

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİLİMARİNİN İNSAN SPERM KRIYOPRESERVASYONUNDA  
ANTIOKSİDAN ETKİSİ**

**Seda ATAY**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Danışman**

**Prof. Dr. Ender ERDOĞAN**

**KONYA-2017**

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİLİMARİNİN İNSAN SPERM KRİYOPRESERVASYONUNDA  
ANTİOKSİDAN ETKİSİ**

**Seda ATAY**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Danışman**

**Prof. Dr. Ender ERDOĞAN**

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı  
Koordinatörlüğü tarafından 2016-ÖYP-001 proje numarası ile desteklenmiştir

**KONYA-2017**

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

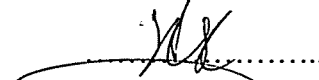
Seda ATAY tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak oy birliği / oy çokluğu kabul edilmiştir.

**Jüri Üyeleri**

**İmza**

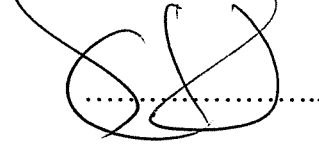
**Başkan**

Prof. Dr. Hasan Cüce



**Danışman**

Prof. Dr. Ender ERDOĞAN



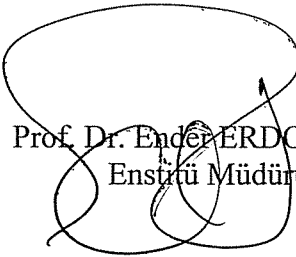
**Üye**

Prof. Dr. Sabiha Serpil Kalkan



**ONAY:**

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu .../.../... ve .....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Ender ERDOĞAN  
Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Ender Erdoğan'ın yönetiminde hazırlanmış olup, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne yüksek lisans tezi olarak sunulmuştur.

Tez çalışmam sırasında bilgi ve görüşleriyle beni yönlendiren ve her daim bana sabır gösterip yardımcı olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Ender Erdoğan'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında gerekli yardım ve tavsiyeleri ile her zaman destek olan Uzm. Dr. Nejat Ünlükal ve Uzm. Dr. Duygu Dursunoğlu'na, tezimin istatistik kısmında bana yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Fatih Kara'ya, çalışmam süresince örnek toplama sürecinde yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen Rukiye Erdoğan ve Özlem Şahin'e, tez çalışmam süresince yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen mesai arkadaşlarım; Fatma Göktürk, Nazlı Gök, Ömer Ünal, Nilüfer Akgün, Mütahire Tok ve Duygu Eryavuz'a çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana her aşamada destek olan; annem, babam ve kardeşlerim Simge ve Simay'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

## İÇİNDEKİLER

<b>SİMGELER VE KISALTMALAR .....</b>	<b>v</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>i</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>ii</b>
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Erkek Üreme Sistemi	3
1.1.1. Spermatogenez	5
1.1.2. Spermiyogenez	7
1.1.3. Olgun Spermin Yapısı	10
1.2. Semen Analizi	11
1.3. Kriyopreservasyon (Dondurarak Saklama)	14
1.3.1. Dondurma yöntemleri	15
1.3.2. Çözme Yöntemleri	16
1.4. Kriyohasar Oluşumu	17
1.4.1. Spermde Kriyohasar Oluşumu	18
1.5. Kriyoprotektanların (Kriyokoruyucuların) Önemi	25
1.5.1. Hücre Zarından Geçemeyen Kriyoprotektanlar	26
1.5.2. Hücre Zarını Geçebilen Kriyoprotektanlar	27
1.6. Vücudun Antioksidan Sistemleri	27
1.6.1. Silimarin	30
1.6.2. Silimarin'in (SM) Antioksidan Özellikleri	31
<b>2. GEREÇ ve YÖNTEM .....</b>	<b>33</b>
2.1. Örnek toplama ve Çalışma Grubu Oluşturma	33
2.1.1. Semen Analizi	34
2.1.2. Semen Dondurma ve Çözme İşlemi	35
2.1.3. Akrozomal Bütünlüğün Floresan Mikroskop ile Analizi	36
2.1.4. Mitokondriyal Aktivitenin Floresan Mikroskop ile Analizi	37

2.1.5. Kaspas 3 Yöntemi ile Apoptozis Belirlenmesi	37
2.1.6. Sonuçların İstatiksel Analizi	38
<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>39</b>
3.1. Semen Analizi Sonuçları	39
3.1.1. Motilite	39
3.1.2. Plazma Memran Bütünlüğü (Vitalite)	41
3.2. Mitokondriyal Aktivitenin Değerlendirilmesi	42
3.3. Akrozom Bütünlüğünün Değerlendirilmesi	43
3.4. Apoptozisin Değerlendirilmesi	47
3.5. Sperm Parametrelerinin Analizi	49
<b>4. TARTIŞMA .....</b>	<b>50</b>
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>63</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>65</b>
<b>7. EKLER.....</b>	<b>74</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>75</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

ATP:	Adenozin trifosfat
CLC:	Siklodekstrinler
DMSO:	Dimetilsülfoksit
DNA:	Deoksiribonükleik asit
DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü
EG:	Etilen glikol
ETC:	Elektron taşıma zinciri kompleksleri
FSH:	Follicle-Stimulating Hormone
GnRH:	Gonadotropin-Releasing Hormone
GSH:	İndirgenmiş Glutasyon
GSH-Px:	Glutasyon Peroksidaz
GSR:	Glutasyon redüktaz
GSSH:	Okside Glutasyon
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Hidrojen Peroksit
LH:	Luteinizan Hormon
MAO:	Monoamin oksidazlar
Na <sup>+</sup> :	Sodyum
NAD <sup>+</sup> :	Nikotin adenin dinükleotid
NADPH:	Nikotinamid Dinükleotid Fosfat
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> :	Süperoksit Radikali
OH <sup>-</sup> :	Hidroksil Radikali

PBS:	Phosphate-buffered Saline
pH :	Power of Hydrogen
PUFA:	Çoklu Doymamış Yağ Asidi
SM:	Silimarin
TCA:	Trikarboksilik asit
WHO:	World Health Organization





## ÖZET

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

### Silimarinin İnsan Sperm Kriyopreservasyonunda Antioksidan Etkisi

Seda ATAY

Histoloji ve Embriyoloji (Tıp) Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA 2017

Bu çalışma insan sperm kriyopreservasyonu sırasında, spermde meydana gelen kriyohasarin sonucu olarak, sperm parametrelerinde meydana gelen olumsuz etkiyi azaltmak için, dondurma ortamına eklenen silimarin antioksidanın etkisini araştırmak üzere yapılmıştır.

Silimarin, devedikeni (*Silybum marianum*) bitkisinin tohum ve meyvelerinin etkresinden elde edilen bir flavonoiddir. Silimarin, uzun yıllardır klinik olarak alkole bağlı karaciğer hastalıklarının tedavisinde ve anti-hepatotoksik ajan olarak kullanılmaktadır. Fakat silimarinin asıl aktivitesi; iğerdiği flavano-lignanlar ve diğer polifenolik bileşikler ile g¼çlü antioksidan özellik göstermesidir.

20 normospermik bireyin semen örneği çalışmaya dahil edilmiş olup, örnekler çalışma için 6 gruba ayrılmıştır. İlk grup kriyopreservasyon işleminin spermde oluşturduğu kriyohasarin tespiti için taze semen örneğinin kullanıldığı kontrol grubudur. Diğer gruplar ise eklenen farklı konsantrasyonlarda silimarinin dondurulup çöz¼len sperm üzerinde etkisinin araştırılması için oluşturulmuştur. Bunun için örnek 5'e böl¼nmüş ve sırasıyla 0, 20, 100, 500 ve 1000 µg/ml silimarin, sperm dondurma ortamına eklenmiştir. 72 saat boyunca -196 C°'lik likit azot tankında saklama işleminin gerçekleştirilmiştir. Daha sonra örnekler 37 C°'de çöz¼r¼lmüş ve tüm gruplarda: motilite, plazma membran büt¼nlüęü, mitokondriyal aktivite, akrozomal büt¼nlük ve apoptozis parametrelerine bakılmıştır.

Dondurup çözme işleminin sperm parametreleri üzerindeki etkisine bakmak için taze semen örneği ile silimarin eklenmeden (0 µg/ml) dondurulup çöz¼lmüş grup karşılaştırılmış ve kriyopreservasyon işleminin sperm parametrelerinin tümünü anlamlı ( $p<0,05$ ) düzeyde olumsuz etkilediği gör¼lmüřtür.

Kriyohasarin üzerine silimarinin etkisinin araştırılması içinde sperm dondurma ortamına değişen dozlarda silimarin eklenen gruplarda sperm parametreleri karşılaştırılmıştır. Motilite, plazma membran büt¼nlüęü ve mitokondriyal aktivite için en etkili silimarin konsantrasyonun: 100 µg/ml ve 500 µg/ml olduğu bulunmuştur. Akrozomal büt¼nlüęün ise en iyi 1000 µg/ml silimarin eklenen grupta korunduğu gör¼lmüş ve apoptozis değerlendirmesi için kullanılan % kaspaz 3 değeri en düşük 20 µg/ml ve 100 µg/ml silimarin içeren gruplarda olduğu bulunmuştur.

Sonuçlarımıza göre: sperm kriyopreservasyon ortamına silimarin antioksidanın takviyesi dondurup çözme işleminin sonrası spermde meydana gelen hasarı önemli derecede azaltmıştır. Hücrede doğrudan serbest radikal temizleme ve mitokondri üzerinde koruyucu etki özelliği olan silimarinin, kriyohasarin ana sebebi olarak gör¼len serbest oksijen radikalleri (ROS)'un oluşturduğu zararlı etkiyi baskılayabildiği gösterilmiş olup, insan sperm kriyopreservasyonunda kullanılabileceğini gösteren ilk çalışma olmuştur.

**Anahtar Sözc¼kler:** Antioksidan; Kriyopreservasyon; Silimarin

## **SUMMARY**

REPUBLIC of TURKEY  
SELÇUK UNIVERSITY  
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

### **Antioxidant Effect of Silimarin on Human Sperm Cryopreservation**

**Seda ATAY**

**Department of Histology and Embriology**

**MASTER THESIS / KONYA 2017**

This study was conducted to investigate the effect of silymarin antioxidant added to the freezing medium in order to reduce adverse effects on sperm parameters as a consequence of cryoinjury during human sperm cryopreservation.

Silymarin is a flavonoid derived from the extracts of seeds and fruits of the milk thistle (*Silybum marianum*) plant. Silymarin has been used for many years in the treatment of alcoholic liver diseases clinically and as an anti-hepatotoxic agent. But the actual activity of silymarin is; contain flavano-lignans and other polyphenolic compounds and exhibit strong antioxidant properties.

Samples of 20 normospermic individuals were included in the study and the samples were divided into 6 groups for study. The first group is the control group in which fresh semen samples are used to detect cryoinjury to the sperm of the cryopreservation process. The other groups were established to investigate the effect of silymarin on frozen spermatozoa in different concentrations. For this, the sample was divided into 5 and added to the freezing medium of 0 µg / ml, 20 µg / ml, 100 µg / ml, 500 µg / ml and 1000 µg / ml silymarin sperm respectively. Storage was carried out in a -196°C liquid nitrogen tank for 72 hours. The samples were then thawed at 37°C and the motility, plasma membrane integrity, mitochondrial activity, acrosomal integrity and apoptosis parameters were examined in all groups.

In order to see the effect of freezing and thawing on the sperm parameters, frozen-thawed group was compared without addition of silymarin (0 µg / ml) with fresh sample of sperm and the cryopreservation process was found to negatively affect sperm parameters as a whole ( $p < 0.05$ ).

Sperm parameters were compared in groups of 0, 10, 100, 500, and 1000 µg / ml silymarin added to sperm freezing medium in the investigation of the effect of silymarin on cryoinjury. The most effective silymarin constructions for motility, plasma membrane integrity and mitochondrial activity were found to be 100 µg / ml and 500 µg / ml. Acrosomal integrity was best preserved in the 1000 µg / ml silymarin added group and the % Caspase 3 rate used for apoptosis evaluation was found to be lowest in groups containing 20 µg / ml and 100 µg / ml silymarin.

According to our results, the addition of silymarin antioxidant to the sperm cryopreservation medium reduced freezing damage to the sperm after freezing and thawing. Direct free radical scavenging and direct protective action on mitochondria have been shown to silymarin inhibit the deleterious effect of caused by free oxygene radicals (ROS), the main cause of cryoinjury, and have been the first study showing that it can be used in cryopreservation of human sperm.

**Keywords:** Antioxidant; Cryopreservation; Silymarin

## 1. GİRİŞ

Kriyopreservasyon bir diğerk adıyla dondurarak saklama hücreleri sıfırın altındaki derecelerde dondurup stabilize ederek saklama ve istenildiğı zaman kullanma imkanını sağlayan işlemdir. Sperm kriyopreservasyonu ise içeriğinde sperm hücrelerini bulunduran seminal plazma sıvısının dondurularak saklama işlemlerini içerir.

İnsan spermasının kriyoprezervasyonu, yardımcı üreme merkezlerinde, androloji laboratuvarlarında ve sperm bankalarında rutin olarak kullanılan bir prosedürdür (Gandini ve ark 2006). Radyasyon ve kemoterapi gibi tedavilerden önce, testiküler hasara neden olabilecek hastalıkları taşıyan bireyde, sperm aspirasyon ve ekstraksiyonu uygulanan azospermik hastalarda tekrarlanan işlemleri önlemek adına fertilitenin korunması için yaygın olarak kullanılmaktadır. Sperm kriyoprezervasyonu, ilk olarak 1953 yılında fertilitenin korunması amacıyla tedavi yöntemi olarak kullanılmaya başlanmıştır (Bunge ve Sherman 1953).

Kriyopreservasyon işleminin uzun bir geçmişe sahip olmasına rağmen, eritme sonrası sağkalım oranı sınırlı kalmış ve ideal beklentileri karşılamayı başaramamıştır (Li ve ark 2010).

Bu işlemin üreme devamlığı için büyük yararları vardır. Ancak, sperm membran lipid kompozisyonunda, mitokondriyal membran potansiyelinde, akrozom durumu, motilite ve canlılığında olumsuz değişikliklere neden olabilir ve bu olaya “kriyohasar oluşumu” denir. Ayrıca sperm DNA hasarında artışa ve apoptoz ile ilgili değişikliklere neden olur (Love 2005, Amidi ve ark 2010, García-Herrero ve ark 2011).

Sperm kriyohasarına artmış tuz konsantrasyonuna bağlı olarak ozmotik şokun izlediğı hücrel dehidrasyon, hücre içi buz kristali oluşumundan kaynaklanan fiziksel hasar, termal şok, oksidatif stres (OS) veya reaktif oksijen türleri (ROT) oluşumu sebep olur.

Artmış ROT üretimi, lipid peroksidasyonunu (LPO), yapısal değişiklikleri, kromatin disfonksiyonunu ve DNA hasarını indükleyebilir(Kodama ve ark 1997, Cocuzza ve ark 2007). ROT ile oluşturulan hasardan kaçınmak için seminal plazma, antioksidan enzimleri (süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz) ve enzimatik olmayan

süpürücüleri (albümin, taurin, ürat ve askorbat) bol miktarda içermektedir (Venkatesh ve ark 2011).

Bu antioksidanlar spermleri bakteri ve lökositlerden ve anormal spermlerden üretilen oksidanlardan korumaya yardımcı olur. Bu nedenle, antioksidan savunma kapasitesinde azalma semenin kriyoprezervasyonunu takiben canlılığın ve hareketlilik gibi çeşitli fertilizasyon parametrelerinin olumsuz etkilenmesine neden olabilir (Martinez-Soto ve ark 2010). Bu olumsuz etkinin azaltılması için dondurma ortamları yaygın olarak farklı antioksidanlar ile takviye edilmiştir (Roca ve ark 2005, Li ve ark 2010, Zribi ve ark 2010).

Silimarin devedikeni (*Silybum marianum*) bitkisinin tohum ve meyvelerinin ektresinden elde edilen bir flavonoiddir. Silimarin 30 yılı aşkın bir süredir klinik olarak alkole bağlı karaciğer hastalıklarının tedavisinde ve anti-hepatotoksik ajan olarak kullanılmaktadır (Saller ve ark 2001). Fakat silimarinin asıl aktivitesi; içerdiği flavano-lignanlar ve diğer polifenolik bileşikler ile güçlü antioksidan özellik göstermesi ve buna bağlı olarak serbest radikal tutucu işlevinin bulunmasıdır (de Groot ve Rauen 1998). Bu özelliğinden dolayı silimarin ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır.

Silimarinin hücre GSH seviyesinde artışa neden olduğu, SOD aktivitesini arttırdığı ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır (Bosisio ve ark 1992, Zhao ve ark 2000). Silimarin eklenerek sperm dondurup saklanması ile ilgili literatürde yalnızca hayvalar ile yapılan birkaç çalışma mevcuttur.

Roostaei-Ali Mehr ve Parisoush (2016) yaptığı bir çalışmada farklı konsantrasyonlarda silimarin ve kaproik asit eklenmiş koç semeninin saklanması araştırılmıştır. Sperm canlılığı, hareketliliği, membran bütünlüğü ve melondialdehit seviyeleri araştırıldığında sonuçlar, silimarinin sperm kalitesini arttırdığı gözlenmiştir.

Purdy ve ark (2004) yaptığı bir çalışmada ise keçi sperminin saklanması sırasında eklenen silimarin ve kateşin flavonoidlerinin sperm hareketliliğine etkisi araştırılmıştır.

Yaptığımız bu çalışma ile fertilitenin korunması amacıyla, dondurup- çözme işlemi (kriyoprezervasyon) uygulanmış spermde meydana gelen kriyohasarı motilite, plazma membran bütünlüğü, mitokondriyal aktivite, akrozomal bütünlük ve apoptozis gibi parametreleri üzerinden incelemek ve kriyohasar üzerinde güçlü antioksidan özelliğe sahip silimarinin etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

### **1.1. Erkek Üreme Sistemi**

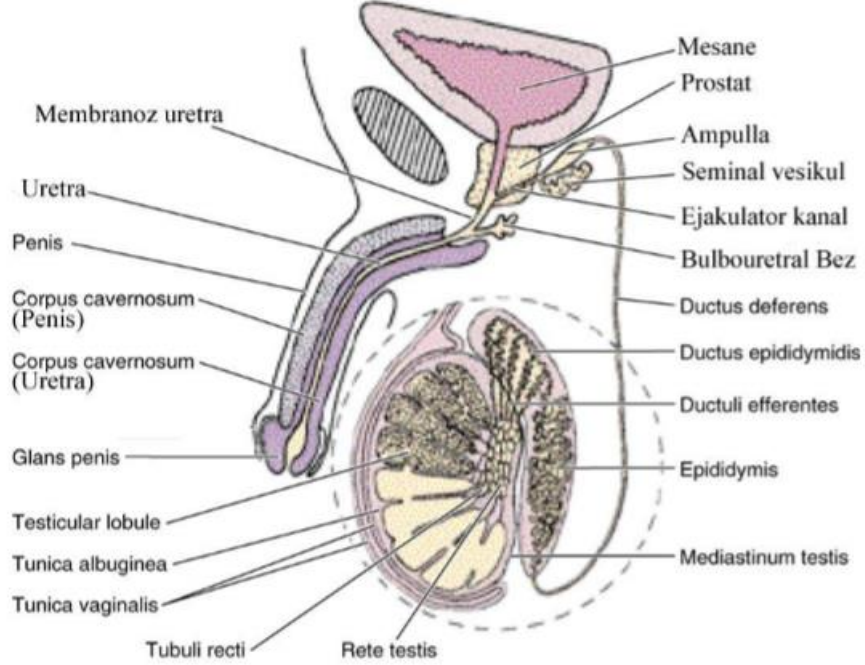
Erkek genital sistemi bir çift testis, genital boşaltım yolları ve bu yollara yardımcı aksesuar genital bezler ve eksternal genital organdan oluşmaktadır (Şekil 1.1.). Üreme ve hormon salgılama görevi olan testisler skrotum içinde spermatik kord ile asılı dururlar. Birleşik tübüller içeren testis hem ekzokrin hem de endokrin salgı yapan karışık bezlerdir. Endokrin salgısı steroid yapıdaki testesteron hormonudur. Ekzokrin salgısı ise testis sıvısı (testiküler luid) ve spermatozoon (sperm, spermiyum)'dur (Kierszenbaum 2006).

Testisler en dışta tunika albuginea adı verilen sıkı düzenli bağ dokusu kapsülü ile sarılıdır. Tunika albuginea, mediastinum testis denilen bir kalınlaşma yaparak organın parankimasının içine doğru sokulma yapar. Mediastinum testisten sıkı bağ dokusu yapısında ışınsal biçimde septula testisler çıkar. Bu septula testisler parankimayı 200-300 adet lobuli testislere ayırır. Bunların tepeleri mediastinuma yöneliktir ve piramit biçimlidir.

Her lobül içinde oldukça kıvrımlı, 1-4 adet kadar seminifer tübül yer alır. Tübüllerin arasında intertisyel bağ dokusu ile doludur ve burada interstisyel Leydig hücreleri yer almaktadır (L. Carlos Junqueira 2006). Seminifer tübüller spermatogenezis olayının gerçekleştiği yerdir. Çok kıvrıntılı kanallardan oluşmakla birlikte bu kanalların uzunluğu 30-40 cm uzunlukta ve 150-250 mikrometre kalınlığındadır. Her bir testisteki seminifer tübüllerin toplam uzunluğu 250 metre kadardır.

Her bir seminifer tübül rete testise açılır. Rete testis seminifer epitelin ürünlerini toplayan kanallar ağıdır. Seminifer epitelde lamina proprianın bazal laminaya bitişik iç hücreleri, yassılaşıarak miyoid ya da peritubuler kontraktıl hücreleri oluştururlar. Bu hücrelerin ritmik kontraksiyonları, spermiyumlar ve

seminifer tübül sıvısının, seminifer tübül ve genital boşaltma yolları boyunca ileri doğru hareketini sağlarlar (L. Carlos Junqueira 2006).



**Şekil 1.1.** Erkek genital Sistemi (L. Carlos Junqueira 2006).

İnterstisiyel doku içinde kan, lenf kapillerleri, sinüzoidler ve etrafında gruplar halinde androjen üreten Leydig hücreleri yer alır (Thakur ve ark 2014).

Erginde seminifer tübül epitel, somatik Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücre serilerini içeren çok katlı epitel görünümündedir. Sertoli hücreleri gelişmekte olan spermatogenetik hücreleri destekleyerek korur, spermiyogenezin sonunda artık hücre kalıntılarını fagosite eder, spermiyasyon sırasında lümene salınımı kolaylaştırır ve seminifer tübül lümenine protein ve iyondan zengin sıvı salgılayan tek tip hücrelerdir (Kaur ve ark 2014).

Spermatogenik hücreler ise spermatogenesis sırasında oluşan farklı gelişme evrelerindeki farklı tip hücreleridir.

Bunlar:

- spermatogoniumlar,
- primer spermatozitler

- sekonder spermatozoidler,
- spermatidler ve spermatozoidler (sperm-spermatozoon)'dır (L. Carlos Junqueira 2006).

### 1.1.1.Spermatogenez

Bir gelişme olgusu olan spermatogenez, farklılaşmamış ilkel tip erkek üreme hücrelerinin (spermatogoniumlar), ileri derecede farklılaşmış spermatozoidlere dönüşmesi olayıdır.

Spermatogenez; spermatozoidogenez, mayoz ve spermatozoidogenez safhalarından oluşur.

Seminifer tübül epitelini puberteden önce, çok sayıda Sertoli hücresi içerirken, az sayıda ilkel germ hücresi içermektedir. Pubertede, hipofiz ön lobundan, hipotalamustan salgılanan gonadotropin salgılayıcı hormonun (GnRH) etkisi ile gonadotropik hormonlar salgılanmaya başlar. Bu hormonlar, Folikül uyarıcı Hormon (FSH) ve Lüteinleştirici Hormon (LH)'lardır.

Bu hormonların uyarısı ile tip A spermatogonium'ları meydana getirmek üzere spermatogonium'lar bir dizi mitoz bölünmeye uğrarlar. Tip A spermatogoniumlarının bir kısmı, spermatogenezin ileri yaşlara kadar devam etmesi için kök (stem) hücreler olarak işlev görürler (Komeya ve Ogawa 2015).

Diğer bir kısım ise tip B spermatogoniumlara farklılaşır. Tip B spermatogoniumlarının mitoz bölünmeleri ile primer spermatozoidler meydana gelir. Spermatogenezin mayoz safhası başlangıcını oluşturan hücreler primer spermatozoidlerdir.

Primer spermatozoidler, 46 kromozom sayısına (diploid) sahiptirler. Oluştuktan hemen sonra 1. mayoz bölünmenin profaz safhasına girerler. İnsanlarda profaz safhası 22 gün sürer. DNA'ları replike olur ve normalin iki katı kromozom sayısına ve iki katı DNA miktarına sahip olurlar (Hassa 2003).

Benzer kromozomlar metafaz plağında yan yana gelerek homolog kromozom çiftlerini oluştururlar. Sentromerleri bölgesi hariç, sıkıca birbirlerine değerkler. X ve Y

kromozomları homolog olmayıp, ancak kısa kollarının uçlarındaki homolog segmentlerde çift oluştururlar.

Sonra tetradlar arasında gen alışverişi (krossing over) olayı gerçekteşir. Bu çift yapılı homolog kromozomların uzunlamasına açılarak, kromatinlerde enine kırılmalar oluşması ve bu parçaların çiftler arasında karşılıklı değişimi olayıdır. Daha sonra homolog kromozomlar, birbirlerinden ayrılmaya başlarlar. Ancak, çiftler, bir süre daha kromatidlar arası değişimin olduğu bölgelerde, birbirlerine bağlı kalmaya devam ederler.

Homolog kromozomlar X şeklinde görünüme kiyazma adı verilir. Kiyazma aşamasında homolog kromozomlar arasında, karşılıklı gen blokları değişimi gerçekteşir, homolog çiftlerin birbirinden ayrılmaları da devam eder.

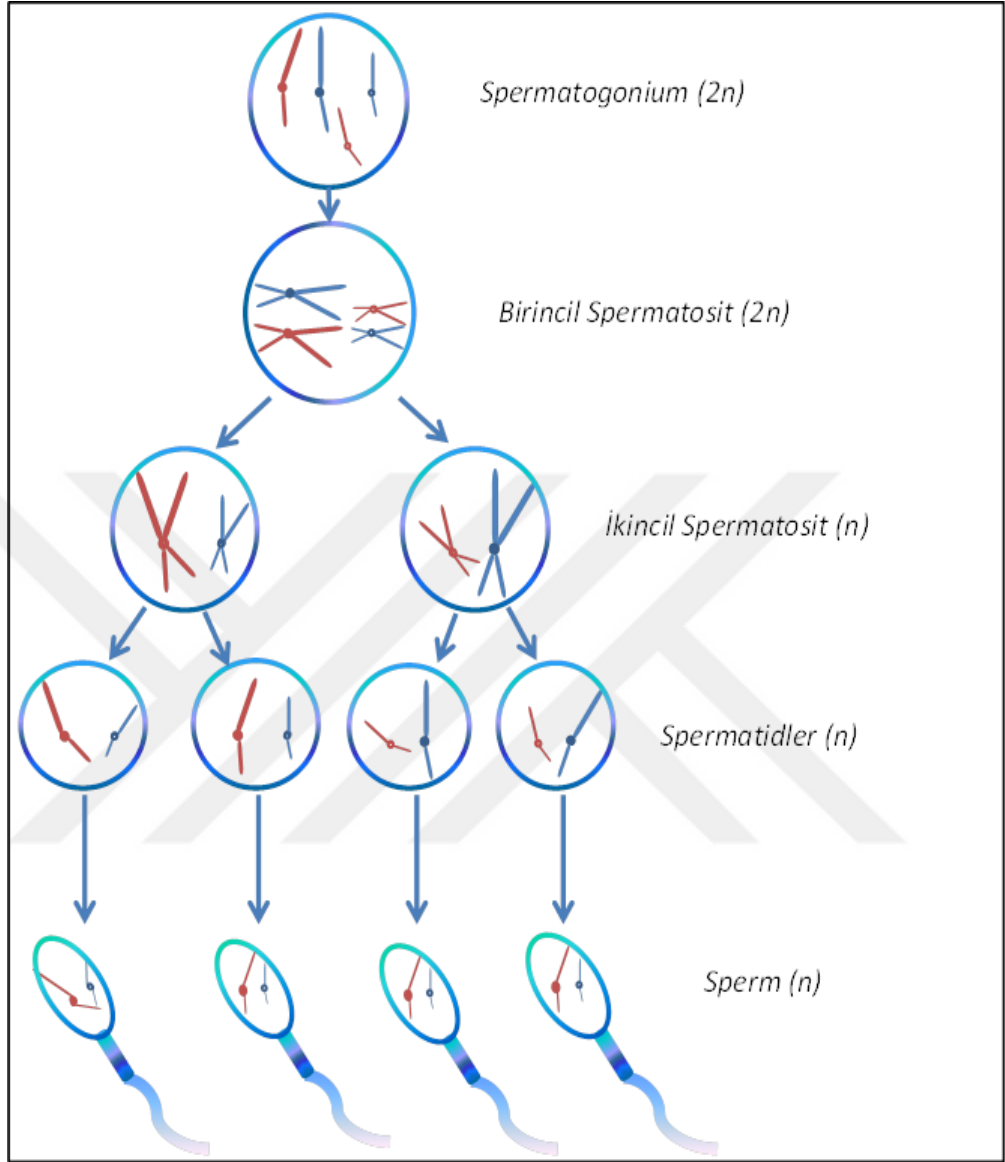
Sonunda, homolog kromozomlar birbirlerinden ayrılırlar ve tetradlar ayrılarak diyard halini alır. Kromozom çiftinin iki üyesi, ekvator bölgesinde düzenlenerek bölünme içi (spindle) oluşturur. Daha sonra, üyeler karşı kutuplara çekilir ve primer spermatoisitler ikiye bölünürler (Hassa 2003).

Primer spermatoisitlerden birinci mayoz bölünme ile sekonder spermatoisit adı verilen iki yavru hücre oluşur. Sekonder spermatoisitler primer spermatoisitlere oranla küçük hücrelerdir ve homolog kromozom çiftlerinin birer üyesini, yani 22 otozom ve bir seks kromozomu olmak üzere 23 adet kromozom içerirler.

Böylece, 1. mayoz bölünme ile DNA miktarı  $2n$  ve kromozom sayısı diploid olur. Sekonder spermatoisitler, hemen ikinci mayoz bölünmenin profazına girerler. Bu bölünmede DNA replikasyonu olmaz, 23 iki yapılı kromozomlar iki kardeş kromatid içerir ve bunlar sentromerleri bölgelerinden ayrılırlar. Bölünme sonunda, 23 adet tek haploid kromozom sayısına ve  $1n$  DNA miktarına sahip spermatoisit denilen 4 yavru hücre meydana gelir (şekil 1.2.).

İki mayoz bölünme sonunda 1 adet primer spermatoisitten, haploid kromozomlu 4 adet spermatoisit meydana gelir. Bunların ikisi  $22 + X$  diğer ikisi ise  $22 + Y$  kromozom düzenine sahiptir (Michael H. Ross 2014).





**Şekil 1.2.** Spermatogenezin safhaları

### 1.1.2. Spermijenez

Spermatozoidlerin olgun erkek üreme hücresi olan spermijum ya da spermatozoonlara dönüşmesi olayıdır (O'Donnell 2014).

Yuvarlak bir hücre olan spermatozoidler kuyruklu ve hareketli bir spermijuma dönüşürler. Bu dönüşme olayında, spermatozoidte bazı değişiklikler meydana gelir. Dört fazda gerçekleşen morfolojik farklılıklar şu şekilde sıralanmaktadır;

Golgi Fazı: Spermatidte çok sayıda golgi kompleksi oluşumları gözlenir. Bunlar periyodik asit-Schiff (PAS) pozitif granülleri içermektedir. Bu granüller akrozomal vezikülü oluşturmak üzere bir araya gelirler (Şekil 1.3.).

Akrozomal vezikül nukleusun ön bölümünü kaplayacak kadar genişler ve akrozomal kepi oluşturarak ön kutbu belirler. Sentriyoller arka kutba doğru göç eder ve aksonemi oluşturan 9 periferik mikrotübül çifti ve iki merkezli mikrotübül parçaları bir araya gelmeye başlar.

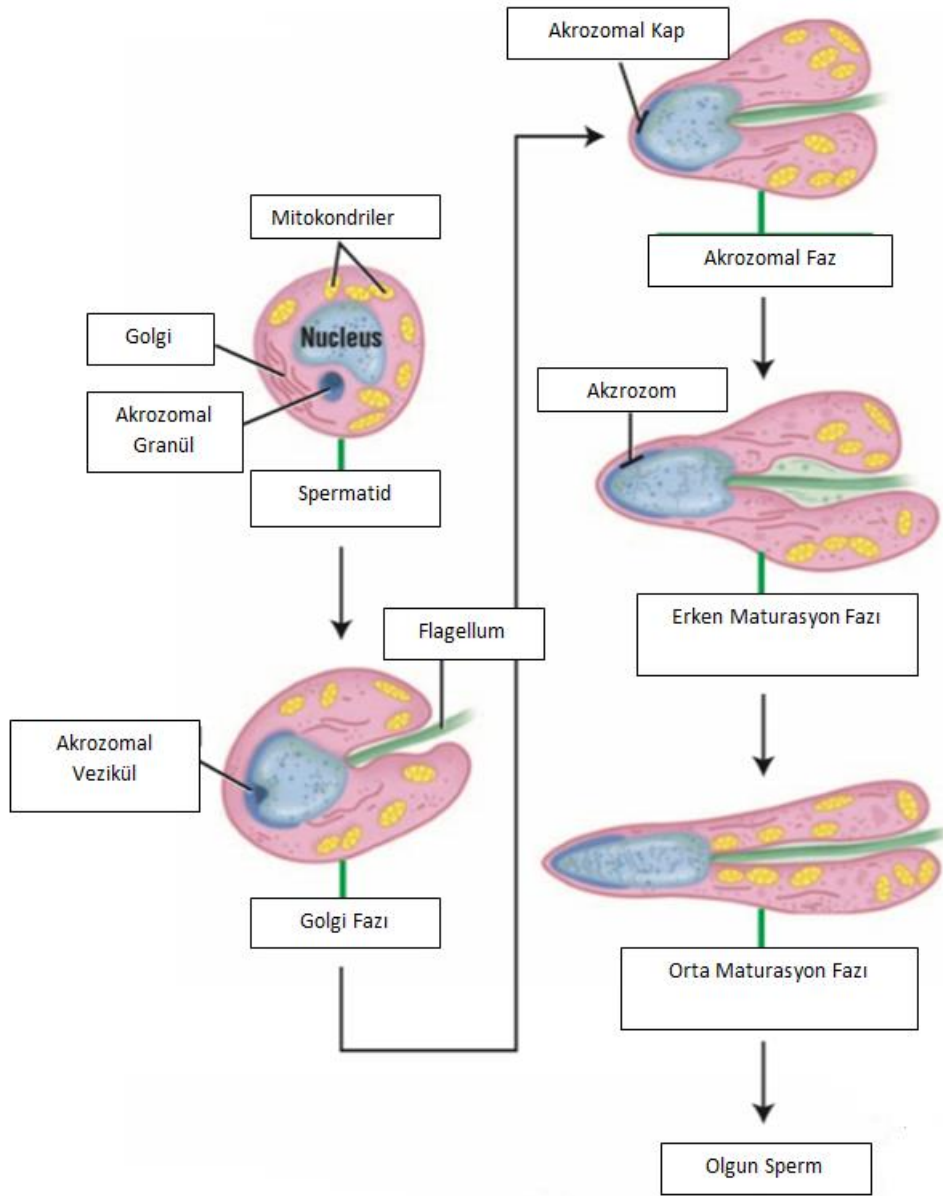
Kep Fazı: Akrozomal vezikül en kutupta nukleusun ön yarısı üzerinde genişleyerek akrozomal kep (akrozomal şapka)'i oluşturur (Şekil 1.3.).

Akrozom Fazı: Spermatid bazal laminaya doğru yönelerek sertoli hücrelerinin içerisine iyice gömülür. Çekirdek şekil ve büyüklük değiştirir, kromatin yoğunlaşır nukleus yassılaşıp uzar. Sitoplazmik mikrotübüller akrozomdan arka kutba doğru uzanarak silindirik kılıfı (manşeti) oluşturur. Sentriyollerden gelişen 9 kalın fibril aksonemin mikrotübüllerini sarmak üzere kuyruğun içine doğru uzanır (Şekil 1.3.).

Nukleusu flagellum ile birleştirdiği için bu liflerin başladığı bölgeye bağlayıcı parça (boyun) adı verilir. Flagellumun yüzeyini sarmak için plazma membranı arkaya doğru uzanır ve manşet kaybolur.

Sperm kuyruğunun orta parçası dediğimiz kısımda ise mitokondriyonların kaba fibrilleri heliks tarzında sararak bir kılıf oluşturduğu kısımdır. Kuyruğun esas parçasında ise orta parçanın distalinde longitudinal iki fibröz sütun ve birçok sayıda bağlayıcı fibröz halkalardan oluşan fibröz kılıfın dış yoğun lifleri çevreleyerek flagellumun ucuna kadar ilerlediği kısımdır. Fibröz kılıfın en uç kısmında kalan ve yalnızca aksonem mikrotübüllerini içeren en son kısım ise kuyruğun son parçasını oluşturmaktadır.

Maturasyon Fazı: Fazla sitoplazmanın Sertoli hücreleri tarafından fagosite edildiği fazdır. Spermatidler birbirinden bağımsız hale gelir ve lümeneye salınırlar. Bu ilk spermatozoonlar hareketsizdir ve oositi dölleme potansiyeline henüz sahip değildir. Spermatozoonlar kapasitasyonlarını dışı genital kanalları içerisinde tamamlar (Şekil 1.3.).



**Şekil 1.3.** Spermiyogenezin safhaları. diFiore'nin Histoloji Atlası'ndan alıntılanmış ve Türkçeye çevrilmiştir (Eroschenko 2008).

Spermiyogenez, çoğunlukla seminifer tübüllerdeki Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazma girintilerinde geçmektedir. Spermiyogenezde olan birçok spermatid, başları aynı Sertoli hücresi apikal girintilerine gömülü, kuyrukları lümenine uzamış olarak dururlar(O'Donnell 2014).

Spermiyumların Sertoli hücrelerinden seminifer tübül lümenine atılmalarına spermiyasyon denir. Lümenine atılan ve serbest kalan spermatidler yavaş yavaş genital boşaltma yollarına geçer. Spermiyumların seminifer tübül lümenine salınmaları

sırasında, hücreler arası köprüler, artık cisimler olarak geriye kalırlar ve sonra Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilirler (L. Carlos Junqueira 2006).

### 1.1.3. Olgun Spermin Yapısı

Ergin spermiyum, hareketli olup baş ve kuyruk (flagellum) kısımlarından oluşur (Şekil 1.4.).

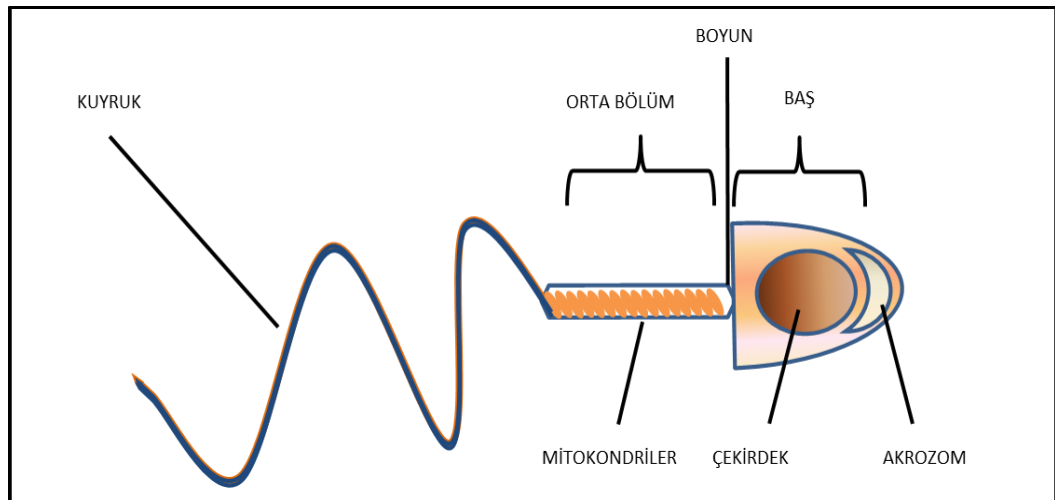
Yaklaşık 60 mikrometre uzunluğunda olan olgun spermin baş kısmı yassı ve sivridir ve 4,5 mikrometre uzunluğunda ve 3 mikrometre genişliğindedir. Akrozomal başlık zona pellusidanın delinmesi için gerekli birçok proteaz enzimi içermekedir. Baş kısmında akrozomal kepin posteriorunda ise genetik bilginin taşındığı nukleus bulunmaktadır.

Sperm kuyruğu ise boyun, orta parça, esas ve son parça olmak üzere bölümlere ayrılmıştır.

Yaklaşık 7 mikrometre uzunluğundaki orta parçada kalın fibrillerin ve aksonemal kompleksin etrafını saracak şekilde birçok mitokonriyon kılıfı bulunduğu kısımdır.

Esas parça ise yaklaşık 40 mikrometre uzunluğundadır. Fibröz kılıf, dış yoğun fibriller ve aksonemal kompleksi içerir.

Son parça ise 5 mikrometre uzunluğunda olup kalın fibrillerden yoksun olup yalnızca aksonemal kompleksi içeren kısımdır (Bruce Alberts 2008).



Şekil 1.4. Olgun spermin şematize edilmiş yapısı.

## 1.2. Semen Analizi

Günümüzden infertilite şikayetiyle gelen çiftlerin yaklaşık %30'unda infertilite sebebinin erkek faktörüne bağlı olduğu saptanmıştır. Semen analizi ise erkek infertilitesinin belirlenmesinde çok önemli bir parametre olup ejakülatın incelenmesi işlemidir.

Bu test ile başlıca semendeki sperm sayısı, hareketliliği ve sperm şekli değerlendirilir. Semen analizi ilk olarak Edward Martin tarafından 1902 yılında infertilitenin saptanması için önerilmiştir. Daha sonraki yıllarda analiz için incelenen parametreler genişletilerek Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 1980 yılında semen analiz klavuzu oluşturularak parametreler standartlaştırılmıştır ve en son 2010 yılında revize edilmiştir.

**Çizelge 1.1.** Semen analizi için Dünya Sağlık Örgütü'nün en düşük referans değerleri (WHO 2010)

Parametreler	En Düşük Referans Değer
Semen volümü (ml)	1.5 (1.4-1.7)
Total sperm sayısı ( $10^6$ )	39 (33-46)
Sperm konsantrasyonu ( $10^6$ /ml)	15 (12-16)
Total motilite (PR+NP,%)	40 (38-42)
Progressive motilite (PR,%)	32 (31-34)
Vitalite (canlı sperm,%)	58 (55-63)
Sperm morfolojisi (normal formlar,%)	4 (3.0-4.0)
pH	$\geq 7.2$
Peroksidaz – pozitif lökosit ( $10^6$ /ml)	$< 1.0$
MAR testi (%)	$< 50$
Immunobead testi (%)	$< 50$
Seminal çinko ( $\mu\text{mol}$ /ejakülat)	$> 2.4$
Seminal fruktoz ( $\mu\text{mol}$ /ejakülat)	$> 13$
Seminal nötral glukozidas (mU/ejakülat)	$> 20$

Semen analizi 3 ila 5 günlük cinsel perhiz sonrası ejakülasyon ile elde edilen semenin miktar, görünüş, hacim, viskozite, morfoloji, pH, motilite ve semende ki diğer hücrelerin tespiti ve konsantrasyonlarının belirlenmesi gibi birçok parametre içermektedir.

Perhiz süresi önemli olup sürenin 3 günden kısa olması durumunda sperm sayının azalmasına ancak hareketliliğin artışına sebep olurken bu sürenin 5 günden uzun olması durumunda ise bu durumun tersi gözlenir.

2-3 ayda bir tekrarlanan sperm üretimi çevresel faktörlerden oldukça etkilenmektedir. Sonuçlar değerlendirilirken de zararlı etkenlere maruz kalma durumunda göz önünde bulundurulmalıdır.

Semen beyazımsı vizköz bir sıvıdır ve spermiler ile çeşitli salgı bezlerinden salınan sıvıları içerir. Ejakülasyondan sonraki 10-60 dakika içinde ise sıvılaşarak akışkan hale gelir ve bu olaya likefaksiyon denir.

Steril idrar kabına toplanan sperm mastürbasyon yolu ile elde edilmektedir. Bu işlem öncesinde mutlaka idrar tamamen boşaltılmış olması ve eller ile penisin yıkanarak kurulandıktan sonra kap veya kapağın iç kısımlarına dokunmadan, herhangi bir kayganlaştırıcı madde kullanmadan meni örneğinin tamamının kap içine steril bir şekilde boşaltılması gerekmektedir.

Toplanan örnek likefaksiyonu için 37°C de 10-60 dk bekletilmelidir. Likefiye olan semen örneği ilk olarak makroskopik olarak değerlendirilir. Görünümü, likefaksiyon zamanı, rengi, kokusu, volümü ve viskozitesi değerlendirilerek not edilir.

Semen rengi opak ve beyazımsı, kokusu atkestanesi bitkisine benzer, partikülsüz ve kansız görünümlü olmalıdır.

Vizkozitesi ise pipetleme işlemi sonrasında pipetten damla damla dökülmeyecek kadar olmalıdır. Likefikasyon süresi 37 °C de 15 ile 60 dakika arasında olmalıdır.

Semen pH'sı 7,2 ile 8 arasında bazik değerdedir ve ölçümü pH kağıtları ile yapılır.

Mikroskopik değerlendirmesinde konsantrasyonu, motilitesi, canlılığı, aglütinasyonu, morfolojisi ve sperm olmayan hücreler incelenir. Kimyasal değerlendirmesi ise pH (power of hydrogen) ölçümü yapılarak yapılır.

Sperm konstrasyonu spermin fertilizasyon kapasitesinin belirlenmesi için kullanılan önemli bir parametredir. Yumurtayı dölemek için belli bir sayıda olması gerekmektedir ve bu sayı normal bir semen örneğinde  $15 \times 10^6/\text{ml}$  sperm'dir (WHO 2010).

10x10 kareden oluşan Makler kamaraya (Sefi Medical Instruments, İsrail) (Şekil 1.5.) 1 damla damlatılan semen, 3 farklı 10 karede (toplam 30 kare) sperm hücrelerinin sayılıp ortalaması alınarak konsantrasyon hesaplanır.



Şekil 1.5. Makler sperm sayma kamarası

Sperm hareketliliği (motilitesi) için 4 farklı değer kullanılmaktadır.

- Progresif motilite ; + 4; lineer ileri yönde hareketli, + 3; geniş dairesel hareketli
- Non-progresif motilite ; + 2; yerinde hareketli
- İmmotilite ; + 1; hareketsiz.

Normal bir semen mililitrede 1 milyondan daha fazla lökosit içermemelidir. Semende normalden fazla lökosit görülmesi, üreme organlarında bir enfeksiyon varlığını düşündürür.

Ayrıca semen örneğinde gelişimini tamamlamamış üreme hücrelerinin (germinal inmatür hücre) sayısının mililitrede 1 milyon veya altında olması beklenir.

### 1.3. Kriyopreservasyon (Dondurarak Saklama)

Kriyojenik sıcaklıklarda hücreleri stabilize ederek saklama ve istenilen zamanda yeniden kullanma imkânı tanıyan prosedüre kriyopreservasyon (dondurarak saklama) denir.

Kriyoprezervasyon işlemindeki gelişmeler sayesinde, oosit ve sperm gibi erkek ve dişi üreme hücrelerinden, embriyo gibi daha ileri yapıları organizmalara kadar çeşitli hücre tiplerinin düşük sıcaklıklarda korunarak saklanmasına imkân veren pek çok yöntemin gelişmesine olanak sağlamıştır (Di Santo ve ark 2012).

Sperm kriyopreservasyonu ise içeriğinde sperm hücresini bulandıran seminal plazma sıvısının sıfırın altındaki sıcaklıklarda dondurularak, daha sonra kullanılması için saklama işlemlerini içerir. Bu işlemlerin genel prosedürü ise kriyokoruyucular ile dengelenen semenin önce soğutulması, daha sonra  $-196^{\circ}\text{C}$  sıvı azot içinde saklanması ve çözülürken kriyokoruyuculardan uzaklaştırılarak uygun fizyolojik ortama aktarılması basamaklarını içermektedir.

1930'lu yıllarda tavşan spermine sıfırın altındaki sıcaklıkların etkisinin araştırılması ile başlayan hücre dondurma çalışmaları, 1949 yılında gliserolünde saklama ortamına eklenerek kriyokoruyucu etkisinin olduğunun ilk defa kanıtlanması ile ilerleme kaydetmiştir (Hammond 1930)

İlk olarak 1953 yılında, fertilitenin korunması amacıyla sperm kriyopreservasyonuna başlanmış ve bu yıllarda tanıtilen insan spermatozoasının kriyoprezervasyonu birçok kısıtlamasının üstesinden gelerek şimdi yardımcı üreme teknolojilerinin (ART'lerin) ayrılmaz bir parçasını oluşturmaktadır (Bunge ve Sherman 1953).

Sperm kriyoprezervasyonu birçok erkek için fertilitenin korunmasında yararlı ve etkili bir yöntem sağlamaktadır. Kanser hastaları, radyasyon ve kemoterapi gibi tedavilerden önce sperm kriyopreservasyonu fertilitenin korunabilmesi için oldukça önemli bir avantaj sağlar. Aynı zamanda diyabet ve otoimmün bozukluklar gibi bazı hastalıklarda testiküler hasara neden olabilir. Ayrıca, vazektomi uygulanan bireylerde fertilitiyi korumak içinde bu yöntem kullanılabilir. Perkutanöz epididimal sperm aspirasyonu veya testiküler sperm ekstraksiyonu yapılan



azoospermik hastalarda, tekrarlanan biyopsileri veya aspirasyonları önlemek için dondurulup çözülen spermeler kullanılabilir.

Korunmuş sperma intrauterin aşılama, IVF ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu için kullanılmaktadır.

Bununla birlikte donma ve çözme yöntemleri, spermatozoayı çok fazla fiziksel ve kimyasal hasara maruz bırakır. Bu yüzden kriyoprezervasyon prosedürlerinin geliştirmesi için çalışmalar devam etmektedir (Said ve Agarwal 2012).

### **1.3.1. Dondurma yöntemleri**

Sperm kriyoprezervasyonunda kullanılan üç konvansiyonel dondurma tekniği vardır; yavaş dondurma, hızlı dondurma ve vitrifikasyon.

#### **Yavaş dondurma**

2-4 saatlik zaman aralıklarında iki veya üç kademeli sperm soğumasından oluşan yavaş dondurma tekniği Behrman ve Sawada tarafından önerilmiştir (Behrman ve Sawada 1966).

Elle veya otomatik olarak yarı-programlanabilir derin dondurucular kullanılarak yapılır.

Manuel yöntemde, numune oda sıcaklığından 5°C'ye kadar, 0,5-1°C/dk hızında soğutulur. Örnek daha sonra 5°C'den -80°C'ye 1-10°C/dk hızında dondurularak, -196°C'de sıvı azota daldırılır.

Manuel tekniklerle başarılı bir şekilde sperm dondurma gösteren çalışmalara rağmen, bu prosedürün tekrarlanabilirliği bazı sorunlara neden olabilmektedir. Bu sebeple, programlanabilir dondurucular geliştirilmiştir (Thachil ve Jewett 1981).

#### **Hızlı dondurma**

İlk olarak Sherman tarafından önerilen hızlı dondurma tekniğinde kriyotüpler nitrojen buharında 10-20 dakika bekletilir ve daha sonra -196°C'de sıvı nitrojene alınır (Natarajamani 2017).

Azot buharlarının altında, alttaki sıvının uzaklığı ve hacminin bir fonksiyonu olarak bir termal fark vardır. Örnek başlangıçta yavaş yavaş kriyokoruyucu eklenerek karıştırılır ve kriyotüplerdeki karışım bir süre 4°C'de inkübe edilir. Kriyotüpler daha sonra -80°C'deki sıvı azot seviyesinden 15-20 cm uzaklığa yerleştirilir 20 dk beklenir ve bu aşamadan sonra tüpler sıvı nitrojene batırılır.

Soğutma sırasında, iki uç arasındaki ısı farkını en aza indirmek için tüpleri yatay konuma getirmek tercih edilir.

Bu tekniğin dezavantajı ise sıcaklık düşüşü eğrisi kontrol edilemez ve donma sıcaklıkları -70, -80 ve -99°C arasında değişebilir.

### **Vitrifikasyon**

Bu yöntemin hızlı donurmada farkı buz kristallerinin oluşumunu engellemek için yüksek ozmolariteli sperm medyumunun kullanılarak çok hızlı dehidrasyonun gerçekleştirilmesidir.

Hücrede cam benzeri hızlı bir katılaşma meydana getirdiği için bu ismi almaktadır (Trounson ve ark 1987).

### **1.3.2. Çözme Yöntemleri**

Çözme prosedürü de dondurma yöntemi kadar önemlidir. Hücrenin, fizyolojik aktivitesini geri kazanmasının sağlanması gerekir. Ani ısı değişimlerinden kaçınılmalıdır.

Genel olarak, çözme işlemi protokolleri 37°C'lik bir eritme sıcaklığında yapılır. Hızlı çözünme için daha yüksek erime sıcaklıklarının kullanımı hücre hasarına sebep olabileceğinden dolayı önerilmez.

Oda sıcaklığında 10 dakika eritme ve daha sonra 37°C'de 10 dakika daha inkübe ederek çözme, bir termostat veya su banyosu içinde 37°C'de 10 dakika boyunca çözme, oda sıcaklığında 15 dakika boyunca bekleterek çözme gibi yöntemler vardır.

Örnek eritildikten sonra, yıkama ve santrifüjleme ile kriyokoruyuculardan uzaklaştırılarak kriyoprezervasyon ortamından ayrılır.

#### 1.4. Kriyohasar Oluşumu

Düşük sıcaklıklarda hücre metabolizmasının yavaşlaması durumu germ hücrelerini, embriyoları ve dokuları uzun vadeli saklayabilmemize olanak sağlar. Donma-çözme prosedürlerindeki başlıca sorun, düşük sıcaklıklara maruz kalan hücrede meydana gelen hücre içi ve hücre dışı suyun faz değişikliği ile ilişkili olan kriyohasardır (Gao ve Critser 2000).

Donma ve çözme sırasında asıl hasar  $-15^{\circ}\text{C}$  ila  $-60^{\circ}\text{C}$  arasındaki orta sıcaklık aralığında meydana gelmektedir. Hücreler ve hücre dışı ortam  $-5^{\circ}\text{C}$ 'de donmamış ve aşırı soğutulmuş halde kalır.  $-5^{\circ}\text{C}$  ile  $-15^{\circ}\text{C}$  arasındaki sıcaklıklarda hücre dışı ortamda buz oluşur, ancak hücre içi eriyikler donmaz ve aşırı soğutulur (Gao ve Critser 2000).

Soğutma hızı çok düşük olması durumu suyun çoğunun hücre dışına çıkmasını sebep olur ve hücre içi eriyikler konsantre olur. Hücre içi donma gerçekleşmeden, hücreler dehidrate olur, organelerin ve zarların hacimleri daralır ve hücre yüksek konsantrasyonlara maruz kalır (Şekil 1.6.).

Bu durum, lipid-protein komplekslerini ve denatüre makromolekülleri etkiler, donmamış kanalların boyutunu azaltır ve irreversibl membran füzyonunu indükler (Mazur ve ark 1972, Wiest ve Steponkus 1979).

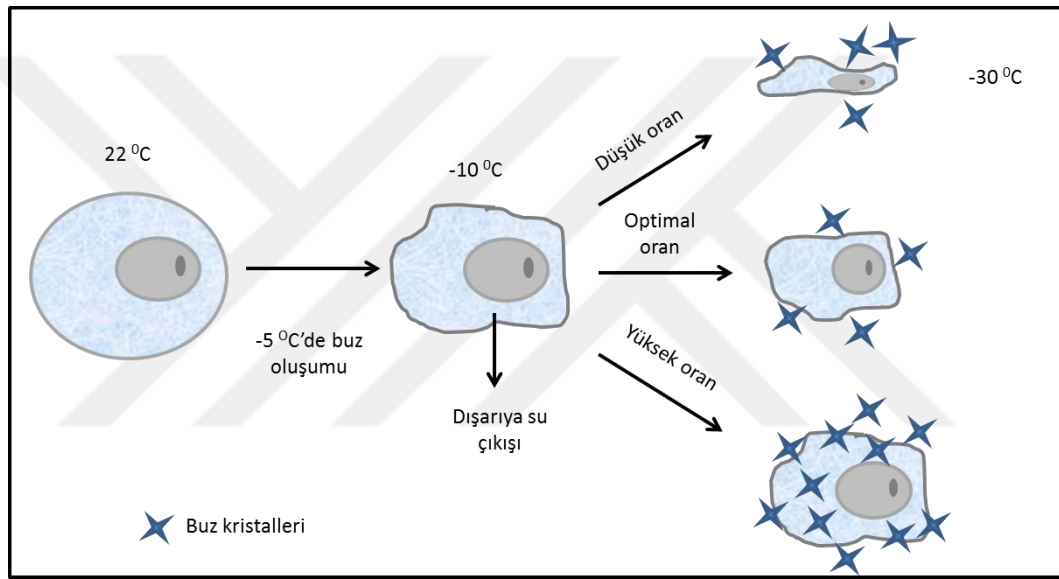
Soğutma oranı çok yüksek olursa, hücre içi su tamamen hücre dışına çıkmaz ve hücre içinde donarak sitoplazmada buz kristalleri oluşur ve bu durum kriyohasara sebep olur (Şekil 1.6.) (Mazur 1990, Muldrew ve McGann 1994). Hücre içi buzun oluşumu kriyokoruyucu maddeler eklenerek azaltılabilir (Gao ve Critser 2000).

Bu nedenle, hem yüksek hem düşük hızda dondurma ayrı mekanizmalarla hücrenin kriyohasasına sebep olabilir. Sonuç olarak, iki şekilde kriyohasar meydana gelir. İlki yüksek soğutma hızlarında ölümcül olabilen hücre içi buzun oluşumu ve ikincisi düşük soğutma hızlarında çözünürlük/elektrolit konsantrasyonu, hücre dehidrasyonu ve ekstrasellüler boşlukta donmamış fraksiyonun azalması nedeniyle kriyohasar meydana gelebilir.

Her hücre tipi için en uygun bir soğutma hızı mevcuttur. Bu hız hücre içi buz oluşumunu önleyecek kadar düşük ancak çözünen/elektrolit konsantrasyonundan

dolayı kriyohasarı asgariye indirecek kadar yüksek olarak tanımlanmaktadır (Şekil 1.6.) (Mazur 1990). Çözülme sırasında da kriyohasar meydana gelebilir. Yüksek sıcaklıklarda çözülme kriyoprotektanların hücreyi yeterince hızlı terk edememeleri nedeniyle ozmotik strese artışa sebep olurken, düşük çözülme sıcaklıkları yeniden kristalleştirme ile sonuçlanır (Mazur ve ark 1972, Wiest ve Steponkus 1979).

Bu nedenle optimum çözülme oranları, bu iki durumun ortasında olmalıdır (Şekil 1.6.). Dolayısıyla, sperm kriyoprezervasyon protokollerindeki gelişmeler, optimum soğutma ve çözme hızlarını bularak kriyohasarı olabildiğince önlemeye yöneliktir (Juarez ve ark 2011).

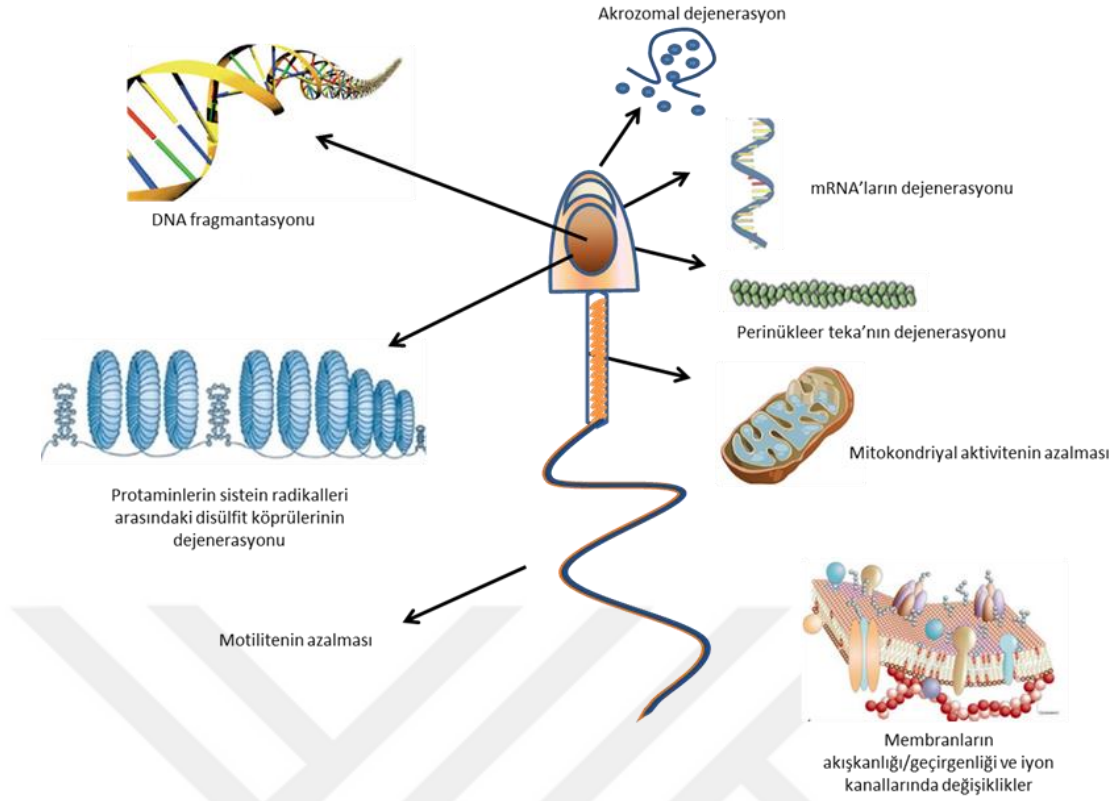


Şekil 1.6. Soğutma hızının hücreye etkisi

#### 1.4.1. Spermde Kriyohasar Oluşumu

Diğer hücre türleriyle karşılaştırıldığında, spermatozoa, membranın yüksek akışkanlığı ve düşük su içeriği (yaklaşık %50) nedeniyle kriyoprezervasyon hasarına daha az hassas gibi görünmektedir. Buna rağmen, kriyoprezervasyon sperm yapısının ve fonksiyonunun olumsuz yönde etkilenmesine neden olabilir.

İnsan spermatozoasının dondurulması-çözülmesi işleminde hücre içi ve hücre dışı buz kristallerinin oluşmasıyla oluşan termal şok, ozmotik şok, hücresel dehidrasyon ve oksidatif stres oluşumu gibi bazı zararlı süreçlerin oluşabileceği yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir (Stanic ve ark 2000, Watson 2000).



**Şekil 1.7.** Kriyopreservasyonun sperm yapısına etkisi

Kriyoprezervasyon, dondurulmuş çözülmüş spermin viabilitesini, akrozom bütünlüğünü, hareketliliğini ve dölleme yeteneğini kaçınılmaz olarak azaltmaktadır (Şekil 1.7.) (Zeng ve ark 2014, Yeste ve ark 2015).

### **Kriyoprezervasyonun plazma zarına etkisi**

Zar bütünlüğü, sperm hareketliliği ve canlılığı için önemli bir faktördür. Dondurup-çözme işlemlerine karşı hücrenin hassasiyeti plazma membranının kompozisyonu ve biyofiziksel özelliklerine bağlıdır (Comizzoli ve Wildt 2013).

Bu işlemin plazma membranı üzerine en önemli etkilerinden biri soğuk şokudur. Soğuk şoku, plazma membranının 5 °C'ye eşit veya daha düşük sıcaklıklarda kararsız bir yapı kazanmasından sonra ortaya çıkan olumsuz etkileri içerir.  $Ca^{2+}$  homeostazı, akrozom bütünlüğü ve zar lipit yapısının bozulması ile sonuçlanır (Casas ve Flores 2013).

Herhangi bir plazma membranı, akışkanlığı sağlayan fosfolipidleri ve kolesterol gibi sertliği ve kararlılığı sağlayan değişen miktarda sterollerini içerir. Düşük sıcaklıklarda, lipitler fiziksel fazlarda (yani sıvı ve jel fazlı lipidlerde) değişikliğe uğrarlar. Bu nedenle, zar fosfolipidlerinin yanal hareketlerinin

kısıtlanması, sıcaklık 5°C'den düşük olduğunda ortaya çıkar ve sonuçta akışkan fazdan jel fazına geçiş meydana gelir.

Farklı membran lipidleri farklı geçiş sıcaklıkları gösterdiğinden dolayı bazı doymamış fosfolipitler diğerlerinden daha erken jelleştirilir ve faz ayrımı meydana gelir. Bu olaydan sonra, integral membran proteinleri lipid-faz ayrımlarıyla geri dönüşümsüz şekilde kümelenir ve membran lipidleri yeniden yapılandırılır. Bu durumun sonucunda ise bazı kolesterol molekülleri ortama salınır (Harrison ve Miller 2000, Vadnais ve Althouse 2011). Bu yapısal değişikliklerin sonucunda, lipid ve protein etkileşimleri bozulabilir ve iyon kanalları gibi bazı proteinler yer değiştirir veya fonksiyonlarını kaybeder (Steponkus 1984).

Bu durum plazma membranının destabilize olmasını ve seçici geçirgenliğini kaybetmesine sebep olur ve bunun sonucunda  $Ca^{2+}$  ve bikarbonat gibi iyonların hücre dışı boşlukta konsantrasyonları artarak homeostazi bozulmuş olur (Watson 2000, Bailey ve ark 2008).

Sonuç olarak insan spermatozoasının kriyopreservasyonu, membranın şişmesi ve akrozomal bütünlüğün bozulması ve dejenerasyona bağlı olarak sperm hareketliliği ve hızı üzerinde olumsuz etkilere sahip olduğu bilinmektedir.

### **Kriyoprezervasyonun sperm nukleusuna etkisi**

Kriyoprezervasyonun sperm nukleusunu nasıl etkilediğini değerlendiren çalışmalar kromatin bütünlüğüne odaklanmıştır. Bu DNA, nükleoproteinler ve DNA ile nükleer proteinler arasındaki yapısal etkileşimi ayırt ederek açıklanabilir.

Sperm kromatini esas olarak DNA ve protamin (P1 ve P2) ve %2 ile %15 arasında histon H1 nükleoproteinden oluşur (Ward 2010). Donma-çözmenin protaminler üzerindeki etkisi ile ilgili olarak, sperm nukleusu boyunca P1 ve H1'in yerinde ve dağılımında değişiklikler meydana gelir (Flores ve ark 2008, Flores ve ark 2011). Dahası, sperm kromatininin ana hatlarını oluşturan protaminlerin sistein radikalleri arasındaki disülfid köprüleri yoluyla etkileşimi, dondurulup çözülme işlemi sonrası bozulmaktadır (Flores ve ark 2011).

DNA fragmantasyonu ile ilgili olarak, Terminal Deoksinükleotidil transferaz (TdT)-aracılı dUTP-biotin çentik-uç etiketleme (TUNEL), Sperm Kromatin Yapı

Analizi (SCSA), Sperm Kromatin Dispersiyon testi (SCD), Comet nötr ve Comet alkalın testi gibi sperm DNA bütünlüğünü değerlendirmek için farklı yöntemler vardır.

Çözülme sonrasında hemen DNA fragmantasyonunda önemli bir artış olmamasına rağmen, dondurulmuş çözülmüş sperm en az 2 saat boyunca 37°C'de inkübe edildiğinde DNA hasarının daha belirgin olduğu görülmüştür (Alkmin ve ark 2013, Yeste ve ark 2013).

DNA kaynaklı kriyohasarin oluşumu türler arasında da farklılık gösterir, çünkü P1 ve P2'ye sahip olan türler, sadece P1'e sahip olanlardan daha yüksek düzeyde DNA parçalanması gösterirler. Örneğin, sperm kriyoprezervasyonu insanlardaki DNA bütünlüğünü ve yoğunlaşmasını büyük oranda etkileyebilirken, köpeklerde böyle bir etki yoktur (Urbano ve ark 2013).

Kriyoprezervasyon sonrası DNA fragmantasyonundaki artışın altında yatan mekanizmalar halen tam olarak bilinmemektedir ve oksidatif DNA hasarının artışı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Paoli ve ark 2014). Son yıllarda yapılan çalışmalar ile insanlarda, kriyoprezervasyon ile bağlantılı DNA fragmantasyonun artışı, kaspazların aktivasyonu yerine oksidatif stres ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir (Thomson ve ark 2009).

### **Kriyoprezervasyonun perinükleer tekaya etkisi**

Perinükleer teka, sperm çekirdeğini çevreleyen bir bölgedir ve sperm baş bölgesini korumak için hayati önem taşıyan sito-iskelet proteinleri içerir (Sutovsky ve ark 2003).

Bu bölgede döllenme sırasında önemli bir rol oynayan PLC $\zeta$  ve PAWP gibi sperm proteinleri içerir (Esoffier ve ark 2015). Buranın bütünlüğü spermin işlevini uygun bir şekilde yerine getirebilmesi için oldukça önemlidir.

Bu yüzden, sperm kriyoprezervasyonunun perinükleer tekaya zarar vermesi F-aktinin stabilizasyonunda değişikliğe ve çekirdek dekonduksiyonuna sebep olur.

## **Kriyoprezervasyon sonrası sperm proteinlerinin seviyeleri, yerleri ve fonksiyonlarındaki değişiklikler**

Sperm kriyoprezervasyonu sperm proteinlerin seviyeleri, lokalizasyonu ve fonksiyonu üzerinde farklı etkilere sahiptir.

Yapılan bir çalışmada taze ve dondurulup çözülmüş domuz spermının, sperm proteomu karşılaştırmış (Chen ve ark 2014). Çalışma sonucunda sperm prematür kapasitasyonu, adhezyon, enerji üretimi ve sperm-oosit bağlanması ve füzyonu gibi çoklu süreçlerde yer alan 41 kadar proteinde değişiklik olduğu görülmüş. Bu 41 proteinin altısının seviyeleri kriyoprezervasyon sonrasında düşerken diğer 35'inin arttığı gözlenmiştir.

Western blotting ile bakıldığında da donmuş ve çözülmüş spermde, AKAP3, süperoksit dismutaz 1 (SOD1), TPI1 ve ODF2 ekspresyonunun arttığını gözlemlemişlerdir. Taze ve dondurulup çözülmüş insan spermi karşılaştırıldığında da 27 kadar sperm proteininin farklı olduğu bulunmuş. Bu durumda, kriyoprezervasyona cevap olarak ACO2, TEKT1, VIM, OXCT1'in azaldığı görülürken, ENO1, TEKT3 ve TEKT4'ün anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir (Wang ve ark 2014).

Farklı proteinlerin içeriğindeki değişiklikler dışında, kriyoprezervasyonun, aktin ve mitofusin 2 ve glikoz taşıyıcı GLUT3 gibi proteinlerin yerini değiştirmesine neden olduğu bildirilmiştir (Sancho ve ark 2007, Flores ve ark 2010).

Protein fonksiyonu ile ilgili olarak, kriyohasara iyon kanal proteinlerinin işlevini etkileyebileceği de belirtilmiştir. Bu işlevi kaybetmek dondurulup çözülmüş spermilerin fertilizasyon yeteneğinin azalmasının temelini oluşturabilir. Örneğin, L tipi voltaj kapılı  $Ca^{2+}$  kanalının,  $[Ca^{2+}]$  ortalama bazal değeri taze sperme göre dondurulup çözülen spermde daha yüksek bulunmuştur ve agonistlerin aracılık ettiği  $[Ca^{2+}]$ 'i artışları, dondurulup çözülmüş spermelerde taze spermde daha yüksek bulunmuştur. Bunun tersi olarak antagonistlerin eklenmesi ile verilen yanıt dondurulup çözülmüş spermde, taze spermde daha düşük bulunmuştur (Albrizio ve ark 2015).

Bütün bu bulgular ile donma çözme işleminin bu kanalların işlevini etkilediği sonucuna varılmaktadır.



## **Kriyoprezervasyonun mitokondriyal fonksiyon ve ROS üretimine etkisi**

Mitokondri membranında plazma membranı gibi kriyoprezervasyona karşı oldukça hassastır. Mitokondriyal aktivitenin, spermde dondurulup çözüldükten sonra azaldığı bilinmektedir.

İç mitokondriyal membranda oksidatif fosforilasyon yoluyla üretilen ATP, motilite sağlamak için mikrotübüllere aktarılır (Wallach ve Zamboni 1987). Bu nedenle, mitokondriyal aktivitedeki bir bozulma motilitedeki azalmanın başlıca sebebidir.

Mitokondriyal fonksiyon ile ilgili bir diğer nokta, reaktif oksijen türleri (ROS) üretimine yöneliktir. Mitokondriyal membran akışkanlığında bir değişiklik mitokondriyal membran potansiyelinde değişime sebep olur ve bu durum da ROS'un serbest bırakılmasına neden olabilir (Wallach ve Zamboni 1987, Lasso ve ark 1994).

Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), süperoksit anyonlar ( $O^{2-}$ ) ve hidroksil radikaller ( $OH\cdot$ ) gibi ROS'ların üretimi, sperm kapasitasyonu, akrozom reaksiyonu ve zona pellusidaya bağlanma gibi önemli sperm fonksiyonlarında kritik bir rol oynamaktadır (Agarwal ve ark 2006).

Yüksek ROS konsantrasyonlarına maruz kalınması mitokondriyal ve plazma membranlarının bozulmasına ve kromozomal ve DNA fragmentasyonuna neden olduğu için, sperm hareketliliği ve canlılığı azalır (Taylor ve ark 2009).

Sperm fosfolipid bağlı çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFAs) bis-alliklik metilen gruplarının oksidatif hasarı, lipid peroksidasyona (LPO) yol açar ve bu da ROS'un spermatozoaya verdiği zararın başlıca belirtisidir (Sharma ve Agarwal 1996).

LPO nedeniyle, zarların geçirgenliği ve akışkanlığında meydana gelen değişimler, sperm hareketinin geri dönüşsüz kaybına, hücre içi enzimlerin sızıtmasına, DNA hasarına, oosit penetrasyonundaki zorluklara ve sperm-oosit füzyonuna yol açmaktadır (Aitken 1995).

Normal koşullar altında, ROS'un zararlı etkilerini nötralize etmek için, spermatozoa ve seminal plazmada ROS'u temizleyen ve hücrel hasarı önleyen

antioksidan sistemlere sahiptir (Gadea ve ark 2011). ROS'un varlığı ile sperm antioksidan aktivitesi arasındaki dengesizlik, sperm kriyohasarının ana nedenidir (Ball 2008, Li ve ark 2010).

Antioksidanlar, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif strese karşı ana savunma faktörleridir (Silva ve ark 2011). İki tip antioksidan vardır: enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar.

Enzimatik antioksidanlar doğal antioksidanlar olarak da bilinirler; glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalazın tümü sperm doğal antioksidan savunma sistemine katılır.

Sentetik antioksidanlar veya diyet takviyeleri olarak da bilinen enzimatik olmayan antioksidanlar, indirgenmiş glutatyon (GSH), urat, askorbik asit, vitamin E (atokoferol), karotenoidler (b-karoten), ubikinonlar, taurin ve hipotaurin, selenyum ve çinkodur (Alvarez ve Storey 1989).

### **Kriyoprezervasyonun apoptozise etkisi**

Seçici hücre ölümü olarak da adlandırılan apoptoz, hücrenin sonlandırılmasına neden olan hücre morfolojik değişiklikleri tetikleyen bir dizi biyokimyasal olayı içerir.

Çalışmalar, kriyoprezervasyon ve çözülme takiben sperm hücrelerinde apoptoz belirteçlerinin artma eğiliminde olduğunu ortaya koymuştur. Kaspaz aktivasyonu, fosfatidilserin'in hücre zarında dış yüzeye translokasyonu, mitokondriyal membran potansiyelinin değişimi ve DNA parçalanması, insan spermlerinde görülen apoptoz belirteçleridir.

İnsan spermatozasındaki apoptoz mekanizmaları tam olarak anlaşılamamış olsada spermatozoadaki kaspazların varlığı hücre apoptoz için en iyi belirteçlerden biridir.

Apoptoz büyük ölçüde kaspaz adı verilen sistein proteazlarının aktivasyonu ile düzenlenir. Bunlar bir  $\text{NH}_2^-$  terminal grup içeren sisteinil-aspartat spesifik inaktif zimojen olarak üretilen proteazlardır. Apoptoz, aspartat rezidülarına yüksek afinite gösteren kaspazların aktivasyonu ile sağlanır (Fuentes-Prior ve Salvesen 2004).

2, 8, 9 ve 10 gibi apoptotik başlatıcı kaspazlar, efektör kaspazlarını (3, 6 ve 7) aktive eden çeşitli substratların bölünmesine ve apoptoz sürecinin tamamlanmasına yol açarlar. Kaspaz-3 aktivasyonu apoptotik kaskadtaki hücrenin kaderini belirler. Burdan sonra hücre ölümü geri dönüşümsüzdür.

Apoptozun diğer bir belirteçi fosfatidilserinin sperm zarı dış yüzeyine translokasyonudur. Bu nispeten erken bir apoptotik belirteçtir (Martin ve ark 1995). Dış yüzeyde beliren fosfatidilserin, yıkım için fagositler üzerindeki çeşitli reseptörler tarafından tanınır.

DNA parçalanması, spermatozoa'daki geç evre apoptozis için bir belirteçtir. DNA fragmantasyonuna kısmen, bir DNA tamir enzimi olan poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) 'yi inaktive eden ve hasar görmüş DNA'nın tamirini engelleyen Kaspaz 3'ün aktivasyonu neden olabilir (Grunewald ve ark 2009).

Son olarak kriyoprezervasyonun sperm hücrelerinin antioksidan aktivitesini azalttığı ve hücreleri ROS hasarına karşı daha duyarlı hale getirdiği görülmüştür. Yüksek konsantrasyonda reaktif oksijen türlerinin varlığı ve antioksidan enzim seviyesinin azalması sonucu hücre apoptozis uğramaktadır. Bu gibi durumlarda apoptozis, apoptotik uyarı hisseden ve BAX ve BAK proteinleri yoluyla dış mitokondriyal membranın permeabilizasyonunu tetikleyen ve sitokrom c salınımını sağlayan BCL-2 protein ailesinin aktivasyonu aracılık eder. Buna karşılık, bir apoptozis oluşturmak için kaspaz-9 APAF-1 ile birlikte aktive edilir, sonuç olarak apoptozis kaskadı başlatılır ( Arnoult ve ark 2003).

### **1.5. Kriyoprotektanların (Kriyokoruyucuların) Önemi**

Daha önce belirtildiği gibi, donma ve çözme ortamının bileşimi hem yavaş hem de hızlı dondurmada kritik bir rol oynamaktadır. Buna ek olarak, yavaş dondurma hücre içinde buz kristallerinin oluşumunu önlemek için kullanılır, ancak bu kristallerin oluşumu tamamen önlenemez.

Bu nedenle kriyokoruyucular donma ve çözme protokollerinden kaynaklanan stresin azaltılması için kullanılır, ancak en uygun konsantrasyonu bulmak oldukça önemlidir çünkü bu maddeler sperm için toksik olabilir (Okazaki ve ark 2009).

### **1.5.1.Hücre Zarından Geçemeyen Kriyoprotektanlar**

Plazma membranından geçemeyen kriyokoruyucular süt ve yumurta sarısında bulunan proteinler, şekerler ve polivinilpirolidon, hidroksietil nişasta, polietilen glikoller ve dekstranlar gibi yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Buz oluşumunu önler, protein ve hücre zarını stabilize etmeye katkıda bulunurlar. Bu bileşikler kriyokoruyucu rolü ekstrasellüler olarak geliştirirler. Bu çözünenler hücre zarını geçen kriyokoruyucular yokken hücreyi tam olarak koruyamamasına rağmen, hücre zarını geçen kriyokoruyucuların etkinliğini arttırarak hücre dışı konsantrasyonlarının azaltmasını sağlarlar (Fahy 1986, Benson ve ark 2012).

Yumurta sarısı farklı proteinlerin bir karışımıdır ancak ana koruyucu etkisi LDL aracılıdır. Yapılan farklı çalışmalar ile yumurta sarısı bileşeninin düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL) veya soya lesitiniyle değiştirilip değiştirilemeyeceği araştırılmıştır. Domuz spermi ile yapılan çalışma ile yumurta sarısı fraksiyonunun LDL ile değiştirilmesi ile donma çözülme sonrası kalitesinin arttığı ve DNA bütünlüğünü olumlu yönde etkilediği görülmüştür (Fraser ve ark 2007).

Buna ek olarak, yumurtanın kaynağının da elde edilen LDL fraksiyonlarının özelliklerini etkilediği görülmüştür. Örneğin güvercin yumurta sarısından elde edilen LDL fraksiyonunun, tavuk, devekuşu, ördek ve bildircin yumurtalarından elde edilenlerden daha yüksek kriyokoruyucu etkilere sahip olduğu görülmüştür (Wang ve ark 2012).

Yumurta sarısı proteinlerinin soya lesitiniyle değiştirilmesi ile ilgili olarak insanlar, koçlar ve boğalar üzerindeki çalışmalar farklı sonuçlar vermiştir. İnsanlarda konvansiyonel sperm kalite parametreleri, DNA bütünlüğü ve hyaluronata bağlanma yeteneği bakımından, yumurta sarısı ve soya lesitini ile yapılan çalışmalarda önemli farklılıklar görülmemiştir (Reed ve ark 2009). Buna karşın, aygır spermi ile yapılan araştırmalar, yumurta sarısının soya lesitiniyle değiştirilmesinin üreme performansının düşmesine neden olduğu ve koçlarda yapılan çalışmalarda ise toplam sperm hareketliliği, kromatin ve akrozom bütünlüğü üzerinde olumlu bir etki olduğu gösterilmiştir (Papa ve ark 2011, Mata-Campuzano ve ark 2015).

### **1.5.2. Hücre Zarını Geçebilen Kriyoprotektanlar**

Hücre zarını geçen kriyokoruyucular gliserol, DMSO, etilen glikol, metanol, propilen glikol ve dimetilasetamid gibi bileşiklerdir. Bütün bu çözücüler hücelere nüfuz eder ve 1 M'a kadar ve hatta daha yüksek konsantrasyonlarda bile nispeten zehirsizdirler (Gao ve Critser 2000).

Etki mekanizmaları elektrolit konsantrasyonunu azaltma ve düşük sıcaklıklarda ozmotik büzülme derecesi ile ilgilidir (Mazur 1984). Bu ajanlar, sitoplazma viskozitesini etkiler, difüzyon hızlarını değiştirir ve lipid çift katmana yerleşerek hücre zarı özelliklerini değiştirir (Holt 2000).

Bununla birlikte, bu maddeler hücreye zarar verebilir ve 5°C'den yüksek sıcaklıklarda ozmotik hacim değişikliklerine neden olabilir. Donmadan önce nüfuz etmeleri gerekir ve çözülürken çabucak hücre dışına çıkarılmaları gerekir.

Son olarak, belirli bir kriyokoruyucunun uygunluğunun, hücrenin bu ajana geçirgenliğine ve spesifik sitotoksik etkilerine bağlı olduğunu ve bu nedenle uygun kriyokoruyucu konsantrasyonunun hücre türüne bağlı olduğu önemli bir noktadır (Gao ve Critser 2000).

### **1.6. Vücudun Antioksidan Sistemleri**

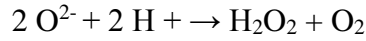
Evrimsel süreçte, canlı organizmalar, reaktif oksijen türlerine (ROS) ve reaktif nitrojen türlerine (RNS) karşı özel antioksidan koruyucu mekanizmalar geliştirmiştir (Surai 2014). Bu nedenle, canlı organizmaların oksijen bakımından zengin bir ortamda hayatta kalmalarını sağlayan doğal antioksidan sistemleri mevcuttur.

"Antioksidan sistemler" genel terimi, hücrelerin serbest radikallerden korunmasından sorumlu olan mekanizmaları tanımlamaktadır. Koruyucu antioksidan bileşikler, organellerde, hücre içi veya hücre dışı boşluklarda bulunur ve maksimum hücrel koruma sağlar.

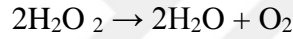
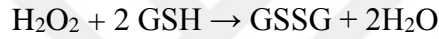
Canlı bir hücrenin antioksidan sistemi üç önemli savunma basamağı içerir (Surai ve I. Fisinin 2010, Surai 2014, Kumar ve ark 2015)

İlk savunma basamağı, serbest radikallerin öncüllerini temizleyerek veya katalizörleri inaktive ederek serbest radikal oluşumunun önlenmesinden sorumludur ve süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) artı metal bağlayıcı proteinler olmak üzere üç antioksidan enzimden oluşur.

Süperoksit radikali, hücredeki fizyolojik koşullarda üretilen ana serbest radikal olduğundan, hücredeki birinci antioksidan savunma basamağının ana unsuru SOD (EC 1.15.1.1) olarak düşünülür. Bu enzim aşağıdaki reaksiyonda ki gibi süperoksit radikalini parçalamaktadır:



SOD tarafından oluşturulan hidrojen peroksit, aşağıdaki gibi GSH-Px veya CAT ile detoksifiye edilerek suya indirgenir:



Geçiş metal iyonları lipid hidroperoksitlerinin, aldehitler, alkoksil ve peroksil radikalleri gibi sitotoksik ürünlere ayrışmasını hızlandırır. Bu nedenle, metal bağlayıcı proteinlerde (transferrin, laktoferrin, haptogloblin, hemopeksin, metalotiyonein, seruloplazmin, ferritin, albümin, miyogloblin, vb.) savunma sisteminin ilk basamağına aittir.

Ne yazık ki, hücredeki antioksidan savunma sisteminin ilk basamağı, serbest radikal oluşumunu tamamen engellemek için yeterli değildir ve bazı radikallerin bu sistemden sızması, lipid peroksidasyonunu başlatmaları ve çoklu doymamış yağ asitlerine (PUFA'lar), DNA'ya ve proteinlere zarar vermelerine neden olur.

Bu nedenle, savunmanın ikinci basamağı, zincir kırıcı antioksidanlardan (E vitamini, ubiquinol, karotenoidler, vitamin A, askorbik asit, ürik asit ve diğer bazı antioksidanlar) oluşur. Glutatyon (GSH) ve tioredoksin sistemleri de antioksidan savunmanın ikinci basamağında önemli bir role sahiptir.

Zincir kırıcı antioksidanlar, çoğaltma reaksiyonunun zincir uzunluğunu olabildiğince kısa tutarak peroksidasyonu inhibe ederler. Böylelikle, zincir

reaksiyonunda peroksil radikal ara ürünlerini atarak lipid peroksidasyonunun artmasını önlerler.

Bununla birlikte, hücrede antioksidan savunmanın ikinci basamağı bile, lipid ve protein oksidasyonunu önleyemez ve bazı biyolojik moleküller hasar görebilir. Bu durumda üçüncü savunma basamağı hasar gören molekülleri ortadan kaldıran veya onaran sistemlere dayanır. Bu antioksidan savunma basamağı, lipolitik (lipazlar), proteolitik (peptidazlar veya proteazlar) ve diğer enzimleri (DNA tamir enzimleri, ligazlar, nükleazlar, polimerazlar, proteinazlar, fosfolipazlar, çeşitli transferazlar, vb.) içerir.

Bütün bu antioksidanlar birbirleriyle entegre bir antioksidan sistemi oluşturarak vücutta işlev görürler. Hücredeki antioksidanların karşılıklı etkileşimi, serbest radikallerin ve toksik ürünlerin zararlı etkilerinden maksimum düzeyde hücreyi koruma için hayati öneme sahiptir.

Bu nedenle, antioksidan savunmalarında çeşitli seçenekler bulunmaktadır (Surai 2014);

- Lokalize oksijen konsantrasyonunu azaltmak
- Pro-oksidan enzimlerin aktivitesini azaltmak ve mitokondride elektron zincirinin etkinliğini arttırmak ve süperoksit üretimine yol açan elektron sızıntısını azaltmak
- Çeşitli transkripsiyon faktörlerini (örneğin Nrf2 ve NF- $\kappa$ B) indükleyerek başlangıç radikallerini temizleyip birinci zincirin başlamasının önlenmesi ve AO enzimlerinin sentezi (SOD, GSH-Px, CAT, glutatyon redüktaz (GR), GST vb.)
- Vita-gen aktivasyonu ve sentezi ve koruyucu moleküllerin artan ekspresyonu (GSH, tioredoksinler, ısı şoku proteinleri (HSP'ler), sirtuinler vb.)
- Metal iyonlarının bağlanması (metal bağlayıcı proteinler) ve metal şelatlama
- Peroksitlerin radikal ve toksik olmayan ürünlere dönüştürülerek parçalanması (Se-GSH-Px)
- Peroksil ve alkoksil radikalleri gibi atılabilen ara radikallerin temizlenerek zinciri kırılması (vitamin E, C, GSH, ürik asit, ubikinol, bilirubin vb.)

- Hasar görmüş moleküllerin (metionin sülfoksit redüktaz (Msr), DNA onarım enzimleri, şaperonlar vs.) onarılması veya parçalanması.

### 1.6.1. Silimarin

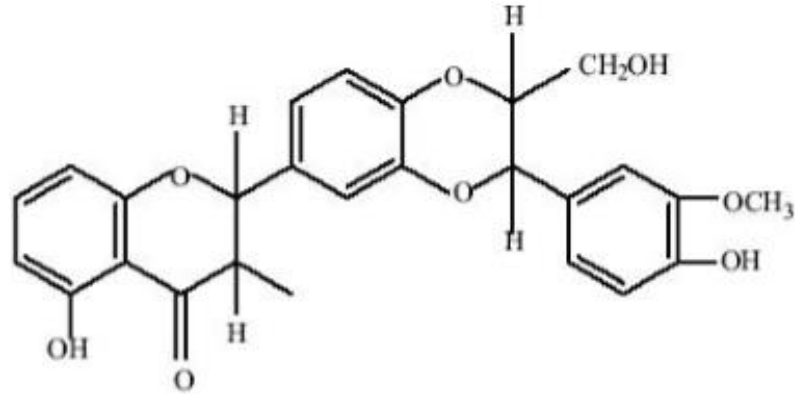
Silimarin (SM), *Silybum marianum* (deve dikenini) bitkisinden elde edilen C25 içeren flavonoid karışımıdır.



*Silybum marianum* (Milk Thistle)

**Şekil 1.8.** Silimarin elde edilen *Silybum marianum* (milk thistle) bitkisi (Agarwal ve ark 2006).

Günümüzde standartlaştırılmış (silibinin, çoğunlukla silybin olarak adlandırılan) içeriğine göre, SM ekstraktı, az miktarda flavonoid ve yaklaşık % 65-80 flavonolignanlar (silybin A ve silybin B, izosilybin A, izosilybin B, silikristin ve silydianin) içerir. Yaklaşık olarak % 20-35 oranında yağ asidi içerir ve bu polifenolik bileşiklerin çeşitli metabolik düzenleyici etkileri vardır (Comelli ve ark 2007).



**Şekil 1.9.** Silimarinin kimyasal yapısı (Comelli ve ark 2007).



Silibin 1959 yılında flavonolignanlar olarak adlandırılan doğal bileşiklerin yeni bir ailesinin birinci üyesi olarak keşfedilmiştir (Biedermann ve ark 2014). Silimarinin baskın ve birinci aktif bileşeni olarak bilinmektedir (Hackett ve ark 2013, Kren ve ark 2013). Bu nedenle silibin içeriği ve silibin antioksidanı içeren bileşimler çeşitli model sistemlerde SM'nin biyolojik aktivitesini açıklamak için kullanılır.

Özellikle SM, karaciğer rahatsızlıklarını tedavi etmek için altın standart ilaç olmuştur ve deve diken özleri, yaklaşık 2000 yıldır geleneksel bitkisel ilaçlar "karaciğer tonikleri" olarak kullanılmıştır. Bu nedenle SM, karaciğer üzerindeki antioksidan ve kemoprotektif etkileri ile çok iyi bilinmektedir ve genellikle tamamlayıcı ve alternatif hepatoprotektif bir ilaç olarak reçete edilir (Loguercio ve ark 2007, Post-White ve ark 2007, Federico ve ark 2008, Loguercio ve Festi 2011, Loguercio ve ark 2012, Stiuso ve ark 2014).

SM'nin aynı zamanda güçlü antioksidan ve doku yenileyici özelliğinden hepato-, nöro-, nefro- ve kardiyokoruyucu madde olarakta kullanılmıştır. Hayvan modellerinde ve insan deneylerinde SM'nin antioksidan özelliği üzerine çeşitli yolları ve etki mekanizmalarını kapsayan kapsamlı araştırmalar yapılmıştır (Madrigal-Santillán ve ark 2014, Milic ve ark 2014, Vargas-Mendoza ve ark 2014, Zholobenko ve Modriansky 2014).

Bununla birlikte, polifenollerin doğrudan antioksidan (AO) aktivitesinin, direk olarak vücudun antioksidan savunmasına katılarak etkisini göstermediği düşünülmektedir ve Nrf2 ve NF- $\kappa$ B ve ilgili gen ve protein ifadeleri de dahil olmak üzere çeşitli transkripsiyon faktörlerinin modülasyonu yoluyla hücrel antioksidan savunmanın indüklenmesi üzerindeki SM / silibin etkisini araştırmak için sadece sınırlı çalışma yapılmıştır (Hollman 2014, Surai 2014).

### **1.6.2. Silimarin'in (SM) Antioksidan Özellikleri**

Silimarin antioksidan savunma sistemine farklı yollarla katkıda bulunur;

1. Serbest radikalleri doğrudan temizleyerek
2. Serbest radikal oluşumundan sorumlu spesifik enzimleri inhibe ederek veya stres koşullarında mitokondrilerin elektron taşıma zincirinin bütünlüğünü koruyarak serbest radikal oluşumunu önleyerek

3. Çoğunlukla Nrf2 ve NF-κB'yi de kapsayan transkripsiyon faktörleri vasıtasıyla bir dizi antioksidan enzim ve enzimatik olmayan antioksidanı aktive ederek hücrenin optimal redoks durumunun muhafaza edilmesine katkı olarak.

4. HSP, tioredoksin (Trx), sirtuenler vb. olmak üzere koruyucu moleküllerin sentezinden sorumlu olan ve stres koşullarında ilave koruma sağlayan bir dizi vitageni aktif hale getirerek katkıda bulunur.



## 2. GEREÇ ve YÖNTEM

### 2.1. Örnek toplama ve Çalışma Grubu Oluşturma

Semen örneklerinin toplanması işlemi için Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tüp Bebek Merkezi Kliniği'ne spermiyogram testi için başvuran ve semen parametreleri World Health Organization (WHO, Dünya Sağlık Örgütü) 2010 kriterlerine göre (WHO 2010 kriterleri Tablo 1'de verilmiştir) normospermi sınıfına giren ve çalışmaya katılmayı gönüllü olarak kabul eden 20 erkek birey seçilmiştir.

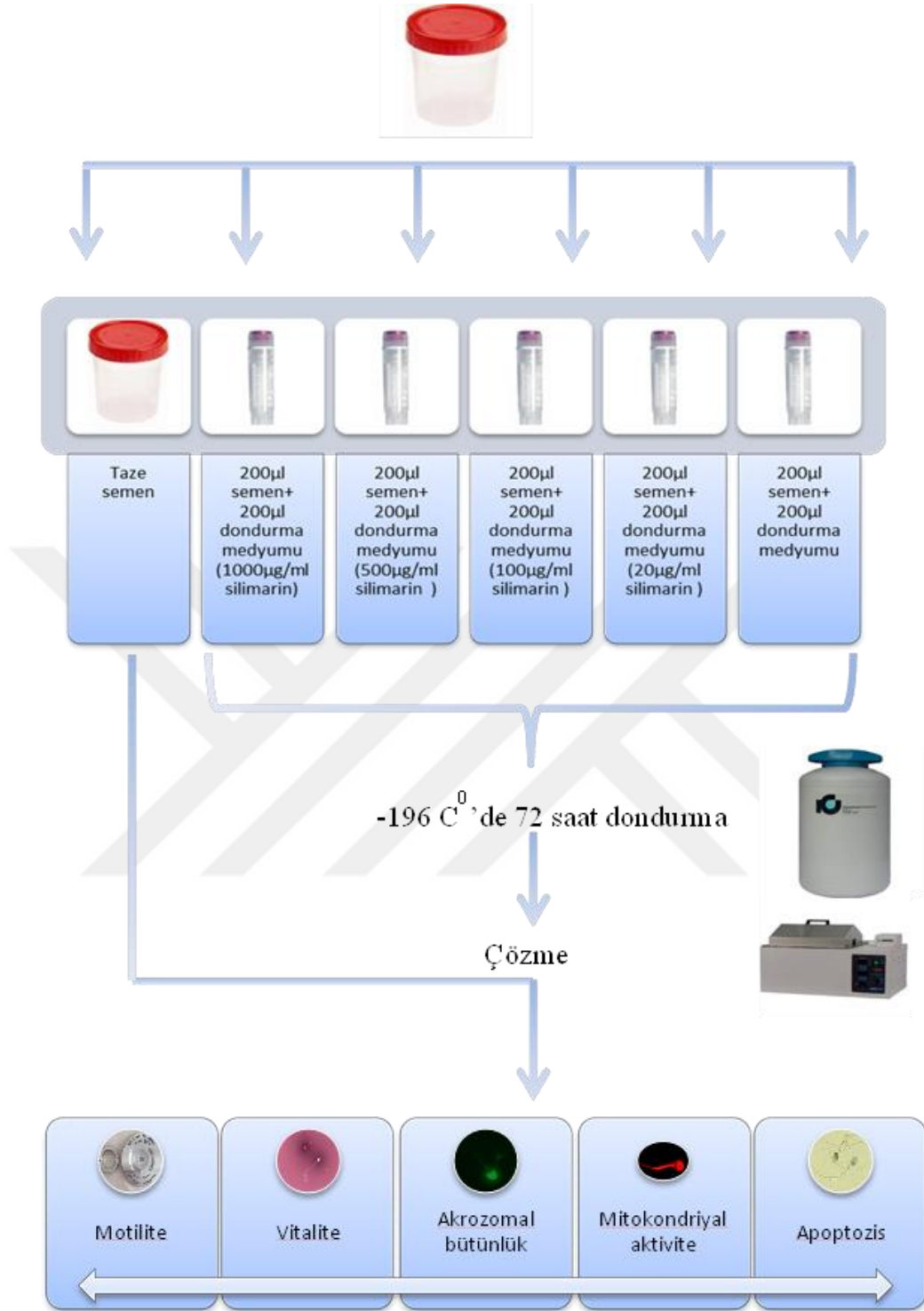
Seçilen bireyler spermiyogram testi öncesi çalışma konusu hakkında tek tek bilgilendirilmiş olup gönüllülük formu imzalatılmıştır. Bireyler aktif üreme döneminde (20-40 yaş arasında) olup, sigara kullanmayan, herhangi sistemik bir hastalık, çocuk yaşta ateşli hastalık, testis travması, varikosel gibi üreme fonksiyonelliğini etkileyen bir hastalık geçirmemişlerdir.

Örnekler üç-beş günlük cinsel perhiz süresi ardından mastürbasyon yolu ile elde edilmiştir.

Hastalardan elde edilen taze semen örnekleri çalışmamız için farklı gruplara ayrılmıştır. Her bir hastanın semen örneği 6 gruba bölünmüştür. Oluşturulan bu gruplar çizelge 2.1'de özetlenmiştir. İşlem başmakları da şekil 2.1'de şematize edilmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışma için oluşturulan gruplar

1. Grup	Dondurma Öncesi (Taze Semen-Kontrol 1)
2. Grup	Semen + Dondurma Medyumu + Silimarin (1000µg/ml)
3. Grup	Semen + Dondurma Medyumu + Silimarin (500µg/ml)
4. Grup	Semen + Dondurma Medyumu + Silimarin (100µg/ml)
5. Grup	Semen + Dondurma Medyumu + Silimarin (20µg/ml)
6. Grup	Semen + Dondurma Medyumu (Donma sonrası-Kontrol2)



**Şekil 2.1.** İşlem Basamakları

### 2.1.1. Semen Analizi

Verilen semen örneği 37°C'leri inkübatörde likefiye olana kadar bekletildi. Bekleme süresi her hasta için değişmekle birlikte ortalama süre 20 dk'dır. Daha sonra 10'luk pipet yardımıyla semen örneğinin hacmi belirlenmiştir.

Likefiye olmuş semen örneği çalışma için 6 grup oluşturmak adına eşit hacimde bölünmüştür. İlk grup olan dondurma öncesi kontrol grubu için taze semen örneğinden Makler Chamber üzerine 10 µl koyularak faz kontrast mikroskopunda (Olympus, CX31), 20X objektif altında tüm kareler sayılarak konsantrasyon ve motilite değerlendirildi. Konsantrasyon için üç farklı on kare sayılarak ortalama değer alındı. Çalışmaya 60-120 10<sup>6</sup>/ml aralığında sperm sayısına sahip bireyler dahil edilmiştir.

Motilite değerlendirmeleri lineer ileri yönde hareketli olanlar + 4 progresif-motil, geniş dairesel hareketli olanlar + 3 progresif-motil, yerinde hareketli olanlar + 2 nonprogresif-motil ve hareketsiz olanlar ise + 1 immotil olarak değerlendirildi.

Plazma membran bütünlüğü (vitalite) değerlendirmesi için Merck Eosin Y Çözeltisi kullanılmıştır. Lam üzerine damlatılan 15 µl semen örneği üzerine 15 µl boya eklenerek üzeri lamel ile kapatılmıştır. Faz kontrast mikroskopunda (Olympus, CX31), 40X objektif altında 5 farklı bölgede en az 200 adet sperm hücresi sayılarak ortalamaları alınmış ve plazma membran bütünlüğünü koruyan canlı hücrelerin oranı hesaplanmıştır.

PH (Merck)'ı belirlenerek değerler kaydedilmiştir.

1. Grubun semen analizi sonrası akrozomal bütünlüğü, mitokondriyal aktivitesi ve apoptozis değerlendirmeleri yapılmıştır.

Diğer gruplar için ayrılan semen örneği ise dondurma işlemi için hazırlanmıştır.

### **2.1.2. Semen Dondurma ve Çözme İşlemi**

2., 3., 4., 5. ve 6. Grupları oluşturmak için taze semen örnekleri 1:1 oranında olacak şekilde dondurma medyumunu (1067- Origio sperm freezing medium) ile steril kriyotüpler (Cryo Vial, T3082A) içinde karıştırılmıştır.

Her bir grup için dondurma medyumuna içine farklı konsantrasyonlarda silimarin eklenmiştir. Eklenen silimarin konsantrasyonları tablo 2.1'de özetlenmiştir. 6. Grup kontrol grubu olup silimarin eklenmeden yalnızca medyum eklenmiştir.

Semen içine dondurma medyumu damla damla eklenerek karıştırılmıştır. Üzerine hasta ismi ve grubu yazılmıştır. 10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 15 cm yükseklikte sıvı azot buharında 30 dk tutulmuş ve sonrasında sıvı azot içine (-196 C<sup>0</sup>) daldırılmıştır. 72 saat bekletildikten sonra çözme işlemine geçilmiştir.

Sıvı azottan çıkarılan örnekler 37 C<sup>0</sup>'lik sıcak su banyosunda 1 dk bekletilerek çözülmüştür. 1:1 oranında PBS (Phosphate Buffered Saline) (Sigma) eklenerek 1500 rpm'de 15 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant atılarak kriyoprotektan uzaklaştırılmıştır. Elde edilen sperm örneklerine ilk basamaktaki taze semen örneğine uygulanan işlemlerin aynısı uygulanmıştır.

Semen analizi yapılmış motilite ve plazma membran bütünlüğü (vitalite) değerleri faz kontrast mikroskobu (Olympus, CX31) altında 40X büyütmede incelenerek belirlenmiştir ve tüm grupların yüzdeleri hesaplanmıştır. Akrozomal bütünlüğü, mitokondriyal aktivitesi ve apoptozis değerlendirmeleri yapılmıştır.

### **2.1.3. Akrozomal Bütünlüğün Floresan Mikroskop ile Analizi**

Spermde akrozomal membran bütünlüğünün değerlendirilmesi işlemi için floresan bağlı lektinler kullanılır. Peanut agglutinin (PNA) ve Pisum sativum (PSA) en çok kullanılan lektinlerdir. Bu lektinler Fluorosein isothiocyanate (FITC), phycoerthryne (PE), Alexa Fluor gibi floresanlar ile işaretlenir. Çalışma için kullanılan konjugat FITC-PNA (L7381 Sigma)'dır.

Bunun için 30 µl semen örneği lama yayılarak havada kurutulmuştur. Absolu metanol ile 10 dk fikse edilmiştir. Daha sonra üzerine FITC-PNA içeren PBS solüsyonunu(100µg/ml) damlatılarak 37 C<sup>0</sup> de 30 dk bekletilmiştir ve tekrar PBS ile yıkanarak 100X büyütmede epifloresan mikroskop (Olympus Bx51) altında bakılmıştır. Dış akrosomal membran yapısının bozulması lektinin membrana bağlanmasını azaltmaktadır.

Değerlendirme yapılırken spermin baş bölgesinde ki akrozomal kep kısmında yeşil floresan vermesi hasarsız akrozomun varlığını gösterirken, yalnızca ekvatorial bölgede yeşil floresan ya da hiç boyanmama durumu akrozomal bütünlüğün

bozulduğu anlamına gelmektedir. Değerlendirme yapılırken 5 farklı bölgede 200 hücre sayılarak ortalama değerler alınmıştır.

#### **2.1.4. Mitokondriyal Aktivitenin Floresan Mikroskop ile Analizi**

Sperm hücresinde mitokondriyal membran potansiyelinin belirlenmesi için MitoTracker adı verilen özel floresan boyalar kullanılarak mitokondri membranı içindeki oksidatif stres hasarının anlaşılması sağlanmaktadır.

Çalışmada mitokondriyal aktivitenin belirlenmesinde MitoTracker™ Red FM (M22425 Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır. 1 vial MitoTracker™ Red FM PBS (1/2000 oranında) ile sulandırılarak hazırlanmıştır. Ependrof içinde 1 milyon hücre için 50 µl seyreltilmiş mitotracker solüsyonu olacak şekilde karıştırılarak, 30dk 37C<sup>0</sup>'de inkübe edilmiştir.

İnkübasyondan sonra sperm örneği lama yayılmış ve DAPI içeren floresan kapatma medyumu (ab104139 abcam) damlatılarak lamel ile kapatılmıştır. Daha sonra epifloresan mikroskop (Olympus Bx51) altında 100X büyütmede değerlendirilmiştir. Floresan işaretli spermlerin yüzdesinin belirlenmesi için en az beş bölgede 200 sperm sayılmıştır.

#### **2.1.5. Kaspas 3 Yöntemi ile Apoptozis Belirlenmesi**

Normal hücreler apoptozis sinyali aldıkları zaman CAD (kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz) enzimi tarafından, DNA nükleozom birimlerine ayrılarak fragmente olur. CAD enzimi normal hücrelerde ICAD (kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü- DNA fragmentasyon faktör 45) ile bağlı formda bulunur. Kaspas 3 bu DNaz enziminin aktivasyonunu sağlar ve apoptotik süreci indükler.

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için Kaspas 3'ün immunhistokimyasal boyama yöntemi kullanılmıştır.

Bu yöntem için semen örneği lama yayılarak kurutulmuş ve 15 dk absolu metanol ile fikse edilmiştir. Primer antikör olarak Anti-Caspase-3 antibody (ab13847) kullanılmıştır. İmmunhistokimyasal boyama için Histostain-Plus IHC Kit, DAB, broad spectrum (Invitrogen, 859643) kullanılmıştır. Kit protokolüne uygun

işlemler yapılmış ve mayer hematoksilen (MHS1 SIGMA) ile çapraz boyamasıda yapılarak entellan ile kapatılmıştır.

Işık mikroskopunda (Zeiss Axio Imager.A1) 100X büyütmede bakılarak apoptotik hücreler belirlenmiş ve sonuçlar farklı 5 bölgede 200 hücre sayılarak verilmiştir.

#### **2.1.6. Sonuçların İstatistiksel Analizi**

İstatistiksel analiz için; oluşturulan gruplar arasındaki motilite, plazma membran bütünlüğü, mitokondriyal aktivite, akrozomal bütünlük ve apoptozis karşılaştırmaları Oneway ANOVA Testi kullanılarak yapılmıştır. Grupların sperm parametreleri (motilite ve plazma membran bütünlüğü) arasındaki korelasyon ise Pearson korelasyon testi kullanılarak yapılmıştır.  $p < 0.05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir.



### **3. BULGULAR**

#### **3.1. Semen Analizi Sonuçları**

20 normospermik bireyden toplanan sperm örneklerinin likefikasyonu sonrası gruplar oluşturulmuştur. Çalışmamız iki kontrol grubu içermektedir. Dondurma öncesi ve sonrası spermde meydana gelen kriyohazarın tespiti için ilk kontrol grubumuz taze semen örneğidir. İkinci kontrol grubumuz ise silimarinin kriyopreservasyon üzerine etkisinin tespiti için dondurma işlemi sırasında dondurma medyumuna silimarin eklenmeyen örnektir.

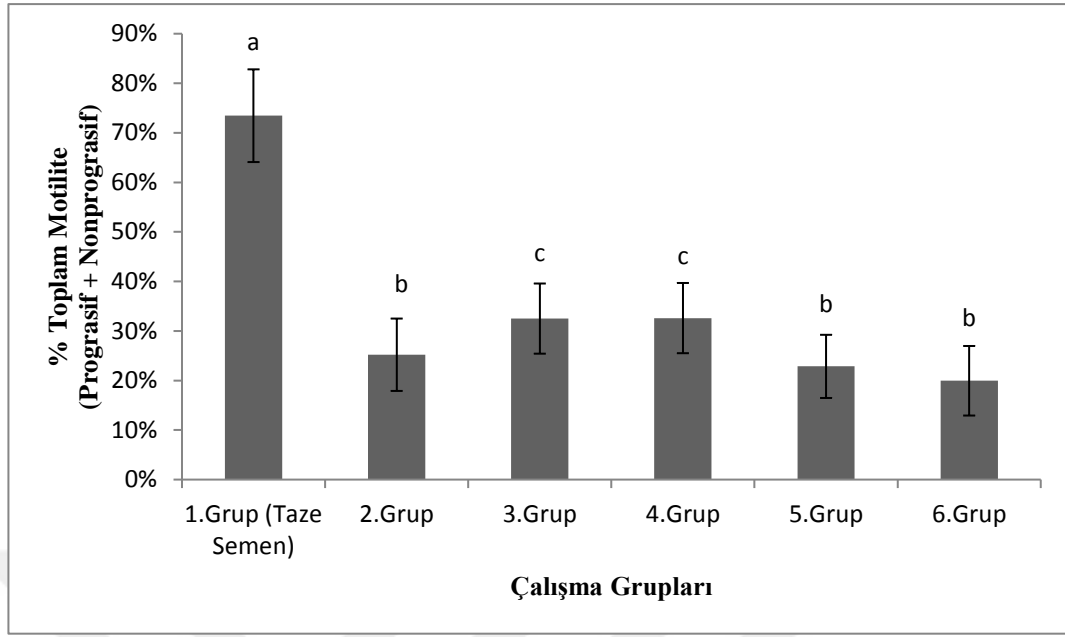
Taze semen örneği ilk olarak motilite, vitalite, pH, renk, koku, vizkozite, konsatrasyon gibi makroskobik ve mikroskobik değerlendirmeleri yapılmıştır. Aynı işlemler dondurulup çözülen gruplar içinde sırasıyla uygulanmıştır.

Seçilen bireylerin semen örneklerinde ortalama sperm sayısı mililitrede  $85,6 \times 10^6$  olup en az  $61 \pm 6 \times 10^6/\text{ml}$ , en fazla  $115 \pm 5 \times 10^6/\text{ml}$  konstrasyondadır.

##### **3.1.1. Motilite**

Donma öncesi ve donup çözme sonrası sperm hareketliliğinde meydana gelen değişim karşılaştırıldığında, dondurup çözünen spermin hareketliliğinde istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0,05$ ) düzeyde azalış olduğu görülmüştür. Taze semen örneğindeki sperm örneklerinin progresif ve nonprogresif olmak üzere toplam hareketliliğinin ortalama yüzde değeri  $73 \pm 9,6$  iken bu değer 6. grup olan silimarin eklenmeden dondurulup çözülen sperm hareketliliği ile karşılaştırıldığında, hareketliliğin  $\%20 \pm 7,2$ 'ye kadar azaldığı görülmüştür.

Kontrol grupları dışında, taze semen ile silimarin eklenerek dondurulup çözülen örneklerin toplam yüzde motilite değerlerine baktığımızda da donmanın sperm hareketliliği üzerinde tüm gruplarda anlamlı ( $p < 0,05$ ) düzeyde azalış olduğu görülmüştür (Şekil3.1.)



**Şekil 3.1.** Donma öncesi (1.grup taze semen) ve dondurulup çözülen sperm örneklerinde prograsif ve nonprograsif olmak üzere toplam hareketlilik. Değerler her grup için (n=20); %Toplam motilite  $\pm$  Standart sapma olarak verilmiş olup, her farklı harf (a,b,c) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılığı ( $p < 0,05$ ) ifade etmektedir.

Örneklerin dondurulması işlemi için farklı konstrasyonlarda silimarin kullanılmıştır. Bu konstrasyonlar; 0, 20, 100, 500 ve 1000  $\mu\text{g/ml}$ 'dir. Eşit hacimde semen örneği ve dondurma medyumu (Origio sperm freezing medium) ile farklı konstrasyonlarda silimarin eklenen örnekler, dondurularak 72 saat sonunda çözülmüştür.

Gruplar karşılaştırıldığında 3. Grup (Semen+Dondurma Medyumu+Silimarin (500  $\mu\text{g/ml}$ )) ve 4. Grup (Semen+Dondurma Medyumu+ Silimarin (100 $\mu\text{g/ml}$ ))'larda ortalama sperm hareketliliği  $\%33 \pm 7,2$  olup eşittir. Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında (2., 5. ve 6.) göre sperm hareketliliğinin istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0,05$ ) düzeyde daha fazla olduğu görülmüştür.

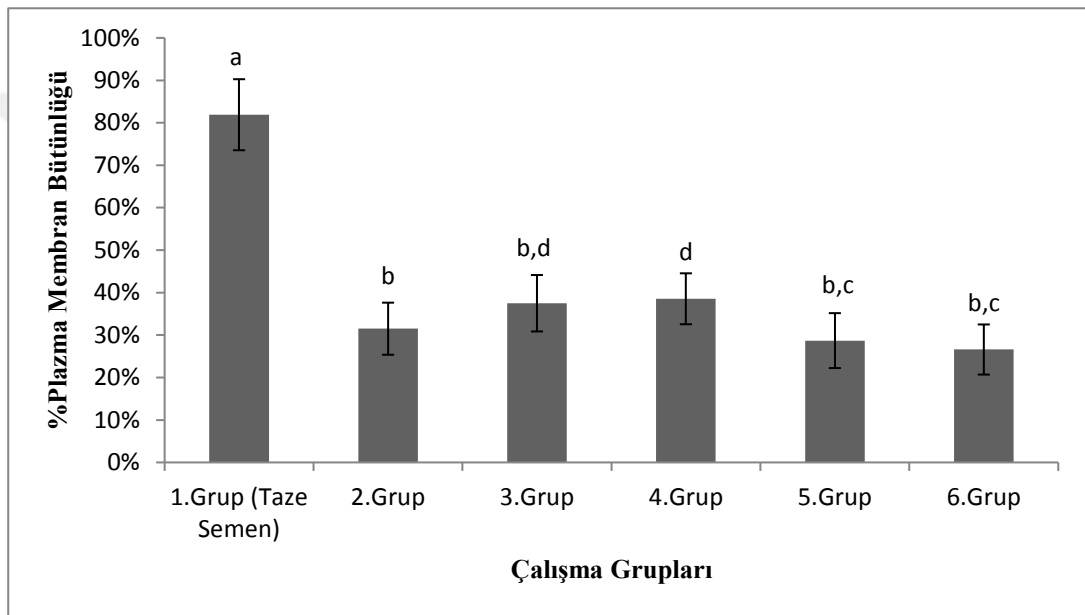
2.Grup (Semen+Dondurma Medyumu+Silimarin (1000 $\mu\text{g/ml}$ )), 5. Grup (Semen+Dondurma Medyumu+Silimarin (20 $\mu\text{g/ml}$ ) ve 6. Grup (Semen+Dondurma Medyumu) grupları arasında toplam yüzde motilite değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ( $p=0,925$ ,  $p=0,256$ ) düzeyde bir fark görülmemiştir.

6. Grup yalnızca Semen+Dondurma Medyumu ile dondurulup çözülen grup olup  $\%20 \pm 7,2$  değeriyle en az sperm hareketliliği gösteren gruptur.

### 3.1.2. Plazma Membran Bütünlüğü (Vitalite)

Plazma membran bütünlüğüne baktığımızda da dondurup çözme işleminin plazma membran bütünlüğü üzerine olumsuz etki ettiği görülmüştür.

Dondurma öncesi taze semedeki sperm örneklerinde %82±8,5 oranında plazma membran bütünlüğü görülürken bu oran dondurup çözme sonrası örneklerde %27±6'lara kadar düşmüş olup tüm kriyopreservasyon işlemi uygulanmış gruplar ile taze semen karşılaştırıldığında plazma membran bütünlüğünde istatistiksel olarak ( $p < 0,05$ ) anlamlı düzeyde azalış görülmüştür.



**Şekil 3.2.** Donma öncesi ve dondurulup çözülen sperm örneklerinde plazma membran bütünlüğü yüzdesi. Değerler her grup için n=20 olmak üzere; % Plazma membran bütünlüğü± Standart sapma olarak verilmiş olup her farklı harf (a,b,c,d) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılığı ( $p < 0,05$ ) ifade etmektedir.

Dondurulup çözülen gruplar arasındaki karşılaştırmaya baktığımızda da 4. Grup olan 100µg/ml silimarin eklenmiş grupta %38,55±6,151 oranında plazma membran bütünlüğü görülmüş olup bu oran gruplar arasında en yüksek değerdir ve 2. Grup, 5. Grup ve 6. Grup ile karşılaştırıldığında ( $p < 0,05$ ) anlamlı düzeyde fark görülmüştür.

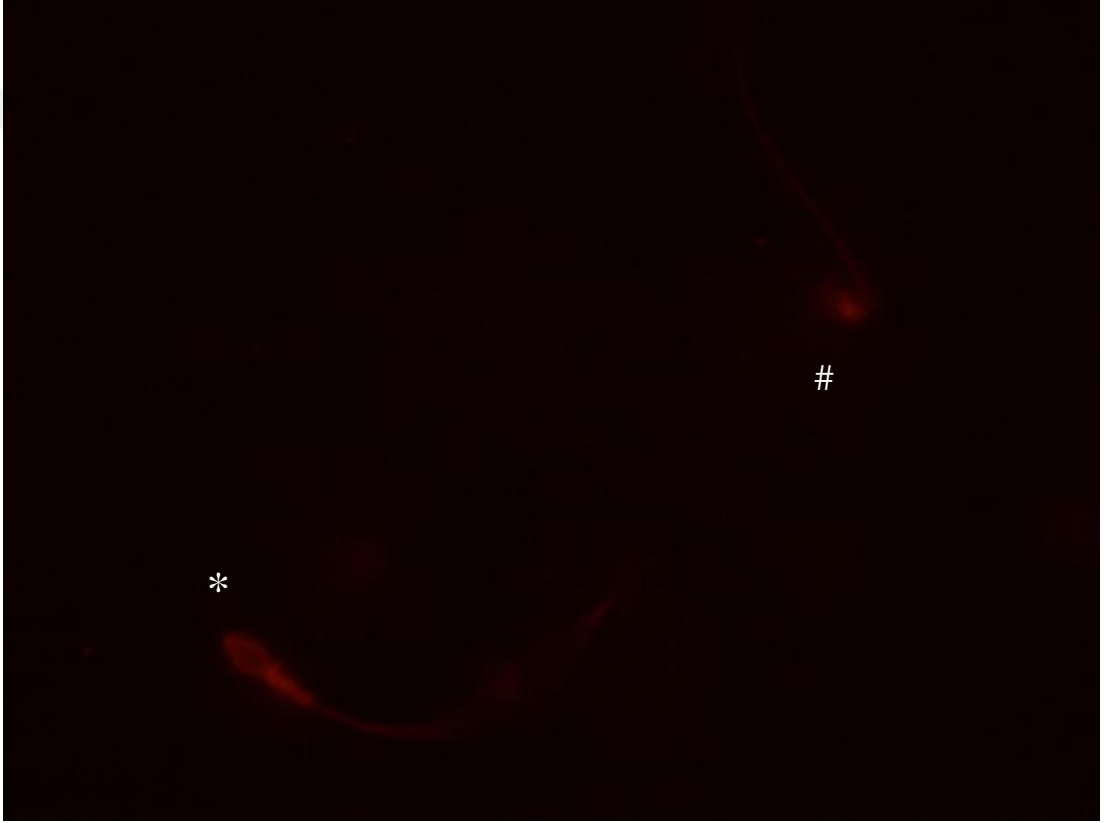
Ancak plazma membran bütünlüğü açısından 3. ve 4. gruplar arasında anlamlı ( $p=0,997$ ) düzeyde bir fark bulunamamıştır.

2., 5. ve 6. Gruplar arasında ( $p=0,784$ ,  $p=0,213$ ) % plazma membran bütünlüğü değerleri arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

### 3.2. Mitokondriyal Aktivitenin Değerlendirilmesi

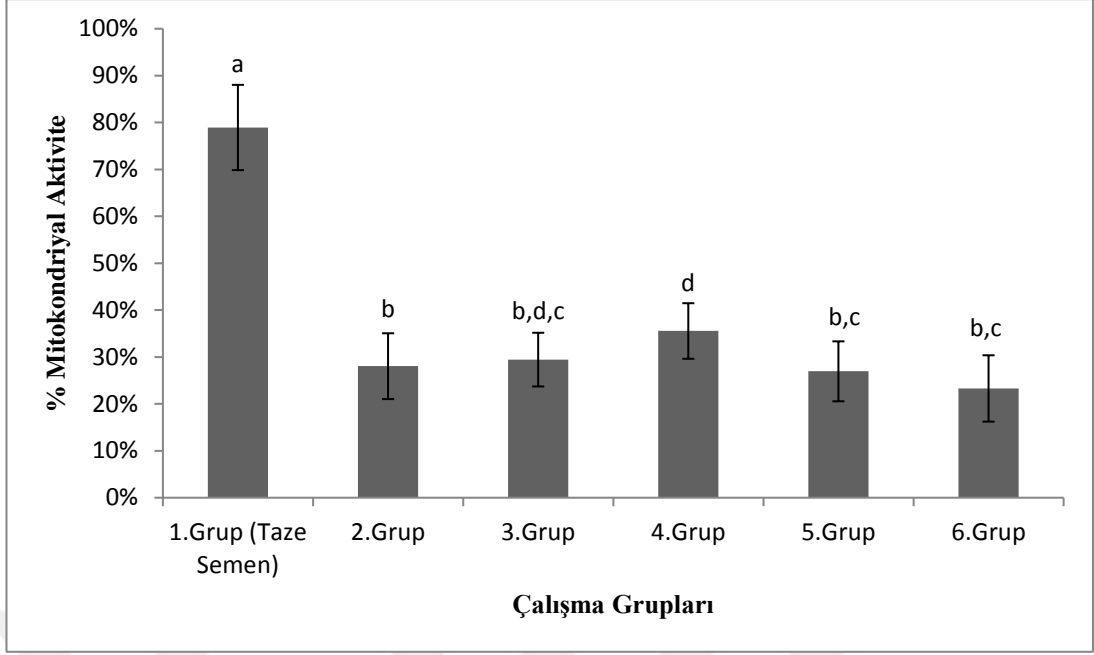
Dondurma öncesi ve dondurup çözme işlemi sonrası mitokondriyal aktivitedeki değişimlerin değerlendirilme işlemi MitoTracker Red ile yapılmış olup epifloresan mikroskop ile 100X'lük büyütmede incelenmiştir.

Spermde mitokondrinin bulunduğu kısım olan orta kısımda yoğun kırmızı floresan görülmesi aktif ve hasarsız mitokondriyal membrana sahip sperm varlığını göstermektedir. Boyanmanın olmaması mitokondriyal aktivitenin olmadığını göstermektedir.



**Şekil 3.3.** Mitokondriyal membran potansiyeli (\*) hasarsız ve (#) hasarlı sperm floresan mikroskop görüntüsü. X100 büyütmede.

Dondurma öncesi taze semendeki sperm örneklerinde %78,9±9,3 oranında mitokondriyal aktivite görülürken bu oran dondurup çözme sonrası örneklerde %23,3±7,2'lere kadar düşmüş olup tüm kriyopreservasyon işlemi uygulanmış gruplar ile taze semen karşılaştırıldığında plazma membran bütünlüğünde istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0,05$ ) düzeyde azalış görülmüştür.



**Şekil 3.4.** Donma öncesi ve dondurulup çözülen sperm örneklerinde % Mitokondriyal Aktivite değerleri. Değerler her grup için n=20 olmak üzere %Mitokondriyal aktivite  $\pm$  Standart sapma olarak verilmiş olup her farklı harf (a,b,c,d) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılığı ( $p < 0,05$ ) ifade etmektedir.

Kriyopreservasyon işlemi uygulanmış gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında ise 4. grubun mitokondriyal aktivitesi diğer silimarin eklenen gruba ve kontrol grubuna göre anlamlı ( $p < 0,05$ ) düzeyde daha fazla bulunmuştur.

En yüksek konsantrasyonda silimarin eklenmiş grup olan 2. grubun % mitokondriyal aktivite değeri 3., 5. ve kontrol grubu olan 6. gruba göre sırasıyla  $p=0,989$ ,  $p=0,997$  ve  $p=0,293$  olmak üzere anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

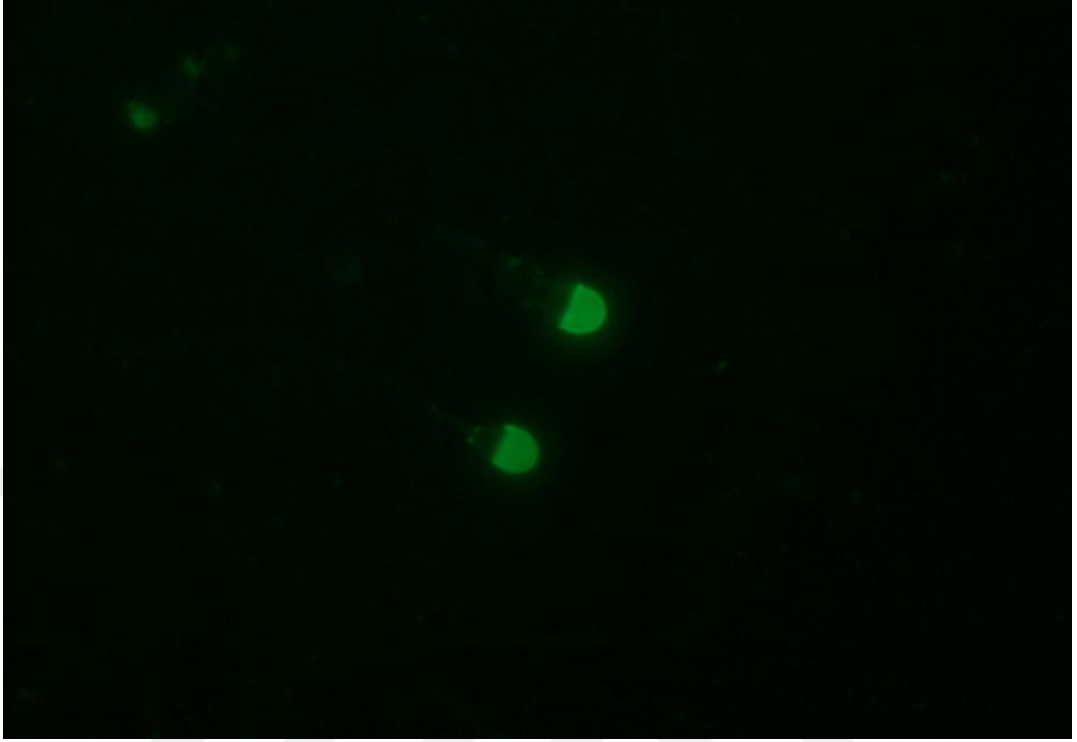
Silimarin eklenmeden kriyopreservasyon işlemi uygulanmış grubun % mitokondriyal aktivite değeri  $23,3 \pm 7,2$  olarak bulunmuş olup en düşük aktivitenin bu grupta olduğu görülmüştür.

### 3.3. Akrozom Bütünlüğünün Değerlendirilmesi

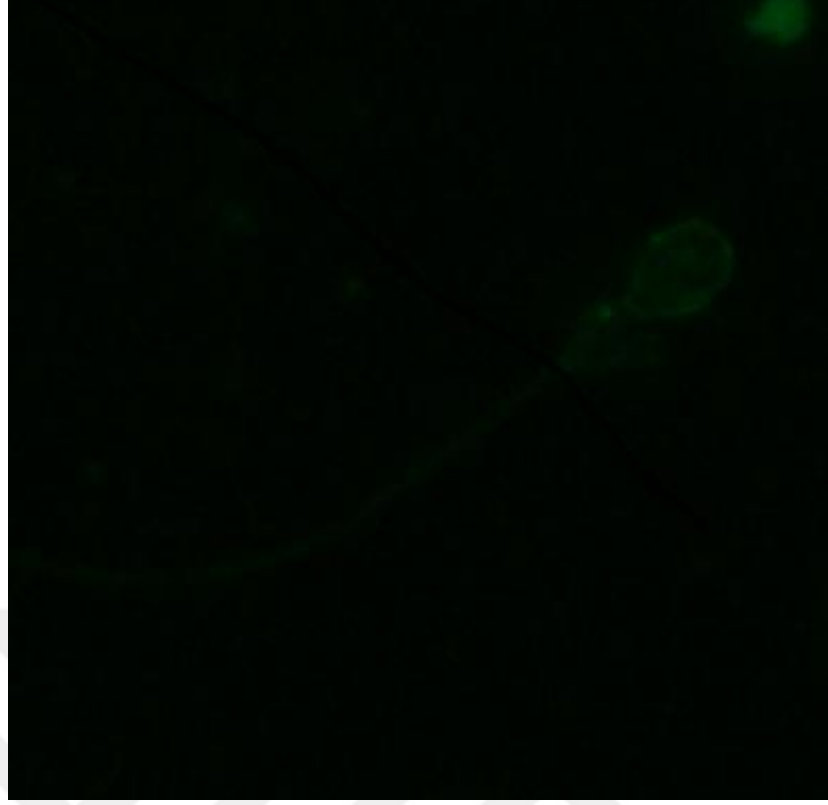
Fluorosein isothiocyanate (FITC) bağlı peanut agglutinin lektini kullanılarak sperm akrozomal membranının bütünlüğü değerlendirilmiştir. Akrozomal membran yapısının bozulması lektinin bağlanmasını azaltmaktadır.

Sonuçlar epifloresan mikroskop altında 100X'lük büyütmede değerlendirilmiş olup akrozomal bütünlüğünü koruyan spermilerin akrozomal kep kısmında yeşil ve parlak floresan görülmüştür ( Şekil 3.5.).

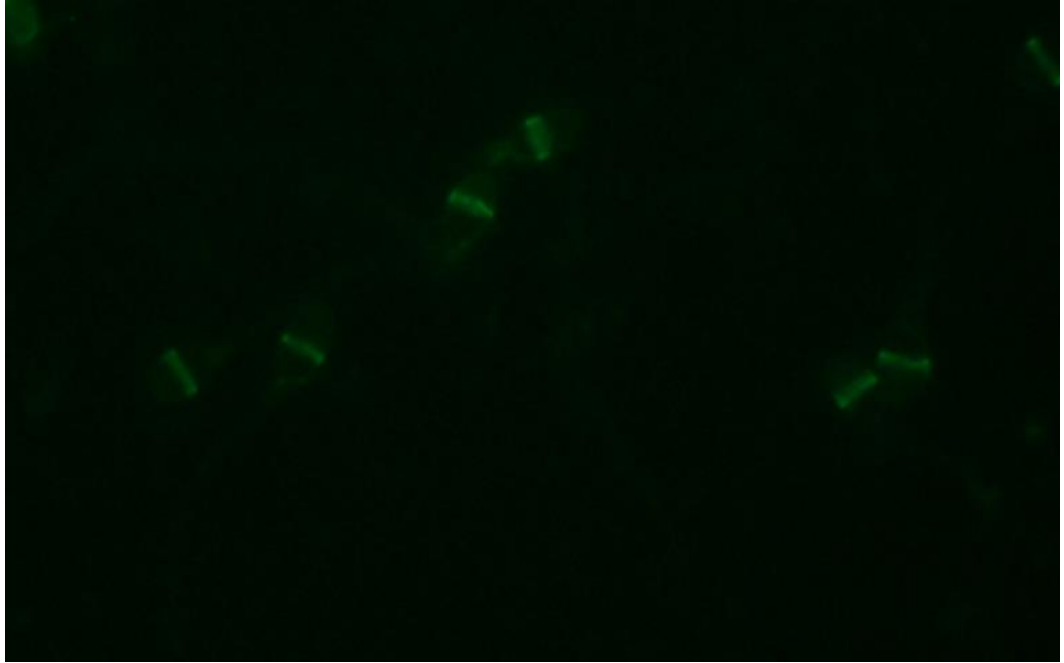
Akrozomal membranı hasarlanan spermelerde ise yalnızca ekvatorial bölgede yeşil floresan ya da hiç boyanmama durumu görülmüştür ( Şekil 3.6.)



**Şekil 3.5.** Akrozomal bütünlüğünü koruyan spermelerin floresan mikroskop görüntüsü. Akrozomal kep kısmında yoğun floresan ışımaya görülmektedir. 100X'lük büyütmede



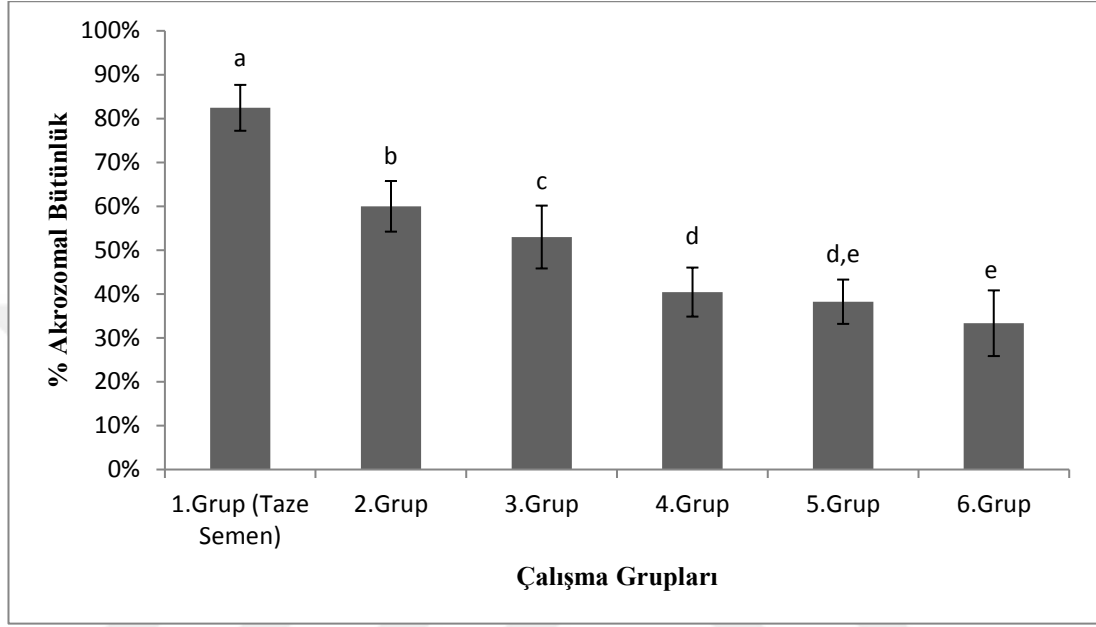
(a)



(b)

**Şekil3.6.** Akrozomal membranı hasarlanan spermelerin floresan mikroskop görüntüsü.  
(a) Çok az boyanma (b) Ekvatorial bölgede floresan boyanma görülmektedir.  
X100'lük büyütmede.

Taze semen örneğinde ki spermelerin  $82 \pm 5,3$ 'ünün akrozomal bütünlüğünü koruduğu görülürken, donma ve çözme işlemi sonrası akrozomal bütünlüğünü koruyan sperm oranı  $33 \pm 7,6$ 'ya düşmüş olup dondurup çözme işlemi sperm akrozomal bütünlüğününün % değerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ( $p < 0,05$ ) azaltmıştır.



**Şekil 3.7.** Donma öncesi ve dondurulup çözülen sperm örneklerinde akrozomal bütünlük yüzdesi. Değerler her grup için  $n=20$  olmak üzere % Akrozomal Bütünlük  $\pm$  Standart sapma olarak verilmiş olup her farklı harf (a,b,c,d,e) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılığı ( $p < 0,05$ ) ifade etmektedir.

Dondurulup çözme sonrası gruplara baktığımızda ise silimarin konstrasyonun artmasıyla spermde akrozomal bütünlüğün korunduğu görülmüştür. En yüksek akrozomal bütünlüğe sahip spermelerin en yüksek silimarin konstrasyonu eklenen grupta (2. grup) olduğu bulunmuş ve  $60 \pm 5,9$  oranında sperm akrozomal bütünlüğünü koruduğu bulunmuştur. Diğer dondurulup çözülen gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0,05$ ) düzeyde farklı olduğu görülmüştür.

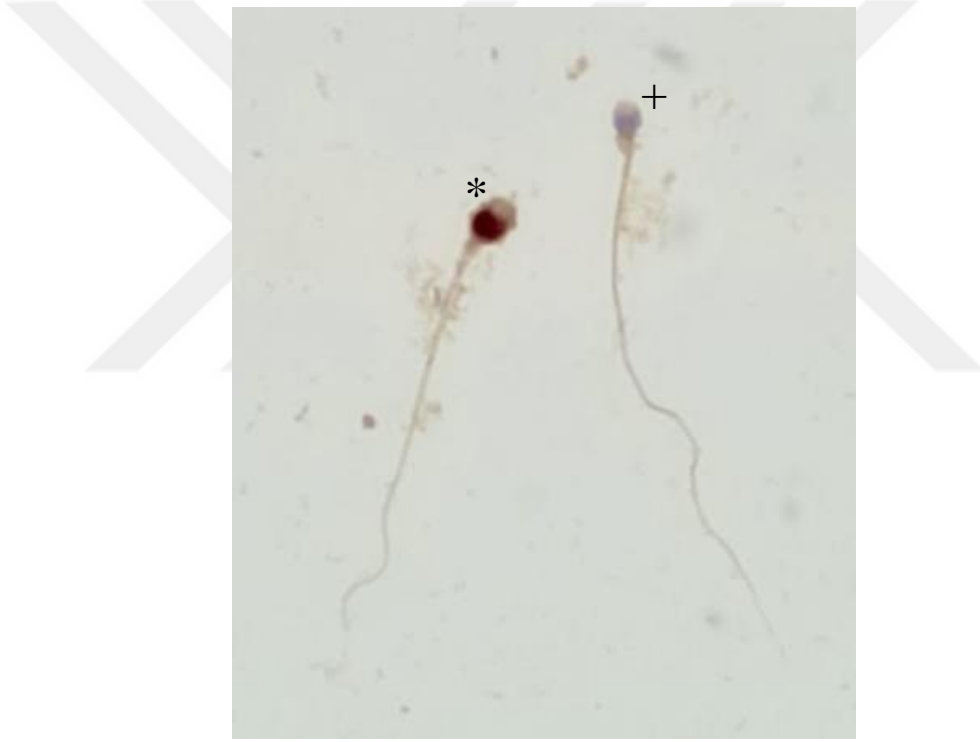
Dondurulup çözülen grupları akrozomal bütünlük açısından birbirleriyle karşılaştırdıklarında 4. ve 5. gruplar haricinde diğer tüm gruplar arasında anlamlı ( $p < 0,05$ ) düzeyde farklılıklar olup, 4.ve 5. gruplar arasında ( $p=0,875$ ) anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.



### 3.4. Apoptozisin Değerlendirilmesi

Kaspaz adı verilen sistein proteazların aktivasyonu ile düzenlenen apoptozis sürecinin tamamlanmasında önemli rol oynayan, efektör kaspaz olan Kaspaz 3 'ün immunhistokimyasal yöntem ile belirlenmesi ile apoptozis değerlendirmesi yapılmıştır.

Anti-Caspase-3 antibody ile yapılan boyama ışık mikroskobu altında incelenmiştir. 100X 'lük büyütmede alınan görüntülerde görüldüğü gibi kahverengi boyanmanın olduğu sperm hücreleri Kaspaz 3 aktivasyonunun varlığını gösterirken, yalnızca mayer hematoksilin ile boyanmış sperm hücrelerinde apoptotik sürecin olmadığını göstermektedir (Şekil 3.9.).

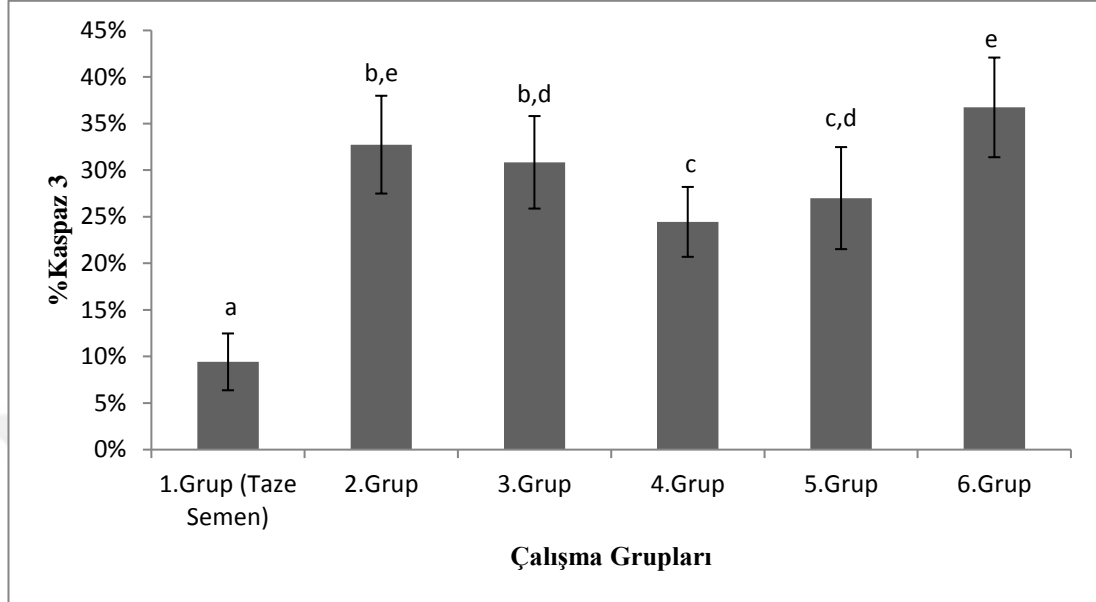


**Şekil 3.8.** İmmünohistokimyasal yöntem ile boyanmış spermin ışık mikroskop görüntüsü. (\*) Kaspaz-3 aktivasyonu görülen sperm, (+) Aktivasyon görülmeyen sperm. X100'lük büyütmede.

Sonuçlar değerlendirildiğinde sperm kriyopreservasyonun hücreyi apoptotik sürece yönlendirdiği görülmüştür.

%  $9,35 \pm 3$  oranında Kaspaz-3 pozitiflik görülen taze semen örneğinin dondurulup çözülmesi sonrasında değeri %  $36,6 \pm 5,3$  oranına yükselmiştir.

Kaspaz-3 aktivasyon yüzdesi taze semen örneği ile kriyopreservasyon yapılan tüm gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ) düzeyde artış olduğu görülmüştür.



**Şekil3.9.** Donma öncesi ve dondurulup çözülen sperm örneklerinde Kaspaz 3 yüzdesi. Değerler her grup için  $n=20$  olmak üzere % Kaspaz 3  $\pm$  Standart sapma olarak verilmiş olup her farklı harf (a,b,c,d,e) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılığı ( $p<0,05$ ) ifade etmektedir.

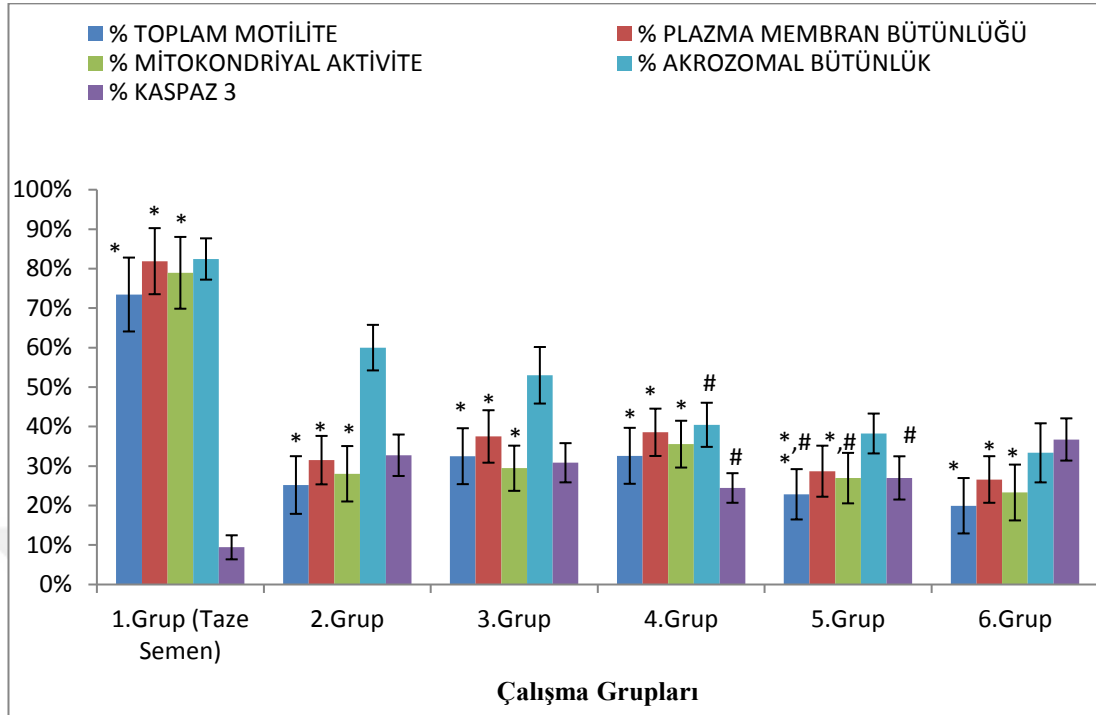
Dondurulup çözülen sperm örneklerine baktığımızda en düşük Kaspaz 3 aktivasyon yüzdesi, 4. grup olan  $100\mu\text{g/ml}$  silimarin eklenerek kriyopreservasyon yapılan grupta görülmüştür.

Bu değer  $24,4\pm 3,7$  olarak bulunmuş olup 5. grup olan  $20\mu\text{g/ml}$  silimarin eklenmiş grup hariç diğer kriyopreservasyon işlemi uygulanmış gruplara göre anlamlı ( $p<0,05$ ) düzeyde düşük bulunmuştur. Grup 4 ve 5 arasında  $p=0,481$  olmak üzere anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.

En yüksek silimarin konsantrasyonu içeren 2. grup ile 4. ve 5. gruplar arasında anlamlı ( $p<0,05$ ) bir farklılık olmakla birlikte, 2. grup ile 3.ve 6. gruplar arasında sırasıyla  $p=0,803$ ,  $p=0,106$  olmak üzere anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

Kriyopreservasyon için kontrol grubu olan 6. grubun % kaspaz 3 değeri  $36,6\pm 5,3$  olup en yüksek değerdir. Bu değer 2. grup hariç diğer tüm gruplar ile anlamlı ( $p<0,05$ ) düzeyde farklılık göstermektedir.

### 3.5. Sperm Parametrelerinin Analizi



**Şekil 3.10.** Gruplara göre sperm parametrelerinin karşılaştırılması Değerler her grup için n=20 olmak üzere Parametre  $\pm$  Standart sapma olarak verilmiş olup her farklı işaret (\*,#) her grup içinde istatistiksel olarak anlamlılığı ( $p < 0,05$ ) ifade etmektedir.

Taze semen ve kriyopreservasyon işleminin uygulanmış olduğu grupların tümünde sperm parametreleri arasında korelasyon analizi yapılmış ve tüm gruplarda motilite, plazma membran bütünlüğü ve mitokondriyal aktivite yüzde değerleri arasında  $p < 0,01$  olmak üzere pozitif yönlü ve anlamlı bir ilişki bulunmuştur.

4. Grubun % motilite, % plazma membran bütünlüğü ve % mitokondriyal aktivite parametrelerinde ki pozitif yönlü korelasyonun yanında, % akrozomal bütünlük ve % kaspaz 3 değerleri arasında  $r = -0,57$ ,  $p = 0,008$  olmak üzere negatif yönlü anlamlı bir ilişki bulunmuştur.

5. grupta ise % kaspaz 3 değeri ile % plazma membran bütünlüğü ve % mitokondriyal aktivite değerleri arasında sırasıyla  $r = 0,569$ ,  $p = 0,09$ ,  $r = 0,544$ ,  $p = 0,13$  olmak üzere pozitif yönlü anlamlı bir ilişki bulunmuştur.

#### 4. TARTIŞMA

Bu çalışma ile semen kriyopreservasyon medyumuna farklı konstrasyonlarda (20 µg/ml, 100 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml) silimarin eklenmesinin, dondurulup çözme sonrası sperm motilitesi, plazma membran bütünlüğü, mitokondriyal aktivitesi, akrozomal bütünlüğü ve Kaspaz 3 aktivasyonu üzerinde olumlu etkiler gösterdiğini tespit ettik.

Bu çalışmanın amacı, kriyopreservasyonu yapılan normal sperm parametresine sahip erkeklerde dondurma ortamına ilave edilen bir antioksidanın kriyohasar oluşumunu en aza indirgeyerek, çözülme sonrası sperm parametreleri üzerinde olumlu etkiye sahip olup olmadığını belirlemektir.

Memeli spermatozası, başarıyla kriyoprezervasyonu yapılan ilk hücrelerden biridir (Talaie-Khozani ve ark 2010). Spermanın dondurulması, vazektomi uygulanan erkekler için ve HIV ve hepatite karşı seronegatiflik düzeltilinceye kadar verici spermanın depolanması için, yardımcı üreme, radyasyon veya kemoterapi tedavisi de dahil olmak üzere çeşitli durumlarda rutin olarak kullanılır. Testiküler sperm ekstraksiyonu yapılan azospermik hastalardan alınan spermlerin depolanmasında da kullanılır. İntrauterin inseminasyon, in vitro fertilizasyon ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu gibi ileri düzeyde yardımcı üreme tekniklerinde kullanılması için sperm depolanması önemli bir doğurganlık rezervi sağlar.

Hücreler, hem donma hem de çözme işleminde şiddetli strese maruz kalırlar (Talaie-Khozani ve ark 2010). Kriyoprezervasyon, sperm plazma zarında aşırı lipid peroksidasyonuna neden olabilir ve numunelerin oksijen radikal konsantrasyonunda genel bir artışa neden olabilir. Yüksek ROS konsantrasyonlarına maruz kalma, sperm hareketliliğini ve canlılığı, DNA bütünlüğünü, servikal mukusa penetrasyonunu ve akrozomal yapıyı bozar (Critser ve ark 1987, Taylor ve ark 2009, Thomson ve ark 2009).

ROS'un zararlı etkilerine karşı koymak için spermatozoa ve seminal plazma, ROS'u temizleyen ve iç hücresel hasarı önleyen bir takım antioksidan sistemler içerir. Antioksidan sistemler enzimatik ve enzimatik olmayan moleküllerden oluşur (Branco ve ark 2010, Gadea ve ark 2011). Enzimatik antioksidan savunma mekanizmaları glutatyon peroksidaz/redüktaz sistemi, süperoksit dismutaz ve katalaz

içerirken, enzimatik olmayan antioksidanlar indirgenmiş glutatyon, ürat, askorbik asit, vitamin E, karotenoidler, ubikinonlar, taurin ve hipotaurin içerir (Alvarez ve Storey 1989).

Dondurma ortamına antioksidan moleküller, enzimler veya her ikisinin eklenmesi çözme sonrası spermatozoa'nın sağkalım ve DNA bütünlüğünü iyileştirir (Kalthur ve ark 2011). Antioksidanlar sadece diyet takviyeleri olarak değil, aynı zamanda sperm oksidatif stresinin olumsuz etkilerini gidermek için in vitro kültür ortamında da kullanılmaktadır. Örneğin askorbat, genistein, katalaz, ve E vitamini gibi antioksidan bileşikler, semen dondurma protokollerinin geliştirilmesi için kullanılmıştır (Taylor ve ark 2009, Thomson ve ark 2009, Martinez-Soto ve ark 2010, Gadea ve ark 2011).

Sperm kriyopreservasyonu prosedürlerinin geliştirilmesi, çözme sonrası elde edilen spermin kalitesini arttırmak için oldukça önemlidir. Bu bağlamda yapılan çalışmalar arasında dondurma ortamına ilave maddelerin eklenmesi ile eklenen maddenin özelliği ve konstrasyonuna bağlı olarak kriyopreservasyon başarısında artış görülmüştür.

Literatüre baktığımızda bununla ilgili birçok çalışma yapılmıştır.

Yapılan ilk çalışmalar seminal plazma proteinlerinin ortama eklenmesi ile başarının artırılmaya çalışılması üzerine olmuştur. Bu proteinlerin ortama eklenmesi ile sperm hareketliliği, akrozom ve membran bütünlüğü ve ROS düzeyinde değişiklikler görülmüştür. Ancak başarıdaki artış eklenen seminal plazmanın hacmine, kullanılan medyuma ve inkübasyon sıcaklığına bağlı olarak değişmektedir (Fraser ve ark 2007).

Son yıllarda yapılan başka bir çalışmada kolesterolün (kolesterol yüklü siklodekstrinler, CLC) siklodekstrin partiküllerine yüklenerek ortama eklenmesi ile plazma membranındaki kolesterol miktarları artırılmaya çalışılmıştır (Purdy ve Graham 2004). Elde edilen sonuçlara göre sperm plazma membranının stabilitesinin arttığı, membran ve akrozom bütünlüğünün korunduğu görülmüştür. Bununla birlikte,  $500 \times 10^6$  sperm başına 12.5 mg CLC'den yüksek konsantrasyonlarda CLC eklenmesinin sperm motilitesine zararlı bir etkisi olduğu için, çözündürme ortamına

CLC'nin dahil edilip edilmeyeceğini araştırmak için daha fazla araştırma yapılması gerekli olduğu düşünölmüştür (Tomás ve ark 2011).

Dondurucu medyumuna aljinat ilavesi ile çözünme sonrası sperm kalitesi arttırılmaya çalışılmış (Hu ve ark 2014).Eklenen aljinatın sperm akrozom bütönlüğünü iyi koruduğu, SOD ve glutasyon peroksidaz aktivitelerini arttırdığı ve dondurulup çözöldükten sonra malondialdehit seviyesini düşürdüğu gözlenmiştir.

Yeni bir strateji olarak kriyoprezervasyon medyumuna, donma prosedürlerinin zararlı etkilerine karşı koyan proteinlerin eklenmesi ile çözölme sonrası sperm parametrelerinde olumlu sonuçlar elde edilmesi beklenmiştir. Örneğin, ısı şok 70 kDa protein 8'in (HSPA8) oviduktteki sperm sağkalımını uzattığı ve sperme yanıt olarak oviduktal tek katlı tabakalarda upregüle olduğu bilinmektedir (Elliott ve ark 2009, Yeste ve ark 2014).

Bu proteinin sperm sağkalımını sürdürmesini sağladığı mekanizma, sperm plazmalemmasının akışkanlığını ve stabilitesini korumak için olan yeteneği ile ilgilidir. Burdan yola çıkarak, sığır, rekombinant HSPA8'in donma ve çözme ortamına eklenmesinin, çözölme sonrasında sperm sağkalımını arttırdığı gösterilmiştir (Holt ve ark 2015).

Kriyoprezervasyon ortamının antioksidanlarla desteklenmesi pozitif sonuçlar ile rapor edilmiştir.

Melatonin ilavesinin antioksidan özelliğide göz önüne alındığında dondurulmuş çözölmüş semende, sperm canlılığını ve motilitesini geliştirdiği ve çözölme sonrası lipid peroksidasyonunu azalttığı bildirilmiştir (Succu ve ark 2011)

E vitamini ve insölin büyüme faktörü I (IGF-I) eklenmesinin de sperm canlılığı, hareketliliği ve MDA seviyesi üzerinde olumlu etkiler gösterdiği görölmüştür (B. ve ark 2013).

Yine başka çalışmalarda donma ortamına E vitamini, hipotaurin ve doğal antioksidanların (örneğin; *Opuntia ficus-indica*'dan elde edilen doğal antioksidan) takviyesi ile sperm motilitesini arttırırken, DNA fragmantasyonunu azalttığı görölmüştür (Taylor ve ark 2009, Meamar ve ark 2012, Brugnon ve ark 2013).

Çalışmalarda pozitif etkileri görülen diğer antioksidanlar L-sistein,  $\alpha$ - tokoferol, Lutein, Bütillenmiş hidroksitoluen, Trolox ve Askorbik asittir (Roca ve ark 2004, Chanapiwat ve ark 2009, Jeong ve ark 2009, Kaeoket ve ark 2010, Satorre ve ark 2012, Giaretta ve ark 2015, Varo-Ghiuru ve ark 2015).

Sperm dondurma ve çözme ortamlarına GSH ilavesinin, çözülme sonrasında sperm kalitesini arttırdığı, nükleoprotein yapısını stabilize ettiği ve hem in vivo hem de in vitro dölleme yeteneğini geliştirdiği görülmüştür (Gadea ve ark 2005, Yeste ve ark 2013, Estrada ve ark 2014, Yeste ve ark 2014, Yeste ve ark 2015). İnsan sperminde dondurucuda eritildikten sonra GSH içeriğinde% 64'e kadar bir azalma vardır, bu da antioksidan savunma sisteminin sperm kriyoprezervasyonuna meydan okuduğunu göstermektedir(Gadea ve ark 2011). Ayrıca, donma ve çözme ortamına GSH eklenmesi ROS düzeylerini düşürdüğü ve insan sperminin motilitesini geliştirdiği görülmüştür (Gadea ve ark 2011).

Reaktif oksijen türevlerinin yarattığı bu hasarları azaltabilmek adına kriyoprezervasyon sırasında semen sıvısına dışarıdan antioksidan eklenerek sperm kalitesi arttırmaya yönelik yaptığımız bu çalışmamızda antoksidan olarak silimarin seçilmiştir.

Silymarin (SM), Silybum marianum (deve dikeni) bitkisinden elde edilen C25 içeren flavonoid karışımıdır. Silimarinin serbest radikalleri süpüren güçlü bir antioksidan olduğu ve hücre lipid peroksidasyonuna karşı iyi bir koruma sağladığı bilinmektedir (Zi ve diğerleri 1998).

Literatüre baktığımızda silimarin ve onun aktif formu silibinin serbest radikalleri direkt olarak temizlediğini gösteren birçok çalışma mevcuttur. Silibinin ile insan trombositleri, beyaz kan ve endotel hücreleri ile yapılan bir çalışmada ROS ve eikozanoidlerin oluşumu üzerindeki etkisi araştırılmıştır (Rickling ve ark 1995) Silibinin insan granülosit hücrelerinde güçlü bir HOCl (IC 50 7  $\mu$ M) temizleyicisi olduğu gösterilmiştir. Aynı şekilde, silibinin rat karaciğer kupffer hücreleri ile yapılan bir çalışmada da  $O_2^-$  ve  $NO^-$  üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir (Dehmlow ve ark 1996, Dehmlow ve ark 1996).

Aslında, Silybin'in süperoksit anyon temizleme kabiliyeti bulunmamasına karşın, hem aracılı düşük dansiteli lipoprotein (LDL) oksidasyonunu önemli

derecede azaltabildiği (20 µM'de) ve hidroksil radikal oluşumu inhibe ettiği göstermiştir (Varga ve ark 2006).

Başka bir in vitro çalışmada ise serbest radikal temizleme aktivitesi ve antioksidan özellikleri (>200 µM) dört farklı deneyle gösterilmiştir (Asghar ve Masood 2008). Saf silimarin bileşiklerinin serbest radikal temizleme aktivitesinin kayda değer ölçüde değiştiği, silidianin ve silikristinin, silibinden 2-10 misli daha aktif olduğu ve kütle esasına göre SM'nin silibinden yaklaşık 8 kat daha güçlü serbest radikal temizleyici olduğu gösterilmiştir (Dvořák ve ark 2003).

Silimarinin hücredeki serbest radikal üretimin ana kaynağı olan mitokondri üzerine koruyucu etkileri olduğunu gösteren birçok çalışma da mevcuttur. Mitokondri hücrede, oksijenin birincil tüketildiği ve tekli elektronları oksijene transfer edebilen çok sayıda redoks enzimi içeren ve ROS süperoksitini ( $O_2^-$ ) üreten kısımdır. ROS ürettiği bilinen mitokondriyal enzimlerin başında, trikarboksilik asit (TCA) döngüsü enzimleri olan akonitaz ve  $\alpha$ -ketoglutarat dehidrojenaz; elektron taşıma zinciri (ETC) kompleksleri I, II ve III; piruvat dehidrojenaz ve gliserol-3-fosfat dehidrojenaz; dihidroorotat dehidrojenaz; monoamin oksidazlar (MAO) A ve B ve sitokrom b5 redüktaz gelmektedir.

Mitokondride oluşabilecek herhangi bir hasar, oksidatif stresin artışına ve ROS üretimi ve temizlenmesi arasında dengesizliğe neden olarak net ROS üretiminde artışa neden olur. Üretilen bu ROS, proteinlerin modifikasyonlarına, lipid peroksidasyonuna ve sonuçta mitokondriyal disfonksiyon ile sonuçlanan mitokondriyal DNA hasarına neden olabilir (Sekine ve Ichijo 2015). Birçok çalışma ROS'un zararlı etkileri üzerine odaklanmıştır ve şu anda mitokondriden üretilen ROS'un, hücrenin strese girmesine neden olan hücre içi sinyal iletim yollarının düzenlenmesinde de yer aldığı iyi bilinmektedir (Calabrese ve ark 2010).

Oksidatif stresin azalmasından sorumlu olan mekanizmalardan birisi, SM / silibinin'in mitokondriyal yapı ve fonksiyonu üzerindeki koruyucu etkisidir. Aslında SM, hücre içi sinyalleri tetikleyerek mitokondriyi patolojik olaylardan korur. Örneğin, silibininin, elektron taşıma zincirini optimize ettiği, elektron sızıntısını ve ROS oluşumunu azalttığı ve doğrudan mitokondride ROS üreten enzimlerin etkinliğini azalttığı gösterilmiştir.



Rat karaciğer hücresi ile yapılan bir çalışmada ise silibinin ilavesinin, SOD aktivitesini arttırdığı ve mitokondriyal membran potansiyelini düzenlediği ve mitokondriyal disfonksiyonunu ve hücre hasarını önlediği gösterilmiştir (Rolo ve ark 2003).

Başka bir çalışmada ise Silibinin, 10 µM kadar düşük bir konsantrasyonda bile, perfüze edilmiş sıçan hepatositlerinde metabolik akışa dayalı ROS oluşumundaki artışı azalttığı gösterilmiştir. Ek olarak, izole karaciğer mitokondriyolojisi üzerine yapılan çalışmalar, bu düşük doz silibinin elektron transfer zinciri aktivitesine bağlı olarak ROS üretimini baskıladığını ortaya koymuştur (Detaile ve ark 2008).

Sıçan karaciğerinin soğukta tutulması ve sıcak reperfüzyonu ile ilgili yapılan bir çalışmada lipid peroksidasyonu arttırdığı ve süperoksit anyon oluşumuna sebep olduğu ve GSH ve mitokondriyal ATP içeriğini azalttığı görülmüştür. Bununla birlikte, silibinin (100 µM) eklenmesiyle bu parametrelerin iyileştiği gözlenmiştir (Ligeret ve ark 2008).

Silimarinin güçlü antioksidan özelliği kullanılarak sperm kriyopreservasyon başarısında artışına yönelik literatürde çok az çalışma vardır ve yalnızca hayvalar ile denenmiştir. Roostaei-Ali Mehr ve Parisoush (2016) ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada farklı konsantrasyonlarda silimarin ve kaproik asit eklenmiş koç semeninin saklanması araştırılmıştır. Sperm canlılığı, hareketliliği, membran bütünlüğü ve melondialdehit seviyeleri araştırıldığında sonuçlar silimarinin sperm kalitesini arttırdığı gözlenmiştir. Purdy ve ark (2004) yaptığı bir çalışmada ise keçi sperminin saklanması sırasında eklenen silimarin ve kateşin flavonoidlerinin sperm hareketliliğine etkisi araştırılmıştır. Çalışmamız literatürde daha önce insan spermi kriyopreservasyonunda silimarinin kullanılması ile ilgili bir çalışma bulunmadığından bu alanda öncül nitelik taşımaktadır.

Motilite, spermatozoa'nın fertilizasyon kapasitesini belirleyen en önemli özelliklerden biridir (Branco ve ark 2010). Yüksek ROS yoğunluğuna maruz kalınması mitokondriyal ve plazma membranlarının bozulmasına, kromozomal ve DNA parçalanmasına ve sperm hareketliliğinde azalmaya neden olur (Baumber ve ark 2003).

Çalışmamızın ilk basamağında 20 normospermik erkek bireyden toplanan semen örnekleri, donma öncesi ve dondurulup çözme sonrası karşılaştırması yapılarak kriyopreservasyonun hücreye verdiği hasar tespit edilmiştir.

Sonuçlara baktığımızda literatüle uyumlu olarak motilite ve plazma membran bütünlüğü parametreleri soğuktan olumsuz yönde etkilenmiştir. Toplam % motilite değeri taze semende  $73 \pm 9,6$  iken dondurup çözme sonrası  $20 \pm 7,2$ 'ye düşmüştür. Taze semende plazma membran bütünlüğü yüzdesi  $82 \pm 8,5$  iken dondurulup çözme işlemi sonrası  $27 \pm 6$  kadar inmiştir. Ortama farklı konstrasyonlarda silimarin eklenerek çözülme sonrası bu oranlar arttırılmaya çalışılmıştır. Beklenildiği gibi kriyopreservasyon işlemi uygulanmış ve silimarin eklenmiş gruplar hiç silimarin eklenmeyen gruplara göre daha iyi sonuçlar vermiştir.

Motilite ve plazma membran bütünlüğünün korunması için en uygun konstrasyonların  $100 \mu\text{g/ml}$  ile  $500 \mu\text{g/ml}$  arasındaki silimarin olduğu görülmüştür.  $100 \mu\text{g}$  ve  $500 \mu\text{g}$  silimarinin ortama eklenmesi aynı etkiyi göstermiş olup aralarında anlamlı ( $p < 0,05$ ) düzeyde bir fark görülmemiştir.  $20 \mu\text{g/ml}$  silimarin konstrasyonlarında da bu parametreler için iyileşme söz konusudur ancak bu fark kontrol grubu olan hiç silimarin eklenmeyen gruba göre anlamlı ( $p < 0,05$ ) düzeyde bulunmamıştır.

Kriyokoruyuculuk için  $20 \mu\text{g/ml}$  silimarin yeterli bir miktar olarak görülmemiştir.  $1000 \mu\text{g/ml}$  silimarin konstrasyonu ise motilite ve plazma membran bütünlüğü parametreleri için  $20 \mu\text{g/ml}$  silimarin eklenmiş grup ve kontrol grubuyla arasında anlamlı ( $p < 0,05$ ) düzeyde bir farklılık bulunmamıştır. ROS'un zararlı etkisini azaltmak için optimum konstrasyonu uygulamak oldukça önemlidir.

Mitokondrinin apoptozun kontrolünde önemli bir rolü olduğu gibi aynı zamanda enerji üretimi, redoks durumunun modülasyonu, ozmotik regülasyon ve  $\text{Ca}^{2+}$  homeostazı gibi farklı hücresel işlevlerde ana rol oynar (Rasola ve Bernardi 2007). Kriyoprezervasyon, hücre içi  $\text{Ca}^{2+}$  konsantrasyonlarındaki değişikliklerle birlikte oksidatif ve ozmotik streslerle ilişkili olduğundan, mitokondrinin kriyohasar oluşumunda büyük etkisi vardır. Daha önce manda, boğa, insan ve at sperm hücrelerinde olduğu gibi normal spermilerin dondurulup-çözülmesinden sonra

mitokondriyal membran potansiyelinde aşırı bir azalma (erken apoptoz benzeri fenomen) tespit edilmiştir (Paasch ve ark 2004, Ortega-Ferrusola ve ark 2008).

Mitokondriyal aktivite, önceki çalışmalara göre doğrudan sperm motilitesi ile ilişkilidir (Gravance ve ark 2000, Espinoza ve ark 2009). Mitokondriyal ATP üretimi ve dolayısıyla mitokondriyal membran potansiyeli kriyopreservasyondan olumsuz bir şekilde etkilenebilir. Dondurma ortamına antioksidan maddeler eklenerek mitokondriyal bütünlük korunmaya çalışılmıştır.

Bu alanda yapılan çalışmalardan biri, Trolox'un dondurma medyumuna eklenmesi ile domuz sperminin mitokondriyal aktivitesi üzerinde doza bağımlı bir koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir (Peña ve ark 2003) . Aynı maddenin 60 ve 120  $\mu\text{M}$ 'lik konsantrasyonlarda koç sperminin kriyoprezervasyon ortamına ilave edilmesiyle mitokondriyal bütünlüğün korunduğu gözlenmiştir (Silva ve ark 2012). Ancak, milimolar aralıktaki Trolox'un mitokondriyal aktivitede azalmaya neden olduğuda görülmüştür .

Antioksidan ilavesinin dondurup çözme prosedürünün kritik aşamaları esnasında hücre içi yollara müdahale ederek olumsuz bir etki yaratmasında mümkündür. Bizim çalışmamızda silimarinin mitokondri üzerinde sperm kriyopreservasyon işlemi sırasında oluşabilecek hasara karşı koruyucu etkisi araştırılmıştır. MitoTracker Red Fm kullanılarak mitokondriyal membran potansiyeli ölçümü yapılmıştır. Dondurup çözme işlemi, taze semen ile karşılaştırıldığında, mitokondriyal membran potansiyeli oldukça azalmıştır. Bu etkiyi azaltmak adına farklı konsantrasyonlarda eklenen silimarinin en etkin olduğu konsantrasyon aralığının 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  - 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  olduğu görülmüştür.

% mitokondriyal aktivite değerlerine baktığımızda diğer konsantrasyonlarda (1.000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ve 0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) eklenen silimarinin mitokondriyal aktiviteye etkisi  $p>0,05$  olmak üzere anlamlı bir farklılık içermemektedir. Bulunan değerler daha önce belirtildiği gibi motilite ve plazma membran bütünlüğünde olduğu gibi en uygun konsantrasyon aralığının 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  - 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  olduğunu göstermiş olup 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  silimarinin kriyohasarı engellemek adına yetersiz kaldığı, 1.000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  silimarinin ise muhtemelen osmolariteyi etkileyerek hücre yolaklarını baskılayıp negatif etki gösterdiği sonucuna varılabilir.

Yapmış olduğumuz pearson korelasyon analiziyle de tüm gruplar için sperm parametrelerinde  $p < 0,01$  olmak üzere pozitif yönlü ilişki bulunmuş olup motilite, plazma membran bütünlüğü ve mitokondriyal aktivitenin sıkı ilişkisi gösterilmiştir.

Kriyoprezervasyon, prematüre kapasitasyon veya akrozom reaksiyonlara neden olur. Akrozomal bütünlüğü olumsuz yönde etkiler. Antioksidan ilavesi ile akrozomal bütünlüğün korunması için yapılan bazı çalışmalarda, örneğin; Dondurulmuş çözülmüş tavşan, boğa ve keçinin spermatozoası ve  $5^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutulmuş koyun spermatozoa'sında eklenen antioksidanın canlılık ve akrozom bütünlüğünü arttırdığı gösterilmiştir (Tuncer ve ark 2010, Sarıözkan ve ark 2014). Bazı bulgular ise dondurma ortamına quercetin eklenmesinin sperm yaşayabilirliği ve akrozom bütünlüğü üzerinde herhangi bir etki göstermediği yönündedir ( $P > 0.05$ ). Quercetin flavonoidlerinden biridir ve iki değerlikli katyonları şelatlayıp temizleyerek serbest radikal oluşumunu önleme ve böylece hidrosil radikallerinin oluşumunu sınırlama özelliği sayesinde antioksidan koruma sağladığı bilinmektedir. Yine de, Gibb ve ark (2013) ve Silva ve ark (2012) kriyoprezervasyon öncesi quercetin eklenmesinin sperm yaşayabilirliği veya akrozom bütünlüğünü önemli ölçüde etkilemediğini ve bu da quercetin'in antioksidan etkisinin bu kalite özelliklerini kapsamadığını düşündürmektedir.

Literatürde yer alan bu değişik verilere göre akrozomal bütünlükte dahil tüm sperm parametrelerinin kriyohasara karşı korumada eklenen maddenin türüne bağlı olarak değişken sonuçlar elde edilebileceği sonucuna varılmaktadır. Bizim çalışmamızda silimarinin akrozomal bütünlük üzerine etkisinde motilite, membran bütünlüğü ve mitokondriyal aktiviteden farklı olarak silimarin konsantrasyonunda ki artışın akrozomal membran bütünlüğünde oldukça iyi koruma sağladığı gözlenmiştir. Diğer parametrelerde görülen optimum konsantrasyon aralığı olan  $100-500 \mu\text{g/ml}$ , akrozomal bütünlük için geçerli bulunmamıştır.  $1.000 \mu\text{g/ml}$  silimarin eklenen ortamın sperm akrozomal bütünlüğünü en yüksek düzeyde koruduğu görülmüş olup değer  $\%60 \pm 5,9$  olarak bulunmuş ve bu değer diğer silimarin eklenen gruplara göre anlamlı ( $p < 0,05$ ) düzeyde artmış olduğu görülmüştür.

Daha önce yapılan çalışmada ortama silimarin eklenerek  $5^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan spermler üzerinde  $100 \mu\text{g/ml}$  silimarinin akrozomal bütünlüğü en yüksek düzeyde

koruduğu bulunmuştur(Silva ve ark 2012). Yapılan bu çalışmada donma işlemi uygulanmamış yalnızca soğukta saklama yapılmıştır ve koç spermleri kullanılmıştır.

Literatürde yer alan bu bilgi ile bizim bulgularımız arasındaki farklılıkların sebebi, uygulanan saklama işleminin farklılığı ve kullanılan spermin kaynağının farklılığı olabilir.

Hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda, kriyoprezervasyonun, mitokondriyal membran potansiyeli, kaspaz aktivasyonu, membran geçirgenliği ve fosfatidilserinin translokasyonu gibi apoptoz bulgularını arttırdığı görülmüştür.

Bir çalışmada, kriyoprezervasyonun Kaspaz 3, 8 ve 9'un aktivasyonu ile anlamlı olarak ilişkili olduğunu ve mitokondriyal membran potansiyelinin bozulduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, DNA fragmentasyonunda önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir (Paasch ve ark 2004).

Benzer şekilde, hastadan ve sağlıklı donörlerden toplanan örneklerin kriyoprezervasyonu, membran yüzeyinde fosfatidilserin translokasyonu gösteren spermatozoa yüzdesinde bir artışa neden olurken, bu artış DNA bütünlüğünde önemli bir değişiklik ile ilişkili bulunmamıştır (Duru ve ark 2001).

Genel olarak, kriyoprezervasyon sırasında sperm DNA fragmentasyonunun ortaya çıkışı açıklığa kavuşturulamamaktadır. Mevcut yeni çalışmalar, sperm DNA fragmentasyonunun, kaspazların ve apoptozun aktivasyonu yerine, kriyoprezervasyon sırasında oksidatif stresin artışı ile ilişkili olduğunu ileri sürmektedir (Thomson ve ark 2009).

Kriyoprezervasyon sırasında ortaya çıkan mitokondriyal membran akışkanlığındaki değişiklik ROS salınımına yol açacaktır. Daha sonra, salınan ROS, yüksek sıklıkla tek ve çift sarmal DNA kopmaları olan sperm hücrelerinde DNA hasarına neden olur.

Çalışmalar ile spermatozoanın kriyoprezervasyonu ve çözülmesi sırasında ROS üretimi süreci iyi gösterilmiştir. Hem insan spermleri hem de seminal lökositler tarafından ROS üretiminin 4°C'ye soğumada arttığı bildirilmiştir (Wang ve ark 1997). Dolayısıyla, lökositleri içeren dondurularak saklanan semen örnekleri, DNA parçalanmasına daha yatkın olabilir. Buna ek olarak, kriyoprezervasyon işleminin,

sperm hücrelerinin antioksidan aktivitesini azalttığı ve ROS ile oluşturulan hasara daha duyarlı hale geldiğini gösterilmiştir (Lasso ve ark 1994).

Sperm DNA fragmentasyonunun oluşumu, kriyoprezervasyonun sonucu olmayabilir, ancak çözünme ile daha fazla ilişkili olabilir. Sperm DNA fragmentasyonunun zamanla hızlı bir şekilde artması, çözünmeden sonraki ilk 4 saat boyunca en yüksek oranda görülmüştür. Bu nedenle, çözünmüş sperm örnekleri klinik ortamda olabildiğince çabuk kullanılmalıdır (Gosalvez et al., 2009).

Dondurulmuş ile taze spermler kıyaslandığında, kriyoprezervasyonun aktive edilmiş pan-kaspazların yüzdesinin %21'den % 47'ye arttırdığı görülmüştür. İlginç bir şekilde, aktive edilmiş kaspaz konsantrasyonu artan gliserol konsantrasyonu ile %7'den %14'e pozitif korelasyon göstermiştir (Grunewald et al., 2005). Ek olarak, kriyoprezervasyon sonrası sağlıklı donörlerde aktive edilmiş Kaspaz-1'in, infertilite hastalarında Kaspaz-8'in ve hem hasta hem de donör gruplarda Kaspaz-9'un önemli miktarda arttığı gösterilmiştir (Wünderlich ve ark 2006).

Spermatozoa'daki apoptozun derecesi, kullanılan kriyoprotektan tipi ve uygulanan protokollerle ilişkili görünmektedir. Farklı kriyoprezervasyon protokollerinin uygulanmasından sonra fosfatidilserin hücre zarı dış yüzeyine translokasyonunu değerlendirmek için annexin V bağlaması kullanılmaktadır. Annexin V negatif spermatozoa yüzdesi, TEST-yolk buffer ile dondurulmuş olarak saklanan spermatozoada en yüksek bulunmuş. Kriyo-şokuna maruz bırakılan spermlerde (hiçbir kriyoprotektan olmayan) annexin V bağlanması en yüksek oranda görülmüştür (J Glander ve Schaller 1999).

Benzer şekilde, %14 gliserol uygulaması, %7 gliserolden daha yüksek miktarda aktive edilmiş kaspaz ile sonuçlanmıştır. Bu nedenle, gliserolün, sperm kriyoprezervasyonu sırasında mitokondriye toksik etkisi yoluyla doğrudan kaspaz aktivasyonuna katkıda bulunabileceği düşünülmüştür (Wünderlich ve ark 2006).

DNA'nın fragmente olması apoptotik sürece girmiş hücrelerde CAD (caspase activated DNaz -kaspazla aktiveleşen deoksiribonükleaz-) enzimi tarafından DNA'nın nükleozom birimlerine ayrılmasıyla gerçekleşir. CAD normal hücrelerde ICAD'a (inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease-kaspazla aktiveleşen deoksiribonükleaz inhibitörü- DNA fragmentasyon faktör 45) bağlı inaktif formda

bulunur. Apoptoz sürecinin başlamasıyla sinyal alan hücrelerde Kaspaz 3 tarafından CAD'lar aktive edilir ve DNaz (endonükleaz) olan bu enzim çekirdek DNA'sının hızlı biçimde 180-200 baz çiftlik nükleozomal birimlerine ayrılmasını sağlar (Sakahira ve ark 1998).

İnsan spermatozadaki apoptoz mekanizmaları tam olarak anlaşılamamış olsa da spermatozadaki kaspazların varlığı hücrel apoptoz için en iyi belirteçlerden biridir. Efektör kaspaz olan Kaspaz-3 aktivasyonu apoptotik kaskadtaki en önemli kaspazlardan olup hücre ölümü geri dönüşümsüz olarak indüklemektedir. Bu yüzden çalışmamızda apoptozis değerlendirmesi için yalnızca apoptotik hücrelerde oluşan Kaspaz 3 'ün immunhistokimyasal boyama metodu uygulanmıştır.

Dondurup çözme işleminin Kaspaz 3 yüzdesini anlamlı ( $p<0,05$ ) derecede arttırdığı gözlenmiştir. Taze semende Kaspaz 3 yüzdesi  $9,25\pm 3$  bulunmuş olup, dondurup çözme işleminde bu değer  $36\pm 5,3$ 'e yükseldiği görülmüştür. Kaspaz 3 yüzdesinde ki bu artışın kriyopreservasyon işleminin apoptotik süreci anlamlı derecede tetiklediğini kanıtlamıştır. Literatüre baktığımızda kullanılan kriyokoruyucunun türüne göre Kaspaz 3'ün aktivasyonu azaltılmaya çalışılmış ve sonuçların bazılarında koruyucu etki görülmezken, bazılarında azalış tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda eklenen silimarin'in konstrasyon bağımlı olarak Kaspaz 3 yüzdesinde kontrol grubuna göre azalış görüldüğü tespit edilmiştir.

Kaspaz 3 yüzdesinde azalışı en iyi gördüğümüz, optimum konstrasyonlar  $20\mu\text{g/ml}$  ve  $100\mu\text{g/ml}$  olarak bulunmuştur ve aralarında anlamlı ( $p<0,05$ ) bir farklılık bulunamamıştır. Diğer konstrasyonların Kaspaz 3 yüzdesinde ki etkisi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir etki göstermediği görülmüştür.  $500\mu\text{g/ml}$  silimarin takviyesinin  $1000\mu\text{g/ml}$  silimarin eklenen gruba göre % kaspaz 3 değeri daha az çıkmış olsada  $p=0,803$  olmak üzere anlamlı bir farklılık içermemektedir.  $1000\mu\text{g/ml}$  gibi yüksek konstrasyonda silimarin Kaspaz 3 yüzdesinde önemli bir azalış sağlayamamış olup etki göstermemiştir.  $1000\mu\text{g/ml}$  silimarin içeren grubun % Kaspaz 3 değeri kontrol grubuna göre daha fazla çıkmamış olması silimarinin herhangi toksik etki yaratıp hücreyi apoptozise sürüklediğini göstermiştir. Bu sonucun ortama eklenen yabancı bir madde olan silimarinin ters bir etki yaratmadığını düşündürmüştür.

Çalışmamızda sperm kriyopreservasyon işlemi sırasında spermdе oluşаn kriyohasarı motilite, plazma membran bütünlüğü, mitokondriyal aktivite, akrozomal bütünlük ve apoptozis parametreleri üzerinde incelemiş olup, dondurma ortamına silimarin antioksidanının takviye edilmesiyle bu parametrelerde iyileşme sağlayabileceğimizi göstermiş olduk. Sonuçlarımızın çoğu literatür ile uyum göstermiş olup insan sperminin kriyopreservasyonu için kriyokoruyucu olarak ortama silimarinin eklenmesi üzerine daha önce yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Sonuçlarımız silimarinin bu alanda etkin bir şekilde kullanılabileceğini kanıtlayan öncül bir çalışma niteliğindedir.





## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yaptığımız bu çalışmada farklı konstrasyonlarda silimarin eklenmiş dondurma ortamları kullanarak insan sperm kriyopreservasyonu sonrası çözülmüş spermin kalitesinde artışı değerlendirdik. Bunun için 20 normspemik erkek bireyin semen örnekleri kullanılmış olup her bireyin örneği 6 gruba bölünmüştür. İlk grup taze semen örneği, 2., 3., 4., 5. ve 6. gruplar sırasıyla 1.000 µg/ml, 500 µg/ml, 100 µg/ml, 20 µg/ml ve 0 µg/ml silimarin dondurma ortamına eklenerek 72 saat boyu – 196 C°'de saklanmış ve sonrasında 37C°'de çözülmüştür. Tüm grupların motilite, plazma membran bütünlüğü, mitokondriyal aktivite, akrozomal bütünlük ve apoptozis parametreleri değerlendirilmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlar literatürle uyumlu olarak kriyopreservasyon işleminin sperme önemli derecede hasar verdiği görülmüş ve antioksidan takviyesi ile bu hasarın azaltılması başarılmıştır. Değerlendirdiğimiz parametrelere baktığımızda farklı konstrasyonların farklı parametreler üzerinde daha olumlu etki göstermesi yine literatürde yapılan çalışmalar gibi bulunmuştur. Bu farklılıkları daha aza indirmek için çalıştığımız konstrasyonlar arasındaki farkı azaltmalı ve seçilen konstrasyon aralığı genişletilerek çalışma genişletilebilir.

Sonuçlara baktığımızda 100 µg/ml ve 500 µg/ml konstrasyon da silimarin eklenmesi, diğer konstrasyonlara göre motilite, plazma membran bütünlüğü ve akrozomal bütünlük açısından daha olumlu etkilemiş ancak 20 µg/ml silimari ise apoptozis parametresi için daha iyi sonuçlar vermiştir. Bunların aksine literatürde rastlanmayan bir sonuç ise 1.000 µg/ml silimarin eklediğimiz grubun akrozomal bütünlüğü daha iyi koruduğu yönündedir. Bu farklılığın sebebi silimarinin kimyasal yapısının akrozomal bütünlük üzerine etisinin diğer eklenen antioksidanların etki mekanizmalarından daha farklı bir yolla etki ettiği düşünülebilir.

Kriyopreservasyon üzerine yapılan geçmiş çalışmaların sonuçlarına baktığımızda çok değişken olduğu görülmektedir. Bu farklılıklar insan veya hayvan kaynaklı spermin yapısal farklılıkları, kullanılan antioksidanın kimyasal yapısı, seçilen konstrasyon aralıkları, uygulanan kriyopreservasyon protokolü gibi çok değişkenli parametrelerden kaynaklanıyor olabilir.

Bizim çalışmamız silimarinin dondurma ortamına eklenmesi ile çözülen spermin kalitesini arttırmaya yönelik insan spermi ile yapılan ilk çalışmadır. Literatüre bu alanda katkı sağlanacağı düşünülmekte olup, çalışma örneklem sayısı artırılarak ve kontrasyon aralıkları genişletilerek yapılacak invitro ve ayrıca invivo çalışmalar ile geliştirilebilir.



## 6. KAYNAKLAR

- Agarwal A, Sharma RK, Nallella KP, Thomas AJ, Alvarez JG, Sikka SC, 2006. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertility and Sterility*, 86, 4, 878-85.
- Agarwal R, Agarwal C, Ichikawa H, Singh RP, Aggarwal BB, 2006. Anticancer potential of silymarin: from bench to bed side. *Anticancer research*, 26, 6b, 4457-98.
- Aitken R, 1995. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7, 4, 659-68.
- Albrizio M, Moramarco AM, Nicassio M, Micera E, Zarrilli A, Lacalandra GM, 2015. Localization and functional modification of L-type voltage-gated calcium channels in equine spermatozoa from fresh and frozen semen. *Theriogenology*, 83, 3, 421-9.
- Alkmin DV, Martinez-Alborcia MJ, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA, Roca J, 2013. The nuclear DNA longevity in cryopreserved boar spermatozoa assessed using the Sperm-Sus-Halomax. *Theriogenology*, 79, 9, 1294-300.
- Alvarez JG, Storey BT, 1989. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Research*, 23, 1, 77-90.
- Amidi F, Farshad A, Khor AK, 2010. Effects of cholesterol-loaded cyclodextrin during freezing step of cryopreservation with TCGY extender containing bovine serum albumin on quality of goat spermatozoa. *Cryobiology*, 61, 1, 94-9.
- Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, Sharpe JC, Cecconi F, Youle RJ, 2003. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *The EMBO Journal*, 22, 17, 4385-99.
- Asghar Z, Masood Z, 2008. Evaluation of antioxidant properties of silymarin and its potential to inhibit peroxy radicals in vitro. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 21, 3, 249-54.
- B. MMF, G. ZM, P. RLG, G FB, A. PB, D. FC, R. CB, S. MLD, V. SR, 2013. Effect of the addition of IGF-I and vitamin E to stored boar semen. *Animal*, 7, 5, 5.
- Bailey JL, Lessard C, Jacques J, Brèque C, Dobrinski I, Zeng W, Galantino-Homer HL, 2008. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology*, 70, 8, 1251-9.
- Ball BA, 2008. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*, 107, 3, 257-67.
- Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, Meyers SA, 2003. Reactive Oxygen Species and Cryopreservation Promote DNA Fragmentation in Equine Spermatozoa. *Journal of Andrology*, 24, 4, 621-8.
- Behrman SJ, Sawada Y, 1966. Heterologous and homologous inseminations with human semen frozen and stored in a liquid-nitrogen refrigerator. *Fertil Steril*, 17, 4, 457-66.
- Benson JD, Woods EJ, Walters EM, Critser JK, 2012. The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology*, 78, 8, 1682-99.
- Biedermann D, Vavrikova E, Cvak L, Kren V, 2014. Chemistry of silybin. *Natural Product Reports*, 31, 9, 1138-57.
- Bosisio E, Benelli C, Pirola O, 1992. Effect of the flavanolignans of *Silybum marianum* L. on lipid peroxidation in rat liver microsomes and freshly isolated hepatocytes. *Pharmacological research*, 25, 2, 147-54.
- Branco CS, Garcez ME, Pasqualotto FF, Erdtman B, Salvador M, 2010. Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. *Cryobiology*, 60, 2, 235-7.
- Bruce Alberts AJ, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, 2008. *Hücrenin Moleküler Biyolojisi*, Ankara: Garland Science, TÜBA yayınları, p.

- Brugnon F, Ouchchane L, Pons-Rejraji H, Artonne C, Farigoule M, Janny L, 2013. Density gradient centrifugation prior to cryopreservation and hypotaurine supplementation improve post-thaw quality of sperm from infertile men with oligoasthenoteratozoospermia. *Human Reproduction*, 28, 8, 2045-57.
- Bunge RG, Sherman JK, 1953. Fertilizing Capacity of Frozen Human Spermatozoa. *Nature*, 172, 4382, 767-8.
- Calabrese V, Cornelius C, Stella AMG, Calabrese EJ, 2010. Cellular Stress Responses, Mitostress and Carnitine Insufficiencies as Critical Determinants in Aging and Neurodegenerative Disorders: Role of Hormesis and Vitagenes. *Neurochemical Research*, 35, 12, 1880-915.
- Casas I, Flores E, 2013. Gene Banking: The Freezing Strategy. In: *Boar Reproduction: Fundamentals and New Biotechnological Trends*. Eds: Bonet S, Casas I, Holt WV, Yeste M. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 551-88.
- Chanapiwat P, Kaeoket K, Tummaruk P, 2009. Effects of DHA-enriched hen egg yolk and L-cysteine supplementation on quality of cryopreserved boar semen. *Asian Journal of Andrology*, 11, 5, 600-8.
- Chen X, Zhu H, Hu C, Hao H, Zhang J, Li K, Zhao X, Qin T, Zhao K, Zhu H, Wang D, 2014. Identification of differentially expressed proteins in fresh and frozen-thawed boar spermatozoa by iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS. *Reproduction (Cambridge, England)*, 147, 3, 321-30.
- Cocuzza, Marcello, Sikka, C. S, Athayde, S. K, Agarwal, Ashok, 2007. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *International braz j urol*.
- Comelli MC, Mengs U, Schneider C, Prosdociami M, 2007. Toward the Definition of the Mechanism of Action of Silymarin: Activities Related to Cellular Protection From Toxic Damage Induced by Chemotherapy. *Integrative Cancer Therapies*, 6, 2, 120-9.
- Comizzoli P, Wildt DE, 2013. Mammalian fertility preservation through cryobiology: value of classical comparative studies and the need for new preservation options. *Reprod Fertil Dev*, 26, 1, 91-8.
- Critser JK, Arneson BW, Aaker DV, Huse-Benda AR, Ball GD, 1987. Cryopreservation of human spermatozoa. II. Postthaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. *Fertility and Sterility*, 47, 6, 980-4.
- de Groot H, Rauen U, 1998. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 12, 3, 249-55.
- Dehmlow C, Erhard J, de Groot H, 1996. Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. *Hepatology*, 23, 4, 749-54.
- Dehmlow C, Murawski N, de Groot H, 1996. Scavenging of reactive oxygen species and inhibition of arachidonic acid metabolism by silibinin in human cells. *Life Sciences*, 58, 18, 1591-600.
- Detaille D, Sanchez C, Sanz N, Lopez-Novoa JM, Leverve X, El-Mir M-Y, 2008. Interrelation between the inhibition of glycolytic flux by silibinin and the lowering of mitochondrial ROS production in perfused rat hepatocytes. *Life Sciences*, 82, 21, 1070-6.
- Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A, 2012. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Advances in Urology*, 2012, 12.
- Duru NK, Morshedi MS, Schuffner A, Oehninger S, 2001. Cryopreservation-Thawing of Fractionated Human Spermatozoa Is Associated With Membrane Phosphatidylserine Externalization and Not DNA Fragmentation. *Journal of Andrology*, 22, 4, 646-51.
- Dvořák Z, Kosina P, Walterová D, Šimánek Vm, Bachleda P, Ulrichová J, 2003. Primary cultures of human hepatocytes as a tool in cytotoxicity studies: cell protection against model toxins by flavonolignans obtained from *Silybum marianum*. *Toxicology Letters*, 137, 3, 201-12.
- Elliott RMA, Lloyd RE, Fazeli A, Sostaric E, Georgiou AS, Satake N, Watson PF, Holt WV, 2009. Effects of HSPA8, an evolutionarily conserved oviductal protein, on boar and bull spermatozoa. *Reproduction (Cambridge, England)*, 137, 2, 191 - null.

- Eroschenko VP, 2008. Di Fiore's atlas of histology with functional correlations, p.
- Escoffier J, Yassine S, Lee HC, Martinez G, Delaroché J, Coutton C, Karaouzen T, Zouari R, Metzler-Guillemain C, Pernet-Gallay K, Hennebicq S, Ray PF, Fissore R, Arnoult C, 2015. Subcellular localization of phospholipase C $\zeta$  in human sperm and its absence in DPY19L2-deficient sperm are consistent with its role in oocyte activation. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 21, 2, 157-68.
- Espinoza JA, Schulz MA, Sánchez R, Villegas JV, 2009. Integrity of mitochondrial membrane potential reflects human sperm quality. *Andrologia*, 41, 1, 51-4.
- Estrada E, Rodríguez-Gil JE, Rocha LG, Balasch S, Bonet S, Yeste M, 2014. Supplementing cryopreservation media with reduced glutathione increases fertility and prolificacy of sows inseminated with frozen-thawed boar semen. *Andrology*, 2, 1, 88-99.
- Fahy GM, 1986. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology*, 23, 1, 1-13.
- Federico A, Niosi M, Vecchio Blanco CD, Loguercio C, 2008. Emerging drugs for non-alcoholic fatty liver disease. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 13, 1, 145-58.
- Flores E, Cifuentes D, Fernández-Novell JM, Medrano A, Bonet S, Briz MD, Pinart E, Peña A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE, 2008. Freeze-thawing induces alterations in the protamine-1/DNA overall structure in boar sperm. *Theriogenology*, 69, 9, 1083-94.
- Flores E, Fernández-Novell JM, Peña A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE, 2010. Cryopreservation-induced alterations in boar spermatozoa mitochondrial function are related to changes in the expression and location of midpiece mitofusin-2 and actin network. *Theriogenology*, 74, 3, 354-63.
- Flores E, Ramió-Lluch L, Bucci D, Fernández-Novell JM, Peña A, Rodríguez-Gil JE, 2011. Freezing-thawing induces alterations in histone H1-DNA binding and the breaking of protein-DNA disulfide bonds in boar sperm. *Theriogenology*, 76, 8, 1450-64.
- Fraser L, Dziekońska A, Strzeżek R, Strzeżek J, 2007. Dialysis of boar semen prior to freezing-thawing: Its effects on post-thaw sperm characteristics. *Theriogenology*, 67, 5, 994-1003.
- Fraser L, Strzeżek R, Strzeżek J, 2007. Fertilizing capacity of boar semen frozen in an extender supplemented with ostrich egg yolk lipoprotein fractions - A pilot study, p.
- Fuentes-Prior P, Salvesen Guy S, 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochemical Journal*, 384, Pt 2, 201-32.
- Gadea J, García-Vazquez F, Matás C, Gardón JC, Cánovas S, Gumbao D, 2005. Cooling and Freezing of Boar Spermatozoa: Supplementation of the Freezing Media With Reduced Glutathione Preserves Sperm Function. *Journal of Andrology*, 26, 3, 396-404.
- Gadea J, Molla M, Selles E, Marco MA, Garcia-Vazquez FA, Gardon JC, 2011. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology*, 62, 1, 40-6.
- Gandini L, Lombardo F, Lenzi A, Spanò M, Dondero F, 2006. Cryopreservation and Sperm DNA Integrity. *Cell and Tissue Banking*, 7, 2, 91-8.
- Gao D, Critser JK, 2000. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR journal*, 41, 4, 187-96.
- García-Herrero S, Garrido N, Martínez-Conejero JA, Remohí J, Pellicer A, Meseguer M, 2011. Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. *Reproductive BioMedicine Online*, 22, 1, 25-36.
- Giaretta E, Estrada E, Bucci D, Spinaci M, Rodríguez-Gil JE, Yeste M, 2015. Combining reduced glutathione and ascorbic acid has supplementary beneficial effects on boar sperm cryotolerance. *Theriogenology*, 83, 3, 399-407.
- Gibb Z, Butler TJ, Morris LHA, Maxwell WMC, Grupen CG, 2013. Quercetin improves the postthaw characteristics of cryopreserved sex-sorted and nonsorted stallion sperm. *Theriogenology*, 79, 6, 1001-9.

- Gravance CG, Garner DL, Miller MG, Berger T, 2000. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function ☆11☆ Supported in part by EPA R825325-01. *Reproductive Toxicology*, 15, 1, 5-10.
- Grunewald S, Kriegel C, Baumann T, Glander HJ, Paasch U, 2009. Interactions between apoptotic signal transduction and capacitation in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 24, 9, 2071-8.
- Hackett ES, Twedt DC, Gustafson DL, 2013. Milk Thistle and Its Derivative Compounds: A Review of Opportunities for Treatment of Liver Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27, 1, 10-6.
- Hammond J, 1930. The Effect of Temperature on the Survival & In Vitro of Rabbit Spermatozoa Obtained from the Vagina. *Journal of Experimental Biology*, 7, 2, 175.
- Harrison RAP, Miller NGA, 2000. cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm. *Molecular Reproduction and Development*, 55, 2, 220-8.
- Hassa H, 2003. İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuvar Uygulamaları. In: Spermatojeniz. Eds. Eskişehir: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi yayımları OGÜ Basımevi p.
- Hollman PCH, 2014. Unravelling of the health effects of polyphenols is a complex puzzle complicated by metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 559, 100-5.
- Holt WV, 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62, 1, 3-22.
- Holt WV, Del Valle I, Fazeli A, 2015. Heat shock protein A8 stabilizes the bull sperm plasma membrane during cryopreservation: Effects of breed, protein concentration, and mode of use. *Theriogenology*, 84, 5, 693-701.
- Hu J, Geng G, Li Q, Sun X, Cao H, Liu Y, 2014. Effects of alginate on frozen-thawed boar spermatozoa quality, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activities. *Anim Reprod Sci*, 147, 3-4, 112-8.
- J Glander H, Schaller J, 1999. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: A rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage, p.
- Jeong Y-J, Kim M-K, Song H-J, Kang E-J, Ock S-A, Mohana Kumar B, Balasubramanian S, Rho G-J, 2009. Effect of  $\alpha$ -tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology*, 58, 2, 181-9.
- Juarez JD, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA, Roca J, 2011. Boar semen can tolerate rapid cooling rates prior to freezing. *Reproduction, Fertility and Development*, 23, 5, 681-90.
- Kaeoket K, Chanapiwat P, Tummaruk P, Techakumphu M, 2010. Supplemental effect of varying L-cysteine concentrations on the quality of cryopreserved boar semen, p.
- Kalthur G, Raj S, Thiagarajan A, Kumar S, Kumar P, Adiga SK, 2011. Vitamin E supplementation in semen-freezing medium improves the motility and protects sperm from freeze-thaw-induced DNA damage. *Fertility and Sterility*, 95, 3, 1149-51.
- Kaur G, Thompson LA, Dufour JM, 2014. Sertoli cells--immunological sentinels of spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 30, 36-44.
- Kierszenbaum AL, 2006. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Ankara, PALME YAYINCILIK p. 618.
- Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T, 1997. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertility and Sterility*, 68, 3, 519-24.
- Komeya M, Ogawa T, 2015. Spermatogonial stem cells: progress and prospects. *Asian Journal of Andrology*, 17, 5, 771-5.
- Kren V, Marhol P, Purchartova K, Gabrielova E, Modriansky M, 2013. Biotransformation of Silybin and its Congeners. *Current Drug Metabolism*, 14, 10, 1009-21.
- Kumar Y, Yadav DN, Ahmad T, Narsaiah K, 2015. Recent Trends in the Use of Natural Antioxidants for Meat and Meat Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14, 6, 796-812.

- L. Carlos Junqueira JC, Robert O. Kelley 2006. Temel Histoloji. In. Eds: Nobel Tıp Kitabevi, p.
- Lasso JL, Noiles EE, Alvarez JG, Storey BT, 1994. Mechanism of Superoxide Dismutase Loss from Human Sperm Cells during Cryopreservation. *Journal of Andrology*, 15, 3, 255-65.
- Li P, Li Z, Dzyuba B, Hulak M, Rodina M, Linhart O, 2010. Evaluating the impacts of osmotic and oxidative stress on common carp (*Cyprinus carpio*, L.) sperm caused by cryopreservation techniques. *Biology of Reproduction*, 83, 5, 852-8.
- Li Z, Lin Q, Liu R, Xiao W, Liu W, 2010. Protective Effects of Ascorbate and Catalase on Human Spermatozoa During Cryopreservation. *Journal of Andrology*, 31, 5, 437-44.
- Ligeret H, Brault A, Vallerand D, Haddad Y, Haddad PS, 2008. Antioxidant and mitochondrial protective effects of silibinin in cold preservation–warm reperfusion liver injury. *Journal of Ethnopharmacology*, 115, 3, 507-14.
- Loguercio C, Andreone P, Brisc C, Brisc MC, Bugianesi E, Chiaramonte M, Cursaro C, Danila M, de Sio I, Floreani A, Freni MA, Grieco A, Groppo M, Lazzari R, Lobello S, Loreface E, Margotti M, Miele L, Milani S, Okolicsanyi L, Palasciano G, Portincasa P, Saltarelli P, Smedile A, Somalvico F, Spadaro A, Sporea I, Sorrentino P, Vecchione R, Tuccillo C, Blanco CDV, Federico A, 2012. Silybin combined with phosphatidylcholine and vitamin E in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A randomized controlled trial. *Free Radical Biology and Medicine*, 52, 9, 1658-65.
- Loguercio C, Federico A, Trappoliere M, Tuccillo C, Sio Id, Leva AD, Niosi M, D’Auria MV, Capasso R, Blanco CDV, 2007. The Effect of a Silybin-Vitamin E-Phospholipid Complex on Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Pilot Study. *Digestive Diseases and Sciences*, 52, 9, 2387-95.
- Loguercio C, Festi D, 2011. Silybin and the liver: From basic research to clinical practice. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 17, 18, 2288-301.
- Love CC, 2005. The sperm chromatin structure assay: A review of clinical applications. *Animal Reproduction Science*, 89, 1, 39-45.
- Madrigal-Santillán E, Madrigal-Bujaidar E, Álvarez-González I, Teresa Sumaya-Martínez M, Gutiérrez-Salinas J, Bautista M, Gonzalez A, García-Luna Y, González-rubio M, Aguilar-Faisal J, Morales-González J, 2014. Review of natural products with hepatoprotective effects, p.
- Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR, 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*, 182, 5, 1545-56.
- Martinez-Soto JC, de DiosHourcade J, Gutiérrez-Adán A, Landeras JL, Gadea J, 2010. Effect of genistein supplementation of thawing medium on characteristics of frozen human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology*, 12, 3, 431-41.
- Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Álvarez M, Tamayo-Canul J, Anel L, de Paz P, Martínez-Pastor F, 2015. Post-thawing quality and incubation resilience of cryopreserved ram spermatozoa are affected by antioxidant supplementation and choice of extender. *Theriogenology*, 83, 4, 520-8.
- Mazur P, 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *The American journal of physiology*, 247, 3 Pt 1, C125-42.
- Mazur P, 1990. Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophysics*, 17, 1, 53-92.
- Mazur P, Leibo SP, Chu EH, 1972. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Experimental cell research*, 71, 2, 345-55.
- Meamar M, Zribi N, Cambi M, Tamburrino L, Marchiani S, Filimberti E, Fino MG, Biggeri A, Menezo Y, Forti G, Baldi E, Muratori M, 2012. Sperm DNA fragmentation induced by cryopreservation: new insights and effect of a natural extract from *Opuntia ficus-indica*. *Fertility and Sterility*, 98, 2, 326-33.
- Michael H. Ross WP, 2014. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas Palme Yayıncılık, p.

- Milic N, Milosevic N, Suvajdzic L, Zarkov M, Abenavoli L, 2014. New therapeutic potentials of milk thistle (*Silybum marianum*). *Nat. Prod. Commun.*, 8, 12, 1801-10.
- Muldrew K, McGann LE, 1994. The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. *Biophysical Journal*, 66, 2 Pt 1, 532-41.
- Natarajamani S, 2017. Cryopreservation of Human Semen. In: *Male Infertility: A Clinical Approach*. Eds: Gunasekaran K, Pandiyan N. New Delhi: Springer India, p. 207-19.
- O'Donnell L, 2014. Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed. *Spermatogenesis*, 4, 2, e979623.
- Okazaki T, Abe S, Shimada M, 2009. Improved conception rates in sows inseminated with cryopreserved boar spermatozoa prepared with a more optimal combination of osmolality and glycerol in the freezing extender. *Animal Science Journal*, 80, 2, 121-9.
- Ortega-Ferrusola C, Sotillo-Galán Y, Varela-Fernández E, Gallardo-Bolaños JM, Muriel A, González-Fernández L, Tapia JA, Peña FJ, 2008. Detection of "Apoptosis-Like" Changes During the Cryopreservation Process in Equine Sperm. *Journal of Andrology*, 29, 2, 213-21.
- Paasch U, Sharma RK, Gupta AK, Grunewald S, Mascha EJ, Thomas AJ, Jr., Glander HJ, Agarwal A, 2004. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biol Reprod*, 71, 6, 1828-37.
- Paasch U, Sharma RK, Gupta AK, Grunewald S, Mascha EJ, Thomas JAJ, Glander HJ, Agarwal A, 2004. Cryopreservation and Thawing Is Associated with Varying Extent of Activation of Apoptotic Machinery in Subsets of Ejaculated Human Spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 71, 6, 1828-37.
- Paoli D, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L, 2014. Sperm Cryopreservation: Effects on Chromatin Structure. In: *Genetic Damage in Human Spermatozoa*. Eds: Baldi E, Muratori M. New York, NY: Springer New York, p. 137-50.
- Papa FO, Felício GB, Melo-Oña CM, Alvarenga MA, De Vita B, Trínque C, Puoli-Filho JNP, Dell'Aqua JA, 2011. Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen. *Animal Reproduction Science*, 129, 1, 73-7.
- Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez Martinez H, 2003. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Animal Reproduction Science*, 78, 1, 85-98.
- Post-White J, Ladas EJ, Kelly KM, 2007. Advances in the Use of Milk Thistle (*Silybum marianum*). *Integrative Cancer Therapies*, 6, 2, 104-9.
- Purdy PH, Ericsson SA, Dodson RE, Sternes KL, Garner DL, 2004. Effects of the flavonoids, silibinin and catechin, on the motility of extended cooled caprine sperm. *Small Ruminant Research*, 55, 1, 239-43.
- Purdy PH, Graham JK, 2004. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*, 48, 1, 36-45.
- Rasola A, Bernardi P, 2007. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis*, 12, 5, 815-33.
- Reed ML, Ezech PC, Hamic A, Thompson DJ, Caperton CL, 2009. Soy lecithin replaces egg yolk for cryopreservation of human sperm without adversely affecting postthaw motility, morphology, sperm DNA integrity, or sperm binding to hyaluronate. *Fertility and Sterility*, 92, 5, 1787-90.
- Rickling B, Hans B, Kramarczyk R, Krumbiegel G, Weyhenmeyer R, 1995. Two high-performance liquid chromatographic assays for the determination of free and total silibinin diastereomers in plasma using column switching with electrochemical detection and reversed-phase chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 670, 2, 267-77.



- Roca J, Gil MA, Hernandez M, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA, 2004. Survival and Fertility of Boar Spermatozoa After Freeze-Thawing in Extender Supplemented With Butylated Hydroxytoluene. *Journal of Andrology*, 25, 3, 397-405.
- Roca J, Rodríguez MJ, Gil MA, Carvajal G, Garcia EM, Cuello C, Vazquez JM, Martinez EA, 2005. Survival and In Vitro Fertility of Boar Spermatozoa Frozen in the Presence of Superoxide Dismutase and/or Catalase. *Journal of Andrology*, 26, 1, 15-24.
- Rolo AP, Oliveira PJ, Moreno AJM, Palmeira CM, 2003. Protection against post-ischemic mitochondrial injury in rat liver by silymarin or TUDC. *Hepatology Research*, 26, 3, 217-24.
- Roostaei-Ali Mehr M, Parisoush P, 2016. Effect of Different Levels of Silymarin and Caproic Acid on Storage of Ram Semen in Liquid Form. *Reproduction in Domestic Animals*, 51, 4, 569-74.
- Said T, Agarwal A, 2012. Antioxidants in Sperm Cryopreservation. In: *Male Infertility: Contemporary Clinical Approaches, Andrology, ART & Antioxidants*. Eds: Parekattil SJ, Agarwal A. New York, NY: Springer New York, p. 431-7.
- Sakahira H, Enari M, Nagata S, 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 391, 6662, 96-9.
- Saller R, Meier R, Brignoli R, 2001. The Use of Silymarin in the Treatment of Liver Diseases. *Drugs*, 61, 14, 2035-63.
- Sancho S, Casas I, Ekwall H, Saravia F, Rodriguez-Martinez H, Rodriguez-Gil JE, Flores E, Pinart E, Briz M, Garcia-Gil N, Bassols J, Pruneda A, Bussalleu E, Yeste M, Bonet S, 2007. Effects of cryopreservation on semen quality and the expression of sperm membrane hexose transporters in the spermatozoa of Iberian pigs. *Reproduction (Cambridge, England)*, 134, 1, 111-21.
- Sarıözkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Büyükleblebici S, Cantürk F, 2014. Influence of various antioxidants added to TCM-199 on post-thaw bovine sperm parameters, DNA integrity and fertilizing ability. *Cryobiology*, 68, 1, 129-33.
- Satorre MM, Breininger E, Beconi MT, 2012. Cryopreservation with  $\alpha$ -tocopherol and Sephadex filtration improved the quality of boar sperm. *Theriogenology*, 78, 7, 1548-56.
- Sekine S, Ichijo H, 2015. Mitochondrial proteolysis: Its emerging roles in stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1850, 2, 274-80.
- Sharma RK, Agarwal A, 1996. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, 48, 6, 835-50.
- Silva ECB, Cajueiro JFP, Silva SV, Soares PC, Guerra MMP, 2012. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology*, 77, 8, 1722-6.
- Silva SV, Soares AT, Batista AM, Almeida FC, Nunes JF, Peixoto CA, Guerra MMP, 2011. In Vitro and In Vivo Evaluation of Ram Sperm Frozen in Tris Egg-yolk and Supplemented with Superoxide Dismutase and Reduced Glutathione. *Reproduction in Domestic Animals*, 46, 5, 874-81.
- Stanic P, Tandara M, Sonicki Z, Simunic V, Radakovic B, Suchanek E, 2000. Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human semen. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 91, 1, 65-70.
- Steponkus PL, 1984. Role of the Plasma Membrane in Freezing Injury and Cold Acclimation. *Annual Review of Plant Physiology*, 35, 1, 543-84.
- Stiuso P, Scognamiglio I, Murolo M, Ferranti P, De Simone C, Rizzo MR, Tuccillo C, Caraglia M, Loguercio C, Federico A, 2014. Serum Oxidative Stress Markers and Lipidomic Profile to Detect NASH Patients Responsive to an Antioxidant Treatment: A Pilot Study. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 8.
- Succu S, Berlinguer F, Pasciu V, Satta V, Leoni GG, Naitana S, 2011. Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. *Journal of Pineal Research*, 50, 3, 310-8.
- Surai P, 2014. Antioxidant systems of the body: from vitamin E to polyphenols and beyond, p.

- Surai P, I. Fisinin V, 2010. Ill Health Effects of Food Lipids: Consequences of Inadequate Food Processing, Storage and Cooking, p.
- Surai PF, 2014. Polyphenol compounds in the chicken/animal diet: from the past to the future. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 98, 1, 19-31.
- Sutovsky P, Manandhar G, Wu A, Oko R, 2003. Interactions of sperm perinuclear theca with the oocyte: Implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense, and assisted reproduction. *Microscopy Research and Technique*, 61, 4, 362-78.
- Talaei-Khozani T, Esmaeilpour T, Aekiyash F, Sc B, Bahmanpour S, 2010. Effects of cryopreservation on plasma membrane Glycoconjugates of human spermatozoa, p.
- Taylor K, Roberts P, Sanders K, Burton P, 2009. Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online*, 18, 2, 184-9.
- Thachil JV, Jewett MAS, 1981. Preservation techniques for human semen\*\*Supported in part by the Wellesley Hospital Research Foundation. *Fertility and Sterility*, 35, 5, 546-8.
- Thakur RK, Yadav VK, Kumar A, Singh A, Pal K, Hoepfner L, Saha D, Purohit G, Basundra R, Kar A, Halder R, Kumar P, Baral A, Kumar MJM, Baldi A, Vincenzi B, Lorenzon L, Banerjee R, Kumar P, Shridhar V, Mukhopadhyay D, Chowdhury S, 2014. Non-metastatic 2 (NME2)-mediated suppression of lung cancer metastasis involves transcriptional regulation of key cell adhesion factor vinculin. *Nucleic Acids Research*, 42, 18, 11589-600.
- Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Iuliis GN, Zieschang JA, Clark AM, 2009. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Human Reproduction*, 24, 9, 2061-70.
- Tomás C, Blanch E, Hernández M, Gil MA, Roca J, Vázquez JM, Martínez EA, Mocé E, 2011. Treating boar sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins widens the sperm osmotic tolerance limits and enhances the in vitro sperm fertilising ability. *Animal Reproduction Science*, 129, 3, 209-20.
- Trounson A, Peura A, Kirby C, 1987. Ultrarapid freezing: a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation\*\*Supported by a grant from the National Health and Medical Research Council, Canberra, Australia. *Fertility and Sterility*, 48, 5, 843-50.
- Tuncer PB, Bucak MN, Sariozkan S, Sakin F, Yeni D, Cigerci IH, Atessahin A, Avdatek F, Gundogan M, Buyukleblebici O, 2010. The effect of raffinose and methionine on frozen/thawed Angora buck (*Capra hircus ancyrensis*) semen quality, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities. *Cryobiology*, 61, 1, 89-93.
- Urbano MT, Dorado J, Ortiz I, Morrell J, Demyda Peyrás S, Gálvez MJ, Alcaraz L, Ramírez L, Hidalgo M, 2013. Effect of cryopreservation and single layer centrifugation on canine sperm DNA fragmentation assessed by the sperm chromatin dispersion test, p.
- Vadnais ML, Althouse GC, 2011. Characterization of capacitation, cryoinjury, and the role of seminal plasma in porcine sperm. *Theriogenology*, 76, 8, 1508-16.
- Varga Z, Seres I, Nagy E, Ujhelyi L, Balla G, Balla J, Antus S, 2006. Structure prerequisite for antioxidant activity of silybin in different biochemical systems in vitro. *Phytomedicine*, 13, 1, 85-93.
- Vargas-Mendoza N, Madrigal-Santillán E, Morales-González Á, Esquivel-Soto J, Esquivel-Chirino C, García-Luna y González-Rubio M, Gayosso-de-Lucio JA, Morales-González JA, 2014. Hepatoprotective effect of silymarin. *World Journal of Hepatology*, 6, 3, 144-9.
- Varo-Ghiuru F, Miclea I, Hettig A, Ladosi I, Miclea V, Egerszegi I, Zahan M, 2015. Lutein, Trolox, ascorbic acid and combination of Trolox with ascorbic acid can improve boar semen quality during cryopreservation. *Cryo letters*, 36, 1, 1-7.
- Venkatesh S, Singh A, Shamsi MB, Thilagavathi J, Kumar R, K. Mitra D, Dada R, 2011. Clinical Significance of Sperm DNA Damage Threshold Value in the Assessment of Male Infertility. *Reproductive Sciences*, 18, 10, 1005-13.

- Wallach EE, Zamboni L, 1987. The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility: the role of electron microscopy in the evaluation of semen quality. *Fertility and Sterility*, 48, 5, 711-34.
- Wang AW, Zhang H, Ikemoto I, Anderson DJ, Loughlin KR, 1997. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology*, 49, 6, 921-5.
- Wang P, Wang Y-F, Wang C-W, Bu S-H, Hu J-H, Li Q-W, Pang W-J, Yang G-S, 2012. Effects of low-density lipoproteins extracted from different avian yolks on boar spermatozoa quality following freezing–thawing. *Zygote*, 22, 2, 175-81.
- Wang S, Wang W, Xu Y, Tang M, Fang J, Sun H, Sun Y, Gu M, Liu Z, Zhang Z, Lin F, Wu T, Song N, Wang Z, Zhang W, Yin C, 2014. Proteomic characteristics of human sperm cryopreservation. *PROTEOMICS*, 14, 2-3, 298-310.
- Ward WS, 2010. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 16, 1, 30-6.
- Watson PF, 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60, 481-92.
- WHO, 2010. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm cervical mucus interaction Cambridge University Press p.
- Wiest SC, Steponkus PL, 1979. The osmometric behavior of human erythrocytes. *Cryobiology*, 16, 1, 101-4.
- Wünderich K, Paasch U, Leicht M, Glander H-J, 2006. Activation of Caspases in Human Spermatozoa during Cryopreservation – An Immunoblot Study. *Cell and Tissue Banking*, 7, 2, 81-90.
- Yeste M, Estrada E, Casas I, Bonet S, Rodríguez-Gil JE, 2013. Good and bad freezability boar ejaculates differ in the integrity of nucleoprotein structure after freeze-thawing but not in ROS levels. *Theriogenology*, 79, 6, 929-39.
- Yeste M, Estrada E, Pinart E, Bonet S, Miró J, Rodríguez-Gil JE, 2014. The improving effect of reduced glutathione on boar sperm cryotolerance is related with the intrinsic ejaculate freezability. *Cryobiology*, 68, 2, 251-61.
- Yeste M, Estrada E, Rocha LG, Marín H, Rodríguez-Gil JE, Miró J, 2015. Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus. *Andrology*, 3, 2, 395-407.
- Yeste M, Holt WV, Bonet S, Rodríguez-Gil JE, Lloyd RE, 2014. Viable and morphologically normal boar spermatozoa alter the expression of heat-shock protein genes in oviductal epithelial cells during co-culture in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 81, 9, 805-19.
- Zeng C, Tang K, He L, Peng W, Ding L, Fang D, Zhang Y, 2014. Effects of glycerol on apoptotic signaling pathways during boar spermatozoa cryopreservation. *Cryobiology*, 68, 3, 395-404.
- Zhao J, Lahiri-Chatterjee M, Sharma Y, Agarwal R, 2000. Inhibitory effect of a flavonoid antioxidant silymarin on benzoyl peroxide-induced tumor promotion, oxidative stress and inflammatory responses in SENCAR mouse skin. *Carcinogenesis*, 21, 4, 811-6.
- Zholobenko A, Modriansky M, 2014. Silymarin and its constituents in cardiac preconditioning. *Fitoterapia*, 97, 122-32.
- Zribi N, Feki Chakroun N, El Euch H, Gargouri J, Bahloul A, Ammar Keskes L, 2010. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertility and Sterility*, 93, 1, 159-66.

## 7. EKLER



T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARARLARI

Toplantı Sayısı: 2017/05

Toplantı Tarihi : 08.03.2017

**Karar Sayısı 2017/80** S.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Ender ERDOĞAN'ın "Silimarinin İnsan Sperm Kriyopreservasyonunda Antioksidan Etkisi" başlıklı araştırmasının değerlendirilme talebi ile ilgili 20.02.2017 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü.

Yapılan inceleme ve görüşmelerden sonra; Prof.Dr.Ender ERDOĞAN'ın "Silimarinin İnsan Sperm Kriyopreservasyonunda Antioksidan Etkisi" adlı araştırmasının kabulüne oy birliği ile karar verildi.



## 8. ÖZGEÇMİŞ

Ankara Polatlı'da 1989 yılında doğdu. İlk ve ortaokulu Hasan Ali Yücel İlköğretim Okulunda tamamladı. 2012 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü, fakülte birinciliği ve bölüm birinciliği ile tamamladı. Aynı zamanda Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde Yan Dal programını tamamladı. 2014 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Nanoteknoloji ve Nanotıp Bölümü'nde yüksek lisans eğitimini tamamladı. Aynı yıl Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp Bölümü'nde ve 2015 yılı bahar döneminde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Bölümü'nde doktora eğitimine başladı. Yüksek lisans ve doktora eğitim sürecinde Almanya'da Münster Üniversitesi'nde çalışmalarda bulundu. 2015 yılının güz döneminde Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) kapsamında atandığı Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda halen araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.