüyle yukarıda belirtilen literatürlerde verilen bilgilerle benzerlik göstermektedir.

Tavşan spermasının kısa süreli saklama periyodunun 24. saat verileri değerlendirildiğinde 100 TT grubunda plazma membran bütünlüğünün diğer tüm deney gruplarından istatistiki olarak önemli derecede daha iyi plazma membran bütünlüğünün korunduğu tespit edilmiştir. Spermatozoada membran hasarları, spermanın soğutulması işlemi sırasında sıcaklığın 20°C'den 5°C'ye hızlı şekilde düşmesiyle birlikte şekillenen soğuk şoku esnasında spermatozoanın yaşlanması sonucu oluşmaktadır (Paulenz ve ark., 2002). Hücre membranının soğuk şokundan ilk etkilenen bölge olduğu ve bu yapıda gözlenen yapısal değişimlerin; protrüzyonlar, dalgalanmalar ve vezikülasyonlardan membran kayıpları, yırtılmaları ve erimeleri gibi membran bütünlüğünün bozulduğu ağır hasarlara kadar vardığı bildirilmektedir (Morris ve ark., 1999). Dolayısıyla yaptığımız çalışmada; tavşan spermasının 4°C'de saklama süresinin ilerlemesiyle beraber spermatozoa membran bütünlüğünde tespit ettiğimiz bozulmalar yukarıda bildirilen literatürlere paralel şekillenmiştir.

Tavşan spermasının kısa süreli saklamanın yapıldığı bir çalışmada kullanılan antioksidan maddenin saklama periyodunun 12. saatinde motilite, akrozomun morfolojik yapısı ve membran bütünlüğünde istatistiki açıdan önemli düzeyde koruma sağladığı rapor edilmiştir (Sarıözkan ve ark., 2014). Koçlarda kısa süreli saklamanın yapıldığı bir başka çalışmada da kullanılan antioksidan maddelerin spermatozoa motilitesi, plazma membran bütünlüğü ve normal morfolojik yapının korunmasında istatistiki açıdan önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Bucak ve ark., 2007). Yaptığımız çalışmada saklama periyodunda zaman ilerledikçe spermatozolojik parametrelerde 0. saat verilerine kıyasla bozulmaların başladığı tespit edilmiştir. Bu durum, soğutma, dondurma-çözdürme işlemleri spermatozoonun morfolojik yapı ve fonksiyonlarına zarar verebildiği bilgisine benzerlik göstermektedir (Kim ve ark., 2011). Ayrıca, 100 TT grubunda kullanılan taxifolin dozunun kısa süreli saklamanın 24. saatinde spermatozoa motilitesini, normal morfolojik yapısını ve plazma memb-

ran bütünlüğünü etkin bir şekilde koruduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; bu çalışma, taxifolin katılmamış kontrol grubu ile taxifolinin 3 farklı dozu kullanılarak 4 °C de kısa süreli saklama yapılmış tavşan spermatozoasında 24 saatlik değişimi gösteren model bir çalışmadır. Çalışma sonucunda 100 µl dozda kullanılan taxifolinin; kontrol grubuna kıyasla motilite oranında 6., 12. ve 24. saatlerde istatistiki olarak en yüksek oranı verdiği, kısa süreli saklamanın 12. ve 24. saatte plazma membran bütünlüğünü istatistiki olarak önemli derecede koruduğu ve istatistiki olarak daha düşük spermatozoa toplam anomali oranı verdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmayla taxifolinin dozu arttıkça toksik etki gösterebileceği, düşük dozda kullanıldığında ise koruyucu etki göstermediği kanısına varılmıştır. Dolayısıyla, antioksidatif etkinliği bilinen taxifolinin sperma sulandırıcısına ilave edilmesiyle tavşan spermasının spermatojistik karakterlerinde doza bağlı olarak koruma sağladığı söylenebilmektedir. Taxifolinin farklı dozları ve farklı saklama süreleriyle gerek tavşanlarda ve gerekse diğer türlerde spermanın saklanabilirliği üzerine etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla daha fazla araştırmaların yapılması önerilmektedir.

Kaynaklar

- Agarwal A, Durairajanayagam D, Halabi J, Peng J, Vazquez-Levin M. Proteomics, oxidative stress and male infertility. *Reprod Bio Med Online* 2014; 29(1): 32-58.
- Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM. Prevention of oxidative stress injury to sperm. *J Androl* 2005; 26(6): 654-60.
- Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod Fert Dev* 2004; 16(5): 581-8.
- Avdatek F, Yeni D, Gündoğan M. Merinos koçlarda spermaya katılan antioksidanların kısa süreli saklama sırasında spermatojistik parametreler ve DNA hasarı üzerine etkileri. *Kocatepe Vet J* 2018; 11(2): 126-33.
- 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(3): 282-8.

- Bucak MN, Tekin N, Kulaksız R. Koç spermasının kısa süreli saklanması antioksidanların etkisi. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg* 2007; 47(2): 15-21.
- Castellini C, Cardinali R, Dal Bosco A, Minelli A, Camici O. Lipid composition of the main fractions of rabbit semen. *Theriogenology* 2006; 65(4): 703-12.
- Cotelle N. Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem* 2001; 1(6): 569-90.
- De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 1997; 2(1): 48-54.
- Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A, Remohi J. Prooxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J Androl* 2004; 6(1): 59-66.
- Gupta MB, Bhalla TN, Gupta CR, Mitra GP, Bhargava KP. Anti-inflammatory activity of taxifolin. *Japan J Pharmacol* 1971; 21(3): 377-82.
- Hafez ESE. *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals*. Philadelphia: Lea and Febiger, 1970; pp. 273-98.
- Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62(1-3): 3-22.
- Kim S, Lee YJ, Kim YJ. Changes in sperm membrane and ROS following cryopreservation of liquid boar semen stored at 15°C. *Anim Reprod Sci* 2011; 124(1-2): 118-24.
- Kuang H, Tang Z, Zhang C, Wang Z, Li W, Yang C, Wang Q, Yang B, Kong AN. Taxifolin activates the Nrf2 anti-oxidative stress pathway in mouse skin epidermal JB6 P+cells through epigenetic modifications. *Int J Mol Sci* 2017; 18(7): 1546.
- Morris GJ, Acton E, Avery S. A novel approach to sperm cryopreservation. *Hum Reprod* 1999; 14(4): 1013-21.
- Paulenz H, Söderquist L, Perez-Pe R, Berg KA. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology* 2002; 57(2): 823-36.

- Revell SG, Mrode RA. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim Reprod Sci*, 1994; 36: 77-86.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol Med* 1996; 20(7): 933-56.
- Roca J, Martinez S, Vázquez JM, Lucas X, Parrilla I, Martinez EA. Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15°C. *Anim Reprod Sci* 2000; 64(1-2): 103-12.
- Rosato MP, Iaffaldano N. Effect of chilling temperature on the long-term survival of rabbit spermatozoa held either in a Tris-based or a jellified extender. *Reprod Domest Anim* 2011; 46(2): 301-8.
- Sabir SA, El-Gindy YM, Morshedy SA, Zahran SM, Ahmed MH, Zeweil HS. Semen quality, sex hormone and antioxidant status of male rabbits as influenced by two forms of onion. *Egypt Poult Sci* 2019; (31-39): 31-8.
- Saleh RA, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practise. *J Androl* 2002; 23(6): 737-52.
- Sarıözkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Ulutaş Alkım P, Bilgen A. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology* 2009; 58(2): 134-8.
- Sarıözkan S, Özdamar S, Türk G, Cantürk F, Yay A. In vitro effects of L-carnitine and glutamine on motility, acrosomal abnormality, and plasma membrane integrity of rabbit sperm during liquid-storage. *Cryobiology* 2014; 68(3): 349-53.
- Sarıözkan S, Türk G, Cantürk F, Yay A, Eken A, Akçay A. The effect of bovine serum albumin and fetal calf serum on sperm quality, DNA fragmentation and lipid peroxidation of the liquid stored rabbit semen. *Cryobiology* 2013; 67(1): 1-6.
- Schafer S, Holzman A. The use of transmigration and sperm stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2000; 59(3-4): 201-11.
- Sunil C, Xu B. An insight into the health-promoting effects of taxifolin (dihydroquercetin). *Phytochemistry* 2019; 166: 112066.
- Tittarelli C, Savignone CA, Arnaudín E, Stornelli MC, Stornelli MA, De La Sota RL. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology* 2006; 66(6-7): 1637-40.
- Topal F, Nar M, Gocer H, Kalin P, Kocyigit UM, Gülçin İ, Alwaseel SH. Antioxidant activity of taxifolin: an activity-structure relationship. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2016; 31(4): 674-83.
- Zhang HQ, Wang YJ, Yang GT, Gao QL, Tang MX. Taxifolin inhibits receptor activator of NF-kappaB ligand-induced osteoclastogenesis of human bone marrow-derived macrophages in vitro and prevents lipopolysaccharide-induced bone loss in vivo. *Pharmacology* 2019; 103(1-2): 101-9.
- Zhu Z, Li R, Lv Y, Zeng W. Melatonin protects rabbit spermatozoa from cryo-damage via decreasing oxidative stress. *Cryobiology* 2019; 88: 1-8.