



T.C

MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Yüksek Glikozlu Besiyeri ile Deneysel Diyabetik Modelde Hasara
Uğratılmış Spermilere Dondurma – Çözme İşlemi Sonrası Kök Hücre ve Niş
Etkisi**

Biyolog KAAAN ÇELEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı

Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU

MANİSA-2020



T.C

MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Yüksek Glikozlu Besiyeri ile Deneysel Diyabetik Modelde Hasara
Uğratılmış Spermilere Dondurma – Çözme İşlemi Sonrası Kök Hücre ve Niş
etkisi**

Biolog KAAN ÇELEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı

Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU

TEZ SAVUNMA SINAVI JÜRİ ÜYELERİ

Prof. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU

Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ

MANİSA-2020

**Yüksek Glikozlu Besiyeri ile Deneysel Diyabetik Modelde Hasara Uğratılmış
Spermlere Dondurma- Çözme İşlemi Sonrası Kök Hücre ve Niş Etkisi**

Öğrenci: Kaan ÇELEN

Danışman: Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU

Bu tez çalışması 28.12.2020 tarihinde jürimiz tarafından “Yüksek lisans Programı” nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU Online Katılım
Sağlanmıştır

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi
Üye: Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ Online Katılım
Sağlanmıştır

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi
Üye: Prof. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU Online Katılım
Sağlanmıştır
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi

Bu tez, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından başarılı bulunmuştur. 28/12/2020

Prof. Dr. Ömer TETİK
Enstitü Müdürü

I.BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından, veri toplanması ve yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Öğrencinin Adı, Soyadı

Kaan ÇELEN

İmza

II. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezizmi destekleyen Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve Tıp Fakültesi Dekanlığına;

Tezimi tamamlamamda bana daima yol gösterici olan ve tezime yaptığı sayısız katkılarından dolayı yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel yol gösterici olan Hocam Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU'ya

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini en verimli şekilde aktaran ve her konuda yardımcı olan öncelikle Histoloji-Embriyoloji Anabilim Başkanı Sayın Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER'a, Sayın Prof. Dr. Kemal ÖZBİLGİN, Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER Sayın hocalarıma,

Tezimin gerçekleşmesinde bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen Ege Üniversitesi Tıp Bebek Merkezi Başkanı Sayın Prof. Dr. Ege NAZAN TAVMERGEN GÖKER ve Bio. Betül Pelin YAŞAR'a

Deney hayvanlarının temini ve uygulamaların yapılmasında destek sağlayan Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi ve çalışanlarına,

Deney hayvanlarının cerrahi işlemleri ve laboratuvar çalışmaları sırasında yardımını esirgemeyen Histoloji-Embriyoloji A.D. Araş. Gör. Hilal KABADAYI, Yüksek lisans öğrencisi arkadaşım Meltem ÜÇÖZ e teşekkürü borç bilirim,

Konu ders olunca yapılmayacağı yaptıran olmuycağı olduran imkansızlıklardan imkân üreten eğitim ve öğretimim için her türlü fedakatlığı sağlayan her türlü olumsuzlukta hep yanımda duran, benden karşılıksız sevgisini bir dakika eksik etmeyen ve hayatım boyunca gerek sağlam kişiliği ve karakteri açısından örnek aldığım ve beni bu günlere getirmek için maddi ve manevi hiçbir desteği esirgemeyip her türlü fedakârlığı yapan CANIM BABAMA teşekkürü borç bilir ve sonsuz minnetimi sunarım.

Kaan Çelen

Manisa /2020

III.SİMGELER ve KISALTMALAR

µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
ABD	Amerika Birlesik Devletleri
ABP	ADOROJEN BAĞIMLI PROTEİN
ADS	Androjen duyarsızlık sendromu
AMBY	Alfa-MEM Besiyeri
AMH	Anti Müllerian Hormon
BMP-15	Bone Morphogenic Protein 15
CD90	Cluster of Differentiation 90
CFU-F	Colony Forming Unit Fibroblast
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
CO₂	Carbon dioxide, Karbon Dioksit
CSF	Cytostatic Factor- Sitostatik Faktör
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Deoksiribonükleik Asit
E2	Estradiol- Östradiol
EBSS	Earle's Balanced Salt Solution
ECS	Endometrial Stromal Cells-Endometriyal Stromal Hücreler
EGF	Epidermal Growth Factor- Epidermal Büyüme Faktörü
e-NOS	Endotelial Nitric Oxid Sentetase,
FBS	Fötal Bovin Serum
FCS	Fetal Calf Serum-Fötal Buzağı Serumu
FGF-2	Fibroblast Büyüme faktör-2
FSH	Follicle Stimulating Hormone-Folikül Uyarıcı Hormon
FSH β	Follicle Stimulating Hormone β -Folikül Uyarıcı Hormon β
FSH	Follicle Stimulating Hormone, Follikül Sitümulan Hormon
GDF-9	Growth Differentiating Factor 9
GFP	Green Flouresans Protein- Yeşil Floresan Proteini
GIFT	Gamete Intrafallopian Transfer
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone-Gonadotropin
GnRH_a	Gonadotropin Releasing Hormone Agonisti

GTP	Guanozin trifosfattan
GV	Germinal Vezikül
GVBD	Germinal Vesicle Break Down- Germinal Vezikül Yıkımı
HCG	Human Coryonic Gonadotrophin,
hCG	İnsan koryonik gonadotropik hormonu
H-E	Hematoksilen-Eozin
hMG	Human Menopausal Gonadotropin-
IFN	İnterferon
IGF	Insuline-like Growth Factor-İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IGF-1	Insuline-like Growth Factor-1
IGF-2	Insuline-like Growth Factor-2-İnsülin
IL1	Interleukin 1- İnterlökin 1
İL-6	İnterlakün-6
IL6	Interleukin 6- İnterlökin 6
i-NOS	İnducible Nitric Oxid Sentetase,
İTSBY	İnsan Tubal SıvıBesiyeri- İnsan Tubal Sıvı İçeren Besiyeri
IU	International Unit
IUI	Intra Uterin İnsemination-İnrta Uterin İnseminasyon
IVF	İn Vitro Fertilizasyon
IVF	İn Vitro Fertilisation, İn Vitro Fertilizasyon
IVM	İn vitro maturasyon
KOH	Kontrollü Over Hiperstimülasyonu
LH	Luteinazing Hormone-Luteinizan Hormon
LH	Luteinizan Hormon
LIF	Leukemia İnhibition Factor-Lösemi İnhibe Edici Faktör,
Mg	Miligram
MI	Metafaz 1
MII	Metafaz 2
MİM	Müllerian İnhibe edici Madde
MİM	Müllerian İnhibe edici Madde
MKH	Mezenkimal Kök Hücreleri
MPF	Maturation Proceed Factor-Olgunlaşmayı İlerletici Faktör
MPF	Maturation Promoding Factor
NO	Azot Monoksit

NO²	Azot Dioksit
OKK	Oosit- Kumulus Kompleksi
OMI	Oocyte Maturation Inhibitor-Oosit Olgunlaşma İnhibitörü
OPU	Oosit pick-up
P1	Profaz 1
PAS	Periodic Asid Schiff
PBS	Fosfat Buffer Salin
PDE	Fosfodiesteraz
PGH	Primordiyal Germ Hücresi
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotropin
PVB	Perivitellin boşluk
PVB	Perivitellin boşluk
PZD	Partial Zona Dissection-Kısmi Zona Disseksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif oksijen radikallerinin
SKH	Spermatogoniyal Kök Hücre
SO	Süperovulasyon
SSBY	Single Step Besiyeri- Tek Adımlı Besiyeri
SUZI	Subzonal Sperm Insemination- Zona altı Sperm İnseminasyonu
TET	Tubal Embryo Transfer-Tubal Embriyo Transferi
TGF	Transforming Growth Factor
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
TNF	Tumor Necrosis Factor-Tümör Nekroz Faktör
uFSH	Urinary Follicle Stimulating
ÜYTE	Üremeye Yardımcı Tedavi
VCAM1	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF A	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organization, Dünya Sağlık Örgütü
ZP1	Zona Pellusida 1
ZP2	Zona Pellusida 2
ZP3	Zona Pellusida 3

V.RESİMLER DİZİNİ

Resim 4.1.1.	Erkek üreme sistemi genel yapısı
Resim 4.2.1.	Primordiyal germ hücrelerinin göçü
Resim 4.2.2.	Gonadların gelişimi
Resim 4.3.1.	Testisin genel yapısı
Resim 4.3.2.	Seminifer tübül şematik yapısı
Resim 4.3.3.	Testis, h&e boyalı histolojik yapısı
Resim 4.3.4.	Spermatogenez
Resim 4.3.5.	Spermiyogenez
Resim 4.3.6.	Sertoli hücresi
Resim 4.3.7.	Leydig hücreleri
Resim 4.3.8.	Spermatogenik seri hücrelerinin şematik gösterimi
Resim 4.3.9.	Spermiasyon sırasında yapısal farklılaşma
Resim 4.3.10.	Rodent spermatozoonu
Resim 4.3.11.	Sıçanlarda başlıca spermatozoon şekil anomalileri
Resim 6.1.	Mkh'lerin cd90 boyama
Resim 6.2.1.	Sperm 24 saatlik değerlendirme.
Resim 6.3.	Diff quick boyaması
Resim 6.4.1.	Hematoksilen eosin boyaması
Resim 6.4.2.	eNos boyaması
Resim 6.4.3.	Tunel boyama sonuçları

GRAFİK VE TABLO DİZİNİ

- Tablo 4.5.** WHO semen analizi için en düşük referans değerler
- Tablo 5.** TUNEL Boyama Protokolü
- Tablo 5.2.** Spermatozoon sayılarının hesap protokolü
- Tablo 5.5.** Yayma preparatlar için Giemsa boyama protokolü
- Tablo 6.1.** MKH için yapılan H-skorla
- Tablo 6.2.1.** Hos testi yapılarak sperm kültür ortamlarının 0. Dakikada canlılık % si
- Tablo 6.2.** Sperminin farklı kültür ortamlarında 24 saatlik canlılık izlemi
- Tablo 6.3.** Spermilerin farklı kültür ortamlarında 0, 1 ve 3 saat canlılık oranları
- Tablo 6.5.** Farklı kültür ortamlarında 6, 18 ve 24 saat canlılık oranları
- Tablo 6.7.** Yüksek glikozlu farklı kültür ortamlarında 24 saatlik canlılık oranları
- Tablo 6.8.** Yüksek glikozlu farklı kültür ortamlarında 0, 1, 3, 6, 18 ve 24 saat canlılık oranları.
- Tablo 7.** Sperminin farklı kültür ortamlarında kriyoprezervasyon sonrası 0. dakika, 1. saat, 3. saat canlılık yerinde hareketlilik ve hareketsizlik değerleri.
- Tablo 8.** Farklı kültür ortamlarında yapılan E-nos boyamasının H-Skore değerleri.
- Tablo 9.** Farklı kültür ortamlarında yapılan Apoptatik indeks H-Skore değerleri
- Grafik 6.2.** Spermilerin farklı kültür ortamlarındaki 24 saat lik inkübasyonu grafiksel gösterilmesi.
- Grafik 6.2.1.** 0. Dakika dondurulmuş çözölmüş ve taze spermilerin canlılık oranları
- Grafik 6.3.** Sıçandan elde edilen taze spermilerin farklı kültür ortamlarındaki 0. 1. Ve 3. Saat canlılık oranları 3'te gösterilmiştir.
- Grafik 6.4.** Taze spermilerin yüksek glikozlu farklı kültür ortamlarındaki 6. 18. Ve 24. Saat canlılık oranları gösterilmiştir.
- Grafik 6.6.** Taze spermilerin yüksek glikozlu farklı kültür ortamlarındaki 6. 18. Ve 24. Saat canlılık oranları gösterilmiştir.
- Grafik 6.7.** Taze spermilerin farklı kültür ortamlarındaki 0. 1, 3, 6 18 ve 24 Saat canlılık oranları gösterilmiştir.
- Grafik 6.8.** Taze spermilerin yüksek glikozlu farklı kültür ortamlarındaki 0. 1, 3, 6 18 ve 24 Saat canlılık oranları gösterilmiştir.

- Grafik 6.9.** Spermilerin farklı kültür ortamlarındaki 3. saat teki inkübasyonundaki canlılık oranının grafiksel gösterilmesi gösterilmiştir.
- Grafik 6.10** Spermilerin farklı kültür ortamlarındaki 6. saat teki inkübasyonundaki canlılık oranının grafiksel gösterilmesi gösterilmiştir.
- Grafik 6.11** Spermilerin farklı kültür ortamlarındaki 18. saat teki inkübasyonundaki canlılık oranının grafiksel gösterilmesi gösterilmiştir.
- Grafik 6.12** Spermilerin farklı kültür ortamlarındaki 24. saat teki inkübasyonundaki canlılık oranının grafiksel gösterilmesi gösterilmiştir.
- Grafik 7.** Spermilerin kriyoprezervasyon sonrası farklı kültür ortamlarındaki 0.dakika, 1, 3 Saatlik inkübasyonundaki canlılık oranının grafiksel gösterilmesi.
- Grafik 7.1.** Spermilerin kriyoprezervasyon sonrası farklı kültür ortamlarındaki 0 Saatlik inkübasyonundaki canlılık oranının grafiksel gösterilmesi.
- Grafik 7.2.** Spermilerin kriyoprezervasyon sonrası farklı kültür ortamlarındaki 1 Saatlik inkübasyonundaki canlılık oranının grafiksel gösterilmesi.
- Grafik 9.** Farklı kültür ortamlarının apoptatik indeks değerlerinin grafiksel gösterimi.

III. İÇİNDEKİLER

1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. ERKEK ÜREME SİSTEMİ	6
4.2. ERKEK ÜREME SİSTEMİ EMBRİYOLOJİSİ	7
4.2.1. Primordial Germ Hücreleri	7
4.2.2. Gonadların Gelişimi.....	8
4.2.3. Testislerin Gelişimi.....	10
4.2.4. Genital Kanalların Gelişimi	11
4.2.5. Genital Bezlerin Gelişimi:	13
4.2.6. Dış Genital Organların Gelişimi	14
4.2.7. Testislerin İnişi	16
4.2.8. Klinik Korelasyon.....	18
4.3. ERKEK ÜREME SİSTEMİ HİSTOLOJİSİ.....	20
4.3.1. Testis.....	20
4.3.2. Testis İçi Genital Kanallar	39
4.3.3. Genital Boşaltım Kanalları	40
4.3.4. Yardımcı Üreme Bezleri	41
4.3.5. Penis.....	43
4.4. FERTİLİZASYON (DÖLLENME):	44
4.4.1. Fertilizasyonun Evreleri.....	46
4.4.2. Oositin Fertilizasyona Cevabı.....	47
4.4.3. Fertilizasyonun Temel Sonuçları:	48
4.5. SEMEN ANALİZİ	48
4.5.1. Who Normal Spermiyogram Kriterleri.....	50
4.5.2. Sperm Morfoloji Değerlendirmesi.....	50
4.6. SPERM KRİYOPREZERVASYONU	54
4.6.1. Ne Zaman Krioprezervasyon?	54
4.6.2. Sperm Krioprezervasyon Talimatı.....	55

4.6.3. Sperm Dondurmada Olası Hasarlar	55
4.7 SEMEN HAZIRLAMA PROTOKOLLERİ	57
4.8. EJEKULATTAN SPERM HAZIRLAMA YÖNTEMLERİ:.....	58
4.8.1. Yıkama.....	58
4.8.2. Yüzdürme.....	58
4.8.3. Gradient Uygulamaları	59
4.9. MEZENKİMAL KÖK HÜCRE (MKH)	60
4.9.1.MKH İzolasyonu ve Karakterizasyonu.....	60
4.9.2.MKH Biyolojisi ve Fonksiyonu.....	61
4.10. AMAÇ	63
5. GEREÇ VE YÖNTEM	65
5.1. YAĞ DOKU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRE (MKH) KÜLTÜRÜ	65
5.1.1. MKH ve Niş eldesi	65
5.1.2. Kök Hücre Sayımı	66
5.1.3. Mkh Karakterizasyonu.....	66
5.2. SPERMLERİN HAZIRLANMASI.....	67
5.2.1. Deney Gruplarının Hazırlanması	67
5.2.2. Cerrahi Uygulamalar.....	68
5.2.3. Doku Örneklerinin Alınması ve Değerlendirilmesi.....	69
5.2.4 Semen Analizi.....	69
5.2.4.4. Hareketlilik:	72
5.3. DENEY GRUPLARI	72
5.3.1. Kontrol Grubu;.....	72
5.3.3. Kök Hücre Grubu + Normal Glikoz (KHNG):.....	72
5.3.4. Kök Hücre + Niş + Normal Glikoz (KHNSNG):	73
5.3.5. Niş + Normal Glikoz (NSNG):.....	73
5.3.6.Yüksek Glikoz (YG):.....	73
5.3.7. Kök Hücre Grubu + Yüksek Glikoz (KHYG):.....	73
5.3.8. Kök Hücre Grubu +Niş + Yüksek Glikoz (KHNSYG):	73
5.3.9. Niş + Yüksek Glikoz (NSYG):.....	73
5.3.9. Kriyoprezervasyon:.....	73
5.3.10. Normal Glikoz Besiyeri:	74
5.3.11. Yüksek Glikoz Besiyeri:	74

5.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	74
5.5. GRUPLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ DEĞERLENDİRİLMESİ:	75
6. BULGULAR	76
6.1. MKH İZOLASYON VE KARAKTERİZASYON BULGULARI	76
6.2. SPERM UYGULAMA SONUÇLARI	78
6.2.1 Sperm Canlılık Testi:	80
6.2.2. Sperm Örneklerinin Farklı Kültür Ortamında 24 Saatlik İnverted Mikroskop İle Değerlendirilmesi	81
6.3. SPERM ÖRNEKLERİNİN KRİOPREZERVASYON SONRASI İNVERTED MİKROSKOP İLE DEĞERLENDİRİLMESİ	91
6.3. SPERM YAYMALARININ DİFF – QUICK BOYAMA İLE DEĞERLENDİRİLMESİ	95
6.4. MİKROSKOPİK BULGULAR	96
6.4.1. H-E Histokimya Bulguları	96
6.4.2. NOS Boyamasına Ait Bulgular	98
6.4.3 TUNEL Boyamasına Ait Bulgular	99
7. TARTIŞMA	102
8. SONUÇ VE ÖNERİ	112
9. KAYNAKÇA	113
10. EKLER	123

Başlık: Yüksek Glikozlu Besiyeri ile Deneysel Diyabetik Modelde Hasara Uğratılmış Spermilere Dondurma – Çözme İşlemi Sonrası Kök Hücre ve Niş etkisi

Öğrencinin Adı: Biyolog KAAN ÇELEN

Danışman: Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU

Anabilim Dalı: HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

1. ÖZET

Amaç: Sperm dondurma işlemi, spermilerin kriyoprotektanlar ile -80 -196 °C sıcaklık arasında dondurularak ihtiyaç duyulduğunda tekrar kullanılması amacıyla saklanması işlemidir. Diyabetes Mellitus insülin hormonu eksikliği ya da etkisizliğidir. Yüksek kan şeker düzeyinden dolayı DM hastalarında tüm hücreler oksidatif stres altındadır ve DM nin oluşturduğu hücre hasarından dolayı sperm kalitesi düşmektedir.

Kök hücreler organizmanın kendi bünyesinde bulundurduğu kolayca elde edilen ve faktörler aracılığı ile yönlendirilen öncül hücrelerdir. Çalışmalarda kök hücrelerin diğer hücreleri olumlu yönde etkiledikleri bilinmektedir. Çalışmamızda kök hücre ve çevresinin krioprezervasyonun olumsuz etkisi ve diabetin olumsuz etkisi üzerine etkisi değerlendirilerek literetürdeki eksiklik giderilecektir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda Mezenşimal kök hücre otolog olarak, Sperm hayvanın epididimisin mekanik ayrışma yöntemiyle, hazırlanmış olup deney grupları kök hücre, niş ve kök hücre + niş olacak şekilde diabet taklit grubu ve normal glikoz şeklinde gruplar hazırlandı.

Bulgular: Tüm deney gruplarında krioprezervasyon ve zaman apoptatik etkiyi ve oksidatif sitresi artırdığı, diabet taklit gruplarında bu olumsuz etkilerin çok daha arttığı, fakat kök hücre niş ve kökhücre + niş olan gruplarda oksidatif sitres ros düzeylerinin ve canlılık hareket değerlerinde yapılan analizde iyileşme olduğu ($p<0,01$) gözlemlendi.

Sonuçlar: Çalışmamız sonuçta bulgular ile yapılan değerlendirmede; Dondurma çözmenin sperm hasarını artırdı, Diabet in bu hasarları dahada artırdığı, Mezenşimal kök hücre ve niş uygulamalarının bu hasarları azalttığı gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Yağ dokusu Mezenkimal Kök Hücresi, İn Vitro Fertilizasyon, sperm, diabetes mellitus, sperm dondurma

Title: Stem Cell and Niche Effect after Freezing-Thawing Process on Damaged Sperm in Experimental Diabetic Model with High Glucose Media

Student name: Biologist KAAN ÇELEN

Supervisor: Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU

Department: Department of Histology and Embryology

2. SUMMARY

Aim: Sperm freezing is the process of freezing sperm with cryoprotectants at a temperature of -80 -196 ° C and storing them for reuse when needed. Diabetes Mellitus (DM) is insulin hormone deficiency or ineffectiveness. All cells in DM patients are under oxidative stress due to high blood sugar levels and sperm quality decreases due to cell damage caused by DM. Stem cells are precursor cells that are easily obtained and directed by factors within the body of the organism. In studies, it is known that stem cells affect other cells positively. In our study, the deficiency in the literature will be eliminated by evaluating the negative effect of stem cell and its environment on the negative effect of cryopreservation and the negative effect of diabetes.

Materials and Methods: In our study, the mesenchymal stem cell was prepared as autologous, by the method of mechanical dissociation of the sperm animal's epididymis, and groups such as diabetes mimicry group and normal glucose were prepared with the experimental groups stem cell, niche and stem cell + niche.

Results: In all experimental groups, cryopreservation and time increased apoptotic effect and oxidative stress, these negative effects increased much more in diabetes mimicking groups, but there was an improvement in the analysis of oxidative stress levels and vitality movement values in stem cell niche and stem cell + niche groups ($p < 0,01$) was observed.

Conclusion: In the evaluation made with the results of our study; It was observed that freezing thawing increased sperm damage, Diabetes increased these damages even more, and Mesenchymal stem cell and niche applications reduced these damages.

Key words: Adipose tissue Mesenchymal Stem Cells, In Vitro Fertilization, sperm, diabetes mellitus, sperm freezing

3. GİRİŞ

Sperm dondurma olarak adlandırılan işlem, sperm hücrelerinin -80 -196 °C sıcaklık arasında dondurularak ihtiyaç duyulduğunda tekrar kullanılması amacıyla saklanması işlemidir. İlk denemeler 1940'lı yıllarda veteriner hekimler tarafından denemeleri yapılmıştır (Celik, Ozkavukcu, & Celik-Ozenci, 2020). Kriyoprezervasyon işleminde spermier kriyoprotektan adı verilen maddeler kullanılarak -196 °C sıvı azotta bekletilerek yıllarca saklanabilir (18). Donma işleminde oluşan buz kristallerinin verdiği hasarı en aza indirmek adına kriyoprotektanlar kullanılır. Su moleküllerinin yerini alan Gliserol, dimetilsülfoksit ve pentoksifilin gibi ajanlar, Su ile yer değiştirerek hücrelerin donma noktasını düşürmekte, hücrenin çözünen ve tuz oranını azaltmakta, hücreyi yüksek osmolariteden korumakta, takip edilebilir düzeyde dehidratasyon sağlayıcı bu özelliklere bağlı olarak hücreyi korumaktadır (Sherman, 1976).

İnsan erkek üreme hücresi (sperm) 1950 yılında dondurulmuştur ve 1954'te üreme için başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Sherman, 1976). İlerleyen dönemlerde, 1962 yılında Sherman ve arkadaşları nitrojen buharında spermierin dondurulması ve saklanması sağlanmış, saklanan spermier on yıl sonra kullanılarak başarılı gebelik elde edildiği bildirilmiştir (Hinting & Agustinus, 2019). Bu nedenle krioprezervasyon, Sık tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir. Çözdürme işlemi sonrası spermier IUI (İntra Uterin İnseminasyon), IVF (İn Vitro Fertilizasyon) ya da ICSI (İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu) işlemi için kullanılabilir (Feldschuh, Brassel, Durso, & Levine, 2005; Simon, Zini, Dyachenko, Ciampi, & Carrell, 2017).

Sigara kullanımının sperm kalitesine zarar verdiği bildirilmiştir (Elshal, El-Sayed, Elsaied, & El-Masry, 2009). Kanseri tedavisine kullanılan radyoterapi ve kemoterapi sonrası veya invaziv girişimler sonunda üreme bozuklukları oluşabilir. Böyle durumlar sonrasında çiftlere üreme sağlığında yardımcı olduğu ispatlanmış olup hali hazırda kullanılan tek yöntem sperm kriyoprezervasyonudur (Zribi, et al., 2010). Kanseri tedavisinde kâr zarar hesaplaması yapılarak yaşam süreni artırmak için yapılan tedaviler infertiliteye neden olabilmektedir. Tedavide kullanılan kemoterapik ve radyoterapik ajanlar spermatogenezi negatif yönlü olarak olumsuz etkilemektedir. Kriyoprezervasyon işlemi, Kanseri tedavisi görececek kişilerin sperm ve semen kalitesini

korumak için altın standarttır (Çelik). Planlı tedaviler öncesinde sperm örnekleri alınıp dondurulup saklanabilir böylece örneklerin tedavi sırasında oluşabilecek DNA (Deoksiribo Nükleik Asit) hasarlarını minimize etmek açısından önem taşır (Lee SJ ve ark 2006; Santi, Spaggiari, & Simoni, 2018).

Sperm Dna fragmentasyonu infertil erkekler ve sağlıklı bireyler arasında yapılan kıyaslamada, Fragmentasyon miktarı interftiliteyi doğrudan etkilediği saptanmıştır (Sun, Jurisicova, & Casper, 1997; Guz, Gackowski, Foksinski, Rozalski, & Zarakowska, 2013). Değişik çalışmalara Dna fragmentasyon tayin yöntemleirni değiştirseelerde temel kanı şudurki Dna fragrantasyonu artıkça infertilite artar ve intfertil çiftlere bakıldığında dna fragmentasyonu anlamlı oranda yüksektir (Tunç. & Bozkırlı, 2013).

Günümüzde artan bir şekilde sorun haline gelen çocuk sahibi olamama durumu, geliştirilen yeni tekniklerle aşılmaya çalışılmaktadır. Bu tekniklerin önemli bir tanesi ise fertilizasyonun laboratuvar koşullarında sağlandığı in vitro fertilizasyon (İVF) olup başarı oranı maalesef hala yeterli değildir (Zhang, Zhu, Jiang, & Chen, 2015). Bu başarının artırılması için değişik besiyeri, büyüme faktörleri ve hormonlar gibi etkenler ile daha iyi sonuç elde edilmeye çalışılmaktadır. Kök hücreler organizmanın kendi bünyesinde bulundurduğu kolayca elde edilen ve faktörler aracılığı ile yönlendirilen öncül hücrelerdir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda bu kök hücrelerin bizatihi kendilerinin dışında salgıladığı faktörler ile niş denilen bir mikro çevre oluşturarak özellikle kanser hücrelerinde olmak üzere diğer hücreleri olumlu yönde etkiledikleri bilinmektedir (Çetin & Çetin, 2014).

Toplumumuzda ve bulunduğumuz dönemde sık olarak raslanan ve bir kronik rahatsızlık olan Diyabetes Mellitus insülin hormonu eksikliği ya da etkisizliğidir. Yüksek kan şeker düzeyinden dolayı DM hastalarında tüm hücreler oksidatif stres altındadır ve DM nin oluşturduğu hücre hasarından dolayı sperm kalitesi düşmektedir ve DM infertilitenin önemli problemlerinden biridir (Özcan, 2017).

Bu çalışmada sıçanlardan alınan spermier yüksek glikozlu ortama alınarak diabetin spermlere uğrattığı zararlı etkiyi kök hücre ortamında ve kök hücrenin beklediği besiyerde muamele edilerek sperme etkisi saptandı. Kök hücre mikro çevresinin fertilizasyon üzerine etkileri ilgili parametrelerle ortaya konup daha kaliteli bir sperm saptanmaya çalışıldı. Çalışmamızda yüksek glikozlu ortamda kök hücre ve niş ‘e maruz bırakılan spermierin sıfır ile yirmidört saat ve eş zamanlı olarak dondurulup çözülüp sıfır üç saat arasındaki süreçte spermierin hareket, sperm kalitesi,

canlılığı apoptoz düzeyi yönünden etkileri ortaya kondu. Literatürde Dondurma – Çözme İşlemi Sonrası Hasara Uğratılmış Sıçan Spermlerinin Yüksek Glikozlu Besiyeri ile Kültür ortamında Deneysel Diyabetik Modelde Kök Hücre ve Niş uygulaması ile tedavisi hakkında bilgi olmayıp literatüre diabet modelinde dondurma çözme hasarının kök hücreye etkisi nin eksikliği giderilecektir.

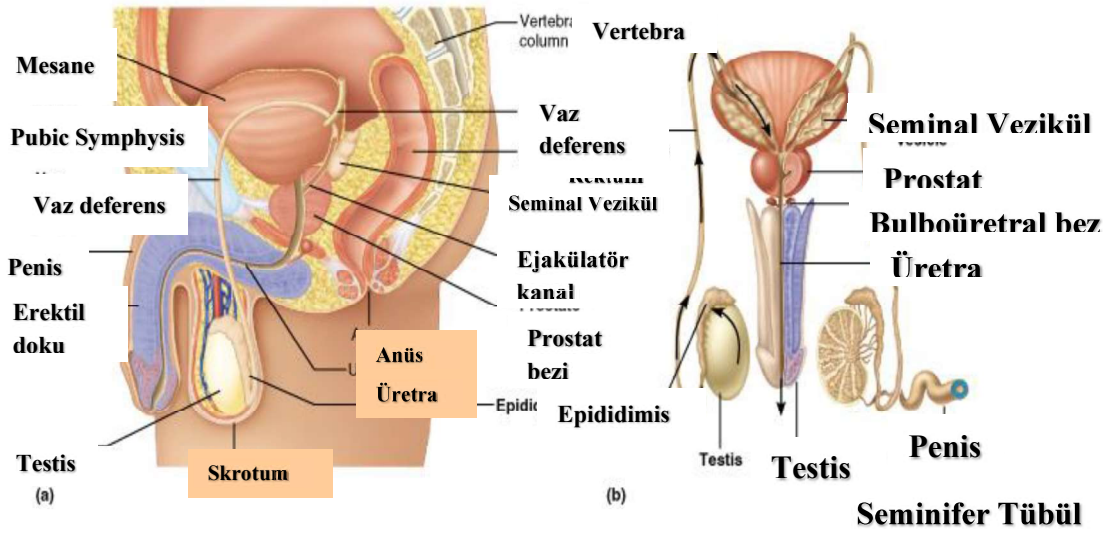


4. GENEL BİLGİLER

4.1. ERKEK ÜREME SİSTEMİ

Erkek üreme sistemi; testisler, testis genital kanallar (rete testis, tubuli rekti, duktuli efferentes), genital boşaltım kanalları (duktus deferens, duktus epididimis, duktus ejakulatoryus) yardımcı bezler (prostat, seminal vezikül, bulboüretral bez) ve penisten oluşmuştur (**Resim 2.1.1**). Testisin endokrin ve ekzokrin işlevleri bulunmaktadır. Erkek üreme sisteminin gelişimi ile ilgili hormonların üretimi endokrin işlevini, spermiyum (spermatozoon) üretimi ekzokrin işlevini oluşturmaktadır (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013).

Genital kanalların ve yardımcı bezlerin salgısı, düz kas kasılma hareketi yardımı ile spermatozoonları dışarı yönlü hareket sağlar. Ayrıca bu salgı spermatozoonlar için gerekli besini sağlar. Genital kanallar ve yardımcı bezlerin salgısına spermatozoonların eklenmesi ile oluşan semen penis yoluyla dışarı atılır (Bingöl, Deprem, Koral Taşçı, & Kocamış, 2011; Jangueria, Carneiro, & Kelley, 1998).

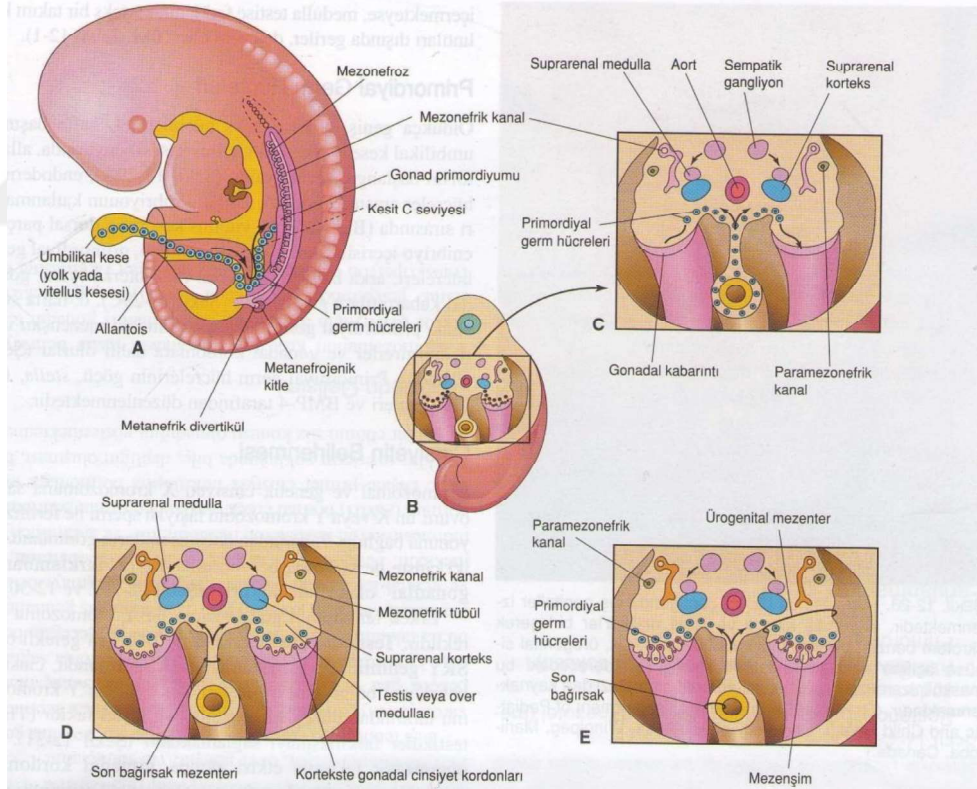


Resim. 4.1.1. Erkek üreme sistemi genel yapısı (12;13).

4.2. ERKEK ÜREME SİSTEMİ EMBRİYOLOJİSİ

4.2.1. Primordial Germ Hücreleri

Embriyonik gelişim, erkek ve dişi gameti olan spermiyum ile oositin birleşmesi olayı olan fertilizasyon ve sonrasında zigot oluşumu ile başlar. Gametler embriyonik gelişimin 2. haftası boyunca epiblastın içinde oluşan ve daha sonra allantoisin başlangıç yerine yakın, vitellüs kesesine (yolk kesesi) göç eden oldukça geniş, oval (PGH) primordial germ hücrelerinden köken alırlar. Embriyonun katlanma sırasında vitellüs kesesinin dorsal parçası embriyo içerisinin bir bölümü olur. Katlanmalar sürecinde, PGH, arka bağırsağın dorsal mezenteri boyuna gonadal kabarıntılara göç ederler (**Resim 2.2.1**). 6. hafta sırasında PGH'leri altındaki mezenşim içerisine girerler ve gonadal kordonlara katılır. PGH'nin göçü, stella, fragilis genleri ve BMP-4 tarafından düzenlenmektedir (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013; Kierszenbaum, 2006).



Resim 4.2.1. Primordial germ hücrelerinin göçü (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013).

Göçle aktif olan mitotik bölünmelerle sayıca çoğalan hücreler, gonadlara gittikten sonra da bölünmeye devam ederler. Fertilizasyona sürecine hazırlık için germ

hücreleri gametogenez sürecine başlarlar. Gametogenez sırasında mayozla kromozom sayısı yarıya iner. Ardından da farklılaşma sürecine girerler (Kierszenbaum, 2006).

Cinsiyetin farklılanması, otozomal ve cinsiyet ile pekçok genin rol oynadığı karmaşık bir süreçtir. Seksüel dimorfizmin anahtarı kısa kolunda (Yp11) **SRY** genini (Sex-determining **R**egion on **Y**) taşıyan Y kromozomudur. Yapılan araştırmalarda SRY geninin testiküler farklılaşmanın ilk dönemlerinde etkin olduğu anlaşılmış ve azospermi ya da oligozoospermi durumlarında %10 oranla Y kromozomunun q kolunda kısmi delesyon varlığı belirlenmiştir. Bu delesyonlarla Y kromozomu üzerinde etkisi olan 3 ana dizi daha ortaya çıkmıştır; AZFa, AZFb ve AZFc (10). Bu genin protein ürünü cinsiyetin kaderini belirleyen genleri harekete geçiren bir transkripsiyon faktörüdür. SRY proteinini **Testis Belirleyici Faktör (TBF)**'dür. Bu faktörün ortamda olması fetusun cinsiyeti erkek tipinde (XY), yokluğunda da kız tipinde (XX) gelişir (Kierszenbaum, 2006).

Ne kadar embriyonun kromozomal cinsiyetini belirleyen erkek olsada, dişi ve erkeğin embriyo bazlı morfolojik karakteri, 7. embriyonik haftaya kadar gelişim sürecine girmezler. Erken dönemde genital sistem her iki cinste de benzer şekildedir, buyüzden genital sistemin gelişiminin başlangıç dönemine *seksüel gelişimin farklılaşmamış safhası* olarak isimlendirilir (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013).

4.2.2. Gonadların Gelişimi

Testis ve over mezodermal epitelden, embriyonik bağ dokusundan ve primordial germ hücrelerinden köken alır.

Mezodermal epitelden posterior abdominal duvarı döşeyen mezotel köken alırken

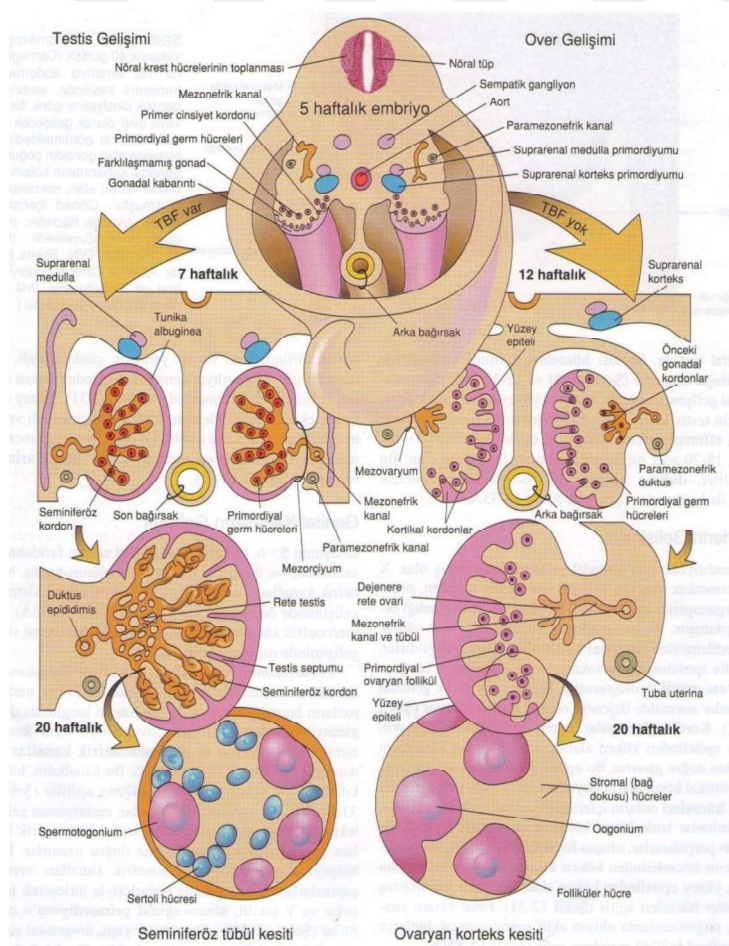
Embriyonik bağ dokudan mezotelin altındaki mezenşim dokusu oluşturur.

Primordiyal germ hücreleri gonadlardaki üreme hücrelerini meydana getirir.

Gonadal gelişimin ilk safhaları 5. haftada ortaya çıkar. Mezotelde bir kalınlaşma mezonefrozun medialinde meydana gelir. Genital veya gonadal kabarıklık kölomik epitel ve altındaki mezenşimin çoğalması ile oluşur. Parmak şeklindeki epitelyal kordonlar (gonadal kordonlar) altındaki mezenşim içerisine doğru kısa sürede büyürler (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013). Bu genital kabarıklıklar içinde gelişimin 6. haftasına kadar germ hücreleri yoktur. Primordiyal germ hücreleri (PGH), 5. haftanın başında primitif gonadlara ulaşır ve 6. haftada genital kabarıklıkları işgal ederler (**Resim 2.2.2.**). PGH'lerinin primitif gonadlara ulaşması sırasında ve hemen önce,

genital kabarıklığın epiteli çoğalır ve epitel hücreleri altlarında yer alan mezenşimin içine gömülürler. Bunlar burada **primitif cinsiyet kordonları** denilen düzensiz kordonları oluştururlar. Bu hücreler genital kabarıklıklara ulaşamadıkları takdirde gonadlar gelişemez. Gonadların ovaryum veya testise farklılaşmasında PGH'lerinin indükleyici etkisi vardır (Kierszenbaum, 2006).

Hem dişi hem de erkek embriyolarda bu kordonlar yüzey epiteline bağlıdır ve bu dönemde dişi veya erkek gonadlarının birbirinden ayırt etmek mümkün değildir. Bu safhadaki gonad **farklanmamış gonad** olarak bilinir. Farklanmamış gonad, dışta bir korteks ve içte yer alan bir medulla'dan oluşur. Eğer embriyo XX kromozom yapısına sahipse, farklanmamış gonad'ın korteksi overe farklılaşır, medullası geriler. Embriyo XY kromozom yapısına sahipse, medulla gelişir ve testisin seminifer tubuluslarına farklılaşır, korteks dejenere olur (Kierszenbaum, 2006; Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013).



Resim 4.2.2. Gonadların gelişimi (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013)

4.2.3. Testislerin Gelişimi

Erkek fenotip gelişimi için bir Y kromozomun olması gereklidir. Primordiyal Germ hücrelerinin içindeki cinsiyet kromozomları eğer embriyo erkek ise XY şeklindedir. **Testis Belirleyici Faktörü (TBF)** kodlayan Y kromozomu kısa kolundaki SRY geninin ortamda varlığıyla, medulla kordonları veya primitif cinsiyet kordonları oluşturmak üzere, çoğalıp medullanın derinliklerine doğru ilerlerler. Bu organizatör faktörün etkisiyle, gonadal kordonlar, seminiferöz kordonlara (seminiferöz tübül primordiyumlarına) farklanırlar. Seminiferöz kordonların oluşumunda, Sox 9 ve Fgf 9 genlerinin ekspresyonları ile bağlantılıdır (4,5). Bu kordon yapıları bezin hilusuna, daha sonra rete testis tübüllerini oluşturmak üzere ince hücre sıralarından oluşan ağsı bir yapı görünümü aarak dağılırlar. Gelişimin daha ileri safhalarında testis kordonlarının yüzey epiteliyle olan ilişkileri *tunika albuginea* olarak isimlendirilen yoğun fibröz bir bağ dokusunun araya girmesiyle tamamlanır. Dens tunika albuginea'nın gelişimi, testiküler gelişme için çok spesifik ve kritiktir. Büyüyen ve gelişen testis aşamalı olarak dejenere olan mezonefrozdaki ayrılarak kendi mezenterisi olan, **mezorsiyum** ile asılı forma geçer. Seminiferöz kordonlar, seminiferöz tübüllere, tubuli rekti ve rete testis'e farklanırlar (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013).

4. ayda ise, atnalı formunu alan testisin kord kısımlarının uçları rete testis ile devam eder. Bu olay testis kordonları artık PGH ve bez-yüzey epitelinden kökenlenmiş **Sertoli** (destek) hücrelerinden oluşmaktadır (Kierszenbaum, 2006).

Gonadal bölge dorsali mezenşiminden kökenlenen *interstisiyel Leydig hücreleri* testis seminifer kordonlarının arasında bulunur ve bu kord farklılaşmaya başlamayla tetiklenir hemenfarklılaşmaya başlar. Gestasyonun 8. haftada Androjenik hormonlar, Leydig hücreleri etkisi ile üretilmeye başlarlar, bu da hormonlar mezonefrik kanalların ve dış genitalerin maskülin olarak farklanmasını uyarırlar. Testesteron üretimi hCG etkisiyle üretimini stimüle edilerek başlar. 8-12 haftalık dönemde hormonun miktarı pik değerine ulaşır (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013). Testisler artık genital kanal ve dış genital organların cinsiyetini etkileyecek hale gelmiştir. Fetal testisler tarafından üretilen **testosteron**, dihidrotestosteron (testosteron metaboliti) ve **Müllerian İnhibe edici Madde (MİM)** veya **Anti Müllerian Hormon (AMH)** normal erkek cinsiyet oluşumunu belirlemektedir. Sertoli hücreleri (destek hücreleri) AMH salgılar, puberteye kadar hormonun salınması devam eder ve sonrasında oran azalır. AMH,

uterus ve tuba uterinalara farkan, paramezonefrik (müllerian) kanalların gelişimini baskılar (Kierszenbaum, 2006; Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013).

Seminifer tübüller saklanmak üzere puberte döneminin başlamasına kadar solid halde durur. Pubetede testis seminifer kordonları pubertede lümenleri açılarak son seminifer tubul haline gelirler. Seminiferöz tübül duvarında iki tip hücre bulunur:

-Sertoli hücreleri, bu hücreler destek hücreleri olan testisin yüzey epitelinden gelişirler.

-Spermatagonia, primordiyal sperm hücreleri olan bu hücreler, primordiyal germ hücrelerine dönüşürler.

Fetal yapıdaki testiste, seminifer tübüllerde sertoli hücreleri oranca fazladır. Devam eden fetal gelişme sırasında, testis yüzey epiteli düzleşir ve yetişkin testisin dış yüzeyindeki mezoteli oluşturur (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013). Rete testis tübülleriyle kanalize olan seminifer tübüller birleşir. Rete testis, duktuli **effeentes**'leri meydana getiren, 15-20 tane mezonefrik tübüller olarak süregelir. Bu tubuller mezonefrik kanal ile bağlantılıdır. Duktus deferens ise rete testis ile *mezonefrik veya Wolffian* kanalları birbirine bağlar (Kierszenbaum, 2006; Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013).

Testisler retroperitoneal olarak, karın boşluğunun arka duvarında gelişir. Fetusun gelişirken göç ederek spermatik kordonların sonlarında skrotumda asılı olarak bulunurlar (Cohen-Bacrie, Belloc, Ménézo, Clement, & Hamidi, 2009). Bu özel yerleşim ile testisler ile vücut sıcaklığı arasında 2°C- 3°C derece fark oluşması sağlanır. Sağlıklı sperm üretmesi için 34°C ila 35°C idealdir (Gneist, et al., 2007). Skrotum, bu düşük sıcaklık korunma olayında önemli bir role sahiptir.

4.2.4. Genital Kanalların Gelişimi

Genital sistem gelişimin 5.-6. haftalarında farkanmamış evrededir ve erkek ve dişi embriyolarda **Mezonefrik (Wolffian) kanallar** ve **Paramezonefrik (Müllerian) kanallar** olarak iki çift genital kanal vardır. Erkek üreme sisteminin oluşumu ve gelişiminde mezonefrik kanallar çok kritik ve önemli iken, dişi üreme sisteminde ise paramezonefrik kanallar önemli rol oynamaktadırlar (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013; Kierszenbaum, 2006).

Gonadların ve mezonefrik kanalların yan taraflarında paramezonefrik kanallar gelişirler ve mezonefrozarın lateral yüzeylerinde, mezotelin longitudinal

invaginasyonlarından oluşurlar. İnvaginasyonların kenarları birbirleriyle kaynaşır ve paramezonefrik kanallar meydana gelirler. Huni şeklinde bu kanallar kraniyal uçları periton boşluğuna açılırlar. Paramezonefrik kanallar, embriyonun gelecekteki pelvik bölgesine ulaşmaya kadar, mezonefrik kanallara paralel olarak devam eder kaudal yöne doğru uzanırlar. Pelvik bölgeye ihtiva ettiklerinde, mezonefrik kanalları ventralde çaprazlarlar ve orta planda birbirleriyle birleşerek bütünleşir ve Y şekilli, **uterovaginal primordiyum**'u oluştururlar. Bu tübüler yapı, ürogenital sinüsün dorsal duvarı içine ihtiva eder, burada bir yükselti (kabarıntı) halinde olan, **sinüs tüberkülü**'nü oluşturur (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013).

Genital Kanalların Gelişiminin Moleküler Düzeni:

SRY geni testisin gelişimi üzerinde en temel rolü oynayan gonadal sırtı doğrudan, mezonefrik kanalları da dolaylı şekilde tetiklemektedir. SRY geni testisin ileri yönlü hareketi ve kanal tübüleirniin yapışması için uyarma görevi görür. Bu tübüller genital sırtı penetre edemedikleri takdirde testisin gelişmesi olanaksızdır. SRY aynı zamanda Sertoli ve Leydig hücrelerinin farklanabilmesi için gerekli olan **SOX 9** üzerinden gösteren **steroidogenezis faktörü 1**'in salgı yönetiminden sorumludur. Ayrıca sertoli hücreleri tarafından salgılanan **Müllerian İnhibe edici Madde (MİM, Anti Müllerian Hormon -AMH- olarak da bilinir)** de paramezonefrik (müllerian) kanalların gerilemesini sağlamaktadır (Kierszenbaum, 2006).

Maskülinizan hormonlar (Testosteron ve MİM) fetal testisler tarafından üretilirler. Sertoli hücreleri, MİM ya da diğer adıyla AMH üretimine 6.-7. haftada başlarlar. Testosteron salgılaması 8. Haftada İnterstisyel hücreler tarafından başlarlar. **İnsan koryonik gonadotropik hormonu (hCG)** testosteron üretimini aktifleştirir. Erkeklerde mezonefrik kanallardan erkek genital kanalların oluşumunu testosteron uyarırken, MİM paramezonefrik kanalın epiteliyal-mezenşimal dönüşüme sebep olur. 8. haftada, testosteronun etkisiyle her bir mezonefrik kanalın proksimal kısımları kıvrıntılı hal alarak epididimisi oluşturur. Mezonefroz dejenere olduğunda, mezonefrik kanallardan bazıları kalır ve efferent duktulileri meydana getirirler. Duktuliler duktus epididimis'e açılırlararak epididimis distalinde mezonefrik kanal, kalın bir düz kas tabakası kazanır ve duktus deferens meydana getirirler (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013).

Leydig hücrelerinden sekrese edilen testosteron da hedef dokulardaki hücrelerin içine girer ya öylece kalır ya da **5 α redüktaz** enzimiyle dihidrotestosterona modifiye olur. Testosteron ve dihidrotestosteron hücre içinde bu hormonlara karşı özel gelişmiş

olan ve yüksek afinitesi olan bir reseptör proteine bağlanırlar. Bu özel reseptör kompleksi de dokuya özgü transkripsiyon genlerinin ve bu genlerin protein ürünlerinin etki edebilmesi için DNA'ya bağlanır. Testosteron reseptör kompleks mezonefrik tubullerin virilizasyonunu oluştururken, dihidrotestosteron reseptör erkek genitak ayapılarının farklılaşmasını sağlar (Kierszenbaum, 2006).

Önceleri cinsiyetin dişi yönünde diferensiyonu için sadece Y kromozomunun bulunmamasının yeterli olduğu bu sürecin pasif olan bir süreç olduğu düşünülürdü. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar ile primitif gonadın, tıpkı testisteki gibi overe farklılaşması için de bazı genlerin varlığına bağımlı olduğu anlaşılmıştır. Örneklendirmek gerekirse, nükleer hormon reseptör ailesininden ve X kromozomunun kısa kolu üzerinde yer alan **DAX 1**, **SF 1** aktivitesini düzenler ve Sertoli ve Leydig hücrelerinin oluşmasını bloke etmektedir (4).

Mezonefroz gerilerken, birkaç boşaltım kanalı **epigenital tübül** olarak adlandırılan rete testis kanallarıyla birleşerek ve bağlantı kurarak efferentesleri oluştururlar. Testisin kaudal kutbunda bulunan boşaltım kanallarıysa, **paragenital tübüller**, rete testis kordonlarıyla birleşmez. **Paradidimis** bu yapı kalıntılarının tamamının addıdır (Kierszenbaum, 2006).

Mezonefrik kanallar en kranialdeki kısmı, **apendiks epididim**, dışında ana genital kanalları meydana getirir. Mezonefrik kanallar efferent duktusların hilusunun hemen altından itibaren uzayarak, kıvrıntılı bir yapı forma geçerler ve **duktus epididimisi** oluştururlar. Mezonefrik kanalın **Duktus deferens**, epididimin kuyruğundan seminifer vezikül domurcuğuna kadar kalın bir kılıfının büzülmesiyle meydana gelir. Ve sonraki parçası **duktus ejakulatoryus** olarak adlandırılır. Paramezonefrik kanallar erkeklerde kranial uçlarındaki küçük bir kısım dışında (appendiks testis) dejeneresyona giderler (Kierszenbaum, 2006).

4.2.5. Genital Bezlerin Gelişimi:

4.2.5.1. Seminal vezikül

Seminal bezler mezonefrik kanal lateralinden dışa doğru gelişir. Bezler, ejakülasyonla dışarı atılan sıvının büyük kısmını oluştururlar ve bu salgılar spermlerin beslenmesini sağlar. Seminal bezlerin kanalı ile üretra ortasında duran mezonefrik

kanalın kısmı ejakülatuar kanal olarak gelişimini sürdürmektedir (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013).

4.2.5.2. Prostat

Prostat üretrada bulunan prostatik kalanılın parçalanmasıyla meydana gelir. Büyük bir çoğunlukta endodermal uzantıyla beraber mezenşim dokusuna doğru uzanarak büyür. Prostatın bir parçası olarak bulunan glandüler salgı epiteli bu endodermal hücrelerden gelişimini sürdürürken, epitel hücresiyle ilişkili içinde bulunan mezenşimden ise organ stromasıyla düz kasları meydana getirmektedir (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013).

4.2.5.3. Bulboüretal bezler

Bezelye görünümünde olan bu organlar üretra spongios kısmında ikili şekilde, dış yönlü büyümeyi gerçekleştiren hücrelerden köken alarak oluşurlar. Kökeni mezenşim kaynaklıdır. Bezlerin salgısı semenle karışmaktadır (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013).

4.2.6. Dış Genital Organların Gelişimi

Farklanmamış evrede, 7. hafta sonlarına kadar dış genital komponentlerin gelişimi dişi gelişimi ve erkek gelişimi benzerdir. Cinsiyet farklılaşması 9. haftada kendini göstermeye başlar ancak 12. Haftaya kadar dış genitallerin diferensiyonu total olarak tamamlanmış değildir. Gelişimin 3. haftası sonunda, primitif çizgiden kökli mezenşim hücreleri bölünerek, kloakal membranın etrafına **kloakal kıvrım** adı verilmiş olan bir çift, hafifçe yüksek bir şişlik meydana getirmek üzere göç ederler. Bu kıvrımlar, kloakal membranın kranialinde birleşerek **genital tüberkül**'ü meydana getirirler (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013; Kierszenbaum, 2006). Genital tüberkül hızlı bir şekilde uzayarak bir **primordiyal fallus** oluşur. 6. haftanın sonunda, ürorektal septum kloakal membran ile birleşir, kloakal membran; dorsalde **anal membrana** ile ventralde **ürogenital membrana** bölünür. Ürogenital membran, **üretral katlantılara** bağlanmış median bir oluk olan **ürogenital oluğun** tabanında bulunur. Anal ve ürogenital membran bir hafta sonra yitilerek anüs ve ürogenital açıklığı oluşturur. Dişi

fetuslarında üretra ve vajina ortak bir boşluk olan **vestibüle** açılırlar (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013).

Bununla beraber üretral kıvrımların her iki yanında labioskrotal şişkinlikler ve ürogenital katlantılar meydana gelir. Bunlar, daha sonra erkeklerde **skrotal şişlikleri**, kızlarda da **labia majörleri** meydana getirecektir.

Farklanmamış dış genital organların erkek yönünde gelişmeleri, fetal testisler tarafından üretilen testosteron hormonunun etkisiyle tetiklenir. **Fallus** olarak isimlendirilmiş olan genital tüberkülün hızlı bir şekilde uzamasıyla penis oluşur. Bu uzama evresinde, fallus penisin ventral yüzeyinde, ürogenital katlantıları frontale çekerek ürogenital oluğun lateral duvarlarının oluşturur. Bu oluk, uzayan fallusun kaudal kısmına kadar ihtiva eder; ancak en uç noktasına yani glansa ulaşamaz. Bu oluğun endodermal kökenli epiteli **üretral plağı** meydana getirir (Kierszenbaum, 2006). Üçüncü ay sonunda, penis vantral yüzeyi boyunca ürogenital katlantılar birleşerek (**penil**) üretra'yı meydana getirir. Bu kanal fallusun ucuna kadar devam etmez. Yüzey ektodermi, penisin median hattında birleşerek penil rafe'yi meydana getirir, böylece spongioz uretra penis içerisinde geri dönüşümsüz olarak konumlandırılır. Glans penisin ucunda, üretranın en distal kısmı 4. ayda ektodermal kökenli içe doğru uzayan, hücresel bir kordondan meydana, bu oluşum penis köküne doğru büyür ve spongioz üretra ile birleşir. Bu hücresel kordon tubal olarak, daha önceden oluşmuş olan spongioz üretraya bağlanır. Bu şekilde, üretranın terminal parçası tamamlanır ve dış üretral açıklık (**eksternal uretral meatus**) glans penis ucuna açılmış olur (Kierszenbaum, 2006; Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013).

12. haftada, glans penisin periferinde, sirküler bir ektodermal içe büyüme oluşur. Bu iç yönlü büyüme, kanalize olarak şekillendiğinde, örtücü özellikte bir deri katlantısı olan, prepus'u oluşturur. Penisin, corpus spongiosum ve corpora cavernosa kısımları, fallus mezenşiminden köken alır ve gelişir. Erkeklerde skrotal şişkinlikler birbirlerine doğru büyüyerek sonuçta birleşirler ve skrotumu oluşturur. Önce inguinal bölgede yerleşmiştir. Gelişimin daha ileri safhalarında, kaudal yönde ileri hareketle her şişlik kendi tarafındaki hemiskrotumu meydana getirir. İki hemiskrotum birbirinden **skrotal septum** ile ayrılmıştır. Katlantıların birleşme çizgisi, skrotal rafe olarak açıkça görülebilir. Skrotumun agenezi (hiç oluşmaması), çok nadir görülen bir anomalidir (Kierszenbaum, 2006; Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013).

4.2.7. Testislerin İnişi

Testis ve mezonefroz 2. ayın sonunda karın arka duvarına **ürogenital mezenterle** bağlı durumdadır. Mezonefroz bozulduğunda sonra bağlantılar gonadın mezenteri haline dönüşür. Bu mezenterin kaudali bir ligament haline gelir ve **kaudal genital ligament** adını alır. Testisin alt kutbundan çıkan ve ekstraselüler matriksçe zengin olan mezenşimal yapıya **gubernakulum** denir. Testisin skrotuma inmesinden önce, gubernakulum inguinal bölgede, internal ve eksternal abdominal oblik kasların arasında biter. Testis inguinal halkaya doğru aşağı yönlü harekete başladığında gubernakulumun ekstra abdominal parçası da inguinal bölgeden skrotal şişliğe doğru büyümeye başlar. Testisler inguinal kanaldan geçerken, gubernakulumun ekstra abdominal kısmı skrotumun tabanına değer. Testiküler iniş iki basamakta gerçekleşir: transabdominal iniş, tahminen fetal Sertoli hücrelerince üretilen MİM tarafından düzenlenir ve inguinal-skrotal inme, genitofemoral sinir tarafından taşınan kalsitonin gen-ilişkili peptid ile indüklenen androjen salınımı etkisindedir (Kierszenbaum, 2006; Gatimel, Moreau, Parinaud, & Léandri, 2017).

Inguinal bölgeden skrotuma testislerin inişleri şu faktörlerle ilişkilidir:

1. MİM ile indüklenen paramezonefrik kanalların atrofiye gidişi, testislerin transabdominal olarak, derin inguinal halkalara yönelik göçü ihtiva etmektedir.

2. Testislerin büyümesi ve mezonefrik böbreklerin atrofisi, testislerin posterior abdominal duvar boyunca, kaudal yönde hareketine izin vermektedir.

3. Prosessus vajinalisin büyümesi, testislerin inguinal kanal boyunca skrotuma ilerlemelerinde yardımcı olmaktadır (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013).

26. haftada, testisler posterior abdominal duvardan, retroperitoneal adlandırılan (peritonun dışında) derin inguinal halkalara yönelerek inerler. Testislerdeki bu lokasyonel değişiklik, fetal pelvisin genişlemesi ve embriyonun boyutlarında uzama ile ilişkili olmaktadır. Testislerin transabdominal ilerlemesi, büyük oranda rölatif harekettir, abdomenin kraniyal bölümün, kaudal bölümünden (gelecekteki pelvik bölge) uzaklaşmasına bağlıdır. Testislerin inguinal kanallar boyunca skrotuma inmelerindeki sebep, olarak yeterli bilgiye sahip olunmamakla birlikte, bu olayın fötal testislerce üretilen androjenlerle kontrol edildiği kabul görmektedir. Gubernakulum, başlangıçta prosessus vaginalisin, inguinal kanalları oluşturmaları aşamasında, prosessus vajinalise, anterior karın duvarı boyunca bir yolak oluşturur. Gubernakulum aynı zamanda, testisi skrotuma bağlar ve testisin skrotuma inişinde rehberlik yaptığı

gören bir bilgidir (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013). İntraabdominal göçün gubernakulumun ekstra abdominal parçasının uzamasıyla gerçekleştiği; organların büyümesinin intraabdominal basıncı artırarak inguinal kanaldan geçişi sağladığı ve gubernakulumun ekstra abdominal kısmının regresyonunun da testisin skrotum içine doğru olan inişini tamamlamasını sağladığı düşünülmektedir. Fakat konuyla ilgili araştırmalar devam etmektedir (Kierszenbaum, 2006).

Normalde testisler gestasyonun yaklaşık 12. haftasında inguinal bölgeye hareketlenmektedir. Inguinal kanallardan skrotuma inişi, genellikle 26. haftada başlar ve inguinal kanaldan 28. haftada devam ederek, skrotuma 33. haftada göçü tamamlamaktadır. Testisler, periton ve processus vaginalis dışından geçerler. Testisler skrotuma girdiğinde, inguinal kanal, spermatik kord etrafında kasılma yaparlar. Terminde doğmuş yeni doğanların %97 ve üzerinde, her iki testis de skrotum içerisinde normal şartlarda bulunur. Doğumdan sonraki ilk 3 ay içerisinde, inmemiş testislerin çoğu skrotuma ihtiva eder (Kierszenbaum, 2006; Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013).

İniş göçü sırasında testisler; aorta tarafından beslenirler ve testiküler damarlar başlangıçtaki posterior abdominal duvar seviyesinde iken meydana gelirler, lumbar lokalizasyonlarından skrotum içindeki testislere kadar süre gelirler. Testislerin skrotuma iniş şekli, duktus deferensin niçin ureteri anteriordan çaprazladığını ve testiküler kan damarlarının seyrini ışık tutmaktadır. Organlar, skrotuma inişi sırasında, duktus deferens ve damarları da beraberinde taşınırlar. Testis ve duktus deferens aşağı indiklerinde, karın duvarının fasiyal uzantıları etrafını sarar (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013; Kierszenbaum, 2006).

Testislerin göçündne farklı olarak, karın boşluğunu çevreleyen periton'da, karın ön duvarının orta hattının her yanında cep şeklinde yapılar oluşur. **Vajinal proses** isimlendirilen periton cepleri, skrotal şişliğe doğru ilerleyen gubernakulu takip ederler. Musküler ve fasiyal tabakalarla birlikte **Inguinal kanal** skrotal şişliğe doğru ilerleyen vajinal biyoişlem tarafından meydana getirilir (Kierszenbaum, 2006).

Testisler, inguinal kanal ve pubik kemiğin üstünden geçerek doğum esnasında skrotuma inmiş olarak bulunurlar. Skrotum içindeki testis vajinal proses tarafından sarılmış durumdadır. Testisi saran bu peritoneal tabakaya verilen isim **tunika vaginalisin visseral tabakası**, peritoneal kesenin diğer kısımlarını da **tunika vaginalisin pariyetal tabakası** olarak isimlendirilir (Kierszenbaum, 2006).

Testisler, vajinal biyoışlem kökenli peritoneal kısım haricinde, içinden geçtiği karın ön duvarına ait tabakalarla da örtölüşekildedir.

Transversalis fasiyası: internal spermatik fasiyayı;

İnternal oblik kas: Kremaster kasını ve fasiyasını;

Eksternal oblik kas: Eksternal spermatik fasiyayı meydana getirir.

Transversus abdominis adı verilen kas bu bölgenin üstünde arkus yaptığı ve göç yolu üzerinde bulunmadığı için testis ve testise ait yapıların çevresinde bu kasa ait tabaka olmaz (Kierszenbaum, 2006).

Testis, prosessus vajinalisin distal ucu skratum içerisine doğru uzantı yapar. Perinatal dönemde, prosesus vajinalisin bağlayıcı sapı, genellikle oblitere olurak testisle ilişkili, izole bir peritoneal kese olani tunika vajinalis olarak durur (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013).

4.2.8. Klinik Korelasyon

4.2.8.1. Kriptorşidizm ya da inmemiş testis

Erkek yenidoğanların %97'sinde bebek doğuşta testisler skrotum içine yerleşmiş durumda bulunurlar. Geri kalanların %lik kısım çoğunluğu da ilk üç ay içinde skrotuma iner. Kriptorşidizm ya da inmemiş testis olarak adlandırılan bu patoloji, gelişim sırasında testisler, skrotal keseye ulaşamadığı için abdominal boşluk veya inguinal kanalda kalır (Gneist, et al., 2007; Kierszenbaum, 2006).

Kriptorşidizm patolojisi, termde doğan erkek bebeklerin yaklaşık %3-4'ünde, erken doğum erkek bebeklerin %30'undan fazlasında görülmektedir. Fakat bebeklerin %1'inden daha azında testislerden biri veya ikisi hiçbir zaman skrotuma ulaşamaz (4,5). Testiküler iniş iki aşamada gerçekleşir;

1) Transabdominal iniş olarak adlandırılan fetal Sertoli hücrelerince üretilen MİM tarafından kontrol edilen iniş

2) Kalsitonun taşınımını sağlayan genitofemoral sinir genetik ilişki içerisinde peptid ile başlatılan androjen salınım etkisinde olan İnguinal-skrotal iniş. Transabdominal inme bozuklukları sık değildir. Birçok vakada inmemiş testis inguinal kanalda görülebilir. İnguinal kanaldaki testisler çevredeki ligament ve kemikler tarafından tramva ve basıya ve strese maruz kalırlar (Gneist, et al., 2007).

Kriptorşidizm, tek veya iki taraflı olabilir ve bunun gelişiminin yetersiz androjen üretimi olduğu düşünülmektedir. Karın boşluğundaki veya inguinal kanal içindeki yüksek ısı nedeniyle olgun spermatozoa üretme yeteneği yoktur (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013; Kierszenbaum, 2006). Eğer iki testis de abdominal kavitede veya onun hemen dışında kalmış ise, normal vücut sıcaklığında (37°C-38°C) organlar olgunlaşamaz ve sterilite oluşur. Kriptorşidizm düzeltilmez ise, özellikle abdominal kriptorşidizmde, bu duruma sahip erkeklerde germ hücre tümörleri görülebilir. İnmemiş testisler doğumda sıklıkla histolojik açıdan normaldir, fakat 1. Yılın sonunda gelişme geriliği ve atrofi görülür. Kriptorşid testisler, abdominal kavitede veya testislerin iniş yollarının herhangi bir yerinde bulunabilirler, fakat çoğunlukla inguinal kanal içinde yerleşmiş durumdadırlar (5). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, insulin benzeri faktör 3 ve Hoxa-10 genlerindeki mutasyonların bilateral kriptorşidizm ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (Gneist, et al., 2007). Kriptorşidizm %3-5 sıklığında böbrek patolojileriyle birlikte görülür.

4.2.8.2. Konjenital inguinal herni

Skratum ile karın boşluğuyla içindeki prosessus vajinalisler arasındaki bağlantı, normalde doğumdan sonra ilk bir yıl içinde kapanması beklenir. Eğer tunika vajinalis ve periton boşluğu arasında bağlantı kapanmaz bu şekilde devam ederse **kalıcı prosessus vajinalis** oluşur ve barsak kıvrımları bu oluşum boyunca skrotuma iner **konjenital inguinal herniye** yol açarlar. Epididimis veya duktus deferens benzer embriyonik kalıntılar, sıklıkla bu inguinal fitik henri içinde bulunur. Erkeklerde inmemiş testis varlığında, konjenital inguinal fitik daha yaygın görülür. Konjenital inguinal henri, ektopik testise sahip erkeklerde ve **androjen duyarsızlık sendromu (ADS)** olan dişilerde de yaygındır (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013; Kierszenbaum, 2006).

4.2.8.3. Hidrosel

Nadiren prosessus vajinalisin abdominal ucu açık olarak durur, fakat barsakların herniasyonu için açıklık son derece dardır. Periton sıvısı, kalıcı prosessus vajinalis içerisine geçer ve **testisin hidroseli** meydana getirir. Bazen, prosessus vajinalis kısmı olarak kapanır ve geride yolu boyunca küçük kistik boşluklar kalır. Prosessus

vajinalisin orta parçası açık kalır ise, boşlukların içine salgılanan sıvıyla kistik bir yapı alıp testis ve/veya **spermatik kord hidroseli** meydana gelir (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013; Kierszenbaum, 2006).

4.2.8.4. Ektopik testisler

İnguinal kanalların kesişmesi ile, testisler normal iniş yolundan ayrı, değişik anormal yerleşimlerde olabilirler.

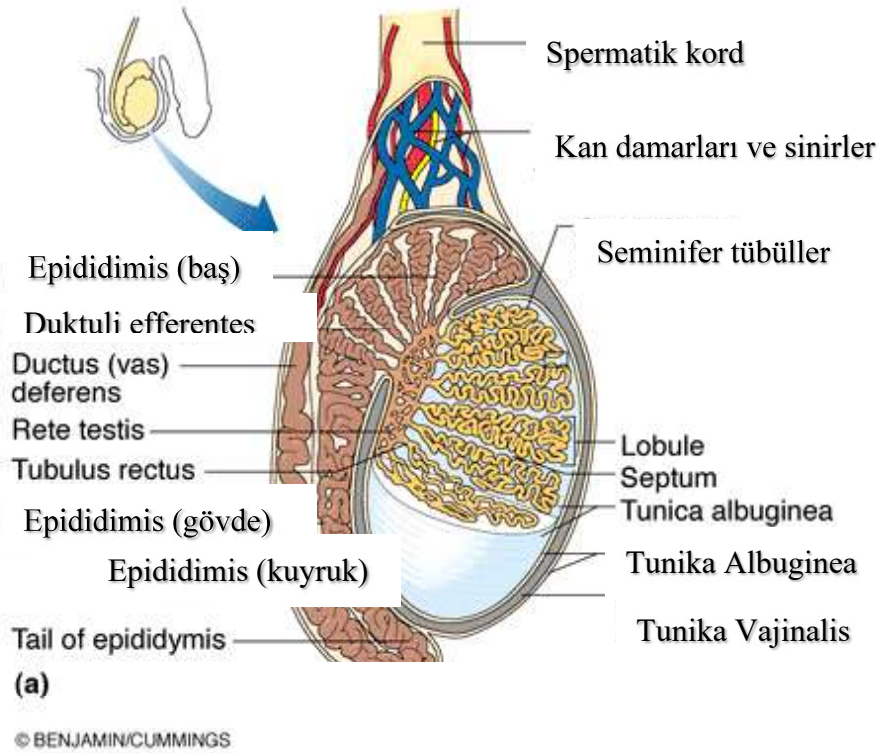
- Penis dorsalinde
- Karşı tarafta (kros ektopi)
- İnterstisyel (eksternal oblik kas aponevrozu dışında)
- Kalça medialinin proksimalinde

Ektopik testislerin bütün çeşitleri oldukça az görülür, ancak en sık rastlanılan tipi interstisyel ektopia'dır. Gubernakulumun bir bölümü anormal bir yerleşimde bulunduğu, testisler'de patolojiyi izler ve ektopik hale geçerler (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013).

4.3. ERKEK ÜREME SİSTEMİ HİSTOLOJİSİ

4.3.1. Testis

Skratum da testisler asılı olarak bulunurlar. Her biri seröz kese ile sarılı *tunika vajinalis* denen peritondandır. Tunika vajinalis dışta pariyetal ve içte visseral bir tabakadan meydana gelerek testisin frontal ve temporal *tunika albuginea*yı sarmalar. Testis, tunika albuginea adı verilen kalın, kollajen liflerden meydana gelmiş bağ dokusu kapsülü ile çevrelenmiştir. Tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşma yaparak *mediastinum testisi* meydana getirir. Bu alanda bezin içeri yönlü ilerleyen fibröz septumlar ile testiküler *lobüller* adı verilen yaklaşık 250 adet piramidal bölmeye ayrılır. Bu septumlar tam değildir, lobüller arasında çoğunlukla iletişim yolları vardır. Herbir lobülde gevşek bağ dokusu ile sarmalanmış 1-4 *seminifer tübül* bulunmaktadır (**Resim 2.3.1**). Bol miktarda kan ve lenf damarları olan bağ dokusunda, sinirler ve interstisyel (leydig) hücreleri de varlık gösterebilir (Gneist, et al., 2007; Cohen-Bacrie, Belloc, Ménéz, Clement, & Hamidi, 2009).



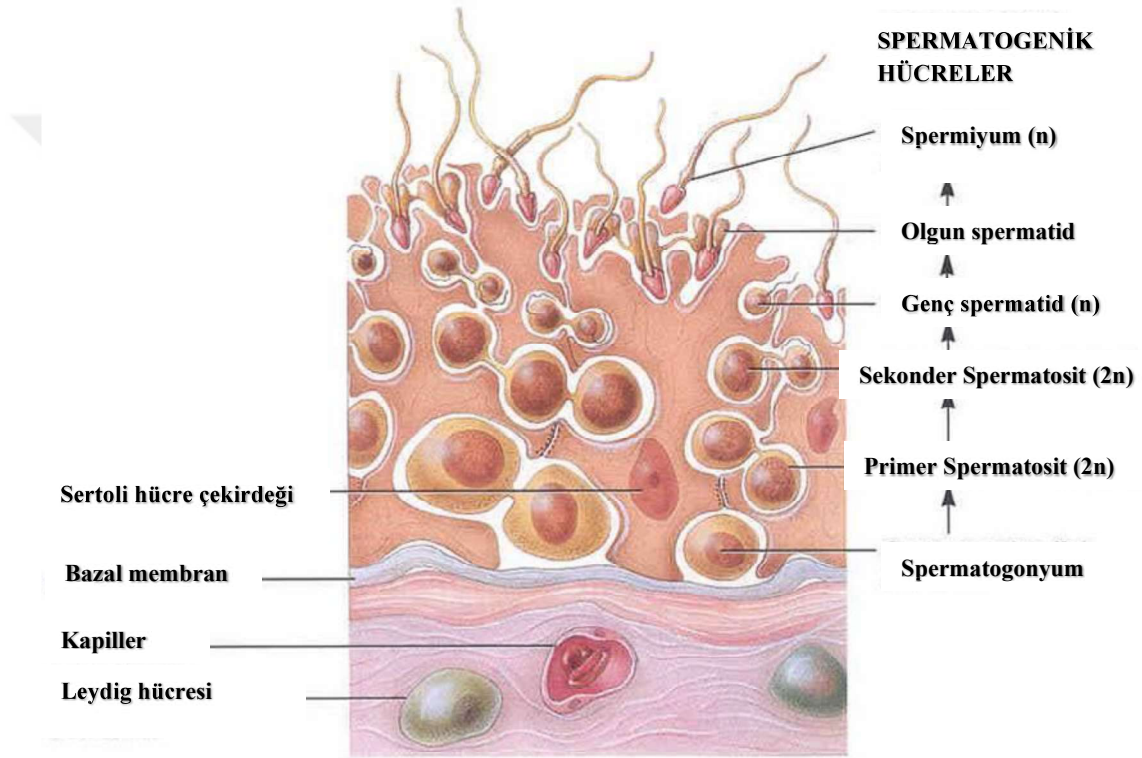
Resim. 4.3.1. Testisin genel yapısı (Bingöl, Deprem, Koral Taşçı, & Kocamış, 2011)

4.3.1.1. Seminifer tübüller

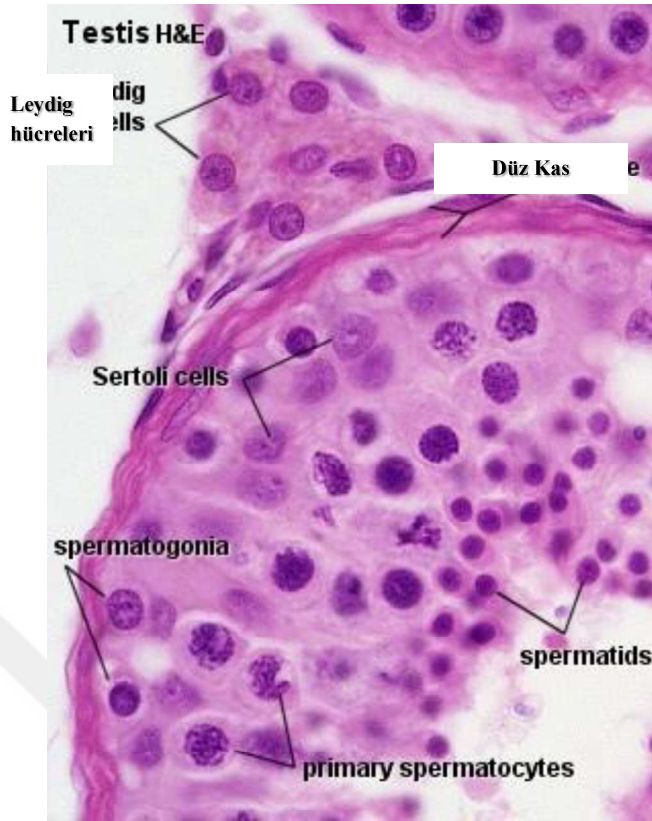
150 – 250 μm dan meydana gelen her bir seminifer tübül 30-70 cm ölçüsündedir, mix yapıda olup epiteli çok katlı epitel döşelidir. Tübüllerin toplam uzunluğu yaklaşık olarak 250 m civarındadır. Tübüller yapılar ilk olarak kör uçlu yapıda ve dallara ayrılmış şekildedirler. Tübül sonlanmalarına doğru lümen daralma gösterir ve düz tübüller diğer adıyla *tubuli rekti* olarak bilinen kısa segmentli hali meydana getirir. Şekilsel olarak düz tübüller görünümde olan bu yapılar, seminifer tübüllerin *rete testis* olarak isimlendirilen, epitel yapısıyla döşeli bir labirent formunu meydana getirirler. Bağ dokusu içerisindeki rete, 10-20 *duktuli efferentes* ile epididimisin baş kısmı birleşik bir yapı oluştururlar.

Seminifer tübüllerde; bir fibröz bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve çok sıralı germinal ya da seminifer tübül epitelinden meydana gelir. Seminifer tübülü döşeyen epitel, iki belirgin hücre popülasyonunu içeren farklılaşmış ve özel bir epiteldir (Gneist, et al., 2007). Epiteli meydana getiren bu hücreler, tübül lümeni ve

bazal lamina arasındaki boşlukları dolduracak 4-8 tabaka halinde koperasyon yapmıştır (**Resim 2.3.2, Resim 2.3.3**). Bu hücreler, mitoz ve mayoz bölünmeler sonrasında diferensiye olarak spermiyum'ları meydana getirirler. Spermiyumlar sürekli diferensiye olduklarından çeşitli evrelerde görülebilirler. Seminifer epitel bir bazal membran ile kollajen lifler, fibroblastlar ve kasılabilir miyoid hücrelerden oluşan bir duvarla sınırları çizilmiş görünümündedir. Miyoid hücreler hareket yeteneği kazanmamış spermleri retina testise iletirmek için kasımla hareketi yapmasıdır. Spermiyumlar epididimal tubulden geçtikten sonra ileri yönlü hareket kazanırlar (Cohen-Bacrie, Belloc, Ménéz, Clement, & Hamidi, 2009).



Resim 4.3.2. Seminifer tübül şematik yapısı



Resim 4.3.3. Testis, H&E boyalı histolojik yapısı

4.3.1.2. Spermatogenez

Spermatogenez; erkek germ hücrelerinin meydana gelmesini, sayılarının çoğalmasını ve olgun spermiumlara dönüşmesini sağlayan süreçtir. Bu süreç, tek sıra Sertoli hücreleri ve spermatogenetik seriye ait hücrelerle çevrili, uzun, tübüler bir yapı olan seminifer tübüllerde meydana gelir. Farklılaşmamış spermatogonyalar oldukça özelleşmiş spermiumlara diferansiye olurlar. Seminifer epitelinde birçok hücre jenerasyonunu aynı anda görülebilir. Bu sebepten farklılaşmaya başlamış spermatogonyalardan oluşan en genç hücreler tübülün periferinde bulunurken, spermatidlerin oluşturduğu en yaşlı jenerasyon lümende varlığı göstermektedir (Delilbaşı, 2008).

Spermatogenez başlangıçtan bitişe kadar gelişen ve oluşan süreçte 3 faza ayrılabilir; Bunlardan ilki **Spermatositogenez** olarak adlandırılan birinci evrede spermatogonyumların bölünmeleri meydana gelen hücrelerden spermatositler oluşur. Spermatositlerin üst üste iki kez bölünerek kromozom sayılarının ve DNA miktarının yarıya düşürülmesi sonucu ihtiva edilen ve oluşan hücrelere spermatid denilen ikinci evre **Mayoz** olarak isimlendirilir. Üçüncü evre ise **Spermioyogenez** olarak adlandırılır.

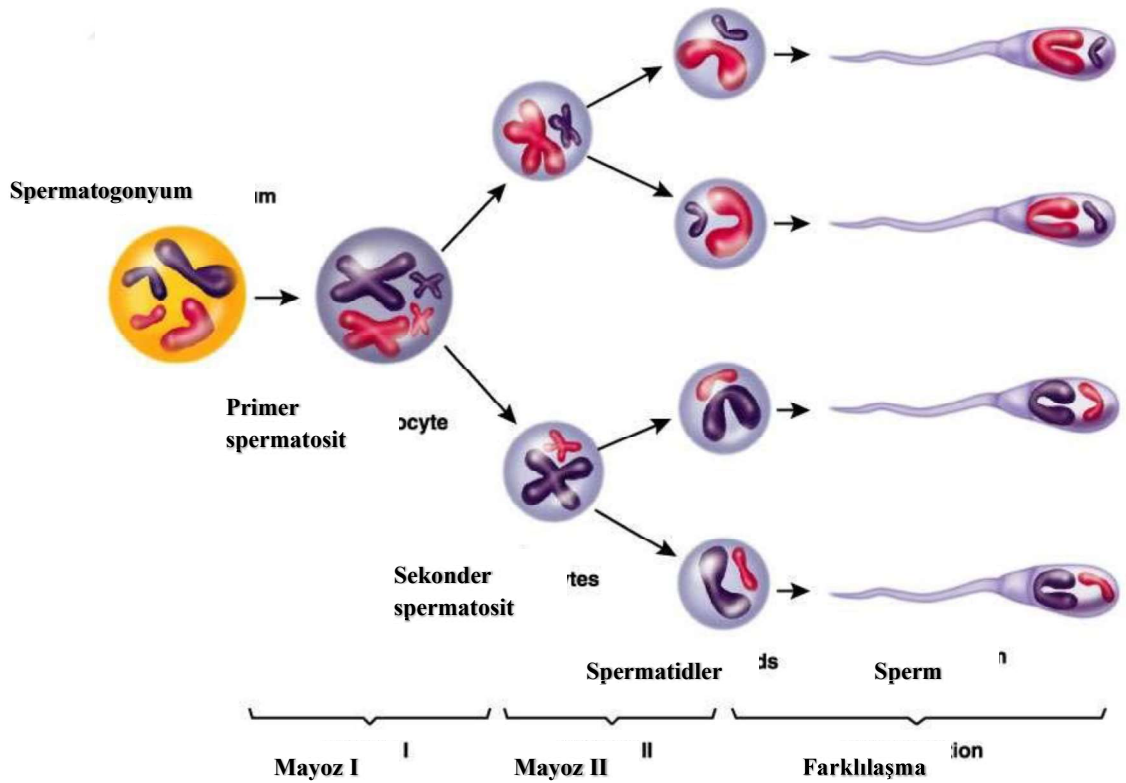
Bu süreçte spermatidlerin farklılaşma geçirerek spermatozoonları oluşturduğu safhadır (Cohen-Bacrie, Belloc, Ménézo, Clement, & Hamidi, 2009).

Spermatogenez başlaması spermatogonyumlar ile olur (**Resim 2.3.4**). Bunlar yaklaşık olarak 12 µm çapında, az miktarda daha küçük hücrelerdir ve çekirdekleri soluk boyanan kromatin içerir. Sertoli hücreleri arasındaki tıkalı bağlantıların altında yer alırlar ve bu nedenle kan-testis bariyerinin dışında yer alırlar. Kan-testis bariyerini geçen spermatositlerde iki olay ihtiva eder;

1.Sertoli- spermatositler arasında spermatogenezin sonuna kadar sürecektir olan yapısal ve işlevsel ilişkisel bağ gerçekleşir.

2.Spermatositlerin mayoz/profaz/pakiten yarı evresinden itibaren yeni yüzey antijenleri geliştirmeye başlamasıdır (Delilbaşı, 2008).

Seksüel gelişimde spermatogonyumlar mitoz bölünme geçirirler ve yeni oluşan hücreler iki aşamaya girebilir; bir- birkaç mitozdan sonra farklılaşmamış kök hücreler olan *tip A spermatogonyumlar* olarak devam ederler ya da süregelen mitotik sikluslar boyunca difrensiye *tip B spermatogonyumları* meydana getirirler (Cohen-Bacrie, Belloc, Ménézo, Clement, & Hamidi, 2009).



Resim 4.3.4. Spermatogenez

Spermatogonyumlar spermatogenik serinin kök akan Tip A hücreleridir. Erkek fertilitesinde spermatogonyal kök hücrelerin etkisi vardır. Bu sebeple kısmen sessizdir ve bu nedenle radyasyon ve kanser kemoterapisine duyarlılığı azdır. Spermatogonyumlar, mayoz bölünme geçiren diferensiye olmuş veya olmamış sperm hücrelerin kemoterapik ajanlara hassasiyeti fazladır. Kişinin aldığı radyoterapi ve kemoterapik ajanların sonlanmasıyla ardından, spermatogonyal kök hücreleri spermatogenik süreci yeniden tetikleyebilir. Mitoz sonrası oluşan sertoli hücreleri bu tedavilere yüksek oranda dirençlidirler (Gneist, et al., 2007). Tip B spermatogonyumlar ise primer spermatositlere diferensiye öncül (progenitor) hücrelerdir. Başarılı mitoz serisi geçirdikten sonra bu hücreler son S fazını (DNA sentezi) tamamlamasının hemen ardından spermatositlerde mayoz hazırlığı başlar ve birinci mayoz bölünmenin profaz evresine girerler. En son mitoz geçirdikten sonra primer spermatositler dinlenme evresine girerler (G0). Dinlenme evresinde olan spermatositler G1 fazına geçerler (bu faz 3 gün sürer) (10). Yaklaşık 10 gün Birinci mayoz bölünme süren uzun bir profaz ile karakterizedir. Bu sırada primer spermatositin DNA'sı 4N kromozoma sahiptir ve 46 (44+XY) şeklindedir. (N haploid kromozom sayısını ya da bu kromozomlardaki DNA miktarını belirtmektedir) Profaz evresinde, hücreler dört fazgeçirler. Bunlar sırasıyla leptoten, zigoten, pakiten ve diptoten- şeklindedir. Tüm bu safhaları geçirdikten sonra diakinez safhasına ulaşırlar kromozomların ayrılma işlemi gerçekleşmiş olur. Zigoten-pakiten evresinde homolog kromozomların (otozomlar ve seks kromozomları X ve Y) eşleşmesini ya da sinapsını kolaylaştıran sinaptonemal kompleks oluşumu ve homolog kromozomların eşleşmesi (sinapsis) oluşur. Gendeki "crossing over" mayoz bölünmenin bu evresinde. Ardından hücreler metafaz olarak adlandırılan sürece girerler ve ardından kromozomlar yapıları anafazda hücrelerin her bir kutba doğru çekilirler. Bu bölünmede, profaz evresinin yaklaşık olarak 22 günde tamamlanması sebebiyle görülmek için izole edilen hücrelerin çoğu bu fazda karşımıza çıkar. Spermatogenik serinin en büyük hücreleri **primer spermatositlerdir**, bu hücreler çekirdeklerinde farklı safhalarında bulunan kromozomların olmasıyla tanımlanırlar (Cohen-Bacrie, Belloc, Ménéz, Clement, & Hamidi, 2009; Gneist, et al., 2007).

Birinci mayoz bölünmenin tamamlanmasının ardından **sekonder spermatositler** olarak adlandırılan 23 kromozomlu (22+X veya 22+Y) ve primer spermatositlerden nispeten daha küçük yapılar meydana getirilir. Kromozom sayısı ve dna miktarının azalması koordineli ve sekron şekilde olur. Histolojik kesitlerde sekonder

spermatisitlerin görülmesi zordur nedeni ise, bu hücreler interfazda çok kısa süre kaldığından ve belirgin bir DNA sentez aktivitesi olmamasından ötürü (sadece tamir DNA sentezi meydana gelir) hızlı bir şekilde ikinci mitoz bölünmeye geçerler. Sekonder spermatisitlerin bölünmesiyle **spermatidlerin** meydana gelir; bunlar 23 kromozom içermektedir. Bir ve ikinci mayoz arasında S fazı olmadığı için ikinci bölünmeden sonra haploid (1N) hücreler meydana gelir. Spermatidlerin oluşması ile

Bölünmeler durur (yani tek bir spermatid tek bir spermatozooya dönüşür). Bu yüzden mayoz sürecinin sonunda haploid sayıda kromozomlara sahip hücreler oluşur. Hücre bölünmesinde Kromozom sayısı indirgeme mekanizması sayesinde kromozom sayısı tüm türler için sabit tutulur ve artış gözlenmez. Böylece kromozom sayısı o türün her canlıları için aynı tutulur (Cohen-Bacrie, Belloc, Ménézo, Clement, & Hamidi, 2009).

Spermatisitler iki başarılı mayoz bölünmeyi kan testis bariyerinin içinde geçirirler. Konum olarak ise sertoli hücreleri arasındaki tıkalı bağlantıların hemen üst kısmında, seminifer tübülün adluminal parçalarında yer alırlar. Dolayısıyla, mayoz bölünmeler kan-testis bariyerinin içinde gerçekleşir (Gneist, et al., 2007).

Spermatidler sekonder spermatisitlerin bölünmesinden sonra meydana gelen hücrelerdir. Bu hücreler boyut olarak diğer hücrelerden nispeten daha küçük (7-8 µm çapta), kromatinin yoğun olarak gözükmeyen ve seminifer tübüllerde lümen yakınında adluminal kompartmanda yerleşmeleri ile tanımlanırlar. Spermatidler sertoli hücre sitoplazma kriptaları içine gömülüdürler. Spermatidler, **spermiyogenez** adı verilen differensiyel bir sürece geçerler. Spermiyogenez, spermatidler olgunlaşarak spermiyumları oluştururlar. En kırıktık evresi akrozom gelişmesidir. Mikrotübüllerin hareketi ile kuyruk oluşumu, nükleusun oval şekil oluşturması, başlangıç evresinde yaygın ve çok bulunan mitokondrilerin kuyruk bölgesine göç ederek boyun kısmı etrafında spiral şekilde uç uca sıralanmaları ve sitoplazmanın bu farklılaşma sırasında lümen boşaltılması benzeri da bu sürece dahildir. Bu aşamadan sonra baş, spermin genetik bilgisini içeren nükleus meydana gelir. Akrozom, vezikül yapıdadır ve yıkıcı enzimle doludur. Kuyruk, tek bir sentriolden gelişir. Sperme hareket yeteneği verir. Kuyruk ileri hareketliliği sperm boynundaki mikrotübüllerin sağladığı enerji ile mikrotübüllerin birbiri üzerinde hareket etmesi sonucu oluşurlar (10). Sonuçta seminifer tübülün lümenine salınan olgun **spermiyum** oluşmuş olur (**Resim 2.3.5**).

Spermiyogenez başlıca üç faza ayrılabilir:

A. Golgi Fazı: Golgi fazında spermatid sitoplazması, çekirdeğin yakın kısmında belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondriyonlar, ikili sentriyol, serbest ribozomlar ve düz yüzölçümlü endoplazma retikulumunun görünüşü vardır. Golgi kompleksinin normal şartlarda hücre içi pozisyonu hücre apikal kutbu ve paranuklear alanıdır. Küçük PAS-pozitif proakrozomal granüller Golgi kompleksinde birikirler ve birleşerek membranla sarımsı bir akrozomal vezikülün içinde yer alan sadece bir akrozomal granülü oluştururlar (Cohen-Bacrie, Belloc, Ménéz, Clement, & Hamidi, 2009). Sentrozom önce ikiye bölünür ve akrozomun karşı kutbuna yerleşir. Oluşan sentriyollerden proksimal kısımda anteriör nodül, ikinci parça distal sentriyolden enine disk gelişir (Eroschenko & di Fiore, 2007).

Sentriyoller hücrede hareket ederek akrozom meydana geldiği lokasyonun tam tersi yönlü olarak hareket ederler ve bu yer hücre yüzeyine yakın olur. Flagellar aksonem meydana gelmeye başlar. Flagellum, distal sentriyolden meydana gelir. Keratin içeren dış yoğun lifler ve bir fibröz kılıf ile çevrili bir aksoneme (eşmerkezli dizilişli 9+2 mikrotübül çiftleri) varlığındadır. Mitokondriyonlar kuyruğun proksimal bölümü çevresinde sarmal şekilde bir kılıf meydana getirir (Cohen-Bacrie, Belloc, Ménéz, Clement, & Hamidi, 2009).

B. Akrozom Fazı: Akrozomal vezikül ve granül, Yoğun forma geçen çekirdeğin ön kısmını komple kapayacak şekilde doldurur ve buna **akrozom** adı verilir. Akrozom, bu enzimlere sahiptir; hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve tripsin benzeri bir proteaz gibi bazı hidrolitik enzimlere sahiptir. Akrozom bu sebeple lizozomun özelleşmiş bir çeşidi benzeri görev yapar. Bu enzimlerin, yumurta hücresinin korona radiata kısmını ve zona pellusidayı sindirdiği yapılan araştırmalarca belirlenmiştir. Bunlar henüz ovulasyon ile atılmış sekonder oositi çevreleyen yapılardır. Kapasitasyon işlemini tamamlamış spermiyumlar, sekonder oosit ile buluştuğunda akrozom dış membranı plazma membranı ile birçok bölgede bütünleşerek akrozom enzimlerini boşaltmaya sebep olur. Bu işlem **akrozomal reaksiyon** olarak bilinir ve fertilizasyonun ilk basamakları arasındadır (Gneist, et al., 2007).

Akrozom fazı sırasında hücrenin akrozomu içeren ön kutbu, seminifer tübülün tabanına doğru gider. Bunlara ek olarak çekirdek uzar ve daha yoğun bir hale gelir. Aynı zamanda sentriyollerden bir tanesi gelişerek flagellumu meydana getirir. Mitokondriyonlar da flagellumun proksimal parçası etrafında toplanarak **orta parça** adı verilen kalınlaşmış bölgeyi meydana getirir. Bu bölge spermiyumların hareket kaynağıdır.

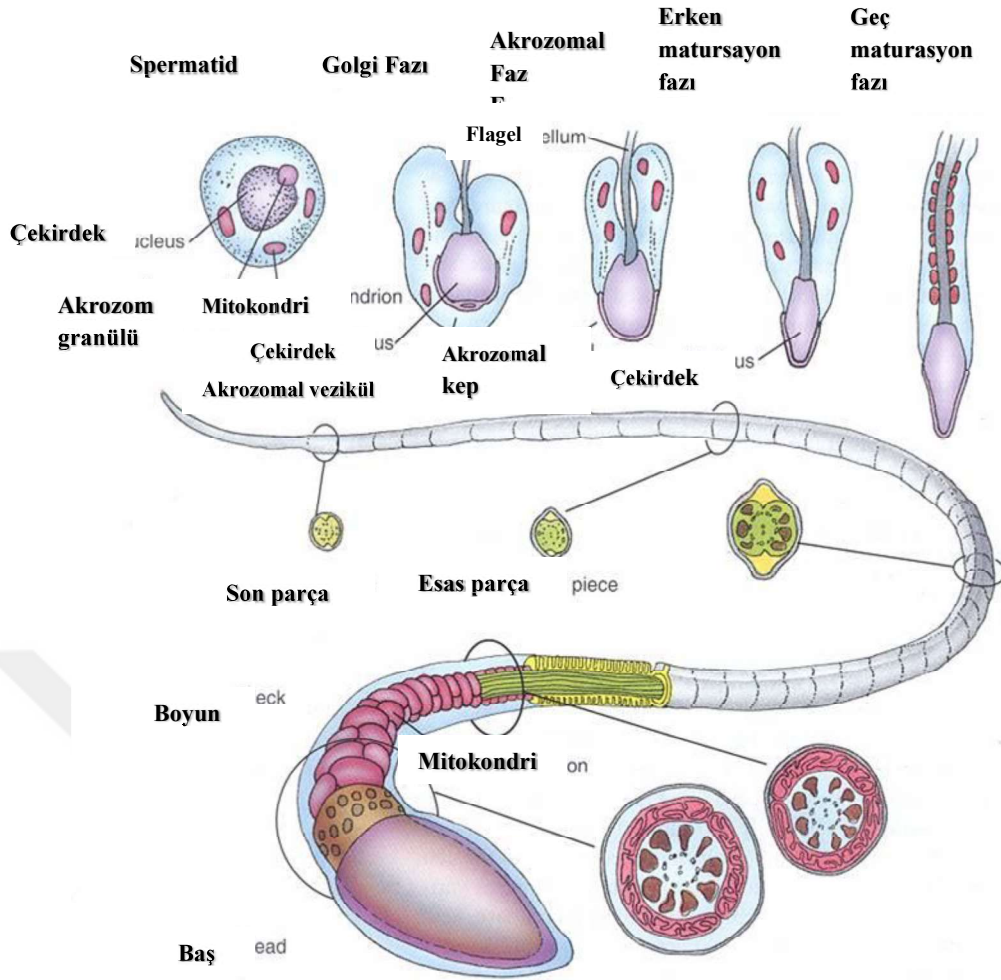
Mitokondriyonların bu özet yapıda yerleşmesi, bu organellerin hücre hareketi ve yüksek enerji tüketimi ile ilgili olan bölgelerde toplanması için iyidir. Flagellum hareketi, mikrotübüller, ATP ve dynein adı verilen ATPaz aktivitesine sahip bir proteinin etkileşmesi sonucunda meydana gelir (Cohen-Bacrie, Belloc, Ménézo, Clement, & Hamidi, 2009; Gneist, et al., 2007).

C. Olgunlaşma Fazı: Spermatid olgunlaşma fazının sonuna doğru, mitokondriyonlar gelişen flagellum boyunca dizilmelerini tamamlar; flagellum yapısında bulunduran keratin dış yoğun liflerle sarılı bulunan merkezi bir aksonemden meydana gelir. Çekirdek uzar ve yoğunlaşır, manşet distal yöne doğru göç eder. Bu özel duruştan dolayı manşet dağınık forma geçtiğinde ve dış yoğun lifler mutlak organizasyonda bulunduğu evre tamamlanır. **Kuyruk** iki ana komponentten meydana gelir: Bunlar orta parça ve esas parçadır.

- 1)Orta parça: mitokondriyonların sarmal şekilde bulunduğu parça
- 2) Esas parça: kuyruğun fibröz bir kılıfla sarılı olduğu parça.

Bir annulus (son halka) sperm kuyruğunun orta parça ve ana parça geçişinin sınırlarını belirler.

İşlem sonrasında geriye kalan artıklar sitoplazma Sertoli hücrelerince fagositoz a uğrar ve spermiyumlar tübülün lümenine doğru salınırlar.



Resim 4.3.5. Spermiyogenez (Çetin & Çetin, 2014)

Somatik histonların arjinin, ve lizinden zengin protaminlerle yer değiştirmesi olayı ve çekirdek yoğunlaşması spermiyogenezin son basamağını meydana getirir. Bu histon değişimi sperm genomik DNA'sını stabil hale getirir ve hasarlanmayı önler (Cohen-Bacrie, Belloc, Ménézo, Clement, & Hamidi, 2009).

Spermatogonyumların bölünmesinde meydana gelen ve tamamen ayrışamayan hücreler sitoplazmik köprülerle hücre hücre arası bağlantıda bulunurlar ve birbirleriyle bağlı kalırlar. Hücreler arasındaki köprüler, tek bir spermatogonyumdan oluşan her primer ve sekonder spermatositte, spermatid arasındaki iletişimi meydana getirir. Hücre-hücre bilgi paylaşımına izin vermesi nedeniyle bu bağlandılar spermatogenezdeki olayların düzenlenmesi ve koordinasyonu için önemli roledir. Bu ayrıntı seminifer epitel döngüsünü anlamakta önemli bir yer tutmaktadır. Spermatogenez süreci sona erdiğinde hücre spermatogenezinin düzenlenmesinde yardımcı olan hücre hücre arası stoplazma bağlandıları köprüleri dökülerek artık

olarak bulunurlar ve spermatidler arasında ayrılma meydana gelir (Cohen-Bacrie, Belloc, Mén  zo, Clement, & Hamidi, 2009).

  nsanda spermatogonyum safhası ile spermiyum olu  şumu arasındaki süre **64 gün** olduğu gösterilmiştir. Sürecin yava  ş olmaq  wının yanı sıra, spermatogenez, senkron olarak seminifer tübülde aynı anda olmaz; bu süreç dalgalanma biçiminde meydana gelir. Bu konu sominifer tübüllerin her bölgesinde spermatogenezin farklı bir safhasının ger  ekleti  inin biyolojik olarak ispatı olur. Seminifer epitel siklusu germinal epitelde belli bir hücre evresinin ardışık iki görünümü arasında meydana gelen olgunlaşma değişiklikleri dizisini betimler.   nsanda her bir siklus yaklaşık 16+1 günde gerçekleşir ve spermatogenez 4 döngü sonra biter (Cohen-Bacrie, Belloc, M  n  zo, Clement, & Hamidi, 2009).

Seminifer tübüllerde olu  şan spermiyumlar belli bir fizyolojik döngü içinde etkil  nerek gelişirler. Bu mekanizması meydana getiren temel faktörler hipotalamustur. Hipotalamus etkisiyle hipofiz hormonları devreye girer; onlarda testisteki Sertoli ve Leydig hücrelerini etkileyerek hipotalamus-testis arasında bir feed-back yanıtı oluştururlar. Sonuçta, sperm geli  şmesi, hipotalamus-hipofiz-testis zinciri üzerinde, bir sistem içinde gerçekleşir (Eroschenko & di Fiore, 2007).

Testiste otoregülasyonu sağlayan temel hormonlar, spermiyositogenez olayında esas rolü oluştururlar. Spermatogonyumdan gelişen spermatosit serilerin yanısıra hipofiz ve testis orijinli hormonların etkisiyle hücrelerarası dönüşümler de meydana gelir.

LH sentezi Klasik spermatogenez regülasyonuna testosteron sentezi için en önemli faktördür. Hipofizden LH salınımı, hipotalamik GnRH etkisi altında etki eder. Testosteron, GnRH-atılım-frekans ve amplitüdüne down regülasyon gösterir. Testosteron, aynı zamanda parakrin etkilidir ve tüm vücuda ihtiyaç eder. Son yıllarda yapılan çalışmalarda g  r  lm    t  rki, tubulus elemanları ile interstisiyel doku arasında ileri derecede etkileşme oldu  ğunu ortaya çıkmıştır. Sertoli ve Leydig hücrelerin, bugüne kadar bilinmeyen birçok hormon reseptörüne sahip oldukları bulunmuştur ve bu faktörlerin bir kısmının testiste lokal olarak görev yaptığı bildirilmiştir (Eroschenko & di Fiore, 2007).

FSH, spermatogenezin en etkili faktörlerinden biridir. GnHR (Gonadotropin salgılatıcı hormon) tarafından kontrol edilen FSH, bu hormon reseptörlerine sahip Sertoli hücrelerini etkiler ve özellikle spermatogenezin ilk evrelerini stimüle eder. FSH da LH gibi negatif feedback kontrol mekanizması ile regüle olur. Sertoli hücreleri

tarafından sağlanan bu kontrol mekanizma “**inhibin**” olarak adlandırılır. İnhibin sadece endokrin değil aynı zamanda parakrin etki de yaptığı bildirilmiştir. Spermatogenezi sadece FSH stimüle etmez; testosteron üzerinden serbestlenen LH da bu mekanizmada etkilidir (Eroschenko & di Fiore, 2007).

Olgun spermiyum, baş ve kuyruk olmak üzere iki yapıdan meydana gelir. Boyun parçası ile baş kuyruğa bağlanmıştır. Baş, akrozomla sarılmış çekirdekten meydana gelir. Çekirdek heterokromatik, oval bir konumdadır. Çekirdeğin ön yarısını akrozom sarar ve lizozomlarda bulunan hidrolitik enzimlere (proteazlar, asit fosfatazlar, hyaluronidaz ve yanı sıra nöraminidaz) sahiptir. Genellikle akrozom, özel bir tip lizozom içerir. Akrozomal enzimler, oositi saran korona radiata ve zona pellucida’yı sperm rahatça girebilmesi için fertilizasyon zamanı sekrese edilir (Gneist, et al., 2007).

Bağlantı kompleksleri, bir çift sentriyolün içerisinde barındığı dar bir bölümdür. Distal sentriyol, sperm kuyruğunun merkezi parçası olan aksonem’e kaynaklık eder.

Meydana getirdiği kuyruk parça ve son parça olmak üzere üç parçada değerlendirilir: Kuyruğun orta parçası, sarmal olarak dizilmiş mitokondriyonların oluşturduğu tabaka, 9+2 mikrotübüler aksonem ve dış yoğun lifler olarak adlandırılan sperm boynundaki bağlantı parçasından kuyruk boyunca uzanan dokuz uzunlamasına seyreden kolonlardan meydana gelir. Orta parçanın alt sınırı bölgesi mitokondriyel sarmalın annulus’ta sonlanmasıyla belli olur (Gneist, et al., 2007).

Esas parça, uzun olan kısmıdır. Yedi adet yoğun lifçe sarılı (orta parçadaki dokuz liften farklı) merkezi aksonem ve bir fibröz yapıdaki kılıftan oluşur. Bu Fibröz kılıf, eş mesafedeki uzunlamasına komponentlerden çıkan dairesel iskelet yapı tarafından oluşturulur. Hem dış yoğun lifler hem de fibröz kılıf, spermin öne hareketi sırasında mikrotübüler kayma ve kıvrılma için sağlam bir iskelet oluşturan proteinler olan keratin oluşturur. Son kısım, dış yoğun lifler ve fibröz kılıfın erken sonlanması sonucu, birtek aksonemde kuyruğun çok az ve küçük bir bölümüdür (Gneist, et al., 2007).

Spermiyumlar seminifer tubuluslardan atılmasının ardından intra testiküler ve ekstra testiküler kanallardan, depo edildikleri yer olan epididimisin kuyruk kısmına meydana gelir. Buradan duktus deferensin kalın kas kılıfının peristaltik kasılmalarıyla hızlı bir şekilde üretraya taşınır. Spermiyumlar duktus deferens ve üretradan geçişi esnasında spermi taşıyan sıvının içerisine cinsiyet bezlerinin (seminal vezikül, prostat ve bulboüretral bez) sekresyonu katılır (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013).

Cinsel ilişki sırasında, vajinanın forniksinde ve serviksin dış ağzı çevresinde 200-600 milyon kadar sperm toplanır. Spermiler kuyruk hareketleri yardımıyla yavaşça

servikal kanaldan ilerler. Seminal vezikülden üretilen *vesikülaz enzimi* bir kısım semeni koagüle ederek, vajinal bir plak meydana gelir. Bu plak semenin vajinaya doğru geri akmasını kontrol eder. Servikal mukusun ovulasyon sırasında miktarı artar ve viskozitesi azalır böylece spermin geçişi kolaylaşır (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013).

Spermilerin ejakülasyon refleksi iki faza ayrılabilir:

1) Emisyon (birikme, depolanma): sperm ve sıvıları, veziküla seminalis ve duktus deferensin peristaltik hareketleri sonrası duktus ejakülatoryus kanaldan geçerek üretranın prostatik kısmına getirilir. Emisyon sempatik bir yanıtıdır.

2) Ejakülasyon: Mesane boynundaki vezikal sfinkter kapanmasının ardından bulbospongioz ve üretral kasların kasılması ile semen üretranın dış ağzına doğru atılır.

Uterus ve uterin tüplerden spermin geçişinde bu organların duvarlarındaki kasların kasılması önemli gerçekleştirir. Semen içindeki *prostoglandinler* uterus hareketlerini aktif ederek spermilerin uterus ve uterin tüpleri geçerek fertilizasyon bölgesi olan tüplerin ampullasına gelmesine yardımcı olur. Semen içerisindeki seminal vezikülden serbest bulunan fruktoz, spermier için bir enerji kaynağıdır (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013).

Spermatogenezi etkileyen patolojik durumlar

1. Sıcaklık: Spermatogenez için 35°C kritik çok önemli bir sıcaklıktır. Bu sıcaklığın korunma sistemi spermatik arteri saran venlerin bir ağ oluşturarak ve pampiniform pleksus adı verilen pleksus ağı ile skrotumda sağlanır ve sıcaklığı düşürmek için ters yönlü akımla ısı değişimi ile yapılır. Testisin sıcaklığının 35°C'nin altında kaldığı durumlarda, spermatik kordondaki kremaster kası kasılır ve skrotal kesenin dartos kasının kasılması sıcaklığı artırmak için vücuda yakın hale getirir (Gneist, et al., 2007).

2. Kriptorşidizm: Spermatogenizi etkileyen bir diğer faktör olan kriptorşidizm, gastrolasyon sırasında testis skrotal keseye ulaşamaz ve abdominal boşluk veya inguinal kanalda yer edinir. Böyle durumlarda, normal vücut sıcaklığı (>37°C) spermatogenezi önler ve durum çift taraflıysa sterilite meydana gelir. Testiküler tümörlerin büyük bir çoğunluğu tedavi edilmemiş kriptorşid testis ile bağlantısı bulunur. Hormonal tedavi (koryonik gonadotropin uygulaması) testisin skratum içine inmesini aktif edebilir. Bu uygulama başarısız olursa cerrahi yöntemler denenir (Gneist, et al., 2007).

3. Kanser Kemoterapisi: Antitümoral uygulamalar yapılan erkek hastalarda geçici süreyle kematerapi etkisiyle aspermatogoni gelişir, çünkü spermatogonyal mitoz ve spermatosit mayozu etkilenebilir. Kematerapinin kesilmesiyle beraber spermatogeneze o an için katılmamış kök hücreler aktive olurlar ve seminifer epiltelde tekrar çoğalarak spermleri meydana getirirler (Gneist, et al., 2007).

4. Kabakulak: Kabakulak, ergenlik sonrası erkeklerin %20- %30 ani gelişen orşit ile toplumda gözlemlenen sistemik viral enfeksiyondur. Çoğunlukla kabakulak enfeksiyonunda görülen orşitten sonra spermatogonik fonksiyonunda değişiklikler gözlemlenebilir (Gneist, et al., 2007).

5. Spermatik kordon torsiyonu: Testise gelen arterior kan akımının şiddeti venöz drenajı etkileyebilir. Bu durum genelde yaşanan bir fiziksel tramva sonucunda veya tunika vajinaliste anormal testis hareketleriyle meydana gelebilir. Testis torsiyonuna anında müdahale edilmez ise, hemorajik enfarkt oluşur ve tüm testisin nekrozu ile son bulabilir (Gneist, et al., 2007).

6. Varikosel: Bu durum spermatik kordon venlerinin dilatasyonu nedeniyle gelişir. Varikosel sonucu sperm üretiminde bir azalma (oligospermi) görülür. Spermatik kordon venlerinin, spermatik arter ile ters yön akım ısı değişimi sayesinde testiküler ısının 35°C'de tutulmasında önemli bir rol göstermektedir (Gneist, et al., 2007).

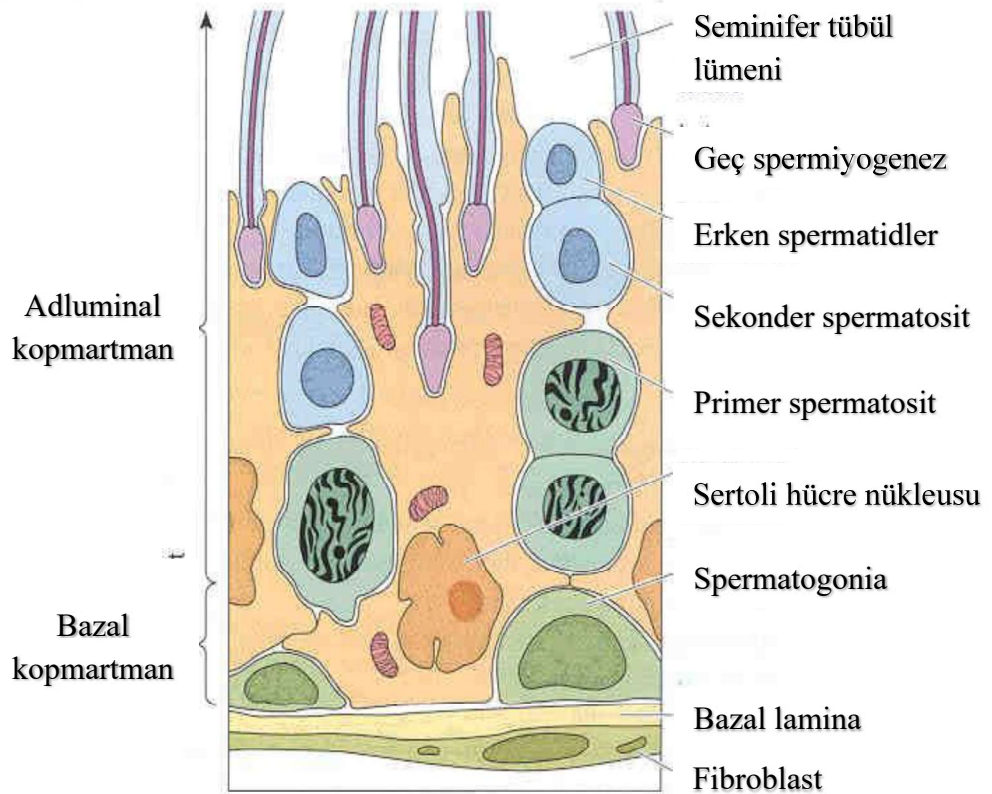
4.3.1.3. Sertoli hücreleri

Puberteye kadar seminifer tübül epitelinin sayıca fazla olan hücre tipidir. Puberte sonrası, seminifer tübülleri saran hücrelerin yaklaşık olarak %10'unu meydana getirir. Daha ilerilerde erkeklerde spermatogonik hücre sayısı azalan ileri yaşlarda ise sertoli hücreleri terar epiltelin ana kompeneti haline gelir (Gneist, et al., 2007).

Spermatogenik serideki sertori hücreleri kısmen saran uzamış piramidal hücrelerdir. Sertoli hücreleri tabanları bazal laminaya tutunurlar, sıklıkla apikal uçları seminifer tübülün lümenine uzanır. Işık mikroskopunda bakıldığında, mikroskop altında bakıldığında sertoli hücreleri belirginsiz olarak görülür, bunun sebebi ise bunların spermatogonik seri hücrelerinin hücrelerini çevreleyen çok sayıda lateral uzantılarının olmasıdır (**Resim 2.3.6**). Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda, düz yüzlü endoplazma retikulumu, granüler endoplazma retikulumu, iyi gelişmiş Golgi kompleksi, çok sayıda mitokondriyon ile lizozomlar, lipid damlacıkları ve

zengin bir hücre iskeleti (vimentin, aktin, mikrotübüller) içerdiği gözlenmektedir. Sıklıkla üçgen biçiminde olan uzamış çekirdekte çok sayıda kıvrımlıdır, belirgin bir çekirdekçik ile az miktarda heterokromatin görülür. Bu hücreye özgü Charcott-Bottcher kristaloidleri izlenir (Cohen-Bacrie, Belloc, Ménéz, Clement, & Hamidi, 2009; Gneist, et al., 2007).

Komşu Sertoli hücreleri, birbirlerine spermatogonyumlar seviyesinde sıkı bağlantılar vardır. Spermatogonyumlar, kan yoluyla gelen materyallerin tam geçirimli seçici geçirgen olmayan bazal kompartmanda yerleşir. Spermatogenez sırasında spermatogonyum serisi, adluminal kompartmana çıkarlar. Burada spermatogenezin daha ileri safhalarındaki hücreler, kandan gelen ürünlerden kan-testis bariyeri ile sağlıklı bir şekilde devam eder. Bu bariyer Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar ile meydana gelir. Spermatositler ve spermatidler, Sertoli hücrelerinin apikal ve lateral kenarlarındaki derin girintilerde konumlanmışlardır. Spermatidlerin flagellar kuyrukları gelişimlerini sürdürdükçe, Sertoli hücrelerinin apikal dışarı yönlü piskül şeklinde görüntülenirler. Sertoli hücreleri iletişim bağlantıları gap junctionlar aracılığı ile de ilişki kurarlar ve yolak ile hücrelerin iyon-kimyasal alışverişi sağlanmış olur. Sonuç olarak seminifer epitel siklusunun koordinasyonunda önemlidir.



Resim 4.3.6. Sertoli hücresi

Sertoli hücrelerinin başlıca işlevleri:

1.Salgılama: Sertoli hücreleri görev olarak sürekli salgı salgılar. Salgı seminifer tübüllerden genital kanallara doğru ileri yönlüdür. Androjen-bağlayıcı protein (ABP) salgılanması Sertoli hücrelerince sekrese edilen FSH ve testesteron kontrolü altında gerçekleştirilir. ABP, testesteron ve dihidrotestesteron androjenlerine yüksek bağlanma afinitesinde olan bir salgısal proteindir (Gneist, et al., 2007). Bu protein, seminifer tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testesteronun yoğunlaşmasını sağlar. Sertoli hücreleri testesteronu östradiyol haline çevirebilirler (Cohen-Bacrie, Belloc, Ménézo, Clement, & Hamidi, 2009). Bu hücreler aynı zamanda, inhibin ve aktivin alt ünitelerini (α ve β alt üniteleri) salgırlar. İnhibin ($\alpha\alpha$ heterodimeri) hipotalamustan ve ön hipofizden salınan gonadotropin salgılatıcı faktör ve FSH üzerine negatif feedback etki gösterir. Aktivin ($\alpha\alpha$ veya $\beta\beta$ homodimer) FSH salınımı üzerine pozitif feedback etki gösterir.

Sertoli hücreleri, puberteden sonra postmitotiktir. Erişkin testisinde mitoz hücre bölünmesi gözlenmez (Gneist, et al., 2007).

2.Anti-müllerian hormon üretimi: Diğer adı Müllerian-inhibe edici hormon olarak isimlendirilir ve bu glikoprotein yapıdaki hormon embriyonik gelişmi kısmında erkek fetusta Müller (paramezonefrik) kanallarının gerilemesini sağlamasına sebebiyet verir. Testesteron ise Wolf (mezonefrik) tubullerinden kökenlenen yapıların gelişmesini ihtiva eder.

3. Sertoli hücreleri, Erkeklerde blue çağından sonra postmitotiktir. Erişkin testisinde mitoz hücre bölünmesine katılmaz (Gneist, et al., 2007).

Gelişmekte olan spermiyumların desteklenmesi, korunması ve beslenmesinin düzenlenmesi: Spermatogenik seri hücreleri birbirlerine sitoplazmik köprülerle bağlanmışlardır. Bu hücreler fiziksel olarak, yaygın sitoplazmik Sertoli hücre dallanmaları ile desteklenir. Spermatositler, spermatidler ve spermiyumlar kan-testis bariyeri ile kan desteğinden ayrıldıkları için, bu spermatogenik hücreler besin maddelerinin ve metabolitlerin alıp verilmesinde, Sertoli hücrelerinin aracılığına gereksinim duyarlar. Sertoli hücre bariyeri gelişen spermiyumları immunolojik saldırıdan da korurlar (Cohen-Bacrie, Belloc, Ménézo, Clement, & Hamidi, 2009)

4. Fagositoz: Spermiyogenez esnaında speratogeneze katılan ve görevi sonlandırılan artıklar veya spermatik stoplazmaları artık cisimler şeklinde dökülür.

Bu artık cisimcikler fagosite edilir ve sertori hücrelerini içine alınır. Sertori hücreleri içerisindeki lizozimler tarafından sindirilirler (Cohen-Bacrie, Belloc, Ménézo, Clement, & Hamidi, 2009).

5. Kan –Testis bariyeri: Hücreleri insanda ve diğer hayvanlarda üreme periyodu süresince bölünmezler. Bunlar, özellikle enfeksiyon, kötü beslenme, x-ışını radyasyonu gibi olumsuz koşullara karşı oldukça dayanıklıdırlar. Zararlı etkiler karşısında spermatogenik seri hücrelerine göre çok daha dayanıklıdırlar.

4.3.1.4. İnterstisiyel doku

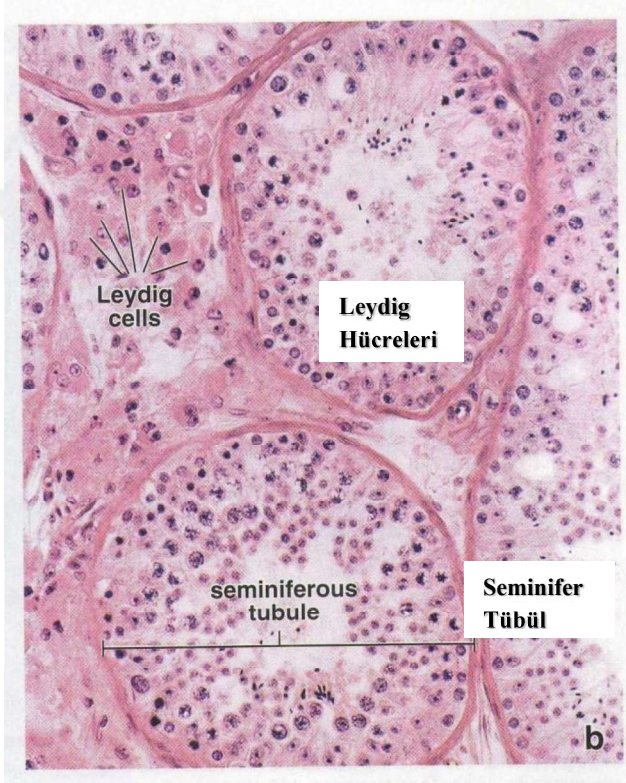
Testiste bulunan seminifer tübüllerin arasını bağ dokuları sinirler kan ve lenfatik damarlar doldurur. Testiküler kapillerler pencere vardır ve kan proteinleri gibi makromoleküllerin serbestçe geçmesine geçirim sağlarlar. İnterstisiyel alandaki lenf damarlarının oluşturduğu yoğun hat, bu organdan alınan interstisiyel sıvı ile lenf sıvısının bileşimindeki benzerliği nednei olarak görülmektedir.

Bağ dokusu çeşitli tipte hücreler içerir; bunlar arasında fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlardır. Puberte sırasında ek olarak bir hücre tipi daha çok kendini gösterir, oval veya poligonal şekilli olan ve santral tek çekirdek ve küçük lipid damlacıklarından zengin eozinofilik bir sitoplazması bulunan hücredir. Steroid sekrese eden hücre özelliklerini gösteren bu hücreler, testisin *interstisiyel ya da Leydig hücreleridir*. Bu tip hücreler testosteron üretirler. Testesteron sentezi mitokondri ve düz yüzlü endoplazma retikulumunda bulunan enzimlerce gerçekleştirilerek, hücre organelleri arası işpaylaşımına bir örnek oluşturur (Cohen-Bacrie, Belloc, Ménézo, Clement, & Hamidi, 2009).

Hormonal uyaramlar interstisiyel hücrelerin aktivitelerini ve sayısını düzenler. Hamilelik dönemindeyken üretilen *plasental gonadotropik hormon* anne kanından fetusa geçerek androjenik hormonları etikler. Bu androjenik hormonlar sayıca fazla fetal testiküler interstisiyel hücreleri uyarırlar. Hormonların bulunması embriyonik farklılaşmada erkek üreme sisteminin gelişmesi için ihtiyaçtır. Embriyonik dönemde meydana gelen interstisiyel hücreler hamileliğin 4,5 ayına non-difrensiyal olarak sabit dururlar; bundan sonra testosteron sentezinde görülen bir downregülasyon eşliğinde gerilerler. Bu süreçten sonra gebelik boyunca ve hipofizden salınan *luteinizan hormon* (LH) uyarımı altında testosteron sentezini yeniden yapmaya başladıkları prepubertal döneme kadar dinlenmede kalırlar.

4.3.1.5. Leydig hücreleri

Leydig hücreleri intertübüler alanda lenfatik damalarlar ve kan damaları arasında yer almaktadır (**Resim 2.3.7**). Birçok steroid-üreten hücre gibi, Leydig hücreleri lipid damlacıkları, karakteristik tübüler kristal mitokondriyonlar ve iyi gelişmiş düz yüzlü endoplazma retikulumu bulunur. Bu hücelere özgü Reinke kristalleri sitoplazmada bulunur (Gneist, et al., 2007).



Resim 4.3.7. Leydig hücreleri (Bingöl, Deprem, Koral Taşçı, & Kocamış, 2011)

Ergenliğe girilmesiyle beraber, siklik adenosin monofosfat (cAMP) aracılı mekanizma tarafından Lüteinizan hormon (LH) ile tetiklenmenin ardından, Leydig hücreleri, 5α -redüktaz enzimi ile dihidrotestosteron'a dönüştürülebilen, *testosteron* sekresyonu yapar. Serumda %95 oranında bulunan testosteron (seks hormon-bağlayıcı globulin, SHBG ve diğer proteinlere tutulmuş halde) Leydig hücreleri tarafından sentezlenir; kalan testosteronun tarafından sekrese edilir.

Başta yağ dokusu olmak üzere testosteron, birçok dokuda östrojenlere aromatize olabilir. Folikül Stimüle edici Hormon (FSH) uyarımından sonra Sertoli hücrelerince

üretilen ABP, gelişen spermatogenik hücrelerin çevresinde yüksek bir testosteron yoğunluğu sağlar (Cohen-Bacrie, Belloc, Ménézo, Clement, & Hamidi, 2009).

4.3.1.6. Testis histofizyolojisi

İnsanda 37°C nin altında olması gereken spermatogenezin sıcaklığının düzenlenmesi sperm sağlığı için çok kritiktir. Spermatogenezin optimal sıcaklığı vücut ısısından 2-3°C altındadır. Zengin bir venöz pleksus (pampiniform pleksus) her bir testiküler arterin etrafını sarar, testiküler ısının sürdürülmesinde önemli olan bir karşı ısı akımı sağlayarak tampon sistemi oluşturur. Diğer faktörler; skrotumdaki deri ustusu suyun buharlaşması ile ısı kaybı ve spermatik kordondaki krameter kaslarının kasılması ile testislerin daha yüksek bir ısıda kalabileceği inguinal kanallara ihtiva etmesidir (Cohen-Bacrie, Belloc, Ménézo, Clement, & Hamidi, 2009).

Beslenme kötülüğü, alko ve bazı ilaçların etkisi ile spermatogonyumlarda değişiklikler ve sonuçta spermiyum üretiminde azalma ortaya çıkar. X-ışını radyasyonu ve kadmiyum tuzları spermatogenik seri hücreleri için oldukça zararlıdır ve bu hücrelerin ölümüne sebep olarak steriliteye sebep olur.

Endokrin salgılar spermatogenez üzerinde kilit rolündedir. Spermatogenez, hipofizin FSH ve LH hormonlarının testiküler hücreler üzerinde etkilidir. *LH* interstisyel hücreler üzerine etki ederek spermatogenik seri hücrelerinin normal gelişimi için gerekli olan testesteron yapımını tetikler. *FSH* ise sertoli hücrelerine etkiyerek adenilat siklaz yapımını stimüle eder ve sonuçta cAMP'nin artışına yol açarak ve aynı zamanda ABP'nin sentez ve salgılanmasını sağlar. Bu protein testesteron ile bağlanır ve bunu seminifer tübüllerin lümenine göç ettirir. Spermatogenez testesteron ile uyarılır ve östrojenler ve progesteronlarla engellenir.

Spermiyumlar, epididimise, uygun bir ortam olan testiküler sıvı içinde taşınırlar. Testiküler sıvı Sertoli hücreleri ve rete testis tarafından üretilir; bu sıvı steroidler, proteinler, iyonlar ve testesteronla birleşmiş ABP eklenir.

4.3.1.7. Kan-testis bariyeri

Kan ile seminifer tübüllerin arasında bir bariyer bulunur. Bu bariyer testiküler sıvı içine kandan çok az seçilen madde geçirinimi sağlar. Yan yana dizilmiş olan Sertoli hücreleri arasındaki *tıkayıcı bağlantılar*, kan- testis bariyerini oluşturur. Bariyer

proteinlerin, antikorlar dahil, gelişmekte olan spermatogenik hücrelere ulaşmasını bloke eder.

Zıt yönde ise, gelişme evresinde olan spermatogenik hücrelerden protein sızmasını ve bir immün cevabı tetiklemesini engel olur. Kan-testis bariyeri benzer olarak kan-beyin bariyeri gibidir, tek fark sonrakinin ana elemanını kapiller endotel hücrelerin tıkaçıcı kavşakları oluşturur. Tıkaçıcı bağlantılar nirengi noktasıdır; çünkü seminifer epiteli **bazal kompartman** ve **adluminal kompartman** olmak üzere bölerler. Spermatogonyumlar bazal kompartmanda lokalize olmuş ve spermatositler ve spermatidler adluminal pozisyonu tutulu bozuzyonda bekletirler. Testiküler kapillerler pencere tiptedir ve büyük moleküllerin geçişine izin verir. Erkek germ hücrelerinin kandan gelen zararlı ajanlara karşı korunmasında önceliklidir (Cohen-Bacrie, Belloc, Ménéz, Clement, & Hamidi, 2009; Gneist, et al., 2007).

4.3.2. Testis İçi Genital Kanallar

4.3.2.1. Tubuli rekti: Seminifer tübüllerin çoğu loplu biçimindedir, bunların her iki ucu rete testise *tubuli rekti* olarak bilinen düz tübüllerle bağlanır. Tubuli rekti, testisin mediastinumunda lokalize olmuştur. Spermatogenik hücrelerin giderek ortadan kaybolduğu bu tübüllerin başlangıç bölümünde duvarı sadece Sertoli hücreleri meydana getirir. Sıkı bağ dokusu kılıfı ile desteklenen ve kübik epitel'den oluşan yapı ile devam eder.

4.3.2.2. Rete testis: Rete testis tunika albugineanın kalınlaşması ile oluşmuş mediastinum içinde konumlanmıştır. Rete testis kübik epitel ile döşeli ve oldukça fazla anastomozları olan bir kanal ağıdır. Epitel hücrelerinin apikal yüzeyi mikrovilluslar ve tek bir sil yapısında bulundurulur. Fibroblastlar ve miyoid hücreler tarafından meydana getirilen bariyer duvar, büyük Leydig hücresi kümelenmesine eşlik eden kan damarları ve geniş lenf kanallarıyla kuşatılmıştır. Sertoli hücreleri tarafından üretilen ABP, androjenleri bağlar. Bu protein-steroid kompleksi, rete testisin lümeninde ve epididimin başlangıç parçasında bulunur. Buda rete testis, arteriyel kandan daha fazla konsantrasyonda androjenleri içerir. Lümen içindeki androjenler, epididim başının normal fonksiyonunu destekliyor görünmektedir.

4.3.2.3. Duktuli Efferentes: Duktuli efferentes, rete testisten içerisinde 10-20 adet çıkar. Yapısında epididimis yönüne doğru hareket sağlayan kinosilyalı hücrelerle değişimli olarak silyasız kübik hücre gruplarından oluşan bir epitele bulundurulur. Bu,

epitele karakteristik tarak şeklindeki görünüm oluşturur. Silyasız hücreler seminifer tübüllerden salgılanan sıvının çoğunu emerler. Silyalı hücre aktivitesi ve sıvı abzorbsiyonu, spermiyumların epididimise doğru süpürülmesini sağlayan bir sıvı akımı sağlar. Epitelin bazal laminasının dışında dairesel olarak dizilmiş düz kas hücrelerinden oluşan ince oluşmuştur. Duktuli efferentes gidip birleşip epididimisin duktus epididimisini meydana getirir (Cohen-Bacrie, Belloc, Ménézo, Clement, & Hamidi, 2009; Gneist, et al., 2007).

4.3.3. Genital Boşaltım Kanalları

4.3.3.1. Duktus Epididimis: Duktus epididimis yaklaşık 4-6 m uzunluğunda, içinde spermiyumların olgunlaştığı ve döllenme için çok kritik olan fertilizasyon kabiliyetini birbirine etkileyen ileri yönlü hareket etme kabiliyetini kazandıkları, tek ve oldukça kıvrıntılı tubuler bir yapıdır. Bu uzun şekilli kanal ve kanalın çevresini saran bağ dokusu ve kan damarlarını ile bir bütün olarak epididimisin kuyruk ve gövesini oluşturur. Epididim kanalı üç ana komponente ayrılır bunlar sırayla; **baş**, **gövde** ve **kuyruk**. Epididim son kısmında toplanan spermler, ileri doğru hareket gösterir. Yuvarlak bazal hücreler ve prizmatik asıl hücrelerden oluşmuş stereosilyalı yalancı çok katlı prizmatik epitele sahiptir. Bu hücreler, yapısında düz kas hücreleri ve kan kapillerce zengin bağ dokusu ile çevrelenmiş bir bazal lamina üzerinde meydana gelirler. Bu düz kasların peristaltik kasılmaları spermin kanallar boyunca ilerlemesine yardım eder. Prizmatik esas hücrelerinin yüzeyleri ise stereosilya adını alan uzun ve dallanmış düzensiz hücre yüzey farklanmaları ile döşenmiştir. Epididimiste baş bölgesinde bulunan stereosilya yapısal olarak uzundur ve dallanmalar yapar. Kuyruk bölgesinde stereosilyanın yüksekliği azdır. Esas hücreler, epididim lümenine **karnitin**, **siyalik asit**, **glikoproteinler** ve **gliserilfosforilkolin** sekrese edilir. Bu hücreler iyi gelişmiş Golgi aygıtı, lizozom ve veziküller komponentleri yapısında bulundurulur. Testiküler sıvının yaklaşık %90'ı eferent kanalcıklarda ve epididimde esas hücreler tarafından emilir. Bazal hücreler ise esas hücrelerin farklılaşmamış öncülleri olarak özen gösterirler. Diğer hücre tipleri, mitokondriyondan zengin ve epididim başında belirgin olan **apikal hücreler** ve epididim kuyruğunda belirgin olan **berrak hücrelerdir**. **İntraepitelyal lenfositler** epididim boyunca yayılmıştır ve epididim immunolojik bariyerinin önemli bir bileşeni olma potansiyalindedir. Epitel yüksekliği epididim kanalının bölümü ile ilgili olarak değişkendir. Epitel baş bölgesinde daha

uzun ve kuyruk bölgesinde daha kısadır. Buna zıt şekilde, epididim kanalının lümeni, baş bölgesinde dar ve kuyruk bölgesinde daha geniştir. Duktus epididimis epiteli spermatogenez süresince atılan artık cisimciklerin ortadan kaldırılması ve sindirilmesine eklenir (Cohen-Bacrie, Belloc, Ménézo, Clement, & Hamidi, 2009).

4.3.3.2. Duktus(vas) Deferens: Epididimisten daha kalın müsküler duvarlı düz bir tüp şeklinde olan duktus (vas) deferens devam ederek, prostatik üretraya açılır. Bu kanalın tipik olarak dar bir lümeni ve kalın bir düz kas tabaka yapısına sahiptir. Mukozası uzanlamasına kıvrımlar meydana getirir; yüzeyi stereosilyalı yalancı çok katlı prizmatik epitele kaplıdır. Lamina propriası elastik liflerce zengindir. Kalın kas tabakası, içte ve dışta longitudinal, ortada sirküler tabakalardan meydana gelmiştir. Spermatik kordonun bir parçasını oluşturan duktus deferens. Bu kordon testiküler arter, pampiniform pleksus ve sinirleri meydana getirir. Prostata girmeden önce duktus deferens genişler ve *ampulla* denilen kısmı meydana getirir. Bu alanda epitel kalınlaşır ve oldukça fazla kıvrımlar yapar. Ampullanın son kısmında seminal veziküller duktusa eklenirler (Cohen-Bacrie, Belloc, Ménézo, Clement, & Hamidi, 2009).

4.3.3.3. Duktus Ejakulatorius: Duktus deferens prostata girer ve prostatik üretraya açılır. Prostata giren segmente *ejakülatuvar duktus* adı verilir. Duktus deferensin mukoza tabakası ampulla boyunca ejakülatuvar duktusun içine kadar devam ederken, kas tabakası ampulladan sonra sonlanır.

4.3.4. Yardımcı Üreme Bezleri

Bu bezler, seminal veziküller, prostat bezi ve bulboüretral bezler'dir. Seminal veziküller ve prostat, seminal sıvının çoğunu üretir ve onların fonksiyonu androjenler tarafından sentezlenir.

4.3.4.1. Seminal vezikül: Seminal veziküller, androjene gerekli ve uzunlukları 15 cm olan iki adet oldukça kıvrıntılı tübüler yapıdaki bezlerdir. Tüplere histolojik olarak bakıldığında aynı durumda olan tüpler farklı yönlerde olabilirler. Salgı granüllerinden zengin tek katlı kübikten, yalancı çok katlı prizmatığe doğru değişen bir epitel ile döşeli olup katlantılı mukoza kıvrımları yapısında bulundurmaktadır. İnce yapısından dolayı düzeyindeki özellikleri protein sentezleyen hücrelere benzer. Lamina propria elastik lifçe zengindir. Orta tabaka, dairesel ve uzanlamasına düz kas tabakaları sarılmıştır. Seminal veziküllerin visköz sarımsı salgısı, spermiyumları aktive eden *fruktoz, sitrat, inositol, prostaglandinler ve çeşitli proteinlerden* zengin yapıdadır. Erkek üreme sistemi ile ilişkili bu bezler tarafından üretilen karbonhidratlar seminal

sıvıya salgılanırlar ve sperm motilitesi için enerji mekanizmasını oluşturur. Fruktöz, bu karbonhidratlar içerisinde en fazla bulunan monosakkariddir ve ejakülasyonla atılan spermin ana enerji kaynağıdır. İnsan ejakülatının %70'i seminal veziküllerden dolaydır. Epitel hücrelerinin boyutları ve salgılama sürecinin aktivitesinin derecesi testesterona muhtaçtır (Cohen-Bacrie, Belloc, Ménézo, Clement, & Hamidi, 2009).

4.3.4.2. Prostat: Prostat, yardımcı durumadaki en büyük üreme bezidir ve 30-50 tane dallanmış yapıdaki tübüloalveoler bezin bir araya getirerek oluşturduğu bir en büyük yardımcı bezdir; bu bez kanalları prostatik üretraya dökülür. Prostatik bezler üç bölgede düzenlenmiştir; periüretral mukozal bezler, periüretral submukozal bezler ve esas bezler olarak adlandırılan periferik birleşik bezler. Bezler tek katlı ya da yalancı çok katlı prizmatik epitel ile çevrilir. Prostat, prostatik sıvıyı sekrese eder ve bunu iç kısmında birleştirir; ejakülasyon sırasında bu sıvıdan itme gücü alır. Prostat düz kaslardan zengin bir fibroelastik kapsül ile çevrelenmiştir. Kapsülden çıkan septumlar bezin içine doğru uzanırlar ve bezi loblara bölerler; bu loblar erişkin erkekte kolay görünür değildir. Bezleri ayrıca zengin bir fibromüsküler stroma çevreler. Prostatta belirgin üç bölgesi bulunur: birincisi *merkezi bölgedir* (santral zon). Yalancı çok katlı bir epitele sahip ve bezin hacminin %25'ini oluşturur. Bezin %70'ini *periferik bölge* (periferik zon) oluşturur. Bu bölgenin epiteli daha düzgündür ve burası prostat kanserinin geliştiği başlangıç bölgesi olarak bilir. Üçüncü bölge olan *geçiş bölgesi* (transition zon), tıpta oldukça önemlidir çünkü burası benign prostat hiperplazilerinin büyük bir bölümünün kaynaklandığı bölgedir (Cohen-Bacrie, Belloc, Ménézo, Clement, & Hamidi, 2009).

Prostatik bezlerin lümeninde genel olarak 0.2-2 mm çapında glikoproteinden zengin ve bazen kalsiyum birikme alanı olan küçük yuvarlak cisimcikler yapısında bulunur. Bunlar *prostat taşları* ya da *korpora amilasea* olarak adlandırılır. Bu cisimcikler çoğunlukla kalsifiye yapıdadır. İşlevleri tam olarak bilinmesede, yaş ilerledikçe sayıları artmaktadır. Hücreler bol miktarda granüllü endoplazmik retikulum ve Golgi kompleksi bulundurlar yapılarında. Salgı ürünleri *prostat-spesifik asit fosfataz*, *prostat-spesifik antijen*, *amilaz* ve *fibrinolizin* yapısında vardır. Prostatın salgısı asidiktir (pH 6,5). Semen in likefaksiyonunda rol alan fibrinolizin meydana getirirler. Semene salgılanan prostatik sıvıda yüksek konsantrasyonlarda *sitrik asit*, *çinko*, *amilaz*, *prostat-spesifik antijen* ve *asit fosfataz* yapısında bulunur (Cohen-Bacrie, Belloc, Ménézo, Clement, & Hamidi, 2009) (Gneist, et al., 2007).

4.3.4.3. Bulboüretal bez: Bulboüretal bezler diğer adıyla *Cowper bezleri*, çapları 3-5 mm olan ve üretranın membranöz kısmının proksimalinde yerleşik olup buraya açılan bezlerdir. Mukus salgısı üreten tek katlı kübik epitele sahip tübüloalveoler yapıdadır. İskelet ve düz kas hücreleri her bir bezi loblara ayıran septumlarda bulundurlar. Oldukça *bol galaktoz ve ortalama miktarda siyalik asit içeren salgı*, penil üretraya boşaltılır. Bu salgı kayganlaştırıcı bir fonksiyona sahiptir ve penil üretra boyunca dışarı çıkan semenin önünden gider şekildedir.

4.3.5. Penis

Penis başlıca üç silindirik erektile doku kitlesi ile üretrayı içerir, dıştan deri ile çevrelenmiştir. Bu yapılardan ikisi olan *korpus kavernozum penis*'ler dorsal olarak konumlanmışlardır. Bir diyeri ise *korpus kavernozum üretra* ya da *korpus spongiyozum* adını almıştır, ventral olarak yerleşerek üretrayı çevreler. Bu yapı en sonda genişleyerek *glans penisi* meydana getirir. Korpus kavernozumlar, tunika albuginea adı verilen ve sıkı bağ dokusundan oluşan dirençli bir tabaka ile çevrelenmiştir. Korpus kavernozum ve korpus spongiyozum, bir arterle beslenen ve venöz kanallarla boşaltılan düzensiz ve birbirleriyle bağlantılı kan boşlukları, ya da *sinüzoidler* yapısında bulundurur. Ereksiyon sırasında, arteriyel kan sinüzoidleri doldurur, sinüzoidler genişler ve kanı boşaltacak olan venöz kanallara bası yaparak onları kasar. Penisin ve üretranın korpus kavernozumları erektile dokudan meydana gelmiştir. Erektile doku, penceresiz endotel hücreleri ile döşeli ve bağ dokusu ile düz kas hücrelerinden oluşan trabekülalarla ayrılan venöz boşluk yapıdadır (Cohen-Bacrie, Belloc, Ménéz, Clement, & Hamidi, 2009).

İki kimyasal madde ereksiyonu kontrol eder: ***nitrik oksit ve fosfodiesteraz***.

Beyin korteksi-hipotalamus aracılığıyla oluşturulan cinsel uyarı spinal kord aracılığıyla otonom sinirlere tanısı, pudental sinirin en uç noktası olan dorsal sinirin dallarının *nitrik oksit* oluşumuna sebep olur. Nitrik oksit molekülleri kan sinüzoidlerini kuşatan düz kas hücrelerinin oluklu bağlantılarından geçerek hızlı bir şekilde ihtiva eder. Düz kas hücrelerinin içinde, nitrik oksit molekülleri *guanozin trifosfat (GTP)*, *siklik guanozin monofosfat (cGMP)* üretmek için *guanilat siklazı* aktifleştirir. cGMP, hücre içindeki depolama alanlarında Ca^{++} 'un tutulmasını indükleyerek sinüzoidleri kuşatan düz kas hücre duvarının gevşemesini sağlar. Düşürülmüş Ca^{++} konsantrasyonları düz kas hücrelerinin gevşemesini belirler, bu da dorsal ve kavernoöz

arterlerden gelen hızlı arteriyal kan akışıyla sinüzoidlerde kan birikmesine sebep olur. Kanla dolan sinüzoidler penisten kanı boşaltan küçük venlerde basınç oluşturur ve penis sert bir hal alır. Fosfodiesteraz (PDE) enzimi cGMP'yi yıkmak ve ereksiyonu sonlandırmak için sekrese edilir. PDE aktivitesinin bloke edilmesiyle, cGMP düzeyleri yüksek tutulur ve penis ereksiyon halinde durur (Cohen-Bacrie, Belloc, Ménézo, Clement, & Hamidi, 2009).

Prepusyum (sünnet derisi), içinde düz kaslar ile bağ dokusu bulunduran retraktıl bir deri katlantısıdır. Yağ bezleri, glansı çevreleyen deride ve katlantı içinde yer almıştır.

Penil üretranın büyük bölümü yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir; glans peniste bu, çok katlı yassı epitele değişir. Mukus salgılayan Littre bezleri penil üretra boyunca varlığını sürdürür.

Penisin arteriyel desteği internal pudental arterlerden meydana gelir, bunlardan da penisin derin arterleri ve dorsal arterleri çıkar. Derin arterler besleyici ve helisin arterleri oluşturmak üzere dallara ayrılırlar. Bunlardan ilki yani besleyici olanlar trabekülalara gerekli oksijen ve besin maddelerini sağlarken ikincisi yani helisin arterler doğrudan kavernoöz boşluklara (erektıl dokular) açılırlar. Helisin arterler ve derin dorsal venler arasında arteriyovenöz pencerelerden oluşur (Cohen-Bacrie, Belloc, Ménézo, Clement, & Hamidi, 2009).

4.4. FERTİLİZASYON (DÖLLENME):

Fertilizasyon, sperm ile oositin birleşmesi ile başlayan birbiri ile ilişkili karmaşık moleküler olaylar zinciridir. Tek hücreli embriyo olan zigotun birinci mitoz bölünmesinin metafaz plağında anne-baba kromozomlarının bir araya gelmesi ile sonlanır. Bu mekanizmalardan herhangi bir aşamada bozukluk zigotun atretiziye uğramasına nedne olur (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013). Fertilizasyon süreci 24 saat sürer ve uterus tüplerinin ampulla bölgesinde meydana gelir. Bu bölge tüpün en geniş kısmıdır ve overe yakındır. Oosit fertilizasyonu burada gerçekleşirse oosit tüplerden uterusa doğru yavaşça ilerler ve burada dejenere olarak atılır. Fertilizasyon tüpün diğer parçalarında olabilir ancak uterusda olmaz. Spermiler dışının üreme kanallarında 72 saat canlı kalabilmektedir (Cohen-Bacrie, Belloc, Ménézo, Clement, & Hamidi, 2009; Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013).

Vajene atılan spermilerin yaklaşık %1'i serviksten geçerler. Buraya ulaşabilen spermier canlılıklarını uzun süre sürdürebilir. Spermier serviksten uterus tüpleri içine kendi sperm kuyruk hareketiyle, bir ölçüde de sıvıların epitel hücrelerinin siliaları tarafından dalgalandırılmasıyla gidecekleri noktaya varış sağlarlar. Spermier bu mesafeyi en çabuk 2 ile 7 saat arasında giderler. İstmusa ulaştıklarında motiliteleri azalır ve hızları düşüőe geçer. Ovulasyonla birlikte oositi çevreleyen kümölüs hücreleri tarafından salgılanan kemotaksik maddelerin etkisiyle kapasitans olmuş sperm oosit için yol göstericidir (10; 14).

Diőü üreme sistemine giren sperler ilk başta dölleme yeteneğine sahip değildir. Fertilizasyon yeteneğine kavuşmak için sperm önce **kapasitasyon** ve **akrozom reaksiyonu** reaksiyon bağımsıdır (Bingöl, Deprem, Koral Taşçı, & Kocamış, 2011).

Kapasitasyon, spermierin diőü üreme kanallarındaki salgıların etkisiyle bu süreci tamamlaması ve fertilizasyon için uygun hale gelmesi dönemidir ve bu dönem insanlarda yaklaşık 7 saati bulmaktadır. Spermle uterus tüpünün iç yüzünü dölseyen mukoza hücreleri arasında epitelyal bir etkileşimi gerektiren kapasitasyonun büyük bir kısmı uterus tüpleri içinde cereyaneder (Bingöl, Deprem, Koral Taşçı, & Kocamış, 2011). Kapasitasyon spermierde yapısal bir değişikliğe sebebiyet vermeyen ve genellikle akrozom reaksiyonunun tamamlanması için gerekli olgunlaşma sürecidir. Bu süre içinde spermin akrozomal bölgesini örten plasma membranı üzerindeki glikoprotein kılıfı ve seminal plasma proteinleri uzaklaştırılır. Ayrıca sperm plazma membranındaki intramembranöz partiküllerin yer değiştirdiği gözlenir, intrasellüler kalsiyum ve sodyum seviyesi yükselir. Yapısal bir değişiklik gözlenmese de kapasite olan spermierde intrasellüler iyonların reorganizasyonu gerçekleşir ve metabolik değişiklikler olur. Moleküler düzeyde ise adenilat siklaz/protein siklaz aktivitesi yeniden düzenlenir ve çekirdek proteinlerinde değişiklikler meydana gelir. Akrozom reaksiyonuna sadece kapasitasyonunu tanımlamış sperm geçebilir ve korona hücrelerinden geçebilir (Chiu, Chung, Tsang, & Koistinen, 2005).

Akrozom reaksiyonu kapasitasyonun aksine spermierde yapısal değişikliğe neden olur. Bu olay spermin zona pellusidaya bağlanmasıının ardından meydana gelir. Zona proteinleri tarafından başlatılır. Bu reaksiyon, zona pellusidanın penetrasyonu için gerekli olan, aralarında tripsin-benzeri maddelerin ve akrozinin de bulunduğu bazı enzimlerin salgılanmasıyla en üst noktada meydana gelirler. Akrozomal reaksiyon spermierin oositle karşılaştıkları dönemde geçirdikleri bir süreç olup, öncesinde akrozom reaksiyonunu tamamlayan spermier kumulus-korona hücreleri arasında

ilerleyemez veya ilerleseler bile zona pellusidaya tutunarak penetre edilemez (Kierszenbaum, 2006; Chiu, Chung, Tsang, & Koistinen, 2005).

4.4.1. Fertilizasyonun Evreleri

Evre 1- Korona radiatanın delinmesi ve geçişmesi

Evre 2- Zona pellusidanın delinmesi ve geçilmesi

Evre 3- Oosit ve sperm hücre zarlarının kaynaşması

1.Evre Korona radiatanın delinmesi ve geçişmesi: Üreme kanallarında bırakılmış 200-300 milyon spermmin sadece ancak 300 ile 500 tanesi dölleme bölgesine ulaşır. Sonrasında da spermlerden yalnızca biri sekonder oositi dölleme yeteneğine sahip olur. Diğer spermilerin fertilize olması, oositten salgılanan faktörler ve zona pellusidanın reseptör yapısının değişmesi ile bloklanır. Sperm akrozom reaksiyonundan salınan hyaluronidaz enzimi ile oosit korona radiatasındaki folliküler hücreler birbirinden ayrıl ve zona pellusidanın ortaya çıkmasını sağlarlar. Bu olayda tubal mukozal enzimler de hyaluronidaza yardımcı olur (5). Kapasitasyon işlemini başarılı bir şekilde meydana getirmiş olan sperm, korona hücrelerinin arasından serbestçe geçer (Kierszenbaum, 2006).

2.Evre Zona pellusidanın delinip geçilmesi: insanda yaklaşık 13-15 µm. Kalınlığında olan zona pellusida, oositi çepeçevre saran ve spermilerin ovuma bağlanmalarını kolay forma getiren ve akrozom ile ilgili reaksiyonları başlatan glikoprotein yapıda olarak tanımlanabilir. Hem spermilerin oosite bağlanması hem de akrozom reaksiyonu **ligand ZP3 (Zona pellusida protein 3)** olarak bilinen zona proteini aracılığıyla meydana gelir. ZP3 molekülünün iki bölgesi vardır:

1- hücre zarında integral proteinleri tanıyan sperm reseptörü ve akrozom reaksiyonunu tetikleyen, sperm başındaki reseptör proteinlerine bağlanan bölge (Delilbaşı, 2008).

2-Akrozomdan salınan *esteraz, akrozin, hyalüronidaz, asit proteinaz, ariminidaz, fosfataz, aril sülfataz, kollajenaz, fosfolpaz C, α-glukorinidaz ve nöraminidaz* enzimleri zona pellusidanın erimesine sebep olur, bu sebeple sperm in oosit içine gireceği bir yol elde edilmiş olur. Bahsedilen enzimlerin en önemlileri **akrozindir** (Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013). Zona pellusida geçirgenliği, sperm panetrasyonu ile değişiklik gösterir. Buradaki ekstrasellüler glikoprotein örtünün içeriği fertilizasyondan sonra değişim geçirmiş olur. Bu temas sonucunda, oositin plazma

membranını döşeyen kortikal granüllerden lizozomal enzimlerin salınımı sağlanır. Bu enzimler de sperm penetrasyonunu bloklamak ve zona yüzeyinde sperm için türe özgü reseptör bölgelerinin inaktivasyonunu belirlemek üzere, zona pellusidanın özelliklerinde bazı değişiklikler meydana getirmede yardımcı olur (**zona reaksiyonu**). Zonaya dikkatli bakıldığında yapışık başka spermier görölmesine rağmen zona pellusidayı sadece bir adet spermın geçtiğı görölür (Kierszenbaum, 2006; Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013).

3.Evre Oosit ve spermın plazma membranlarının kaynaşması: Spermın oosite yapışması başlangıçta kısmen integrinlerle, ligandin ve disintegrinlerin karşılıklı etkileşimleriyle meydana gelmektedir. Sperm oosite birleşmesinin hemen ardından iki plazma membranıda birbiriyle kaynaşır. Spermın akrozomal başını çevreleyen hücre zarı akrozom reaksiyonu sırasında kaybolduğundan, füzyon oositin membranıyla, spermın başının arka kısmını çevreleyen membran arasında meydana gelir (Kierszenbaum, 2006).

4.4.2. Oositin Fertilizasyona Cevabı

1. Kortikal ve zona reaksiyonları. Lizozomal enzimler içeren kortikal oosit granüllerin serbest hale geçmesi sonrasında, Oosit membranı başka bir spermın içeriye girmesini önlemek amacıyla yapı ve fonksiyonel değişiklikler geçirir. Böylece oositin içine birden fazla spermın girmesi önlenmiş olur (Kierszenbaum, 2006).

2. İkinci mayoz bölünmenin tamamlanması. Oosit, spermın sitoplazmasına girmesinin hemen ardından metafaz 2 oositin metafaz da tutukluluğu bitmiş olur. Bölünme sonucu oluşan hücrelerden hemen hemen hiç sitoplazmaya sahip olmayanı ve en küçük olanı **ikinci polar cisim**, diğeri de **kalıcı oosit** olarak bilinir. Bu hücrenin kromozomları (22+X) **dişi pronükleus** adı verilen veziküler bir çekirdek içinde yeniden düzenlenirler (Kierszenbaum, 2006; Erdoğan, Şahin, & Dinçel, 2013).

3. Oosit metabolik aktivasyonu. Metabolik aktivasyonun çok büyük bir olasılıkla sperm tarafından taşınan faktörler tarafından olduğu düşünülmektedir. Oositin füzyon sonrası aktivasyonu, erken embriyogenezisle ilgili ilk hücrel ve moleküler olayların tümü şeklinde adlandırılabilir.

Bütün bu değişimler sırasında, sperm de dişi pronükleusa yakınlanması için hareketini sürdürür. Kuyruğu kopup dejenere olurken, sperm çekirdeğı genişleyerek **erkek pronükleusunu** meydana getirir. Birbirine çok yakın yaklaşan dişi ve erkek

pronükleuslarının çekirdek zarları da kaybolduğundan bu safhadan sonra dişi ve erkek pronükleusların morfolojik olarak ikisinde ayırt edilmesi imkânı hale gelir. İki kısımda da haploid sayıda kromozom içeren erkek ve dişi pronükleusları büyümeleri sırasında kendi DNA'larını replike etmek zorundadırlar. Bunu yapmazlar ise zigotta normalde olması gereken DNA sayısının yarısı kadar DNA sayısı olacaktır. Kromozomlar DNA sentezinin hemen ardından normal mitotik hazırlık olarak iş üzerinde organize olurlar. Anne ve babadan gelen 23 kromozom (çift) sentromerden uzunlaşmasına ayrılır ve yavru kromatidler, zigotun hücreleri normal diploid sayıda kromozom ve DNA'ya sahip olarak karışık kutba doğru hareket sağlar. Yavru kromatidlerin bu hareketi sırasında, hücrenin yüzeyinden başlayarak zamanla derinleşip sitoplazmayı iki parçaya bölen derin bir yarık oluşur (10; 13).

4.4.3. Fertilizasyonun Temel Sonuçları:

1. Yarısı anneden, diğer yarısı da babadan gelen **kromozomların diploid sayısının restorasyonu**. Bu aktivite sonunda zigot yarısı annedene diyer yarısı ise babadan gelmiş olan dna materyaline sahip olmuş olur.

2. **Yeni bireyin cinsiyetinin belirlenmesi**. Cinsiyeti belirleyen baba faktörü zigotun oluşmasıyla beraber cinsiyeti belirlemiştir olur. Sperm x kromozomu taşıyorsa dişi, Y kromozomu taşıyor ise erkek olur.

3. **Yarıklanmanın (cleavage) başlatılması**. Döllenen oosit genellikle 24 saat içinde dejenere olur.

4.5. SEMEN ANALİZİ

Yapılan araştırmalarda ergenlik dönemini geçirmiş çiftlerden %15'inin fertilizasyon yeteneği olmadığı gösterilmiştir. Bu infertil çiftlerin fertilizasyon sebeplerine bakıldığında %30 oranında erkek faktöründen, %20 sinde ise erkek ve adına ait faktörlerden kaynaklandığı bildirilmiştir (Delilbaşı, 2008).

Erkek infertilite sebeplerini araştırılması için sperm analizinin rutin olarak yapılması ilke 1902 yılında Edward Martin tarafından ortaya atılmıştır. Ardından geçen 34 yıldan sonra 1956 yılında MacLeod sperm sayımı, motilite ve hareketin infertilite için önemini ortaya koymuş ve en sonunda 1980 yılında dünya sağlık örgütü WHO semen analizi için klavuz rehber çıkartarak semen analizi için standart teknikleri

belirlemiştir. 2010 yılında son revizasyondan sonra suanda kullanılan haliyle ile rehber kullanımdadır.

Semen analizi ejakülasyon ile erkekten atılan sıvının ve hücrelerin miktar kalite ve durumunun incelenmesi işlemidir. Semen, içinde spermleri ve salgı bezlerinin salgılarını içeren opak beyaz renkli yarı akışkan yoğun bir sıvıdır. Hemen ejakülasyon sonrasında semen izkoz haldedir. Ejakülasyondan 10-60 dakika sonra sperm daha akışkan bir hale gelir ve bu işleme likefaksiyon adı verilir. Likefiye olan semende spermler daha rahat hareket eder.

Masstürbasyon sonrası ejakülasyon olan ve bu sayede alınan semen örneği steril idrar kabına alınır. Kişisel bilgiler ad soyad ve tarih numunenin üzerine yazılır. Kişiye semen toplanması için gerekli yazılı ve sözlü bilgiler verilir. Kişinin kisesel bilgileri düzgünce kaydedilmeli. Ad soyad doğum tarihi yaşı perhiz gün sayısı yazılması unutulmamalıdır. Likefaksiyon işlemi 20 – 37 derece arasındai sıcaklıkta bekletilerek yapılmalı ve lkefiye olan semek örneği maksorkobik mikroskobik ve kimyasal olarak analiz edilir. Makroskopik analizde görünüm, viskozite, likefaksiyon zamanı, renk ve volüm değerlendirilir. Mikroskopik analizde sperm aglütinasyonu, konsantrasyonu, motilite ve sperm olmayan kücreler ölçeklenir. Kimyasal analizde PH (Power of Hydrogen) ölçümü yapılır (Delilbaşı, 2008).

4.5.1. Who Normal Spermiyogram Kriterleri

Tablo 4.5. WHO semen analizi için en düşük referans değerler

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	>7,2
Peroksidaz – pozitif lökosit (10^6 per ml)	<1,0
MAR testi (%)	<50
Immunobead testi (%)	<50
Seminal çinko (μ mol/ejakulat)	>2,4
Seminal fruktoz (μ mol/ejakulat)	>13
Seminal nötral glukozidas (mU/ejakulat)	>20

4.5.2. Sperm Morfoloji Değerlendirmesi

4.5.2.1 Spermatogenik seri hücreler ve spermatogenezis

Spermatogenik seri hücreleri seminifer tübüllerde fonksiyonel yapılardır. Spermatogenezis evrelerinde, farklı morfolojik görünümler aldıkları için spermatogonium, primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatid ve spermatozoon (sperm) gibi hücreler, bazal lamina ile lümen arasında yerleşik 4-8 tabaka halinde bulunmaktadır. Spermatogoniumların üç tipi bulunmaktadır (17, 18).

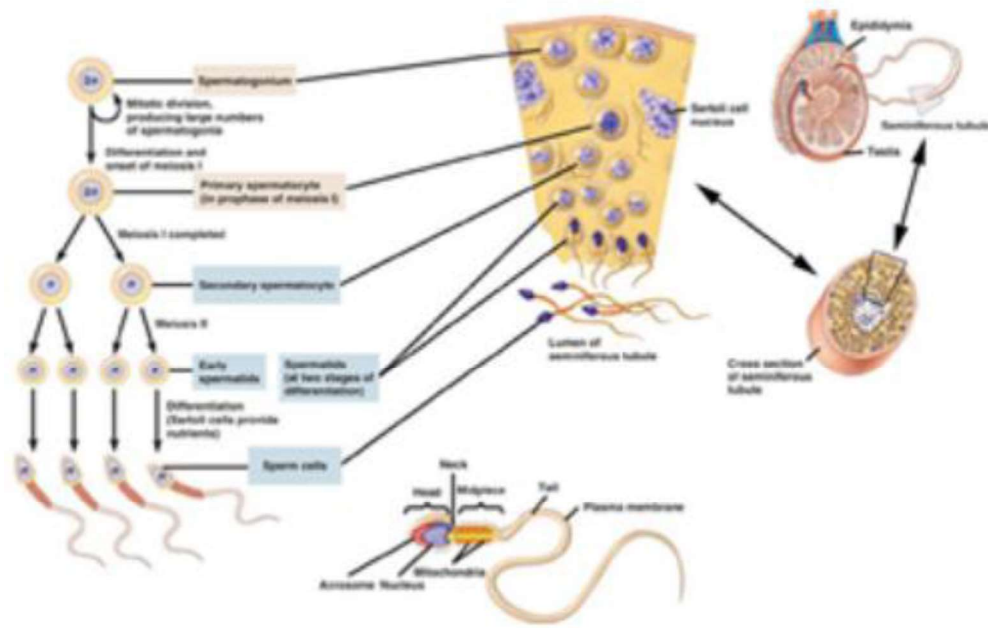
Koyu A tipi spermatogoniumlar: Kubbe şeklindeki, seminifer epitelin kök hücreleri olan koyu A tipi spermatogoniumlar, mitoz ile bölünerek hem koyu hem de açık A tipi spermatogoniumları oluşturmaktadırlar.

Açık A tipi spermatogoniumlar: Ökromatik belirgin nükleus, az miktarda Golgi kompleksi ve granüllü endoplazmik retikulum ve ribozomlara sahip olan bu hücreler testosteron etkisiyle mitozla bölünmeye girerek B tipi spermatogoniumları oluştururlar.

B tipi spermatogoniumlar: Küre şeklinde merkezi nükleusa sahip olan bu hücreler, primer spermatositleri oluştururlar.

Anormal morfolojiye sahip olan spermmler, anormalitenin nerede bulunduğuna bağlı olarak, baş, orta parça ve kuyruk anomalisi şeklinde gruplandırılır. Spermatogenik serinin en büyük hücreleri olan Primer spermatositler meydana gelmesinden sonra adlüminal kompartmana göç eder ve 22.gün sonunda sekonder spermatidlere farklılaşırlar. Hızlı bir interfaz aşaması ve belirgin bir DNA sentezi olmayan hücre bölünmesi ile sekonder spermatositler, spermatidleri meydana getirirler (11).

Spermatidler yaklaşık olarak 7-8 μm çapında, minik, yuvarlak şekilli ve haploid olan hücreler yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içeren nükleusları ile ayırt edilirler (Resim 8).



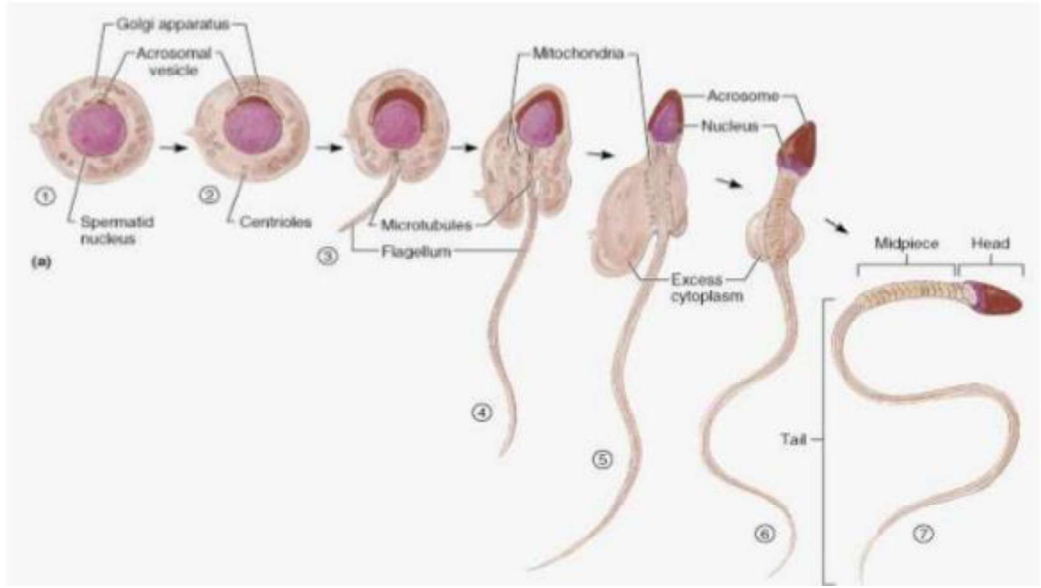
Resim4.3.8: Spermatogenik seri hücrelerinin şematik gösterimi (univercty of miami, 2021)

Spermatositogenezisde, kök hücre olarak görev yapan A tipi spermatogoniumlar seri mitoz bölünmeler ile hem kendi yerlerine geçecek hücreleri hem de primer spermatositlere farklılaşması sonucunda olan hücre popülasyonlarını oluştururlar. Mitoz bölünmeler ile oluşan B tipi spermatogoniumlar mitotik devam ederek primer spermatositleri oluştururlar ve bu aşamada spermatogenezis sona ermiş olur (Hess & De Franca, 2009; Wang & Cheng, 2007). Ratlarda ise primer spermatositler açık A

tipi spermatogonium 6 mitotik bölünme geçirdikten sonra büyüme evresine girerek oluşmaktadır (Hess & De Franca, 2009).

Mayoz bölünmede primer spermatositler kan testis bariyerinin adluminal kompartmanında I. mayoz bölünme ile sekonder spermatositlere dönüşürler. Birinci mayozun profazı insanda çok uzundur ve 24 güne kadar uzayabilir. Her primer spermatosit iki sekonder spermatositi oluşturmak üzere profazın sonunda bölünür. Replikasyon sonucunda kromozomlar, sentromerlerinden birbirine bağlı iki kromatid içermektedir. Her kromozom çifti ayrılır ve 23 kromozomdan oluşan iki grup oluşturur ve sekonder spermatositler çok kısa interfaz ve profazı olan II. mayoz bölünmeye girer. Kromozomlar II. mayozun metafazında sentromerlerinden bölünerek 23 kromozomdan oluşan iki adet kromozom meydana gelir. Bu kromozomlaranafazda, oluşacak olan spermatidlere rastgele dağıtılır. Telofaz safhasında ise haploid sayıda kromozoma sahip 2 spermatid meydana gelir (Resim 9).

II. mayoz bölünme sonucunda da sekonder spermatositler, haploid kromozom içeren spermatidleri oluştururlar (Kierszenbaum, 2006; Hess & De Franca, 2009).

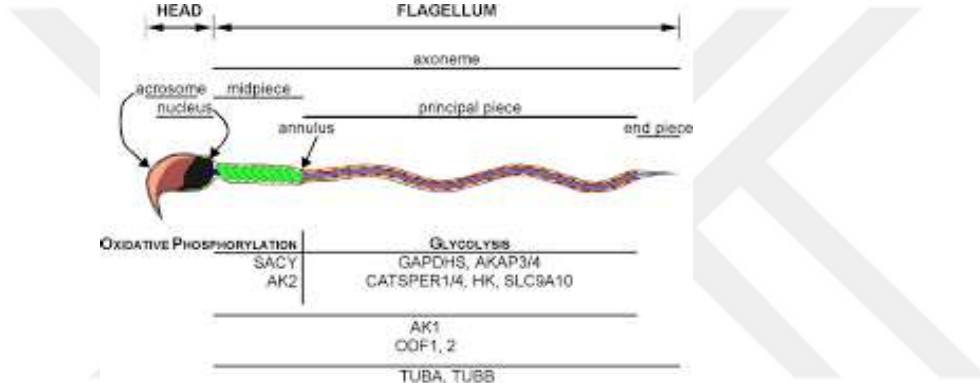


Resim 4.3.9 Spermiasyon sırasında yapısal farklılaşma (Kapoor, 2021).

Spermiasyon evresinde spermatidler lümene salınır ve bu sıradaspermatozoanın sertoli hücresi ile ilişkisi ortadan kaybolmuş olur ve spermatid serbest bir form olarak spermatozoon adı verilir (Resim 10). Peritübüler myoid hücrelerin kasılması ile seminifer tübülün lümenine doğru ilerletilirler (Kierszenbaum, 2006; Erdoğan, Hatiboğlu, Görgün, & Ilgaz, 1996).

Olgun spermatozoonlar, baş ve kuyruktan oluşan 60-65 µm uzunluğundadır. Baş kısımları yassı ve yoğun bir nükleus ile hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve akrozin olarak adlandırılan tripsin benzeri proteaz gibi hidrolitik enzimleri sahiptir. Sıçanlarda ise insanlardan görüntü daha farklıdır. Sçandaki form çengel şeklindedir (Resim 11).

Olgun spermatozoonların kuyruk kısmı; boyun, orta parça, esas parça ve son olacak şekilde bölümlere ayrılır. Boyun kısmı sentriyolleri içerirken, orta parça mitokondrileri içermektedir ve kuyruğun hareketi için enerji sağladıkları için spermatozoonun hareketinden sorumludurlar. Esas parça kalın aksonemin dışındaki fibröz kılıfı içerir ve son parça yalnızca aksonemi içermektedir (Darszon, Nishigaki, Beltran, & Treviño, 2011).



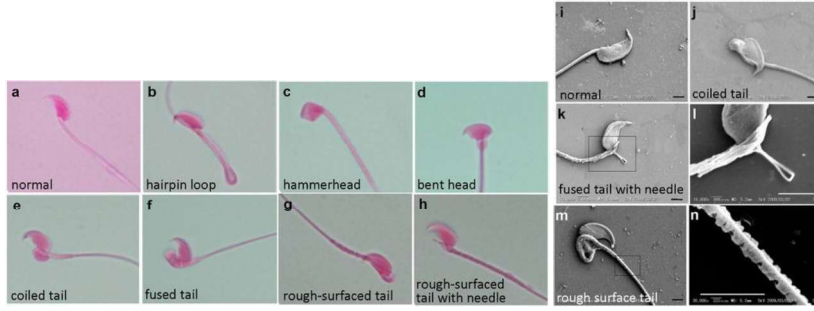
Resim2.3.10: Rodent spermatozoonu (Buffone, Ijiri, Cao, & Merdiushev, 2012)

Spermatozoonlar tübülün lümenine geldiğinde hareket yeteneği henüz yoktur. Testis içi kanallardan geçerek ductus efferente ve daha sonra ductus epididimisin proksimalin ulaşır ve hareket yeteneği kazanırlar. Spermatozoonlar, ductus epididimide bazı değişimler geçirerek olgunlaşırlar. Bu değişimler şunlardır (10; 13; 24):

- Nükleus içerik yoğunlaşmasından dolayı baş kısmı hacmen azalır.
- İçeriğin azalmasıyla birlikte hücre hacmen küçülür.
- Glikozilasyon ile plazma membranında değişimler,
- Fertilizasyon yeteneğinin inhibe edilmesi için yüzey-ilişkili dekapasitasyon fonksiyonunun dış akrozomal membrana eklenmesi.

Spermatozoa DNA anomalileri ve organellerin yanlış konumlanması baş bölgesinde anomalileredenen olmaktadır. Sentrozom kompleksi ile ilgili sorunlar da orta bölgedekimorfolojik anormalliklere neden olmaktadır. Aksonem kompleksiile

ilgili sorunlar da kuyrukta meydana gelen morfolojik bozukluklara ve sperm motilitesinin düşmesine ya da yok olmasına neden olmaktadır (24, 25, 26).



Resim 4.3.11 Sıçanlarda başlıca spermatozoon şekil anomalileri (Takeda, Yoshinaga, Furushima, Takamune, & Li, 2016)

4.6. SPERM KRİYOPREZERVASYONU

Kriyoprezervasyon; Hücre veya doku gruplarının tüm biyolojik aktivitelerinin 0 derecenin altındaki sıcaklıklarda tutularak durulup. İleri tarihlerde kullanılması için saklanması olayına verilen addır. Kriyoprezervasyon sperm için kullanıldığında uygun krioprotektan kullanıldığında spermeler sıvı azot içerisinde -196 °C de yıllarca saklanabilir.

Yılan deneylerde sıçan sperm kriyoprezervasyonu insan protokollerine benzer şekiller yapılabilir (Hess & De Franca, 2009; Aydın, Berber, & Cevahir, 2019). Sperm dondurmak için ana dört temel adım vardır. Bunlar; ısı azalması, hücresel dehidrasyon, dondurma ve çözündürme.

4.6.1. Ne Zaman Kriyoprezervasyon?

Günümüzdeki güncel tüp bebek yönetmeliği kurallarına göre

- Kemoterapi ve radyoterapi gibi sperm hücrelerine zarar verebilecek ajanlar barındıran tedaviler öncesinde
- Üreme yeteneğinin kaybetmeye yol açacak operasyonlar öncesinde
- Sperm eldesinin cerrahi ollu olduğu durumlarda
- Çok yüksek düzeyde sperm azlığı durumunda ilerde hiç sperm olmaması riskini tolere etmek amacıyla yapılabilir.

Yine ilgili yönetmeliğin maddesine dayanarak. Dişi ya da erkek üreme hücresine adit dna analizi ile saklanır.

4.6.2. Sperm Kriyoprezervasyon Talimatı

Protokoller arasında farklılık göstermek ile yıkanıp hazırlıkları yapılan sperm steril kriyotüplere veya viallere alınarak 10 dakika süreyle ve gayet yavaş şekilde ½ oranında krioprotektan ile karıştırılır. Ve sonrasında sterilazyonu bozulmaması için kapağı sıkı bir şekilde kapatılır. Kriyotüpler bir süre sıvı nitrojenin buharına maruz bırakılır. Yeteri kadar bekletilen kriyotüpler azot tankının içine daldırılır ve kriyotüpün yüzünün en az 5 cm geçmiş şekilde olması gerektiğine dikkat edilerek şekilde yerleştirilir.

4.6.3. Sperm Dondurmada Olası Hasarlar

Kriyoprezervasyon işlemiyle kullanılabilir sperm saklama yöntemi olmasına rağmen spermleri fiziksel ve kimyasal yönden olumsuz etkilediği bilinmektedir. Bu hasar sperm membran lipid yağsını, sperm hareketliliğini, canlılığı ve akrozom hareketliliğini olumsuz etkileyebilir. Spermin yaşadığı bu olumsuz değişiklikler fertilizasyonu olumsuz yönde etkileyebilir. Krioprezervasyon sırasında ani ısı şoku, hücre içi buz kristalleri oluşumu, hücresel dehidrasyon oluşumu, tuz yoğunluğundaki artış, oksidatif stres ve ozmotik şok gibi hasarlar oluşabilir ve spermi olumsuz yönde etkileyebilir (Wetzels, Bras, Lens, Piederiet, & Rijnders, 1996). Krioprezervasyon sırasındaki protokollerde öncelikli hedef hücrelerin oluşabilecek olumsuz etkilerden hücreleri korumaktır.

Motilite açısından inceleyecek olursak, sperm dondurma protokolüne ve kullanılan kimyasalların yapısına bağlı olarak sperm canlılığında %31-50'ye azalma bilinen bir gerçektir. Bununla ilişkili yapılan çalışmada sperm sayısı 10 milyonun üstünde olan 56 hasta için yapılan krioprezervasyon işlemi sonrasında sperm canlılığının %66 azaldığı ve *Kruger* morfolojinin motilite azalması ile yakından ilişkili olduğu belirtilmiştir (Delilbaşı, 2008). Bonetti ve arkadaşları hem kanser hastaları hem de sağlıklı hastalar için çözünme işlemi sonrası spermlerdeki ortalama viabilite oranının %30'dan düşük olarak rapor etmiştir (Bunge & Sherman, 1953). Dondurup çözme işleminde ne kadar süre donarak beklediğinin sperm parametreleri açısından bir farklılık olmadığı ortaya çıkmıştır (Delilbaşı, 2008). Sperm saklama süresi yerine dondurup çözme işleminde hücrenin maruz olduğu hasarın düzeyi önemlidir.

Sperm dondurma protokollerinin sperm DNA'sına hasar verip vermediği hala araştırma konusudur. Di Santo ve arkadaşlarının (33) yapmış olduğu sperm DNA

hasarının üzerine yapılan çalışmalar sonucunda 3 adet sonuç bulunmuştur. Araştırmaların pek çoğu sperm dondurma işleminin DNA hasarına neden olduğunu savunurken (Ma, An, Wu, & Wang, Coating biomimetic nanoparticles with chimeric antigen receptor T cell-membrane provides high specificity for hepatocellular carcinoma photothermal therapy treatment, 2020), Başka çalışmalar ise DNA hasarına nedne olan ve krioprezervasyona eşlik eden faktörlerin neden olduğunu savunmuşlardır. Başka araştırmalar ise Krioprezervasyonun sperm DNA'sında bi hasara neden olmadığını savunmaktadır (Delilbaşı, 2008; Ma, An, Wu, & Wang, Coating biomimetic nanoparticles with chimeric antigen receptor T cell-membrane provides high specificity for hepatocellular carcinoma photothermal therapy treatment, 2020). Bunlara ek olarak sperm DNA'sında oluşan hasarın kullanılan krioprezervasyon protokolüyle ilgili değil, numune olarak alınan taze spermin DNA fragmentasyonu ile ilişkili olduğu gösteren sonuçlar da bulunmaktadır. Sonuçların varyasyon göstermelerin sebebi sperm örneklerinin farklı olduğundan düşünülebilir, Dondurma için kullanılan sperm hazırlama protokol farklılığı, kullanılan teknik farklılığı ya da DNA fragmentasyon analiz farklılığı ile ilişkili olabilir (Tunç. & Bozkırlı, 2013).

Çalışmaların birçoğu kriyoprezervasyon tekniginin DNA fragmentasyonuna bir etkisi olmadığını savunmaktadır. Bazı çalışmalar, Krioprezervasyon işlemiyle beraber defekti olan spermelerin ortadan kaldırılarak bu işlemde sadece sağlıklı spermelerin yaşar şekilde çıktığını savunur. Genel kanı ise olarak literetürde kriyoprezervasyon işlemi ile genetik materyale doğrudan zarar veren olduğuna dair kuvvetli bulgu bulunmamaktadır (Sawyer, Mercer, Wiklendt, & Aitken, 2003; Sorahan, McKinney, Mann, & Lancashire, 2001).

Bazı araştırmaları incelersek; İnfertil 25 erkek bireyle yapılan kriyoprezervasyon çalışmasıyla spermlerdeki DNA fragmentasyonunun arttığı gözlenmiştir. Yine yapılan diğer çalışmalar, sperm DNA'sında oluşan hasarın oksidatif stres artışıyla etkili olabileceğini savunuyor. Dondurma çözme işlemi sırasında oluşan serbest radikaller plazma membran lipid yapısını bozarark motiliteye neden olabilir. Endikasyon bağımlı spermeler dondurulup saklansada, spermelerin daha sonradan kullanım oranı %3,7-14,8 kadardır (Thomson, Fleming, & Aitken, 2009).

4.7 SEMEN HAZIRLAMA PROTOKOLLERİ

İnsan spermlerinin in vitro koşullardaki fertilizasyon yeteneği, semen içerisindeki enzimler ve sperm hücresi testis dokusundan izole ediliyorsa, in vivo koşullar ile doğru orantılıdır. Koitus sonrası rahme bırakılan spermeler uterin sıvıda süzülerek en başarılı sperm ileri yönlü gider ve seminifer tubulus e uzanır. İn vitro koşullarda ise bu süreç benzeri sperm hazırlama prosedürü vardır (Delilbaşı, 2008).

Bu protokoller içerisinde en sık kullanılanlar **yıkama, hareketli sperm izolasyonu (swim-up, swim-down), gradient uygulamaları (cam yününden filtrasyon) yöntemleridir** (Shekarriz, DeWire, Thomas Jr, & Agarwal, 1995).

Kullanılan tüm yöntemlerin ortak amacı semenden istenmeyen maddelerin uzaklaştırılması esasına dayanmaktadır ve sonuç olarak fertilizasyon yeteneği en iyi olan spermelerin ayırt edilmesi. Sperm hücrelerinin inseminasyon için hazırlanması sırasında mümkün olduğunca az hasar görmesi gerektiğinden in vivo koşullara yakın özellikteki ortama alınması gerekmektedir. Kültür ortamlarının temelini Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) gibi tuz solüsyonları oluşturmaktadır. Sperm için hazırlanan ortamlar laboratuvar ortamında uzun süre açıkta kalacağından hepes tampon çözelti kullanılması tavsiye edilir.

Dilüsyon, santrifüj hızı ve süresi ve ısı değişiklikleri hazırlama protokollerinin başarısını etkileyeceğinden vasatların içeriğindeki protein bileşimi nedeniyle dilüsyonu yavaş yapılmalıdır. Hazırlama protokolünde en dikkat edilmesi gereken husus santrifüj aşamasıdır. Bu aşamada semen içerisinde bulunan ölü hücreler ve debris, ayrıca santrifüj işleminin kendisi **reaktif oksijen radikallerinin (ROS)** açığa çıkartan ve spermi mekanik hasar veren bir işlemdir. WHO'nun 1999 yılındaki son düzeltmelerinde normal sperm sınır değerleri; sayı: $20 \times 10^6/\text{ml}$, motilite: %30, Net tayin kriteri: %15 olarak değerlendirilmiştir. Sperm hazırlama protokolünün kullanılması için bu değerlerde olan vasatın kullanılması uygundur ancak; Yardımcı Üreme Teknikleri laboratuvarlarında asıl problem bu örneklemelere uymayan vakalarda normal morfoloji ve motiliteye sahip spermelerin seçiminin sağlanmasıdır. Semen analizinde azospermi görülen olgularda Testisten yapılan aspirasyon ya da biyopsi (TESE) de laboratuvarda incelenir ve sperm hücreleri varsa bulunup ayrıştırılarak IVF, ICSI için hazırlanır. Yapılacak olan incelemede sperm ve oositin dikkatlice incelenmesi ve ona göre bir protokol seçilmesi embriyolog kararındadır (Shirota, Yotsumoto, Itoh, & Obama, 2016; Delilbaşı, 2008).

4.8. EJEKULATTAN SPERM HAZIRLAMA YÖNTEMLERİ:

Yıkama yüzdürme ve gradient uygulamalarında bu üç teknik bazı olgularda tek başlarına, bazı olgularda birlikte kullanılır ve başarılı sonuçlar alınır. Sperm hazırlama tekniklerinin belirlenmesi ml'deki sperm sayısı, % motilite, % normal morfoloji, motil spermin total sayısı ve sperm dışı hücreler gibi faktörlere bağlıdır.

4.8.1. Yıkama

Spermilerin hücrelerin mumkun merteye küçük hacimlerde toplanması için koni şeklinde falconlar kullanılır ve ejakulat 1/2 hacim oranında kültür vasatı ile sulandırılır. Ancak yıkama medyumun fazlası diye bir kavram yoktur. 1000 rpm' de 5 dak santrifüj edildikten sonra, dipte kalan pelet bozulmayacak şekilde üstteki sıvı yavaşça pipetle alınır. Pelet üzerine 3 ml kültür vasatı konur ve pelet ile yavaşça karıştırılarak tekrar santrifüj edilir. Santrifüj sonrası üst kısım pipet ile atılır ve tüpün dibinde kalan pelet 0.5 ml kültür vasatı ile sulandırılır (Delilbaşı, 2008).

4.8.2. Yüzdürme

Swim-up yöntemi, yıkama ile elde edilen total motil sperm sayısının belirlenmesi ve tüm hücreler içerisinden inseminasyon ya da mikroenjeksiyon için gerekli olan motil ve morfolojik olarak normal spermilerin izole edilmesidir. İşlemden yıkama sonucu elde edilen örneğe kültür vasatı sızdırılarak iki ayrı katman elde edilmelidir. Alt ve üst katmanlar birbirine kesinlikle karışmamalıdır (Delilbaşı, 2008).

Örnekler kaplarından her örneğin numarasına göre numaralandırılmış 14 ml hacimli konik dipli tüplere alınır, volümleri ölçülür ve kaydedilir. Üzerlerine volümün 2 katı kadar besiyeri eklenir. 1000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilir. Dibe çöken pelletin üzerindeki kültür vasatı, yavaşça pipet ile uzaklaştırılır. Her bir tüpe sabit olarak 2 ml besiyeri eklenir. Tüpler tekrar 1000 rpm'de 5 dakika santrifüje alınır. Üst faz, tüpleri fazla sarsmadan alınır. Her bir tüpte 0.5 ml kültür vasatı yavaş bir şekilde sızdırılır. İstenilen kalitedeki spermilerin yukarıya yüzebilmeleri için ortamın daha uygun olması açısından 45° eğim sağlanarak 37° C 'de 1 saat inkübe edilir. 1 saat sonunda hareket

yeteneği fazla olan spermiler pipet ile üst kısımlardan çekilir ve maklerde sayım yapılır. (Sonuç sperm sayısı x volümdür.) Swim-up sonucu kaydedilir (Delilbaşı, 2008).

Eğer örnek aynı gün herhangi bir işlem için kullanılacaksa %5 CO₂ inkübatörde bir saat bekletilmelidir. Bir saat sonunda örneğın kullanılacak olan üst kısmı, alttaki pelete değmeden pipetle çekilir ve steril bir tüpe aktarım yapılır. Bu işlem sonrasında azospermi vakalarına pipetaj ve lam-lamel ile bakılarak dipte ve elde edilen yaymada sperm araması yapılır.

Yüzdürme protokollerinden bir diğeri de **swim-down**'dur. Konik tüpler içeresine konulan 1 ml kültür vasatı üzerine semen örneği katmanlandırılıp inkübe edilir ve dipteki sıvının 3/4 'ü alınarak sayım yapılır ve inseminasyon için kullanılır.

Total motil sperm sayısı çok düşük ve/veya morfolojinin %5'in altında olduğu olgularda yüzdürme yöntemlerinin başarısı kısıtlıdır. Bu nedenle özellikle ICSI uygulanacak vakalarda yıkama sonrası elde edilen sperm hücrelerini içeren pelet 0.3 ml kültür vasatı ile dilüe edildikten sonra ufak petri kaplarının ortasına yerleştirilir. Kenarlara koyulacak 20 ml temiz kültür sıvılarından uzantılar hazırlanır ve kültür kabı parafın yağı ile kapatılarak %5'lik CO₂ inkübatörüne yerleştirilir. 1 saatlik inkübasyon sonrasında temiz sıvılara doğru yüzen spermiler, ince çekilmiş pasteur pipeti ya da ICSI pipetleri ile toplanarak inseminasyon için kullanılır (Delilbaşı, 2008; Simon, Zini, Dyachenko, Ciampi, & Carrell, 2017).

4.8.3. Gradient Uygulamaları

En çok tercih edilen yöntemdir. Teknik kısaca; Percoll, albumin, Nycodenz, Ficoll ve süktroz polimerleri gibi malzemelerle gradientler oluşturup spermilerin santrifüj sonrası sıvı kolonlarda süzdürme işlemidir (Xue, Wang, Shi, Zhang, & Zhao, 2014).

Kollodial silika partikülleri içeren solüsyonlar kullanılarak uygulanan bir yöntemdir. Sperm hücreleri santrifüj ile bu sıvılar içeresinden süzdürülür. Gradient uygulamalarında iki katman kullanılır. Bu uygulamada fonksiyonel olan spermiler daha yoğun yapıya sahip olduklarından dibe çökeceklerdir dolayısıyla alt katmanın konsantrasyonu yüksek tutulmalıdır. Uygulamalarda genellikle %90 gradient konsantrasyonu tercih edilir. Steril 14 ml konik dipli tüpe yüksek konsantrasyonda 1 ml solüsyon koyulur. Üzerine yine aynı miktarda fakat daha az konsantrasyonda solüsyon tüp kenarından yavaşça aktararak eklenir ve tabakalar oluşturulur. En fazla 2 ml olmak üzere semen eklenerek 20 dakika santrifüj edilir. Üst faz alınır, bu esnada

dipteki pelete dokunmamaya dikkat edilmelidir. Dipte kalan semen 3 ml besi vasatı ile yıkanır. Yıkamadaki amaç; silika partiküllerinin uzaklaştırılmasını sağlamaktır. Bu işlemlerde plazma volümünün uterusu verilebilecek miktara kadar azaltılması sağlanır (Delilbaşı, 2008; Xue, Wang, Shi, Zhang, & Zhao, 2014).

4.9. MEZENKİMAL KÖK HÜCRE (MKH)

4.9.1.MKH İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Hücre bölünmesi sırasında kendisini yenileyebilen vefarklı hücre tiplerine dönüşebilen hücrelere "kök hücre" denir. Aldıkları sinyale göre farklı hücre türlerine dönüşürler. Hücre çekirdeğindeki genler, bir kök hücrenin hangi hücreye dönüşeceğini belirler. Kök hücreler, diğer hücreler ölünce veya hasar görünce, hangi hücre türüne ihtiyaç varsa o hücreye dönüşerek ölen hücrenin yerini alırlar. Bu işlem esnasında ilgili genler daha aktif hale gelirken, bazıları da baskılanır. Diğer hücre çeşitleri için kendisini yenileme gücüne sahip olan kök hücreler tükenmez bir kaynak görevi görür. Kök hücre ilk olarak insan embriyosundan 1998 yılında elde edilip hücre kültüründe çoğaltılmasından sonra kök hücre araştırmaları hızla devam etmiştir (Özdal-Kurt, Şen , Tuğlu, Vatansever, & Türk, 2016).

Vücutta apoptotik hücrelerin veya organların yerini doldurmak üzere laboratuarda kök hücrelerinden yeni hücreler, hatta son çalışmalara göre yeni bir organ elde edilebilmektedir. Ancak hücrelerin sinyalizasyonunu, genetik şifresini ve kontrol mekanizmalarını çok iyi bilmek gerekir. Kromozomların ucunda bulunan ve "telomer" denilen tekrarlayan DNA zincirleri, hücrelerin bölünme kapasitesini belirleyen faktörlerden biridir. Telomeraz enzimi bu zincirlerin uzun kalmasını sağlar ve ne kadar aktifse telomer uzunluğu da o kadar korunabilir. Kök hücreler bu konuda oldukça kullanışlıdır çünkü çok aktif telomeraz enzim faaliyeti ve bundan dolayı uzun telomer zinciri vardır. Böylece kök hücreler çok uzun süreler ile bölünerek kendilerini kopyalayabilirler (Özdal-Kurt, Şen , Tuğlu, Vatansever, & Türk, 2016; Özdal-Kurt, Tuğlu, Vatansever, & Tong, 2015).

Kök hücreler; totipotent, pluripotent ve unipotent olarak 3 grupta incelenirler. Totipotent kök hücreler sınırsız farklılaşma ve farklı yönlere gidebilme özelliğindeki kök hücrelerdir. Embriyo, organlar ve embriyo sonrası tüm doku ile embriyo dışı

membranların ve organların kaynağını oluşturan kök hücre türleri olarak tanımlanırlar Organizmadaki birçok dokunun oluşmasına kaynak oluşturan kök hücreler Pluripotent kök hücrelerdir. Tek bir yönde farklılaşmak üzere programlanmış hücreler Unipotent kök hücrelerdir. Kan hücrelerine dönüşebilen göbek kordonunda, periferik kanda ve kemik iliğinde bulunan, belli özel yöntemlerle ve belli büyüme faktörlerinin yardımı ile çoğaltılan kök hücreler Hematopoetik Kök Hücre'dir. Bütün memelilerdeki tahminen kök hücre sayısının 2×10^4 olduğu bildirilmiştir. Hematopoetik Kök Hücre'lerin küçük bir kısmı siklusa girer ve günlük 4×10^{11} olgun kan hücresi üretimini sağlar. Yapılan çalışmalar irradiye edilmiş hayvanlarda retroviral belirteçler kullanılarak Hematopoetik Kök Hücre'lerin intravenöz transplantasyonunda kanda görülme zamanlamalarına göre yeniden çoğalan hücreler olarak ayrıldığını göstermiştir. Ancak diğer deneysel yaklaşımlar Hematopoetik Kök Hücre'lerin heterojen bir grup olduğunu da saptamış ve periferik kanda düşük düzeyde bulunduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca kemoterapi sonrası iyileşme döneminde ya da hematopoetik büyüme faktörlerinin uygulanmasında dolaşan kök hücrelerde 1000 kat artış olduğunun gözlemlenmesi önemli gelişme sağlamıştır. Kök hücrelere özgü belirteçlerden periferik kan kök hücrelerinin belirteçleri; CD34+/CD38-, Thy-1+'dır ve miyeloid veya lenfoid serilere özgü belirteçleri eksprese etmezler (Brock, 2006).

Doğru indüklemeler ve çalışmalar yapıldığında embriyonik ve yetişkin kök hücreler hasarlı hücrelerin yerini alma potansiyali olan varsa iyileştirmeye teşvik eden hücrelerdir. Günümüzde kök hücreler ilgili çalışmalar devam ede dursun embrionik ve mezenkimal kök hücrelerin iyileştirici etkileriyle ilgi literetüre eklenen yeni bilgiler heyecan vericidir. Fakat embriyonik kök hücre ve mezenkimal kök hücrelerin yararlarının bu kadar geniş bir alana yayılması ve çalışmaların artması tabii ki arkasından çeşitli yasal düzenlemelerin gerekliliğini doğurmuşturEn çok tartışılan konu ise embriyonik kök hücrenin kullanımının çerçevesinin hangi sınır da kalması gerektiğidir. Kök hücre temelli tedavilere geçilebilmesi için güvenilirliğinin doğrulanması ve yararlılığının gösterilmesi yönünde çalışmaların yapılması gerekmektedir (Barry & Murphy, 2004).

4.9.2.MKH Biyolojisi ve Fonksiyonu

Kemik iliği farklı hücrelere dönüşebilen çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan hematopoietik hücreleri ve mezenşimal kök hücreleri barındırmaktadır. Dolaşımdaki

hücrelerin kökeni kemik iliğidir. Kemik yıkımında rol oynayan osteoklast hücreleri de hematopoietik gruptan köken alır. MKH, kemik iliğinin mezenşimalden köken alan hücreleridir ve yetişkin kök hücreler olarak ayrılır. Farklılaşmadan hızlı bir şekilde bölünebilen hücrelerdir ve bu özellikleri sayesinde kemik, kıkırdak, kan, tendon, adipoz dokuyu oluşturabilme yeteneğine sahiptirler. Belirli dönem ve belirli belirteçlerin uyarması ile kültürlerde kemik iliği mezenşimal hücrelerinin adipositlere dönüştükleri gözlenmiştir. Adipositlerin de kültür ortamında yağ depolama özelliklerini kaybedip, osteoblastlara da dönüşebildikleri saptanmıştır. Büyüme faktörleri, ekstraselüler matriks ilişkisi, hücre hücre etkileşimi ve hücre içi kinetiklerin organizasyonu MKH'nın farklılaşmasını etkileyen faktörler arasındadır. Buradaki adezyon molekülleri ve onların reseptörleri hücreler arasında fiziksel bir ilişkinin oluşmasını gerçekleştirmektedir. Hasar sonrasındaki yara iyileşmesinde kök hücre çoğalma ve farklılaşma yeteneklerini kullanarak orijinal hücreye dönmekte ve tedaviyi çok daha etkin ve hızlı bir biçimde gerçekleştirmektedir. Bu hücreler CD14, CD34, CD45 ve integrinlerden alfa-1, alfa-5 ve beta-1'i tanımlamaktadırlar (Özdal-Kurt, Shariati-Sarabi, Tavakkol-Afshari, & Mohammadi, 2020).

Çağımızda insan kaybına yol açan öncemli kronik rahatsızlıklar arasında kanser ve organ yetmezlikleri gelir. Bu hastalıkların mikro olarak kişilere makro olarak da devlet açtığı ekonoimik sorunlar ve kişinin ve yakın çevresindekilerin psikolojik sorunları eklenince büyük toplumsal sorunlar olarak karşımıza çıkar. Çağımızın büyük sorunu haline gelen organ yetmezlikleri ve kanserler tam olarak tedavi edildiğinde kişinin ömür uzamasına yol açacağı bilinen bir gerçektir. Doğrudan ölüme yol açmasada yaşam kalitesini düşüren hastalıklardan olan Parkinson ve alzheimer gibi hastalıklar da sinir sistemi ve beyin ile alakalıdır. Bu hastalıklarda görevini yapamayan veya ölen sinir hücreleri kendilerini yenileyemezler. Kök hücreler kullanılarak cerrahi müdahaleye gerek kalmadan, o organdaki hastalıklı veya ölü hücrelerin sağlıklı hücreler haline gelmesi mümkün olacaktır. Örneğin kök hücre nakli ile kalp krizi geçiren ve kalp kaslarının büyük kısmını kaybeden hastalarda, kök hücrelerden üretilen kalp kası hücreleri nakledilebilecektir. Cerrahi müdahaleye gerek kalmadan damardan enjekte edilerek verilen bu hücreler kalbe ulaşarak hastalıklı veya ölü hücrelerin yerini alabilecektir. Aynı şekilde böbrek veya karaciğer hastalarında da kullanılabilecektir. Kök hücrelerden elde edilen sağlıklı sinir hücreleri beyne yollandığında hastalıklı hücrelerin görevini üstlenebilmektedir. Kök hücre hakkında yapılan son çalışmalar plastisite denilen geniş bir farklılaşma potansiyelinin hem

pluripotent embriyonik hücreler hem de kemik iliği stromal kök hücreleri (KİSKH) için var olduğunu göstermiştir. Kök hücrenin biyolojik özelliklerini incelemek için kullanılan kültür ortamlarının matriks molekülleri, büyüme faktörleri, sitokinler ve diğer farklılaşmayı etkileyen faktörlerin incelenmesinde büyük kolaylık sağladığı bilinmektedir (Özdal-Kurt, Tuğlu, Vatansever, & Tong, 2015; Eren, Zırh, & Zeybek, 2020; Ghoryani, Shariati-Sarabi, Tavakkol-Afshari, & Mohammadi, 2020; Rinaldi, Micali, Marini, & Adamo, 2017)

4.10. AMAÇ

Sperm kriyoprezervasyon erkek fertilitésinin korunması için etkili bir prosedürdür (Ferrari, Paffoni, Reschini, Noli, & Dallagiovanna, 2020). Bununla birlikte, sperm kriyoprezervasyonunun amaçları, insanlar kadar, yüksek genetik değere sahip bireylerin doğurganlığının korunması hastalık veya ani ölüm nedeniyle yok olma tehlikesiyle karşı karşıya olan ırkların devamı da dahil olmak üzere spermleri uzun süre saklamak nedeniyle kullanımıdır. Bu konuda hala istenilen sonuçlar elde edilmemiş olup deneysel modeller arasında farklılık göstermektedir (Ehmcke & Schlatt, 2008; Setyawan, Kim, Oh, & Kim, 2015). Kriyoprezervasyon prosedürü sperimde bozulmuş motilite, azalmış canlılık, hasarlı plazma ve mitokondriyal membranlar, moleküler değişikliklerin başlaması ve bozulmuş üreme potansiyeli gibi birtakım hasarlara neden olabilir (Nijs & Ombelet, 2001; Paasch, Sharma, Gupta, & Grunewald, 2004).

Mezenkimal kök hücrelerin (MKH) rejeneratif tıbbın ayrılmaz bir parçası olduğuna inanılmaktadır. Son zamanlarda, araştırma hücresel düzeyde onarım mekanizmalarında potansiyel rolünü vurgulamıştır. Hasarlı dokunun onarımı MKH'lerin çok yönlü doğası ve farklı proteinler, özellikle proteinler salgılanmasını içeren ilişkili parakrin mekanizmaları tarafından yönetildiğine inanılmaktadır. Bu proteinler bağışıklık yanıtı modüle ve mitoz ve anjiyogenez teşviî ve aynı zamanda apoptoz baskı ve rejenerasyon mekanizmalarını kolaylaştırır. Bunlar arasında temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), keratinosit büyüme faktörü (KGF), stromal -türevli faktör-1 (SDF-1), monosit kemotaktik protein-1 (MCP- 1), insülin-büyüme faktörü- 1 (IGF- 1), dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β), trombosit- türevli büyüme faktörü (PDGF), interlökin- 8 (IL- 8) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) vardır. Buna ek olarak, apoptoz ve oksidatif stres azalması ile birlikte MKH nin

farklılaşma potansiyelini artırır. İndirgenmiş oksidatif stres, reaktif oksijen türleri, nitrik oksit, tiyobarbitürik asit reaktif maddeler, karbonil ve lipofusin üretim düzeylerindeki azalmasından önemli bir rol oynar (Qamar, Fang, Kim, & Cho, 2020).

Kriyoprezervasyon prosedürü spermde bozulmuş motilite, azalmış canlılık, hasarlı plazma ve mitokondriyal membranlar, moleküler değişikliklerin başlaması ve bozulmuş üreme potansiyeli gibi birtakım hasarlara neden olabilir (Nijs & Ombelet, 2001; Paasch, Sharma, Gupta, & Grunewald, 2004). Sağlıklı bir nesil neslin devami için bu mekanizmaların sürekliliği esastır. Oksidatif stresin Sperm DNA sı üzerine apoptoz gibi zararlı etkileri bildirilmiştir (Guz, Gackowski, Foksinski, Rozalski, & Zarakowska, 2013). Bu nedenle, sperm dondurma ve akrozom bütünlüğünün sağlığını korumak için sperm dondurma işlemi optimize edilmelidir (Rahiminia, Hosseini, Anvari, & Ghasemi-Esmailabad, 2017; Valcarce, Cartón-García, Riesco, Herráez, & Robles, 2013). MKH nin oksidatif stres azaltıcı etkisi, kriyoprezervasyon sırasında kriyoprezervasyonun zararlı etkilerini azaltmak için mümkündür. Bununla birlikte, bu takviyelerin faydaları halen tartışılmaktadır (Branco, Garcez, Pasqualotto, & Erdtman, 2010; Câmara, Silva, Almeida, & Nunes, 2011; Livak & Schmittgen, 2001). Mezenşimal kök hücre sperm kalitesinin seminal plazmada MKH konsantrasyonu ile pozitif korelasyon gösterdiği için sperm metabolizmasında ve olgunlaşmasında önemli bir rol oynar (41). MKH uygulamasının diyabetes mellituslu sıçanlarda apoptotik spermatogoni kök hücrelerini azalttığı da bildirilmiştir. Bugüne kadar, MKH 'nin farklı türlerde sperm dondurma üzerindeki etkileri ile ilgili çelişkili sonuçlar vardır. Bazı çalışmalar MKH ile tedaviyi takiben sperm donmasının neden olduğu yaralanmalarda iyileşme olduğunu göstermiştir. Ayrıca, MKH'nin yararlı etkilerinin kesin moleküler mekanizması belirsizdir ve çalışmalar dondurma sırasında MKH'nin moleküler mekanizması üzerinde yoğunlaşmalıdır. Çalışmamızda yüksek glikoz ve normal glikoz ekleyerek oksidatif stres yarattığımız spermelerde kriyoprezervasyon öncesi ve sonra MKH ve MKH – niş ile oluşacak önleyici etkiyi incelemeyi amaçladık. Bu amaçla, MKH'nin sperm parametreleri, akrozomal hasar, oksidatif stres ve apoptozis üzerindeki etkileri açısından donmuş çözdürülen sıçan epididimal sperminde değerlendirildi (Fattah, Sharafi, Masoudi, Shahverdi, & Esmaeili, 2017; Partyka, Rodak, Bajzert, Kochan, & Nizański, 2017).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız; Celal Bayar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun, 28.02.2019 tarih ve 2019-001 sayılı onayı ile gerçekleştirilmiştir.

5.1. YAĞ DOKU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRE (MKH) KÜLTÜRÜ

5.1.1. MKH ve Niş eldesi

Çalışmada Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücre (YDKH), sıçanın inguinal kısmından alınan adiposit dokusu küçük tavsiyeyen 25cm² ayrışmayı takiben %15 fetal buzağı serumu (S0113, Biochrom, Berlin, Germany), 50 µgr./ml. Gentamisin (A2712, Biochrom, Berlin, Germany), 100 UI/ml. Penisilin ve 100 UI/ml. Streptomisin (A2213, Biochrom, Berlin, Germany), 100 UI/ml. Amfoterisin (A2612, Biochrom, Berlin, Germany) ve 200 mM L-glutamin (K0282, Biochrom, Berlin, Germany) içeren α-MEM (F0915, Biochrom, Berlin, Germany) 370C'de kültür vasatı içerisinde ve %5 CO₂'li ortamdaki inkübatörde çoğalmaya bırakıldı. Kök hücreler 3 gün sonra yüzeye tutunmayan Hücreler besi ortamlarının sürekli olarak yenilenmesi ile sürekli olarak beslendi ve ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonrasında ise kültür kabının besiyeri 2 günde bir değiştirildi ve kültür kabına yapışan hücrelerin konfluent olması beklendi (Özdal-Kurt, Tuğlu, Vatansever, & Tong, 2015; Ghoryani, Shariati-Sarabi, Tavakkol-Afshari, & Mohammadi, 2020).

Inverted mikroskop altında yapılan çalışmada yaklaşık 10-12 gün sonra hücrelerin üremesi gözlemlendi ve kontrol edildi. Hücre kültür kabının tabanının %70-80 oranında hücre ile doldurulduğunda (%70-80 konflüente ulaşıldığında) alt-kültür (pasaj) işlemine geçildi. İlk kültür pasajı (P0) kabul edilerek ve onu takip eden her günlük pasajlar P1, P2, P3 şeklinde gruplandı. Steril laminar flow kabin içinde gerçekleştirilen bu işlemde besi ortamı ve flaska tutunaman hücreler pipet yardımıyla çekildikten sonra, flask yüzeyleri 4-5 ml steril PBS ile yıkandı. 1.5-2 ml %0.25 tripsin-EDTA (L2143, Biochrom, Berlin, Germany) solusyonu besiyere eklenerek hücrelerin yapıştığı yüzeyden ayrılması sağlandı ve mikroskoptaki incelemelerde hücrelerin

tümünün yüzeyden ayrıldığı gözlemlendikten sonra, Tripsinin ortamdan uzaklaştırılması için petri içine 5ml besiyer eklendi Daha sonra hücreler konik tabanlı tüplere alınarak 1000 rpm de 5 dk boyunca santrifüj edildi. Süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı, pellet kısmına 1 ml besiyer kelnip, pipet çek bırak ile homojen hale getirildi, hücre sayımı için eppendorf tüpüne mikropipetle 100 µl hücre süspansiyonu alındı. Hücre süspansiyonunun üzerine, mikropipetle 100 µl tripan mavisi solüsyonu eklenerek hücre sayımı mikroskop altında gerçekleştirildi. Hücreler, uygun oranda besi ortamıyla seyreltilerek, 1×10^6 hücre yoğunluğunda 75 cm^2 'lik hücre kültür flaklarına (T-75 kultur kaplarına) ekilerek besi ortamının 2 günde bir değiştirilmesi sağlandı ve kültüre devam edildi (Özdal-Kurt, Tuğlu, Vatansever, & Tong, 2015).

5.1.2. Kök Hücre Sayımı

Adiposit dokusundan izole edilen kök hücreler her bir pasajdan sonra, her dondurma çözme işleminden sonra ve her bir karakterizasyon işlemi öncesinde sayıldı.

Hücre sayımı için; Hücre sayımı için tripsin kullanılarak hücreler flakadan ilk başta kaldırıldı daha sonra süpernatant olarak kullanılmak üzere flaka 1 ml besi vasatı eklenerek pipetle çek bırak yapıldı ve petri içi homojen hale getirildi. Eppendorf tüplerine 100 µl hücre süspansiyonu alındı. Hücre karışımını içerisine 100 µl tripan mavisi eklendi. Sayım için toma lamı kullanıldı. Thoma lamı düz bir zemin üzerine alında ve üzerine lamel kapatıldı. Hazırlanan süspansiyon tam thoma lamının ortasında kalacak şekilde pipetlendi. Hücre sayımı, ışık mikroskopunda, x40 objektifte gerçekleştirildi. Toplam hücre sayıları aşağıdaki formüle göre hesaplandı; $H_s \times D_o \times S_s$, H_s :Sayılan hücre sayısı, D_o :Seyreltme oranı, S_s : $0,1 \text{ mm}^3$ 'deki sayım sonucu 1 ml'deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanıldı. Sabit sayı 10 000'dir (Ghoryani, Shariati-Sarabi, Tavakkol-Afshari, & Mohammadi, 2020; Eren, Zırh, & Zeybek, 2020).

5.1.3. Mkh Karakterizasyonu

Alınan örnekler immunohistokimyasal boyama için Paraformaldehit (%4)'te fiksasyon edildikten sonra, otuzar dakikalık arayla iki saatlik değişim yapılarak ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından %90 dan başlayarak sırayla %60 a kadar alkol serililerinden protokole uygun aralıklar ve süreyle geçirildi ve dehidrasyon

yapıldı. Ve distile suda 5 dakika bekletilecek. Dakopen (IM3580, Immunotech, France) ile sınırlandırılan %0,5'lik tripsin solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük H₂O₂ uygulanacaktır. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu (PBS; Posphate buffer solution) ile yıkanan kesitlere bloklama amacıyla 1 saat bloklama solusyonu (TA-125-UB, Lab Vision, Fremont, CA) ile muamele edilecektir. Bloklama solusyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlar CD90, STRO-1 ve CD45 ile bir gece inkübe edilecektir. Takiben bir gün sonra tampon solüsyon ile 3 defa yıkandı. Örnekler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikor (85-9043 Zymed Histostain kit San Francisco, USA) kullanılarak 30 ar dakikada boyandı. Yine üç defa 5'er dakika tampon solusyonu solüsyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB ile 5 dk boyanacaktır. Mayer's hematoksilen (72804E, Microm, Walldorf, Germany) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma medyumu (AML060, Scytec, Logan, Utah, USA) ile kapatılacaktır.

5.2. SPERMLERİN HAZIRLANMASI

Spermiler Celal Bayar üniversitesi laboratuvar hayvanları uygulama ve araştırma merkezinden temin edilen sıçanlardan sakrifiye yöntemiyle epididimiz alındı ve epididimisten tiftilme yöntemiyle spermier elde edildi.

5.2.1. Deney Gruplarının Hazırlanması

Tüm deney hayvanları Celal bayar üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilerek Celal Bayar üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında 12,12 saat aydınlık/karanlık ışıklandırması olan, ısı (22±2°C) ve nemi (%45-50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda yaşatılmıştır. Deneye başlanmadan önce hayvanların bir hafta boyunca karantinada tutularak ortam koşullarına adaptasyonları sağlanmıştır. Çalışma süresince, yem ve su günlük olarak değiştirilmiştir. Hayvanlar, kenarları sert plastik ve üstünde çelik ızgara bulunan deney grubuna göre işaretlenmiş kafeslerde tutulmuştur.

Bu çalışmada sıçanların epididimi girişimsel işlem ile açıldı. Epididimis fosfat buffer salin (PBS) ile yıkayıp diyer hücreler ortamdan uzaklaştırıldı. Yıkanan epididimis

dokusu 20 ml yıkama mediumu Sydney IVF gamete buffer içine alınıp epididimis ince uçlu iğne yardımıyla epididimis parçalarına ayrıldı ve spermier yıkama mediumu içerisinde serbest yüzer hale getirildi. Yıkama solüsyonu ve spermier 1200 rpm de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant kısmı ortamdan uzaklaştırıldı ve pellet kısmına 1 ml Sydney ivf cleavage medium eklendi ve tabakalandırıldı. Cleavage ile karıştırılan medium u 45 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası karışım karıştırılarak homojen hale getirildi.

Bu homojen karışım;(TSBV) Taze Sperm Besi Vasatı, (NG) Normal glikoz, (KHNG) Kök hücre + Normal glikoz, (NŞGN)Niş + Normal glikoz, (KHNG) Kök hücre + Niş + Normal glikoz, (YG) yüksek glikoz, (KHYG)Kök hücre +Yüksek glikoz, (NŞYG)Niş + Yüksek glikoz, (KHNGYG)Kök hücre + Niş + artı yüksek glikoz şeklinde 9 eşit gruba paylaştırıldı. İn vitro olarak bir, üç, altı, onsekis ve yirmidört saat inkübasyon, gözlem ve fotograflandırma yapıldı. Eş zamanlı Kriyoprezervasyon protokolü uygulanarak tüm gruplar 1/10 oranında kriyoprotektan eklendi ve kriyotüplere konuldu. 30 dk azot buharında bekletilen kriyotüpler ardından azot tankının içine konuldu. Azot buharının içinde 1 gün bekletilen spermier azot buharından çıkartılarak oda sıcaklığında çözülmesi beklendi. Çözülen karışımdan kriyoprotektan uzaklaştırılması için Sydney IVF gamete buffer eklendi ve 1200 rpm de 10 dk boyunca santrifüj edildi. Supernatant ortamdan uzaklaştırıldı ve içine 1 ml Sydney ivf cleavage konularak tüm gruplar tekrar incelendi. Kriyoprezervasyon sonrası tüm grupların 0. Dakikadan itibaren bir ve üç saat gözlemlendi ve 3 saatlik inkübasyon yapılan her bir gruba yayma yapıldı tespit edildi ve H-E, tünel ve e-nos boyaması yapıldı ve immünohistokimyasal farklılıklar gözlemlendi.

5.2.2. Cerrahi Uygulamalar

Tüm deneysel çalışmalar steril ortamda ve steril cerrahi aletler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deney sonunda kontrol ve deney gruplarına ait hayvanlara intramüsküler olarak 10 mg.kg-1 ksilazin ve 60 mg.kg-1 ketamin anestezisi uygulanmıştır.

5.2.3. Doku Örneklerinin Alınması ve Değerlendirilmesi

Hayvanlar kombine ketamin-ksilazin anestezi altında uyutulduktan sonra sakrifiye edilerek deney sonlandırıldı. Sakrifikasyonun ardından sıçanların testis dokuları hızla çıkarıldı. Çıkarılan testis dokularının epidimis kısımları hücre kültürü laboratuvar FBS içerisine hızlı bir şekilde götürüldü. Epidimis hücre kültür işlemleri için Gamete Buffer solüsyonu içine tiftildi. Ve çalışmalar için inkübatöre konuldu.

5.2.4 Semen Analizi

Epidimisten tiftilme yöntemiyle alınan sperm örnekler Makler Chamber üzerine 10 µl konularak 20X büyütmede ışık mikroskopunda sayı ve hareketliliği değerlendirilmiştir. Lama yayma yapılarak, diff quick boyaması ile morfoloji değerlendirilmiştir.

5.2.4.1. Diff Quick boyama

Sperm preparatları geleneksel olarak Papanicolaou, Hematoksilen-Eosin, Giemsa, Spermac ve Diff-quick yöntemleri ile boyanır. Tüp bebek merkezlerinde sperm morfoloji boyası için genel olarak iki boya kullanılmaktadır: Diff-quick ve Spermac boyalarıdır. Yayma havada kurutulur. Semen numunesi karıştırılır. Numunedeki sperm konsantrasyonuna göre 5-10µl numune lam üzerine alınır. 45 derecelik açı ile en az iki yayma yapılır. Yayma, havada 20 dakika kurutulur ve boyanır.

- Numunenin yayılıp kurutulduğu lam, şale içindeki fiksatifte (metil alkol içinde tri-methan boyası) 15 saniye tutulur.

- Solüsyon 1 (ksantin boyası) içinde 10 saniye tutulur.
- Solüsyon 2 (azine A ve metilen mavisi) içinde 5 sn tutulur.
- Preparat çeşme suyu ile yıkanır

Kuruduktan sonra yaymanın değerlendirmesi immersiyon yağı tifi ile 100X büyütmede yapılır. Numunede en az 200 boyanmış sperm sayılır. Baş, boyun ve kuyruktaki şekil değişiklikleri Kruger morfoloji kriterlerine göre sınıflandırılır (Yiğitbaşı, 2014).

5.2.4.2. Tunel immunohistokimyası

TUNEL testi sperm kromozomal bozuklukları incelemek için flow sitometri ve floresan mikroskop ortak olarak kullanılan bir yöntemdir (Agarwal, Majzoub, & Baskaran, 2020). TUNEL Yöntemi kullanılarak apoptotik hücrelerin belirlenmesi amacıyla DeadEnd Colorimetric TUNEL system, Promega G7130 kiti kullanılarak parafin bloklardan 5 mikron kalınlıkta kesitler alınarak uygulandı (Robinson, Gallos, Conner, & Rajkhowa, 2012). Yayma preparatlar hücrelerin boynması için rehidre edilmeye başlandı bunun için azal alkol serileri ile 2'şer dakika %95 dne başlayarak %60 a kadar rehidratasyon uygulandıktan sonra dokular serum fizyolojik (%0,85 NaCl) veya PBS ile oda ısısında 5 dakika boyunca bekletildi. Ardından PBS kullanılarak bir 5 dk daha oda sıcaklığında üzerine pbs dökerek yıkama işlemi yapıldı. Ardından kite uygun tunnel boyama protokolü uygulandı

Kör yöntemle TUNEL pozitif hücreler saptandı. Negatif kontrol için primer antikör yerine PBS kullanıldı. Ortalamalar istatistiksel olarak değerlendirildi. Sayım işlemi yayma preparattta X 40 oküler merceğinde her bir yayma preperatta, homojen boyanmış kahverengi boyanmış sperm apoptotik hücreleri sayıldı. Her bir yayma preparatta eşit alanlarda hücreler syıldı ve içindeki apoptotoik hücreler hesaplanarak apoptotik indeks oluşturuldu (Ghoryani, Shariati-Sarabi, Tavakkol-Afshari, & Mohammadi, 2020; Ayvaz, et al., 2014) (Tablo 4).

Tablo 5. TUNEL Boyama Protokolü

İŞLEM	SÜRE
%95 ALKOL	2 DK
%80 ALKOL	2 DK
DİSTİLE SUDA YIKAMA	3 DK
%0,1 TRİTON X SOLÜSYONU	5 DK
DOKUNUN ETRAFINI ÇİZME	
PROTEAZ K EKLENEREK, COVER SLİP İLE KAPATMA	20 DK
PBS İLE YIKAMA	4 DK
VİAL 1 VE VİAL 2 BİRLEŞTİRİLEREK HAZIRLANAN SOLÜSYONDAN 50 µL EKLENEREK LAMLARLA KAPAMA	60 DK
PBS İLE YIKAMA	6 DK
DOKULARIN ÜZERİNE 50-100 µL DAB SUBSTRAT EKLENİR.	GÖZ İLE TAKİP
PBS İLE YIKAMA 3 KEZ	2 DK
MAYERS HEMATOKSİLEN İLE BOYAMA	1 DK
DİSTİLE SU İLE YIKAMA	2 DK
%80 ALKOL	DALDIR ÇIKAR
%95 ALKOL	DALDIR ÇIKAR

5.2.4.3. Spermatozoon Sayımı

Hemositometerenin üzerine kuyucukların üzerini örtecek büyüklükte bir lamel yerleştirildikten sonra, spermatozoon süspansiyonunda 10 µl alınarak, ilk önce hemositometrenin sol kuyucuğu dolduruldu. Vortekslenerek yeniden homojenize olması sağlanan süspansiyondan 10 µl daha alınarak hemositometrenin sağ kuyucuğu dolduruldu. Mikroskop altına yerleştirilen hemositometrenin sol üstteki ikincil karesine odaklandıktan sonra sayım işlemine geçildi. Sayım işleminde her bir ikincil karenin sol ve üst köşesi üzerinde uzanan ya da herhangi bir bölümü bu bölgelere değen spermatozoonlar sayıma dahil edilirken, ikincil karelerin sağ ve alt köşesi üzerinde uzanan ya da bu bölgelere değen spermatozoonlar sayım dışı bırakılmıştır. Bu şekilde iki kez yapılan sayım sonuçları not edilerek bu sonuçların ortalamaları ($S1+S2/2$) alındı ve aşağıdaki hesaplama sistemi kullanılarak her grup için spermatozoon sayıları hesaplandı (Tablo 5.2).

Tablo 5.2. Spermatozoon sayılarının hesap protokolü

Transfer Edilen Hacim = 0,5 ml

Sekonder Kare Sayısı = 25

Sekonder Karelerin Hacmi = 4×10^{-6} ml

Petri Kabındaki PBS Hacmi = 10 ml

Falkon Tüpündeki Total Hacim = 2,5 ml

$$\text{Seyreltme Faktörü} = \frac{(\text{Petri Kabındaki PBS Hacmi}) \times (\text{Falkon Tüpündeki Total Hacim})}{(\text{Transfer Edilen Hacim}) \times (\text{Sekonder Karelerin Hacmi}) \times (\text{Sekonder Kare Sayısı})} = \frac{10^6}{2}$$

$$\text{Total spermatozoon sayısı} = \frac{S1+S2}{2} \times \frac{10^6}{2}$$

5.2.4.4. Hareketlilik: Hareketlilik WHO labrotuar protokolüne göre yapıldı ve 100 mikro litre sperm süspansiyonu 2x6 kuyucuklu kültür tabağında 5 alandan 200 sperm motilitesi değerlendirilerek yapıldı (Varisli O ve ark. 2013).

5.2.4.5. Canlılık: Canlılık için yaymada H&E boyanmış spermiler ışık mikroskop altında 100 büyütmede morolojik yapıları üzerinden canlılıkları için karar verildi (Varisli O ve ark. 2013).

5.2.4.6 Hücre ölümü: Canlılık için 24 lü well plate içindeki spermilere her bir grup için hypoosmotic swelling HOS testi uygulandı ve canlılıkları için karar verildi (Jayendran, Van der Ven, & Zeneveld, 1992).

5.3. DENEY GRUPLARI

Tüm deney Celalbayer üniversitesi etik kurulu izniyle alınmıştır. Deney hayvanları Celalbayer Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilerek sıçan spermeleri alınmış ve sıçan spermeleri su şekilde gruplara ayrılmıştır;

5.3.1. Kontrol Grubu; Bu grupta sperm örneği alınmış ve hiçbir işlem uygulanmamıştır. 1 gün süreyle cleavage solüsyonu ile inkübe edildi ve saatlik olarak mikroskopik olarak izlendi ve görüntülendi.

5.3.2. Normal Glikoz (NG): Alınan sperm örnekleri normal glikozlu kök hücre besiyeri ile 1 gün süreyle inkübe edildi ve saatlik olarak mikroskopik olarak izlendi ve görüntülendi.

5.3.3. Kök Hücre Grubu + Normal Glikoz (KHNG): Alınan sperm örnekleri kök hücre 1 gün süreyle inkübe edildi ve saatlik olarak mikroskopik olarak izlendi ve görüntülendi.

5.3.4. Kök Hücre + Niş + Normal Glikoz (KHŞNG): Alınan sperm örnekleri kök hücre ve niş ile 1 gün süreyle inkübe edildi ve saatlik olarak mikroskopik olarak izlendi ve görüntülendi.

5.3.5. Niş + Normal Glikoz (NŞNG): Alınan sperm örnekleri niş ile. 1 gün süreyle inkübe edildi ve saatlik olarak mikroskopik olarak izlendi ve görüntülendi.

5.3.6.Yüksek Glikoz (YG): Alınan sperm örnekleri yüksek glikozlu besiyerinde 1 gün süreyle inkübe edildi ve saatlik olarak mikroskopik olarak izlendi ve görüntülendi.

5.3.7. Kök Hücre Grubu + Yüksek Glikoz (KHYG): Alınan sperm örnekleri kök hücre ile yüksek glikozlu besiyerinde 1 gün süreyle inkübe edildi ve saatlik olarak mikroskopik olarak izlendi ve görüntülendi.

5.3.8. Kök Hücre Grubu +Niş + Yüksek Glikoz (KHŞYG): Alınan sperm örnekleri kök hücre ve niş ile yüksek glikozlu besiyerinde 1 gün süreyle inkübe edildi ve saatlik olarak mikroskopik olarak izlendi ve görüntülendi.

5.3.9. Niş + Yüksek Glikoz (NŞYG): Alınan sperm örnekleri niş ve yüksek glikozlu besiyerinde 1 gün süreyle inkübe edildi ve saatlik olarak mikroskopik olarak izlendi ve görüntülendi.

Tüm deney grupları 24 saatlik inkübasyon ve izlem öncesi eş zamanlı olarak kriyoprezervasyon protokolüne göre donduruldu ve çözöldü kriyoprotektan uzaklaştırıldı ve deney gruplarına besiyerleri ve grubuna özgü hücreler eklendi.

5.3.9. Kriyoprezervasyon:

Deney gruplarından alınan besi vasatlı ile seyreltilmiş sperm önerkeri. Sydney IVF gamet buffer ejekülat ile aynı sıcaklığa getirildi ve sperm örneği karıştırılıp homojen bir karışım elde edildi. Elde edilen karışım 1200 Rpm de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı ortamtan uzaklaştırılarak pellet kısmına 1 ml 1 gece önceden karbondioksitlendirilmiş Sydney IVF cleavage medium eklendi. Ve tabaka oluşumu sağlandı. Cleavage ile karıştırılan sperm örnekleri 45 dk boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası oda sıcaklığında olan dondurma solüsyonumuz Irvine scientific crioprotectant 1/2 oranında 10 dakika sürecek şekilde damla damla eklendi. Elde edilen karışım kriyo tüplere aktarıldı. 30 dk azot buharında bekletildi. Ve ardından azot içine daldırıldı.

1 gün sonra kriyotüpler sıvı azot içerisinde çıkartıldı. Oda sıcaklığında bekletilerek çözünmesi sağlandı. Kriyotüpler içerisindeki kriyoprotektanlı sperm örnekleri falcon tüplerine alındı. Tüplere yıkama solüsyonu eklendi Sydney IVF gamet buffer. Yıkama solüsyonu eklenen spermier 1800 Rpm de 5 dk santrifüj edildi. Ve santrifüj sonrasında süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı. Pellet kısmına 1 ml 1 gece önceden karbondioksitlendirilmiş Sydney IVF cleavage eklendi ve karıştırıldı.

5.3.10. Normal Glikoz Besiyeri: Normal glikoz medium hazırlamak için 43,45 ml Alpha Medium içerisine

0,5 ml penisilin streptomisin

0,5 ml L glutamin

0,5 ml gentamisin

0,05 ml anfoterasin

5 ml fbs

Eklenip homojen şekilde karıştırılmıştır. Oluşan 50 ml homojen karışım filtre ile süzdürölüp steril falcon içine konmuştur.

5.3.11. Yüksek Glikoz Besiyeri: Yüksek glikoz besiyeri hazırlamak için 43, 45 ml Dmem high glucose solüsyonu içerisine

0,5 ml penisilin streptomisin

0,5 ml L glutamin

0,5 ml gentamisin

0,05 ml anfoterasin

5 ml fbs

Eklenip homojen şekilde karıştırılmıştır. Oluşan 50 ml homojen karışım filtre ile süzdürölüp steril falcon içine konmuştur.

5.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bu yaptığımız bilimsel çalışmada istatistikleri tutmak için SPSS (Statistical Package of Social Sciences) kullanıldı. Gruplar arasındaki farklılıkları ortaya koymak için parametrik olmayan Mann-Whitney U testi kullanıldı. Uygulama yapılan ve yapılmayan Gruplar arası farklılıkları görmek için için Paired Samples T-testi kullanıldı. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5.5. GRUPLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ DEĞERLENDİRİLMESİ:

Deney grupları 24 saat inkübe edildikten sonra deney sonlandırıldı. Deney grupları deneyin sonlandırılması ile hızlıca lamel üzerine yayma yapıldı ve oda sıcaklığında kuruması beklendi. Bir gün süreyle oda sıcaklığında kuruması beklenen yayma preparatları may glutamat ile 3 dk tespit edildi ve akar suda yıkandı. Yıkanan solüsyonun üzerine 1 e 2 oranında hazırlanmış gimsa çözeltisi dökülür ve 20 dk bekletilir. 20 dk sonunda akar sudan geçirildi ve mikroskopik olarak incelendi. (Tablo5.5)

Tablo 5.5. Yayma preparatlar için Giemsa boyama protokolü

İşlem	Süre
May glutamat ile tespit etme	3 dk
Akar su ile yıkama	2-3 sn.
Kurutma	5 dk
Giemsa çalışma solüsyonu (1:20 oranında dH ₂ O ile seyreltilmiş) ile boyama	35 dk
Akar su ile yıkama	1 dk
Kurutma	5 dk

Bu şekilde boyanan her preparatta, 250 sperm morfolojik olarak incelenmiş ve anormal morfolojideki sperm sayıları kaydedilerek yüzde hesaplamaları yapılmıştır.

6. BULGULAR

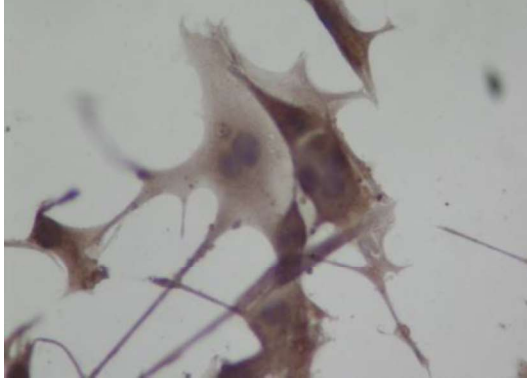
YG besiyerinde epididimden toplanmış spermilerin üzerindeki etkisini anlamak amacıyla Ng besiyerindeki spermilerle karşılaştırmak üzere oda sıcaklığında 24 saat KH, KH tarafından salgılanan faktörler olarak 24 saatlik koşulları besiyeri (conditionet medium) niş olarak kullanılıp ayrıca her ikisinin birlikte olduğu durumda sperm anomolisi, canlılığı ve apoptozu incelendi.

KH için dondurulmuş yağ dokusu MKH besiyerine alınarak kültür tabaklarında çoğaltıldı. Semikomfulent olduktan sonra 24 saatlik besiyeri niş olarak kullanıldı. KH karakterizasyonu yapıldı. Spermier anestezi altında sıçan testinin epididimi alınarak yıkama şeklinde santrifüj tüplerine konularak yıkandı ve uygun besiyerine yerleştirildi. Uygulamalar yapıldıktan sonra spermier yayma yöntemiyle lamlara alındı. Sonuçlar morfolometrik, histolojik ve imminohistokimyasal yöntemlerle incelendi.

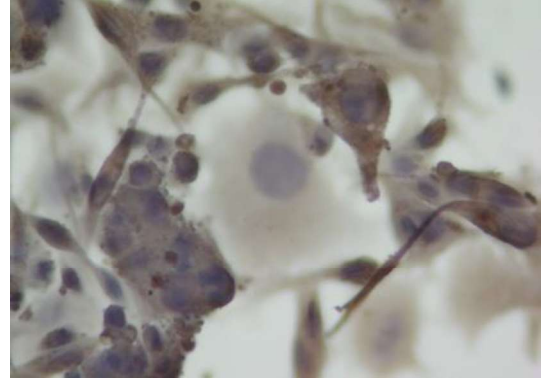
6.1. MKH İZOLASYON VE KARAKTERİZASYON BULGULARI

Hücre kültürü, laboratuvar koşulları altında, sıçan yağ dokusundan izole edilen MKH'ler besiyeri ortamında konfluent oluncaya kadar kültüre edildi. Hücreler, 2. pasaja kadar pasajlama işlemi yapıldıktan sonra uygulamaya en uygun hale getirildi.

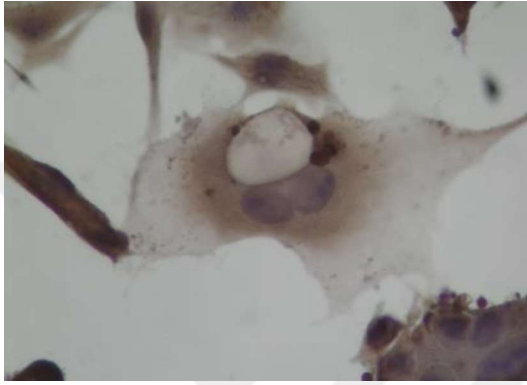
Kültür ortamında 4. pasajdaki MKH kültür kabında konfluent olduğunda, belirteç olarak STRO-1 ile CD90 pozitifliği ve CD45 negatifliği kullanılarak immunohistokimyasal olarak doğrulandı



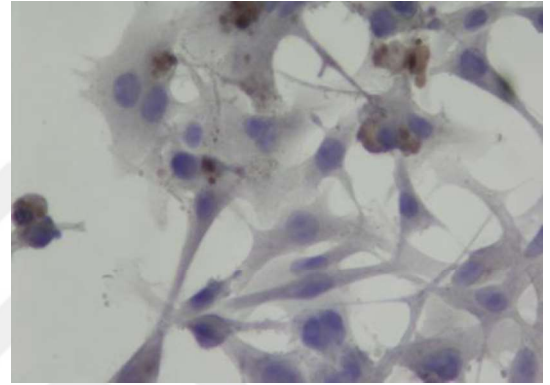
A. KMKH STRO-1 x400



B. KMKH CD90 x400



C. KMKH CD45 x400



D. KMKH PBS x400

Resim 6.1 MKH karakterizasyonu STRO-1 ve CD90 pozitifliği ile CD45 negatifliği ile gösterilip antikor yerine PBS kullanılan boyanmamış negatif kontrol immunohistokimya görüntüleri ile tanımlamalarının yapılması sağlandı.

İmmünohistokimyasal boyamalar üzerinde yapılan H-skore analizinde MKH için büyük çoğunlukla STRO-1 ve CD90 büyük çoğunlukla pozitifliği ile çok az miktarda CD45 pozitifliği ve spesifik boyanmayı gösteren hiç işaretlenememe ortaya kondu (tablo 6.1).

H-SKORE	KONTROL	STRO-1	CD90	CD45
Belirteç yüzdesi	2,84	210,45	217,91	30,60
(Ort. $\pm$ SD)	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	2,11	28,44	28,44	17,94

Tablo 6.1: MKH için yapılan H-skorla yapılan incelenemede belirteçler ile karakterizasyon açısından büyük çoğunluğun CD90 ve STRO-1 pozitif olduğunu, az miktarda CD45 pozitifliğinin olduğunu ve kontrolde işaretlemenin olmadığı görüldü.

6.2. SPERM UYGULAMA SONUÇLARI

Sıçan epidimisinden ekstrakte edilen sperm örnekleri alındıktan sonra sperm swim up protokollü uygulandı daha sonra petrilere konuldu. Petri tabaklarında hareket kabiliyetlerini tamamamen kazanmaları için bekletilerek hareket ve canlılık özellikleri yönünden değerlendirildi. Faz kontras mikroskop altında 10luk objektif ile 10 farklı alanda canlı sperm sayısı ve +1 ile 4 üzerinde hareketliliği değerlendirildi (Resim 4.2.1).

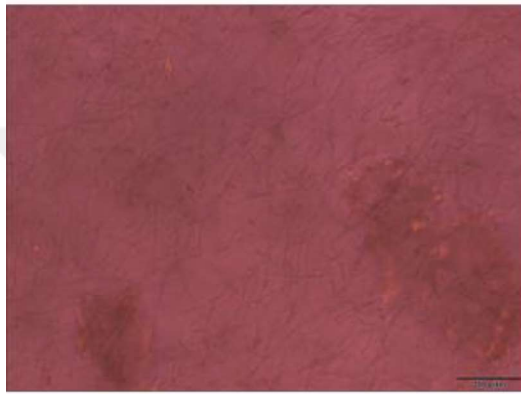




A. KHNŞNG x200



B. KHNG x200



C. KHNŞYG x200



D. KHYG x200



E. NŞNG x200



F. NŞYG x200

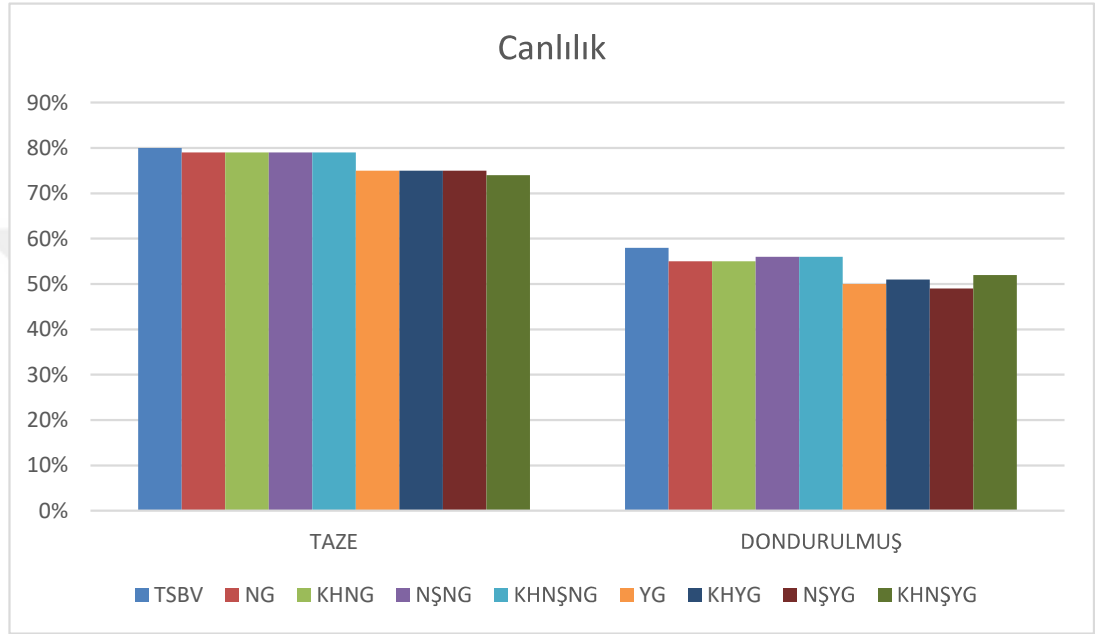
Resim 6.2.1 Sperm örneklerinin farklı kültür ortamında 24 saatlik inverted mikroskop ile değerlendirilmesi.

Örnekler önce hacimlerinin iki katı kadar 37°C sıcaklıktaki Ham's F10 besi vasatı içerisindeki görüntüsü. Epididimisten alınan spermler swim up hazırlanmış ve cleavege mediumu ile tabakalanması sağlanmış ve uygun grup hücreleri ve medyumları eklenerek 37°C'de inkübasyona bırakılmışlardır. Ardından alınan

numüneler 6 lı well plate e konularak sperm sayısı ve hareketliliği belirlenmiştir (Tablo 6.2.1).

6.2.1 Sperm Canlılık Testi:

Farklı kültür ortamında spermier Hos testine tabi tutularak kültür ortamları arasındaki canlılık oranları hesaplandı.



Grafik 6.2.1. 0. Dakika dondurulmuş çözölmüş ve taze spermierin canlılık oranları

Tablo 6.2.1. Hos testi yapılarak sperm kültür ortamlarının saat gözetmeksizin 0. Dakikada canlılık % si hesaplandı

KÜLTÜR ORTAMI	Canlılık(A+B)	YERİNDE HAREKETLİ	HAREKETSİZ
Taze sperm besisi vasatı	81,55±2,55	11,38±2,75	8,12±3,02
Normal glikoz besiyeri	78,67±4,08	12,42± 3,41	9,39±2,83
Normal glikoz + kök hücre	79,30±3,61	12,36±3,42	8,73±2,39
Normal glikoz + niş	79,31±3,07	13,03±2,90	9,06±2,31
Normal glikoz + kök hücre + niş	78,63±2,61	12,70±2,97	9,39±2,37
Yüksek glikoz	74,30±3,06	14,03±2,90	10,06±2,86
Yüksek glikoz + kök hücre	73,30±3,07	14,03±2,90	10,39±3,23
Yüksel glikoz + niş	73,54±2,57	14,12±2,68	10,06±2,86
Yüksek glikoz + kök hücre + niş grubu	73,58±2,01	14,12±2,68	9,73±2,56

Tablo 6.2.1 Sıçan epidimisinde diseksiyon yöntemiyle alınan sperm sayısı 57 milyon, 0. dakika canlılık (A+B) 81% yerinde hareketli 11% hareketsiz sperm yüzdesi 8% değerlendirilmiştir. Ve farklı kültür ortamlarında inkübasyona bırakılarak 24 saat izlenmiştir.

Sıçandan elde edilen spermin farklı kültür ortamlarındaki 0. Dakika canlılık ve hareketlilikleri.

6.2.2. Sperm Örneklerinin Farklı Kültür Ortamında 24 Saatlik İnverted Mikroskop İle Değerlendirilmesi

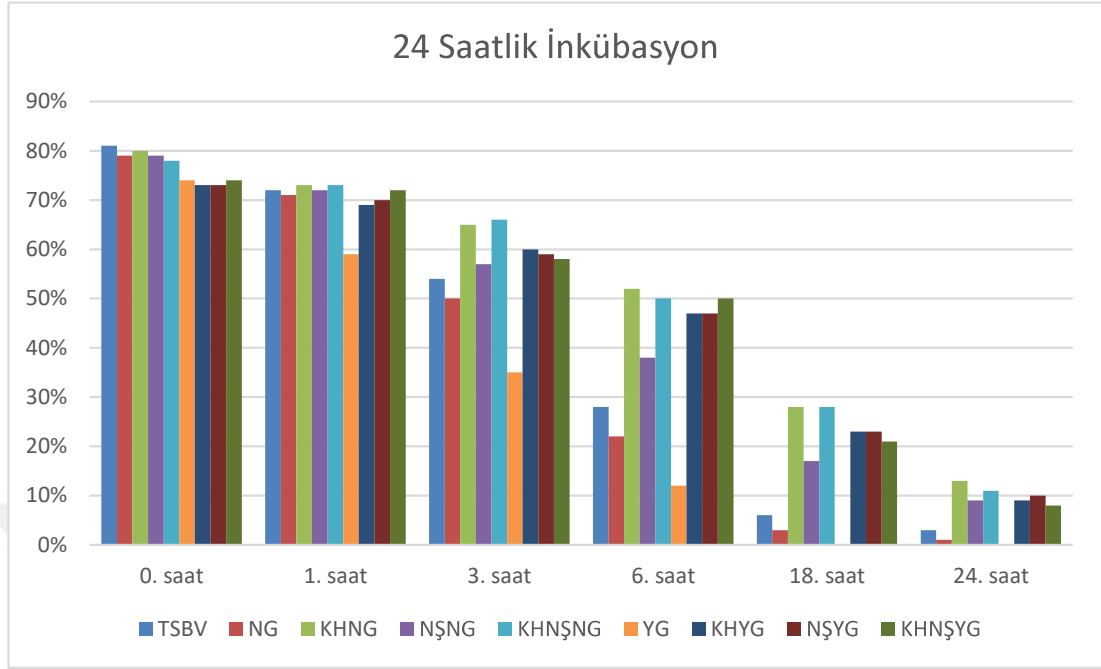
Farklı kültür ortamında inkübe edilen spermeler 24 saatlik takibe alındılar. Spermeler 24 saatlik inkübasyon süresi boyunca her saat inverted mikroskop ile incelenerek canlılık, yerinde hareketlilik ve hareketsizlik olarak incelendiler. İncelemeler 0. Dakika, 1. Saat, 3. Saat, 6. Saat, 18. Saat ve 24. Saat olarak hesaplandılar. Sıçandan elde edilen Spermelerin farklı kültür ortamlarındaki 24 saat lik inkübasyonu **Tablo 6.2.**'de gösterilmiştir.

TABLO 6.2. Sıçan sperminin farklı kültür ortamlarında 0. dakika, 1. saat, 3. saat, 6. saat, 18. saat ve 24. saat canlılık yerinde hareketlilik ve hareketsizlik değerler

Tablo 6.2 Sıçan sperminin farklı kültür ortamlarında 0. dakika, 1. saat, 3. saat, 6. saat, 18. saat ve 24. saat canlılık Değerleri

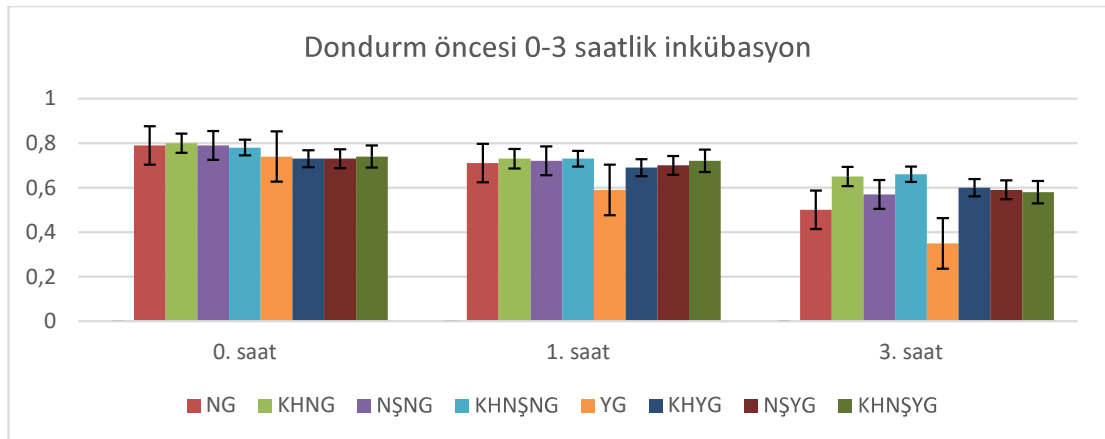
	0.saat			1.saat			3.saat			6.saat			18.saat			24.saat				
	C	Y	H	C	Y	H	C	Y	H	C	Y	H	C	Y	H	C	Y	H		
TSBV	81,55±	11,46±	8,53±	72,15±	15,30±	13,37±	54,20±	12,55±	34,21±	28,19±	12,42±	62,81±	6,30±	15,48±	79,58±	3,30±	1,16±	96,32±		
	4,55	2,49	2,71	2,75	3,31	2,33	3,19	3,19	2,84	2,88	2,78	3,33	3,31	3,36	3,26	3,21	1,11	3,01		
NG	78,67±	11,80±	9,20±	71,49±	14,30±	15,37±	50,53±	11,89±	39,21±	22,19±	1,75±	68,62±	3,30±	3,09,48±	88,58±	1,32±	1,83±	98,16±		
	4,08	2,46	3,18	3,28	3,30	3,33	2,72	2,77	2,17	3,13	1,77	2,87	1	2,80	2,76	1,32	2,35	1,77		
KHNG	79,30±	11,80±	8,20±	73,82±	17,63±	10,37±	65,20±	19,55±	16,54±	52,19±	16,42±	32,38±	28,30±	2,15,47±	57,58±	13,30±	10,83±	77,16±		
	3,61	2,46	2,83	3,82	3,84	3,33	2,82	2,88	2,71	2,88	2,87	3,33	71	3,36	3,37	2,72	2,35	2,76		
NŞNG	79,31±	13,13±	9,20±	72,82±	15,30±	13,37±	57,20±	16,55±	27,21±	38,47±	16,09±	47,62±	17,63±	3,15,25±	68,51±	8,97±	7,40±	84,16±		
	3,07	2,96	3,18	2,84	3,31	2,71	2,82	2,82	2,84	3,31	3,01	2,87	25	2,89	3,22	2,80	3,60	2,76		
KHNS	78,63±	12,43±	10,20±	73,35±	17,63±	10,24±	66,53±	19,05±	15,48±	53,46±	18,69±	32,18±	28,48±	2,19,01±	53,35±	11,03±	11,47±	78,22±		
	2,61	3,32	2,88	2,67	3,44	3,20	2,56	2,91	2,50	2,62	2,82	3,25	81	2,48	3,28	3,45	3,17	3,15		
YG	74,30±	14,30±	12,37±	59,53±	13,67±	28,40±	35,30±	10,53±	55,43±	12,40±	10,32±	78,22±	0,53±	0,510,35±	90,36±	0,12±	1,80±	96,90±		
	3,06	2,96	3,16	3,04	3,55	2,92	2,66	2,94	2,87	2,82	3,34	3,24	5	2,90	2,96	1,46	2,73	2,67		
KHYG	73,30±	14,31±	12,63±	69,35±	16,41±	14,41±	60,25±	19,31±	21,24±	47,76±	16,29±	36,68±	23,28±	13,27±	64,50±	9,4±	7,48±	84,63±		
	3,07	2,98	2,47	2,87	2,94	2,96	3,24	48	90	3,56	3,12	3,05	3,09	3,01	3,14	3,01	2,99	2,98		
NŞYG	73,54±	14,65±	12,30±	70,29±	14,78±	16,94±	59,53±	20,67±	11,57±	48,60±	16,11±	34,41±	23,19±	8,41±	68,37±	10,13±	6,75±	84,27±		
	2,57	2,99	3,04	2,76	2,61	2,76	2,89	47	92	2,55	2,54	2,96	2,80	2,95	3,03	1,11	3,34	2,87		
KHNS	73,58±	14,95±	11,96±	67,62±	18,45±	16,94±	58,23±	20,33±	23,24±	50,25±	14,44±	38,49±	23,54±	12,18±	67,64±	11,64±	9,64±	85,44±		
	2,01	2,98	3,14	2,14	2,82	2,16	3,01	66	11	3,23	2,59	2,47	2,97	2,69	2,01	3,06	2,87	2,77		
TSBV Taze Sperm Besi Vasatı NG Normal glikoz KHNG KHNSNG Kök hücre + Niş + Normal glikoz YG yüksek glikoz C : Canlılık (A+B) Y : Yerde hareketli H :																			Hareketsiz	
Kök hücre + Normal glikoz NŞNG Niş + Normal glikoz KHYG Kök hücre +Yüksek glikoz NŞYG Niş + Yüksek glikoz																				

Sıçandan elde edilen Spermilerin farklı kültür ortamlarındaki 24 saat lik inkübasyonu grafiksel gösterilmesi **Grafik 6.2**'de gösterilmiştir.



TSBV	Taze Sperm Besi Vasatı	KHNŞNG Kök hücre + Niş + Normal glikoz
NG	Normal glikoz	YG yüksek glikoz
KHNG	Kök hücre + Normal glikoz	KHYG Kök hücre +Yüksek glikoz
NŞNG	Niş + Normal glikoz	NŞYG Niş + Yüksek glikoz
		KHNŞYG Kök hücre + Niş + artı yüksek glikoz

Sıçandan elde edilen taze spermilerin farklı kültür ortamlarındaki 0. 1. Ve 3. Saat canlılık oranları **Grafik 6.3**'te gösterilmiştir.

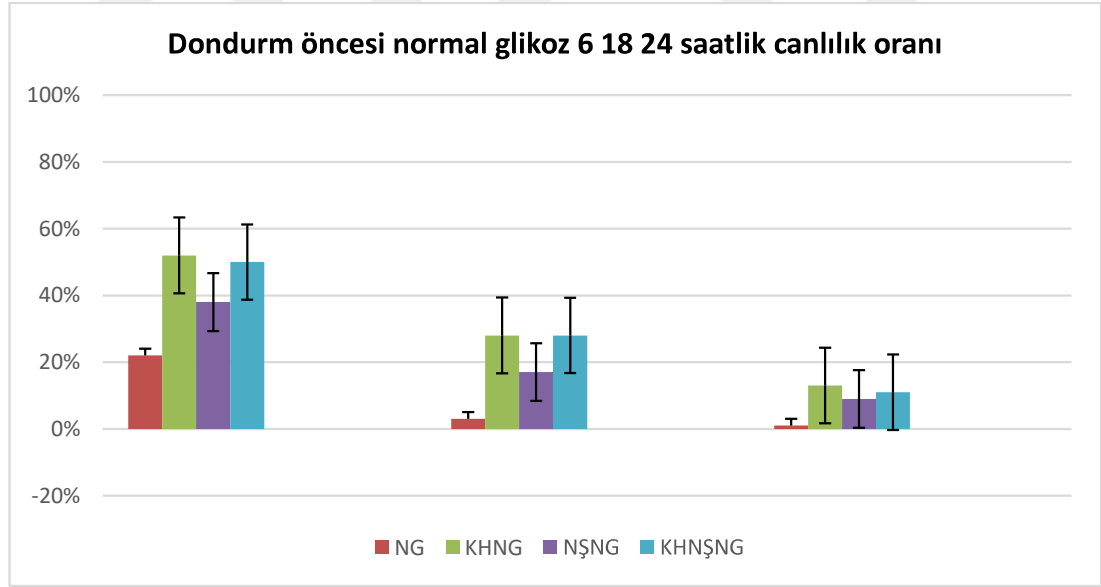


	0.saat	1.saat	3.saat
Gruplar	Ortalama	Ortalama	Ortalama
	±	±	±
	Standart Sapma	Standart Sapma	Standart Sapma
NG	2,356±4,080	1,894±3,280	2,720±1,570
KHNG	2,084±3,610	1,894±3,280	2,820±1,628***
NŞNG	1,772±3,070	1,640±2,840	2,820±1,628
KHNŞNG	1,507± 2,610	1,542±2,670	2,560±1,478***
YG	1,767±3,060	1,755±3,040	1,536±2,660
KHYG	1,772±3,070	1,657±2,870***	1,871±3,240***
NŞYG	1,484±2,570	1,593±2,760**	1,669±2,890***

*** P<0.001 ** P<0.01 * P<0.05

Tablo 6.3. Sıçanlardan alınan spermilerin farklı kültür ortamlarında 0 , 1 ve 3 saat canlılık oranları

Sıçandan elde edilen taze spermilerin farklı kültür ortamlarındaki 0. 1. Ve 3. Saat canlılık oranları **Grafik 6.4'**te gösterilmiştir.



NG Normal glikoz

KHNG Kök hücre + Normal glikoz

NŞNG Niş + Normal glikoz

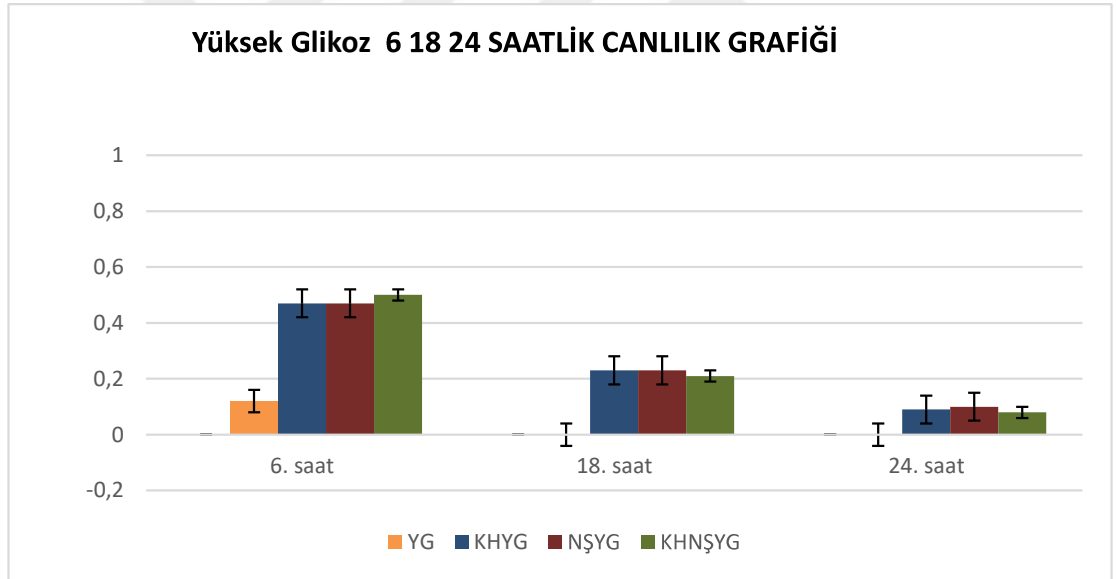
KHNŞNG Kök hücre + Niş + Normal glikoz

	6.Saat	18.Saat	24.Saat
Gruplar	Ortalama ± Standart Sapma	Ortalama ± Standart Sapma	Ortalama ± Standart Sapma
NG	1,807±3,130	1,738±3,010	0,7621±1,320
KHNG	1,663±2,880***	1,565±2,710***	1,570±2,720**
NŞNG	1,911±3,310***	1,876±3,250**	1,617±2,800*
KHNŞNG	1,513±2,620***	1,622±2,810***	1,992±3,450**

*** P<0.001 ** P<0.01 * P<0.05

Tablo 6.5. Sıçanlardan alınan spermilerin farklı kültür ortamlarında 6, 18 ve 24 saat canlılık oranları

Sıçandan elde edilen taze spermilerin yüksek glikozlu farklı kültür ortamlarındaki 6. 18. Ve 24. Saat canlılık oranları **Grafik 6.6**'te gösterilmiştir.

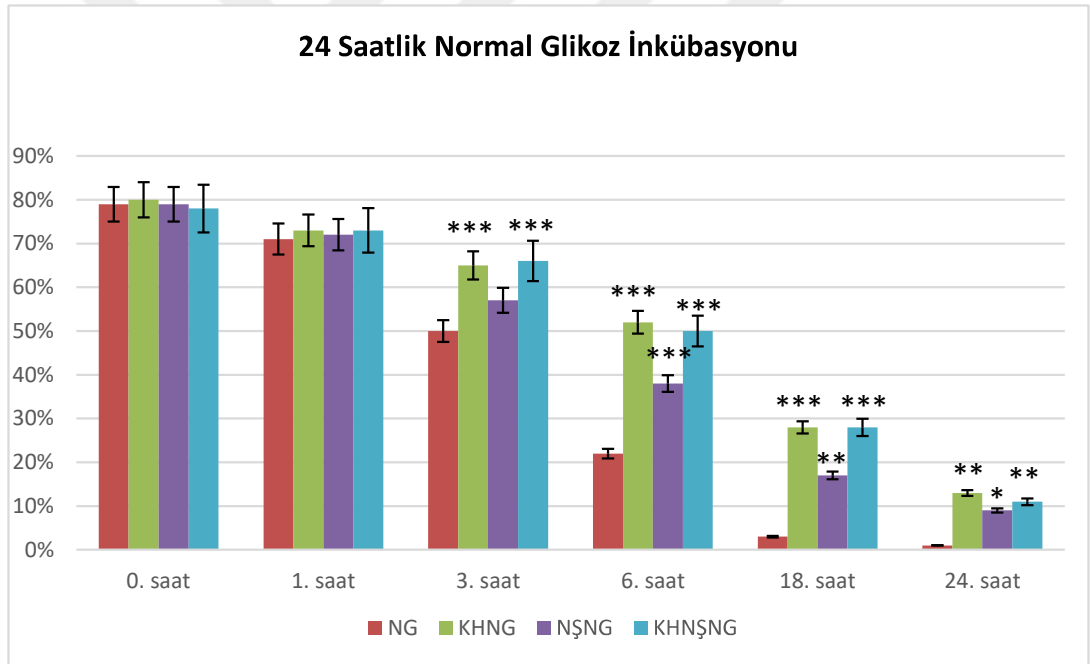


	6.Saat	18.Saat	24.Saat
Gruplar	Ortalama $\pm$ Standart Sapma	Ortalama $\pm$ Standart Sapma	Ortalama $\pm$ Standart Sapma
YG	1,628 $\pm$ 2,820	0,3175 $\pm$ 0,5500	0,8429 $\pm$ 1,460
KHYG	2,055 $\pm$ 3,560***	1,784 $\pm$ 3,090***	1,738 $\pm$ 3,010**
NŞYG	1,472 $\pm$ 2,550**	1,617 $\pm$ 2,800***	0,6409 $\pm$ 1,110*
KHNŞYG	1,865 $\pm$ 3,230***	1,715 $\pm$ 2,970***	1,767 $\pm$ 3,060*

*** P<0.001 ** P<0.01 * P<0.05

Tablo 6.6. Sıçanlardan alınan spermelerin Yüksek glikozlu farklı kültür ortamlarında 6, 18 ve 24 saat canlılık oranları

Sıçandan elde edilen taze spermelerin farklı kültür ortamlarındaki 0. 1, 3, 6 18 ve 24 Saat canlılık oranları **Grafik 6.7** te gösterilmiştir.

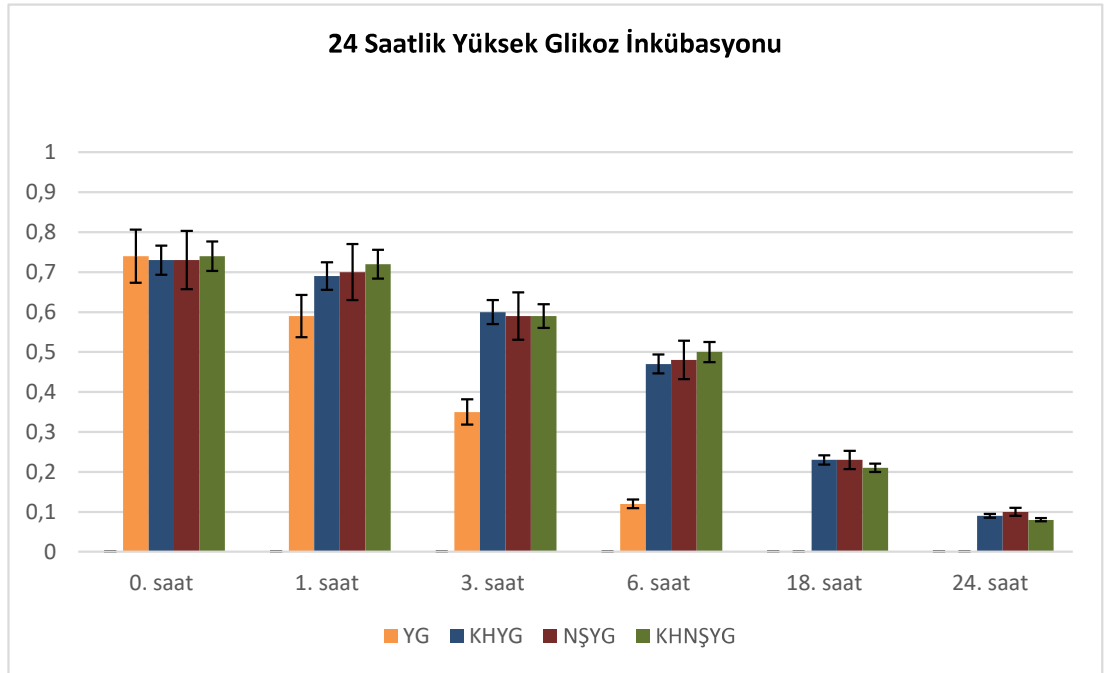


	0.saat	1.saat	3.saat	6.Saat	18.Saat	24.Saat
Gruplar	Ortalama ± Standart Sapma	Ortalama ± Standart Sapma	Ortalama ± Standart Sapma	Ortalama ± Standart Sapma	Ortalama ± Standart Sapma	Ortalama ± Standart Sapma
NG	2,356± 4,080	1,894± 3,280	2,720± 1,570	1,807± 3,130	1,738± 3,010	0,7621± 1,320
KHNG	2,084± 3,610	1,894± 3,280	2,820± 1,628***	1,663± 2,880***	1,565± 2,710***	1,570± 2,720**
NŞNG	1,772± 3,070	1,640± 2,840	2,820± 1,628	1,911± 3,310***	1,876± 3,250**	1,617± 2,800*
KHNŞNG	1,507± 2,610	1,542± 2,670	2,560± 1,478***	1,513± 2,620***	1,622± 2,810***	1,992± 3,450**

*** P<0.001 ** P<0.01 * P<0.05

Tablo 6.7. Sıçanlardan alınan spermlerin farklı kültür ortamlarında 0, 1, 3, 6, 18 ve 24 saat canlılık oranları

Sıçandan elde edilen taze spermlerin yüksek glikozlu farklı kültür ortamlarındaki 0, 1, 3, 6 18 ve 24 Saat canlılık oranları **Grafik 6.8**'te gösterilmiştir



YG yüksek glikoz

KHYG Kök hücre +Yüksek glikoz

NŞYG Niş + Yüksek glikoz KHNŞYG

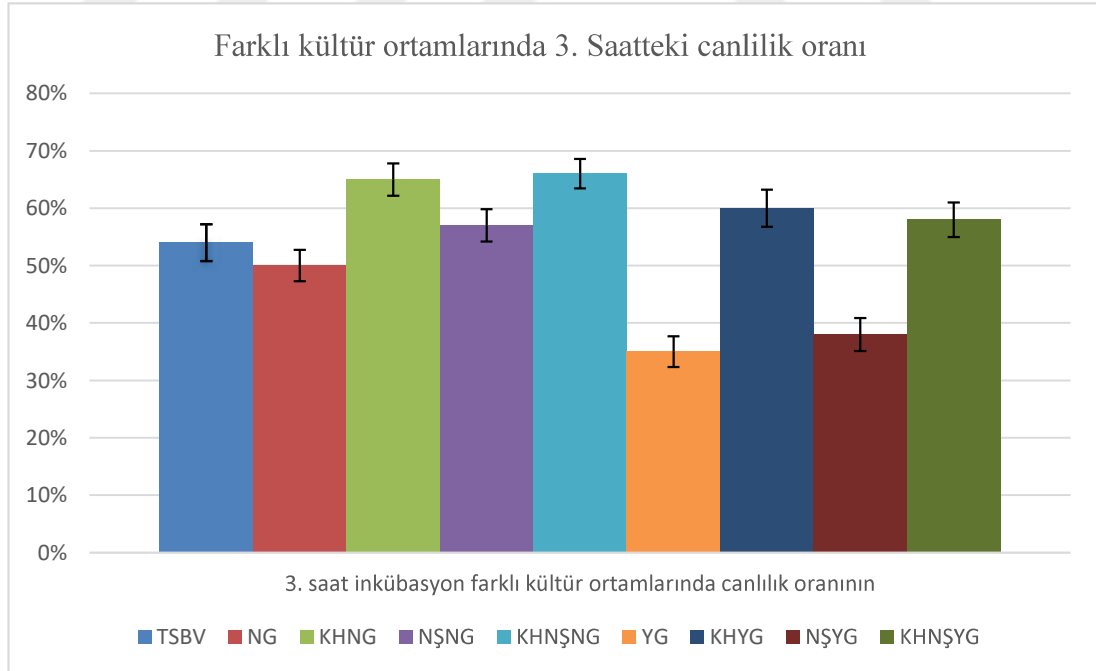
Kök hücre + Niş + artı yüksek glikoz

	0.saat	1.saat	3.saat	6.saat	18.saat	24.saat
Gruplar	Ortalama ±	Ortalama ±	Ortalama ±	Ortalama ±	Ortalama ±	Ortalama ±
	Standart apma	Standart Sapma	Standart Sapma	Standart Sapma	Standart Sapma	Standart Sapma
YG	1,767± 3,060	1,755± 3,040	1,536± 2,660	1,628± 2,820	0,317± 0,5500	0,2656± 0,4600
KHYG	1,772± 3,070	1,657± 2,870***	1,871± 3,240***	2,055± 3,560***	1,784± 3,090***	1,738± 3,010**
NŞYG	1,484± 2,570	1,593± 2,760**	1,669± 2,890***	1,472± 2,550***	1,617± 2,800***	0,6409± 1,110**
KHNŞYG	2,160± 2,010	1,236± 2,140*	1,738± 3,010***	1,865± 3,230***	1,715± 2,970***	1,767± 3,060**

*** P<0.001 ** P<0.01 * P<0.05

Tablo 6.8. Sıçanlardan alınan spermlerin Yüksek glikozlu farklı kültür ortamlarında 0, 1, 3, 6, 18 ve 24 saat canlılık oranları

Sıçandan elde edilen Spermlerin farklı kültür ortamlarındaki 3. saat teki inkübasyonundaki canlılık oranının grafiksel gösterilmesi **Grafik 6.9'**de gösterilmiştir.



TSBV Taze Sperm Besi Vasatı

NG Normal glikoz

KHNG Kök hücre + Normal glikoz

NŞNG Niş + Normal glikoz

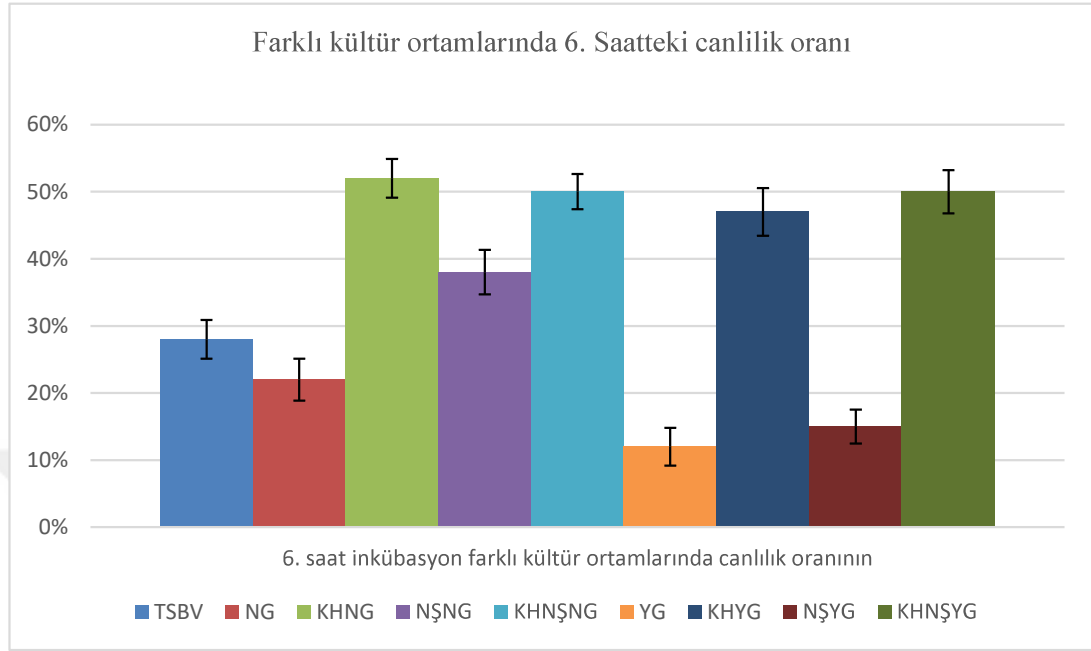
KHNŞNG Kök hücre + Niş + Normal glikoz

YG yüksek glikoz

KHYG Kök hücre +Yüksek glikoz

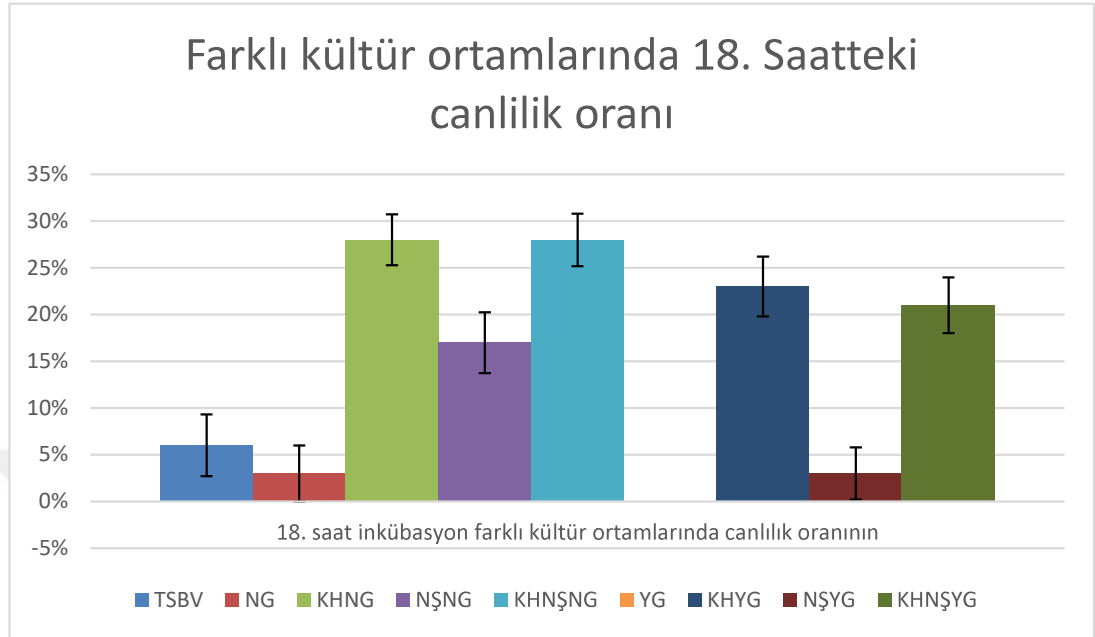
NŞYG Niş + Yüksek glikoz

Sıçandan elde edilen Spermilerin farklı kültür ortamlarındaki 6. saat teki inkübasyonundaki canlılık oranının grafiksel gösterilmesi **Grafik 6.10**'da gösterilmiştir.



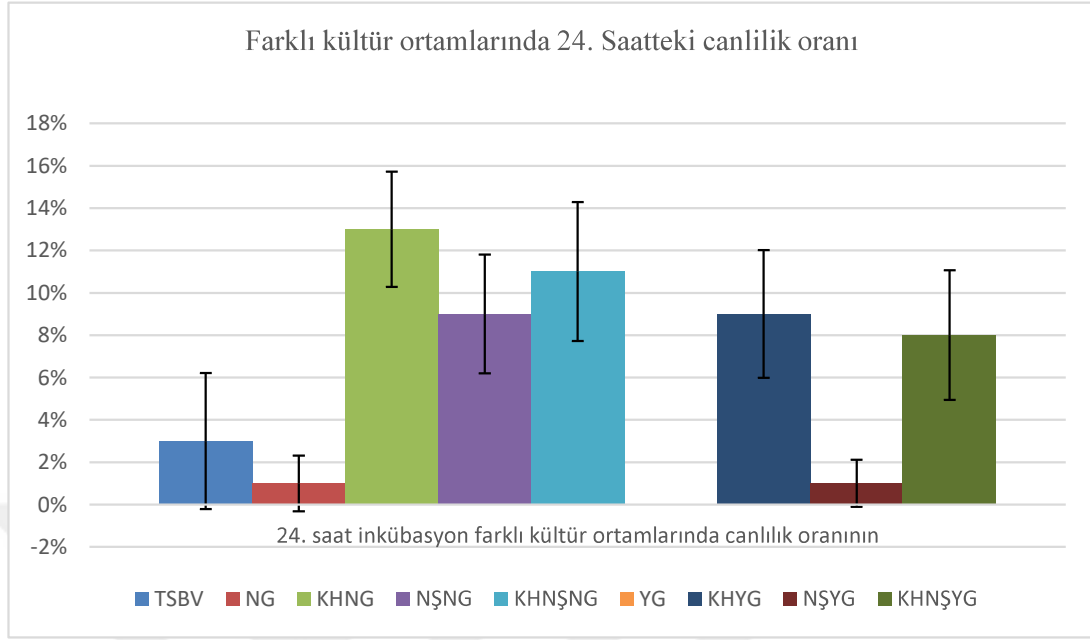
TSBV	Taze Sperm Besi Vasatı	KHNŞNG Kök hücre + Niş + Normal glikoz
NG	Normal glikoz	YG yüksek glikoz
KHNG	Kök hücre + Normal glikoz	KHYG Kök hücre +Yüksek glikoz
NŞNG	Niş + Normal glikoz	NŞYG Niş + Yüksek glikoz
		KHNŞYG Kök hücre + Niş + artı yüksek glikoz

Sıçandan elde edilen Spermilerin farklı kültür ortamlarındaki 18. saat teki inkübasyonundaki canlılık oranının grafiksel gösterilmesi **Grafik 6.11**'de gösterilmiştir.



TSBV	Taze Sperm Besi Vasatı	KHNŞNG Kök hücre + Niş + Normal glikoz
NG	Normal glikoz	YG yüksek glikoz
KHNG	Kök hücre + Normal glikoz	KHYG Kök hücre +Yüksek glikoz
NŞNG	Niş + Normal glikoz	NŞYG Niş + Yüksek glikoz
		KHNŞYG Kök hücre + Niş + artı yüksek glikoz

Sıçandan elde edilen Spermilerin farklı kültür ortamlarındaki 24. saat teki inkübasyonundaki canlılık oranının grafiksel gösterilmesi **Grafik 6.12**'de gösterilmiştir.



TSBV	Taze Sperm Besi Vasatı	KHNŞNG	Kök hücre + Niş + Normal glikoz
NG	Normal glikoz	YG	yüksek glikoz
KHNG	Kök hücre + Normal glikoz	KHYG	Kök hücre +Yüksek glikoz
NŞNG	Niş + Normal glikoz	NŞYG	Niş + Yüksek glikoz
		KHNŞYG	Kök hücre + Niş + artı yüksek glikoz

6.3. SPERM ÖRNEKLERİNİN KRIOPREZERVASYON SONRASI İNVERTED MİKROSKOP İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

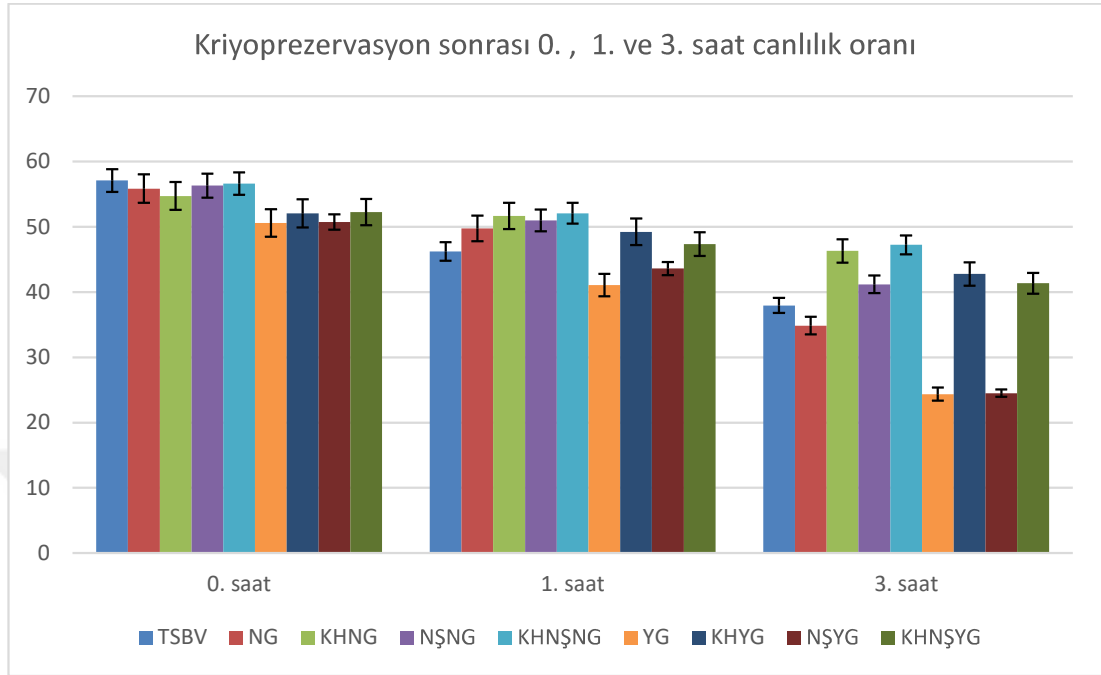
Farklı kültür ortamında spermilerin krioprezervasyon yöntemi kullanılarak donduruldu ve 3 saat inkübasyon süresince her bir gruba ilgili besiyeri inverted mikroskop incelenerek canlılık, yerinde hareketlilik ve hareketsizlik olarak incelendiler.

Sıçandan elde edilen Spermilerin krioprezervasyon sonrası farklı kültür ortamlarındaki değerlendirmesi **Tablo 7**'de gösterilmiştir.

TABLO 7. Sıçan sperminin farklı kültür ortamlarında kriyoprezervasyon sonrası 0. dakika, 1. saat, 3. saat değerleri

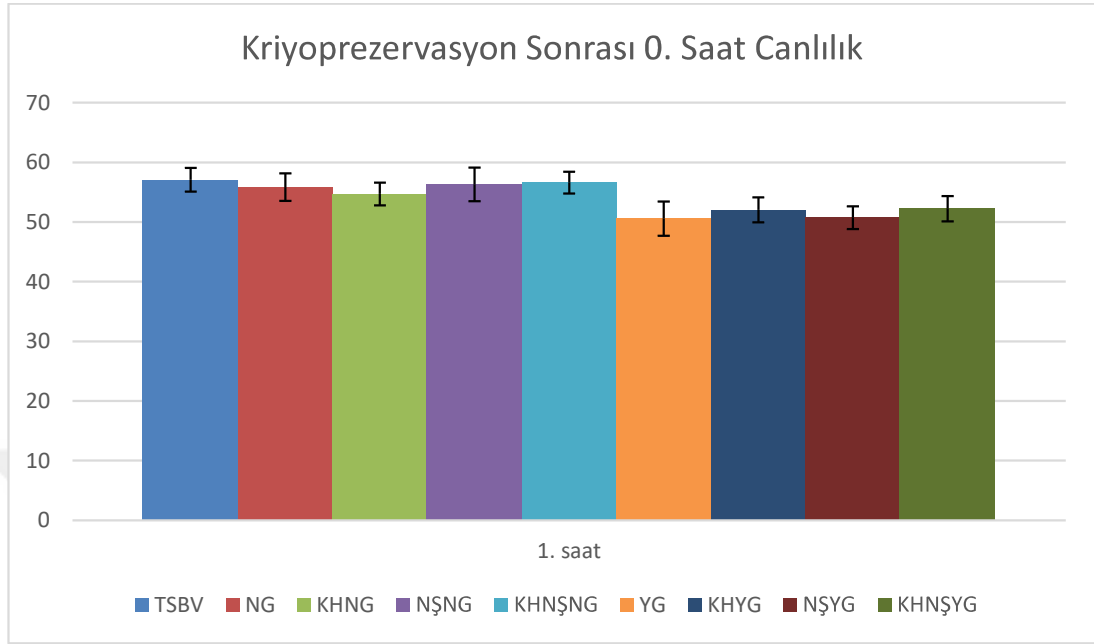
	0.Dakika	1.Saat	3.Saat
TSBV	57,08 ± 1,73	46,22±1,98	37,94±2,23
NG	55,85± 2,85	49,75±2,32	34,86±1,93
KHNG	54,71±2,14	51,67±1,89	46,29±1,37
NŞNG	56,31±3,07	50,97±2,84	41,18±2,82
KHNŞNG	56,61±1,85	52,07±1,83	47,23±1,81
YG	50,57±2,11	41,07±2,09	24,35±1,83
KHYG	52,04±2,17	49,23±2,1	42,77±2,26
NŞYG	50,74±1,17	49,79±1,9	40,51±2,02
KHNŞYG	52,24±2,01	57,01±1,49	41,34±2,1
TSBV:Taze Sperm Besi Vasatı	KHNŞNG Kök hücre + Niş + Normal glikoz		
NG:Normal glikoz	YG yüksek glikoz		
KHNG:Kök hücre + Normal glikoz	KHYG Kök hücre +Yüksek glikoz		
NŞNG:Niş + Normal glikoz	NŞYG Niş + Yüksek glikoz		
	KHNŞYG Kök hücre + Niş + artı yüksek glikoz		

Sıçandan elde edilen Spermilerin kriyoprezervasyon sonrası farklı kültür ortamlarındaki 0.dakika, 1, 3 Saatlik inkübasyonundaki canlılık oranının grafiksel gösterilmesi **Grafik 7.**



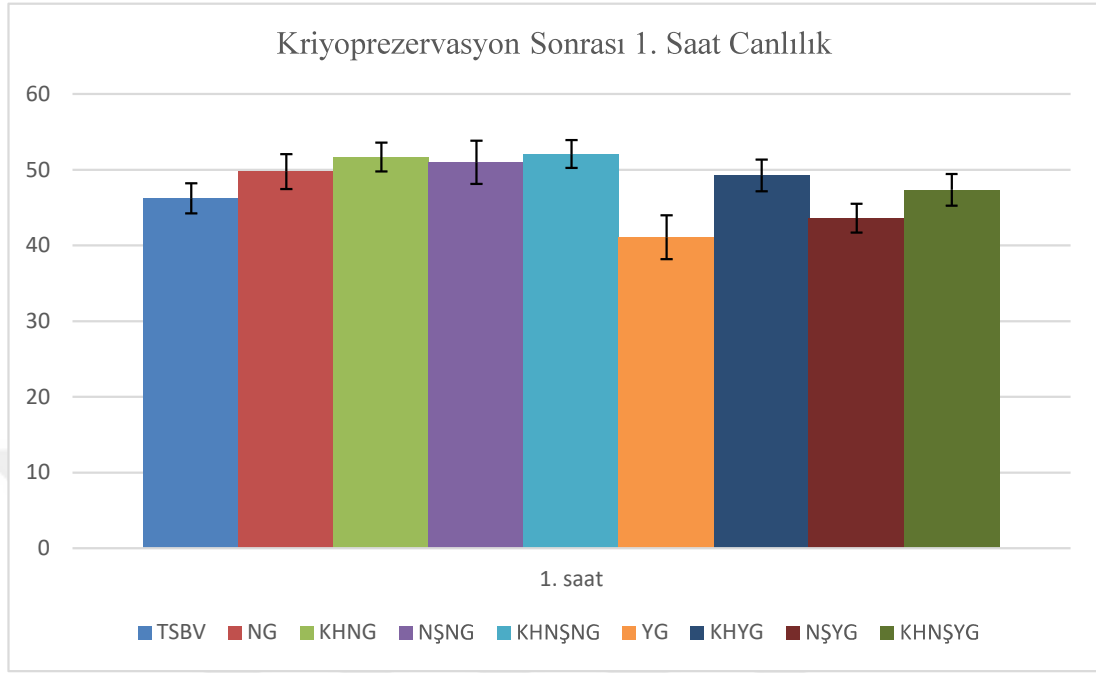
TSBV Taze Sperm Besi Vasatı	KHNŞNG Kök hücre + Niş + Normal glikoz
NG Normal glikoz	YG yüksek glikoz
KHNG Kök hücre + Normal glikoz	KHYG Kök hücre +Yüksek glikoz
NŞNG Niş + Normal glikoz	NŞYG Niş + Yüksek glikoz
	KHNŞYG Kök hücre+Niş+Yüksek glikoz

Sıçandan elde edilen Spermilerin kriyoprezervasyon sonrası farklı kültür ortamlarındaki 0 Saatlik inkübasyonundaki canlılık oranının grafiksel gösterilmesi **Grafik7.1.**



TSBV	Taze Sperm Besi Vasatı	KHNŞNG	Kök hücre + Niş + Normal glikoz
NG	Normal glikoz	YG	yüksek glikoz
KHNG	Kök hücre + Normal glikoz	KHYG	Kök hücre +Yüksek glikoz
NŞNG	Niş + Normal glikoz	NŞYG	Niş + Yüksek glikoz
		KHNŞYG	Kök hücre + Niş + artı yüksek glikoz

Sıçandan elde edilen Spermilerin kriyoprezervasyon sonrası farklı kültür ortamlarındaki 1 Saatlik inkübasyonundaki canlılık oranının grafiksel gösterilmesi **Grafik_7.2.**

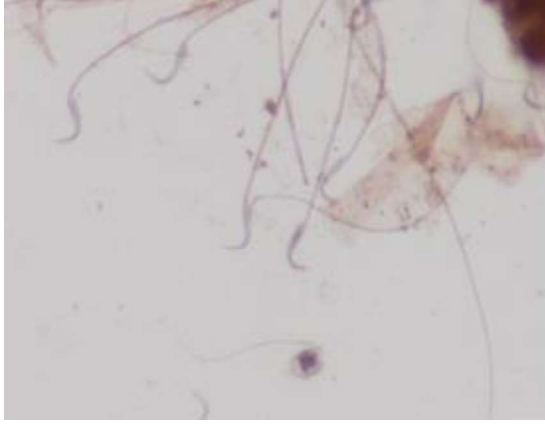


TSBV	Taze Sperm Besi Vasatı	KHNŞNG Kök hücre + Niş + Normal glikoz
NG	Normal glikoz	YG yüksek glikoz
KHNG	Kök hücre + Normal glikoz	KHYG Kök hücre +Yüksek glikoz
NŞNG	Niş + Normal glikoz	NŞYG Niş + Yüksek glikoz
		KHNŞYG Kök hücre + Niş + artı yüksek glikoz

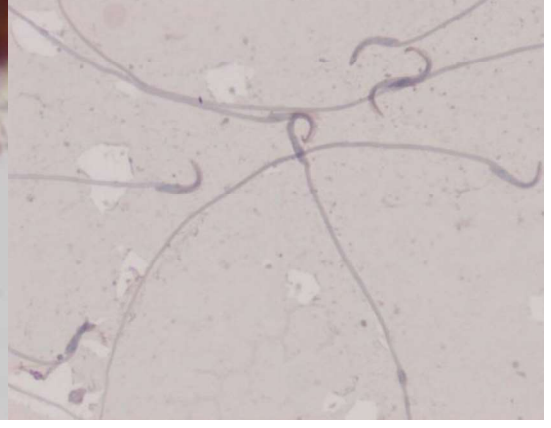
6.3. SPERM YAYMALARININ DİFF – QUICK BOYAMA İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

SpermİYogram değerlendirmesi sonucunda örneklerden hazırlanan yayma preperatları Diff – Quick boyama protokolüne uygun olarak boyanarak, spermier **Kruger** kesin kriterlerine göre morfolojik olarak değerlendirilmiştir (**Resim 4.3.**). Hazırlanan sperm yaymalarında, normal morfolojiye sahip spermier ile baş, boyun ve kuyruk anomalilerine sahip spermier Kruger kesin kriterlerine göre % olarak belirlenmiştir. Sperm morfolojilerinin değerlendirme sonuçları **Tablo 6.3.**'de gösterilmiştir.

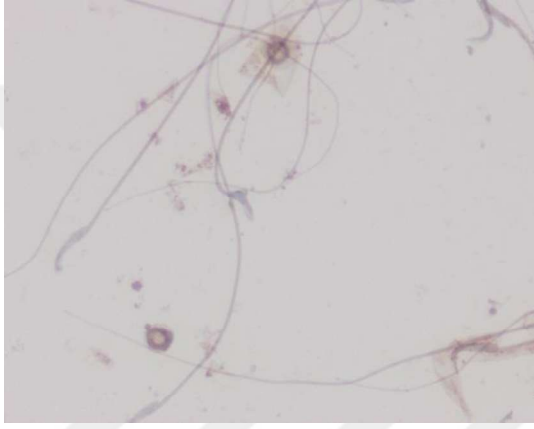
RESİM 6.3. DIFF QUICK BOYAMASI



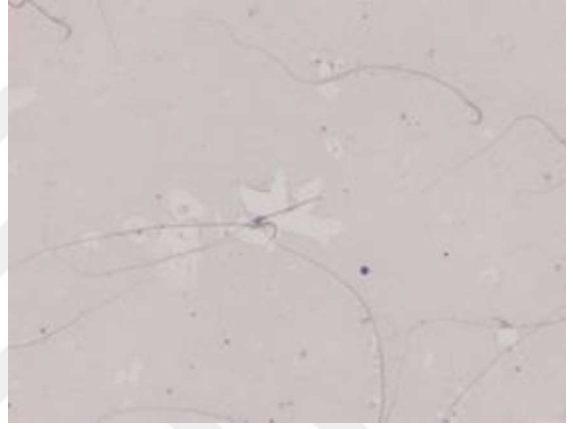
KHNŞNG X200



KHNG X200



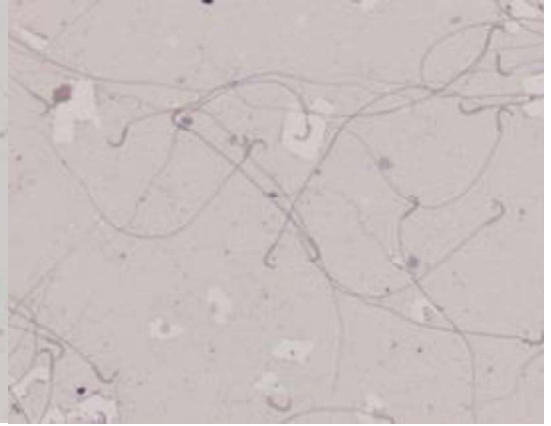
KHNŞYG X200



KHYG X200



NŞNG X200



NŞYG X200

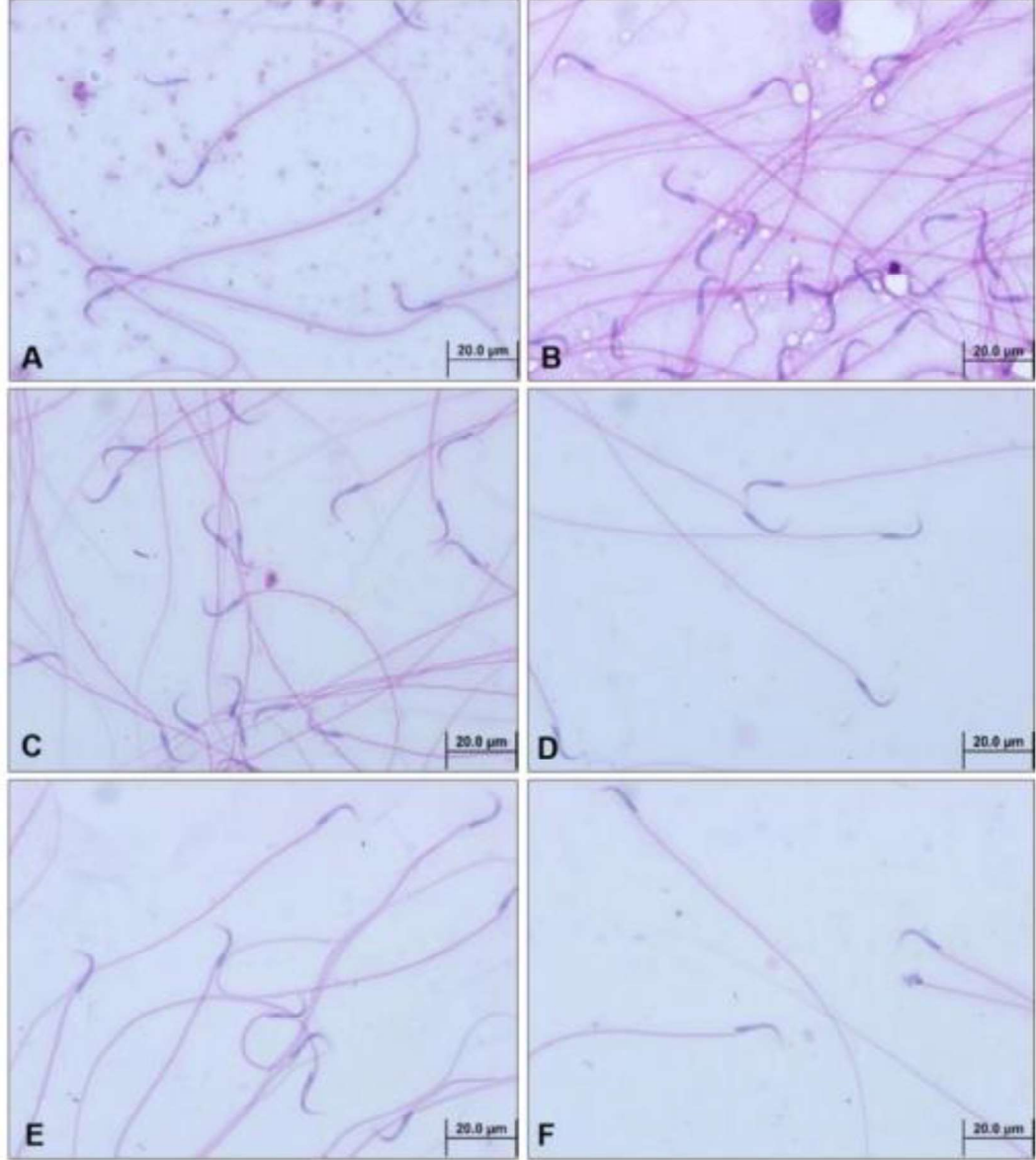
6.4. MİKROSKOBİK BULGULAR

6.4.1. H-E Histokimya Bulguları

Kontrol Grubu histolojik görüntülerde bu spermilerin morfolojik olarak varsa anamolileri görünüldü ve spermilerin kontrol grubu ve deney grupları arasındaki

farklılıkları morfolojik olarak karşılaştırıldı. Yapılan histolojik değerlendirmede spermilerin morfolojik olarak deney gruplar arasında bir farklılıkları olmadığı gözlemlendi. Morfolojik değerlendirmede spermilerin morfolojisi normal olarak belirlendi (Sancho,, Pérez-Sánchez, Tablado, & De Monserrat, 1998).

Resim 6.4.1 Hematoksilen Eosin Boyaması



A.Taze Sperm Besi Vasatı

B.Normal glikoz

C.Kök hücre + Normal glikoz

D .Kök hücre +Yüksek glikoz

F.Niş + Yüksek glikoz

E.Niş + Normal glikoz

6.4.2. NOS Boyamasına Ait Bulgular

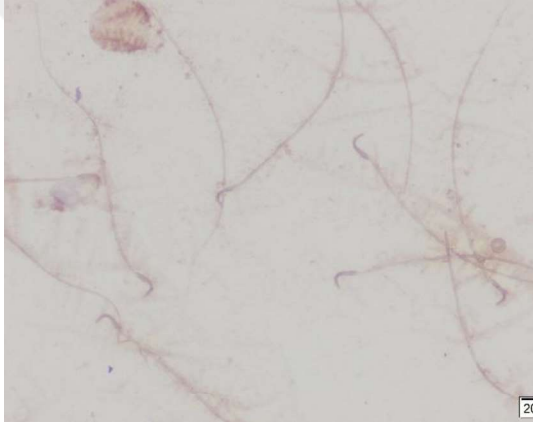
RESİM 6.4.2 ENOS BOYAMASI



KHNŞNG X200



KHNG X200



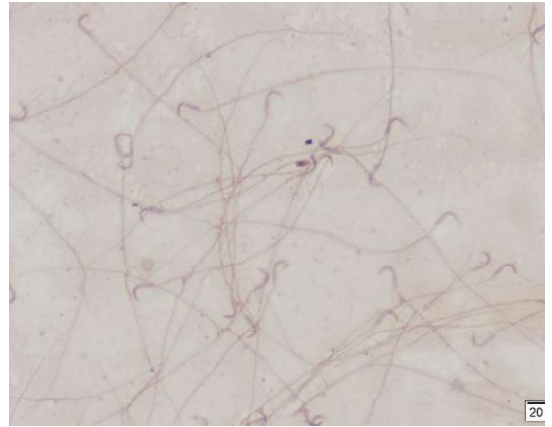
KHNŞYG X200



KHYG X200



NŞNG X200



NŞYG X200

TABLO 8. Farklı kültür ortamlarında yapılan E-nos boyamasının H-Skore değerleri

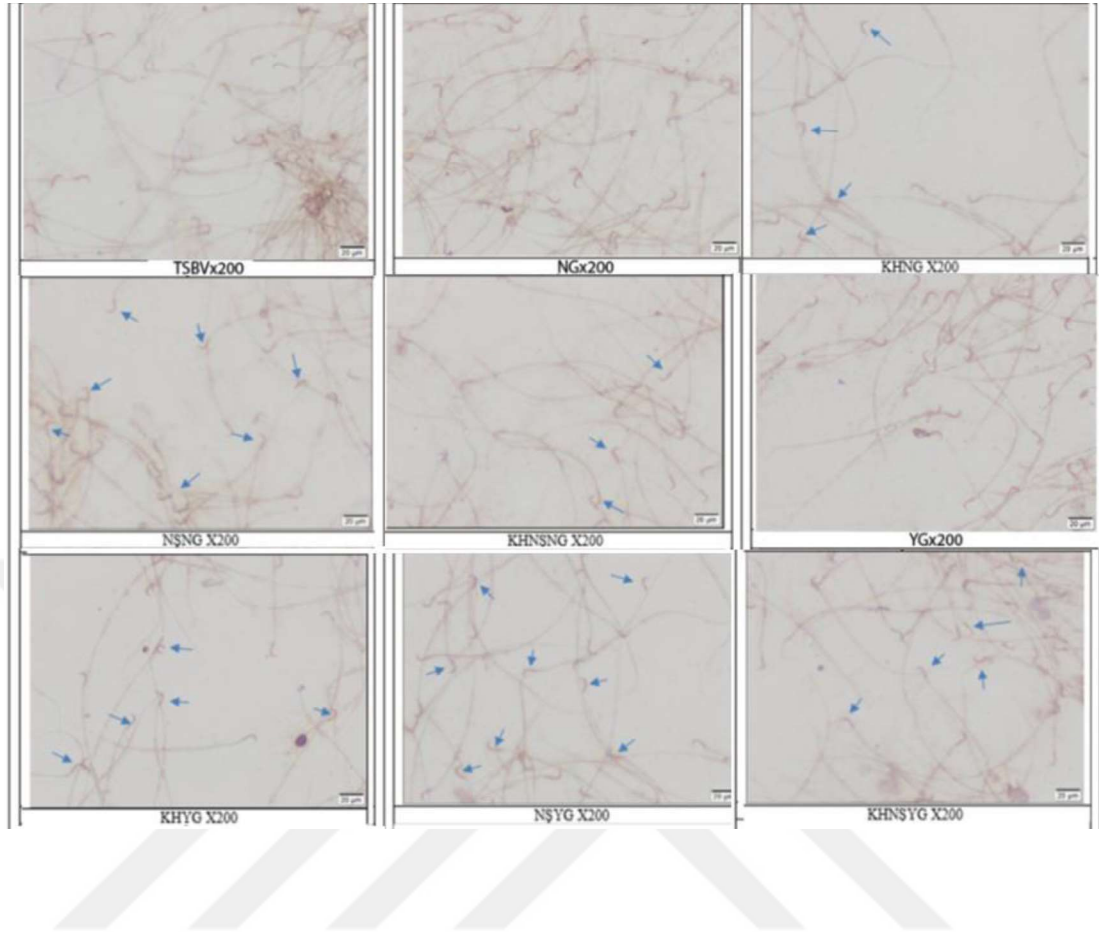
H-SKORE	NG	KHN G	NŞN G	KHNŞN G	YG	KHY H	NŞY G	KHNŞY G
Ort.	16,40	14,22	10,80	13,187	21,21	18,96	15,54	16,420
±	8	6	8	±	2	0	2	±
SD	±	±	±	22,840	±	±	±	28,440
	28,42	24,64	18,72	**	36,74	32,84	26,92	**
	0	0	0		0	0	0	
		*	*			*	*	
*** P<0.001 ** P<0.01 * P<0.05								

Dondurma sonrası NOS boyamasının arttığı ancak kök hücre ve nis uygulaması ile NOS boyamasının azaldığı görüldü.

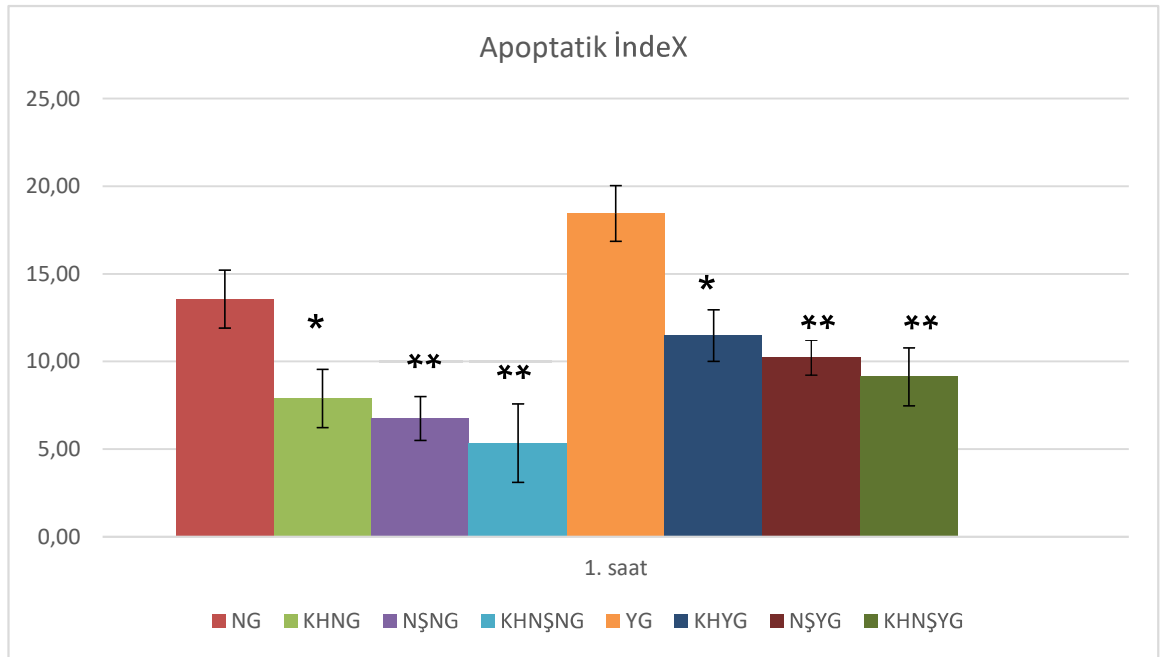
6.4.3 TUNEL Boyamasına Ait Bulgular

Zamana bağlı hücre ölümünün apoptoz ile gerçekleşen kısmını incelemek için TUNEL boyaması yapıp spermelerde baş boyun kısımları değerlendirildi. Kontrol ve deney gruplarının TUNEL boyama koyu kahverengi boyama (oklar) TUNEL-pozitif hücreleri gösterir.

Resim 6.4.3 Tünel Boyama sonuçları



Grafik 9. Farklı kültür ortamlarının apoptotik indeks değerlerinin grafiksel gösterimi



*** P<0,001 ** P<0,01 * P<0,05

TABLO 9. Farklı kültür ortamlarında yapılan Apoptatik indeks H-Skore değerleri

Apoptatik indeks	NG	KHNG	NŞNG	KHNŞNG	YG	KHYH	NŞYG	KHNŞYG
Ort.	0,9526	0,9584	0,7217	1,293	1,599	1,472	1,074	1,651
±	±	±	±	±	±	±	±	±
SD	1,650	1,660	1,250	2,240	2,770	2,550	1,860	2,86
		*	*	**		*	*	**

*** P<0.001 ** P<0.01 * P<0.05

NG, YG gruplarında zamana bağlı sperm hücre ölümleri ile ilgili oldukça anlamlı ($p<0,001$) bir şekilde artan apoptotik hücre sayısı TUNEL pozitifliği ile gösterirken;

KHNG, NŞGN, KHYG, KHNŞYG, KHNŞNG, KHYG, KHNŞYG, NŞYG uygulamalarında anlamlı ($p<0,05$) bir şekilde apoptotik hücre sayısının azaldığı saptandı.

7. TARTIŞMA

Erkek infertilitesi IVF merkezlerinde canlı doğum elde edebilmek açısından önemli bir problemdir. Tedavi sırasında hem siklusun düzenlenmesi açısından hemde uygun zamanda fertilizasyonu sağlamak için dondurma işlemi yapılmak zorundadır. Son çalışmalarda dondurma işleminin germ hücrelerinin fertilizasyon amaçlı kullanımlarında fonksiyonu artırdığı düşünülmektedir. Dondurma işleminin sperm üzerinde hasar verici etkisi bulunmaktadır. Diabete bağlı testis ve sperm hasarı uzun zamandan beri bilinmekte olup regüle olmuş diabetlilerde bile ÜYTE işlemlerinde sorun olmaktadır. Kültür ortamında yüksek glikoz ile taklit ettiğimiz ve model olarak kullandığımız diabetik sperm hasarı başarılı bir şekilde gösterildi. Çalışmamızda dondurma işlemi öncesi ve sonrasında epididimden elde edilmiş sıçan spermleri dış ortamda verilen sürelerde bırakılarak oksidatif stres ve apoptos a zorlandı. Bu zorlama sonucu oluşan hasarı önlemek amaçlı MKH ve salgıladığı faktörler olan koşullu besiyeri niş olarak kullanıldı. Dondurma öncesi 1,3,6,18,24 ve sonrası 3 ve 6. Saatlerde oluşan hasarda MKH ve niş inin anlamlı bir şekilde oksidatif stresi azalttığı ve apoptozu önlediği gösterildi. Oksidatif stres için yapılan nos boyamalarında H scor ile yapılan anelizde ve apoptotik indeks incelendiğinde MKH ve niş olumlu etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü.

ÜYTE deneysel çalışmalarında özellikle toksitite açısından sıçan kullanılması tercih edilmek ile beraber özellikle dondurma işleminin güçlüğü nedeniyle problem oluşturma bilmektedir. Dondurma sonrası sıçan sperminin üretimi, morfolojisi açısından yorumlanmakta zorluk çıkarmaktadır. Farklı yöntemler kullanılarak karşılaştırma yapılmış bir çalışmada sadece yonteme bağlı değişik sonuçların oluştuğu ve yorumlandığı görülmüştür. Bu yöntemler ile CASA incelemesi karşılaştırıldığında bu yöntemlere üstünlüğü tanımlanmış olsada yine de sonuçların yorumlanmasında güçlükler olduğu bildirilmiştir (Horst GV ve ark 2018). Bulgularımızda saptadığımız 0. Saat dondurma öncesi ve sonrası sperm eldesi parametreleri özellikle sperm sayısı ve motilitesi ile uyumlu bulundu.

Dondurma işlemi sadece insanlar için ÜYTE amaçlı değil aynı zamanda ziraatçiler hayvan besleyicileri ve özellikli deney hayvanı üretenler için önemli bir işlemdir. Pahalı ve zahmetli bir işlem olması nedeniyle dondurma yöntemlerinin

geliştirilmesi özellikle dondurma bankacılığı için önemli olmaktadır. Dondurma işleminde spermi alınan türün genetik karakteristikleri önemli rol oynamaktadır. Bu genetik karkteristikler spermin büyüklüğü ve morfolojisi ile ilgili değişiklikler içermektedir. Aynı zamanda membran fosfolipid kompozisyonu ve spermatazoa nın metabolizmasında bu genetik karakteristikten etkilenmektedir. Sıçan spermlerinin santrifüj, pipetleme ve ozmatik strese dondurma ve çözündürme işlemi sırasında çok duyarlı olduğu gösterilmiştir. Çözdürülmüş spermelerin sıçanlar için yapılan IVF de hala doyurucu bir yöntemi bulunamamıştır. Tüm protokollerde dondurucu ajan dondurma derecesinin sıfırın altında olması değişen ısı ve ozmatik basınç ve buz kristallerinin oluşması gibi problemlerle karşılaşmaktadır. Dondurma oranı optimalden yavaş veya hızlı olduğunda spermde geri dönüşü olmayan hasar yapar. Optimal olan yeterince yavaş bir şekilde hücrelerden suyun ayrılmasını sağlayacak ama hücre içi buz kristalleri oluşumunu engelleyecek şekilde olmalı aynı zamanda yeterince hızlı bir şekilde hücre dehidrasyonunu ve solüsyon effectine bağlı dondurma hasarındanda kaçınacak şekilde yapılmalıdır. İdeal bir sperm extendar optimim ph, bufer kapasitesi uygun ozmatik basınç ve spermin soğuk şokundan korucuyu olmalıdır. İdeal bir sperm extendar uygun içeriği ile sıçan sperminin dondurma hayatını anlamlı bir şekilde artırır. %20 latozlu yumurta yonku eklendiğinde dondurma sonrası azalan motiliteyi engellediği bulunmuştur. Dondurma sonrasında oluşan hasarda plazma membran bütünlüğü, akrozom bütünlüğü ve membran potansiyali çalışılarak gösterilmiştir. Dondurma sonrasında IVF için kullanılacak spermelerde canlılık ve hareket olmasına karşın fertilizasyon kapasitesinin olmadığı düşünülmüştür. Ancak dondurma işleminin IVF için seçilecek spermelerde hareketli olmasına karşın fertilize kapasitesi olmayan spermeleri ortadan kaldırdığında düşünülmektedir (Varisli O ve ark. 2013). Çalışmamızdaki bulgular literatürdeki bu bulgular ile uyumlu olup dondurma sonrası hasar gören canlı ve hareketli spermelerin MKH ve niş ile etkileşmesi sonrasında daha iyi bir fertilizasyon kapasitesine sahip olduğu düşünülmektedir.

Deneysel IVF amaçlı sıçan sperm krioprezervasyonunun ve sonrasında IVF ile gerçekleşen canlı doğumların ideal yöntemi hala araştırılmaktadır. Bu amaçla yapılan taze transferlerin sıçan için dondurulmuş spermelerden daha başarılı olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle hala sıçan IVF i için başarının artırılması çalışmaları devam etmektedir. ICSI ile yapılan sıçan IVF çalışmalarında intraselüler siklik amp ve serbest kolesterol düzeylerinin dondurulup çözündürülmüş rat spermatazoa larında düşük

düzeyde olduğu ve bu nedenle kapasitasyon ile ilgili trozin fosforilasyonun baskılanarak başarıyı engellediği bulunmuştur. IBMX gibi bir fosfodiesteraz inhibitörü kullanıldığında siklik amp düzeyi yükseltilirerek IVF başarısının arttığı ve canlı doğum sayısının yükseldiği saptanmıştır. Bir başka çalışmada ATP ve dibütirin siklik imp içeren ekstendırların daha başarılı IVF sonuçları verdiği düşünülmüştür. Sıçan sperm kuyruğunun diğer memeliler ile karşılaştırıldığında çok uzun olması dondurma sonrası başarısızlıkta önemli gözükmektedir. Bir diğer etkende sıçan spermlerinin düşük ısı ile olan etkileşimidir.bu etkileşim prematür kapasitasyon ve nüklear dekondanstasyon yaptığı bulunmuştur. Ancak bundan en önemli etken artan intraselüler ROS düzeyidir. Ekzozom transportundaki etkisi ile oksidatif fosforilasyona ve oldukça yüksek mitokondrial membran potansiyaline ve böyleyee mitokondrial atp üretebildiğine inanılmaktadır. Dondurma sonrası spermi etkileyen bir diğer faktör santrifüj olup insan sperminde akrozomu etkilediği düşünülmektedir. Ayrıca ROS üretiminde patlama yaptığıda gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada dondurma çözündürme sonrası hareketlilikte %15 ile %55 ileri doğru hareket ise %13 ile %78 arası azalmıştır. Santrifüj etmeninde %10 luk bir azalmaya neden olduğu görülmüştür. Hareketliliğin yanı sıra plazma membran bütünlüğünde ve mitokondrial membran potansiyali %10 ile %30 arası azaldığı gösterilmiştir. Bunu dondurulup çözündürölüp spermlerde daha az mitokondrial fonksiyonlar ile ilişkili olduğu düşünülmüştür.ROS oluşumu açısından bakıldığında ise soğutmanın bunu artırdığı dondurmanın daha artırdığı, dondurma çözdürmenin ise iyice artırdığı saptanmıştır. Ancak ROS oluşumunun spermler arasında farklılık gösterdiği ve değişik düzeyde oluştuğu saptanmıştır. Bütün bu gözlemlerin ayrı bir önemi de deneysel sıçan IVF uygulamalarında bu etkilerin fertilizasyon sonrası devam ettiği ve embriyo oluşumunu engellediği şeklinde uzun etkilerini göstermesidir. Bir başka dikkat edilmesi gereken noktanında sıçan ejakulat spermlerinin epidimal spermatozoalara göre özellikle membran lipidleri açısından çok daha fonksiyonel olduğu ve bu etkilere dirençli olduğu bilinmesidir. Ancak seminal plazma proteinlerin özellikle soğuk şoka bağlı hasarı dengeleyebilme yetenekleri vardır. Epidimal spermatoza nın bir başka yeteneği de oluşan strese karşı glukasyon peroksidaz, SOD ve katalaz faktörleriyle antioksidan kapasite göstermesidir. Ayrıca epidimal spermatozalar toplandıktan sonra eklenen faktörler ile bu antioksidan kapasitenin daha da güçlendirilmesi mümkündür. Krioprotektanların neden olduğu ozmatik hacim değişiklikleri kendi başınada oksidatif stres yapmaktadır. Santrifuj yaparkede uzun süreli ve düşük kraviteli yapmanın tüm

bu olumsuz etkileri kaldırabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda uyguladığımız yöntem uzun süreli ve düşük graviteli santrifüj olup literatür ile uyumlu bir biçimde santrifüj kaynaklı oksitadif stres yapmadığımızı düşünülmektedir (KİM S ve ark. 2012). Yağ kökenli MKH besiyerinden alınan ekzozomlar ile yapılan köpek semeninin dondurma çözme sonrası kalitesine etkisinin bakıldığı bir çalışmada ejakülattan elde edilen spermere ekzozom uygulaması yapılmıştır. Hareketlilik %47 den %56 ya canlı sperm %si %45 ten %56 ya membran bütünlüğü %48 den %56 ya, ve akrozom bütünlüğü %48 den %60 a çıkmıştır. İlgili genlere bakıldığında plazma membranının ANX -1, FN1 ve DYSP ile kromatin materyaninin H3 ve HMG1 genlerinin anlamlı bir şekilde ekzozom ile arttığı saptanmıştır. Böylelikle kök hücre ekzozomunun sperm hasarında kesin bir olumlu etki gösterdiği ortaya konmuştur (Qamar AY ve ark 2019). Yapılan nadir çalışmalardaki kök hücre etkisi literatür ile uyumlu olup çalışmamızda bulunan mükemmel etkiyi destekler niteliktedir.

Krioprezervasyonun sperm üzerindeki hasarı kobaylardada gösterilmiş olup nedeni morfolojik yapısına bağlanmıştır. Burada oluşan hasarın spermin radial ve aksial ısı stresine bağlı ekstra selüler buz kristali oluşumu ile ilişkilendirilmiştir ve dondurma esnasında kullanılan küçük çaplı plastik çubuk veya kapillerlerin bu hasarın artmasına neden olduğu gösterilmiştir (Fuchsberger, Teslovich, Flannick, Agarwala, & Koistinen, 2016). Çözme sonrasında iodixanol ve atp uygulaması ile sperm hasarının engellendiği ve hareketliliğin korunduğu gösterilmiştir. Ancak hasarı koruyucu etkinin çözme sonrası 10 dk sürdüğü 3. Saate gelindiğinde etkinin kalmadığı bulunmuştur (Kim & ve ark, 2016). Bu açıdan bakıldığında MKH ve koşullu besiyeri niş in 24 saate varan koruyucu etkisi mükemmelliğinin göstergesi olarak kabul edildi. Krioprezervasyonun toksik etkisinin insanda çalıştığı bir araştırmada sıçan testisler hücre süspansiyonu ile insan tübüler fragmantları karşılaştırılmış ve besiyerine eklenen Epidermal Büyüme Faktörü eklenerek çözme sonrası canlılık morfoloji ve gen ekspresyonu incelenmiştir. Canlılık ve fluid flow sitometri ile incelendiğinde immatür sıçan dokusu TEM ile hücre çoğalması ve farklılaşma İHK ve PCR ile bakılmıştır. İmmatür testis dokusunun krioprotektanlara daha duyarlı olduğu gösterilmiştir. Gliserol, DMSO ve etilen glikol ile yapılan korumada 1N spermatit, 2N spermatagonia ve 4N sparmatosit populasyonlarının korunduğu görülmüştür (Unni, Kasiviswanathan, D'Souza, Khavale, & Mukherjee, 2012).

Dondurma çözme sonrası spermde oluşan boğalarda çalışıldığı bir çalışmada hareket, canlılık ve atp içeriği açısından tüm örneklerde bulunan azalmanın ve ROS

artışının 25 farklı protein ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Mass spektrometri ile yapılan analizde heksokinas -1 adlı sperm glikolikid yolağında hareketle ilişkili katolitik enzimin önemli olduğu ayrıca kazein kinaz -2 alt ünitesi 2 adli diğer enzimin de sperm apoptozu ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Sperm flagellasında yerleştiği saptanan bu iki enzimin taze örneklerde çözündürülmüş olan örneklerle göre daha fazla miktarda olması hasarla ilgili belirteç olabileceğini düşündürmüştür (He & ve ark, 2016).

Çözdürme sonrası hasarın epigenetik etkiyle ilişkisini inceleyen bir başka çalışmada DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu sperm parametreleriyle ilişkili olarak araştırılmıştır. H3K9 asetilasyonu ve H3K4 metilasyonunun değişime uğradığı ve bunun hareketlilik, canlılık ve membran fonksiyonu ile ilişkili olduğu görülmüştür. Bu iki epigenetik etkinin dondurmaya bağlı hasarı önleyebileceği düşünülmüştür (Sallehi & Ark, 2020).

Evli çiftlerin yaklaşık %10- %15 i infertil olarak belirlenir. İnfertil çiftlere bakıldığında bunların yaklaşık %7'sinde azospermi söz konusudur. Tıkanıklık harici sorunlar da genellikle sorun sperm sayısının azlığı ya da var olan spermlerin sayıca yeterli olsa bile kalite olarak düşük olmasından kaynaklıdır (Guz, Gackowski, Foksinski, Rozalski, & Zarakowska, 2013). Ancak yakın tarihte kök hücre bazlı araştırmaların artması ile birlikte eğer genetik bir anomali söz konusu değilse kök hücre tabanlı iyileştirme çalışmalarının sperm kalitesi ve doğurganlığı için umut verici olduğu gözlenmiştir. Literatür incelemesinde erkek infertilitesi için kanıta dayalı tıp açısından çok az sayıda yayın bulunmaktadır (Santi, Spaggiari, & Simoni, 2018). Benzer şekilde MKH, faz çalışmalarını geçmiş özellikle dermatoloji, plastik cerrahi, ortopedi ve göğüs kalp damar cerrahisinde bir ürün olarak tedavide kullanılmaktadır. MKH nin germ hücreleri üzerindeki deneysel tedavi edici etkileri bilinmemektedir. Bu nedenle çalışmamızda erişkin sıçan testisinde yüksek glikoz ve normal glikoz ortamları yaratılarak diabetik ortam ve diabetik olmayan ortam taklit edildi. Veriler doğrultusunda diabetli ortam ve normal ortamda spermin zamana bağlı hasarında uygulamaların anlamlı bir şekilde hasarı geriletmediği ve hücreleri koruduğu görüldü. Özellikle sperm hücrelerinin hareketliliğinin korunmasında bu katkının önemi saptandı. Sperm canlılığı için dondurma öncesi oluşan hasarın dondurma sonrasında daha da ilerlediği MKH ve nişinin anlamlı bir şekilde canlılığı koruduğu izlendi. Yapılan birçok çalışmada farklı nedenlerle hasara uğrayan spermlere koruyucu amaçlı olarak bitki ekstraktları kullanılmış ve yararlı oldukları gösterilmiştir. Bu

çalışmamalarda semen parametrelerinin dondurma sonrasında hem artan oksidatif stres hemde azalan antioksidan kapasite nedeniyle anlamlı bir şekilde bozulduğu bulunmuştur (Forum, 2013). Bir başka çalışmada ise bitki ekstraktları gibi meletoninin de oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (Şen & ve Ark, 2018). Bu antioksidan etkinin AMP ile ilişkili protein Kinaz fosforilasyonu ile artan antioksidatif korumayı sağladığı gösterilmiştir (ark, 2019). İnsanda yapılan bir başka çalışmada humanin analogu ile desteği dondurma hasarını engellediği sperm parametrelerini oksidatif hasarını azaltıp apoptozu engelleyerek yükselttiği saptanmıştır (C. & Ark, 2019). Yapılan bir insan çalışmasında az miktarda NO ile yapılan stres tanıtımının oluşan büyük strese dondurma sonrası sperm hasarını azalttığı ve daha önemlisi insan spermatozoa sınıfı fare oositine yapılan ICSI işleminde 2 hücreli embriyo oluşumunda anlamlı bir farklı göstermiştir (Hezavehei M. & ve Ark, 2019).

Yapılan bir başka çalışmada kök hücre ekzozomları kullanılarak hasara uğramış spermelerde anlamlı bir korunmanın sağlandığı gösterilmiştir (Hsiao, Ji, Chang, & Chien, 2019). Bulgularımız literatür ile uyumlu bir şekilde olup özellikle diyabet gibi sistemik rahatsızlıklara bağlı sperm hasarında allejenik olarak kullanılabilir sağlıklı MKH ve nişinin anlamlı yararının daha kaliteli bir germ hücresini elde etmek için anlamlı olduğu düşünüldü.

Dişi genital yollarında spermin sağlıklı bir şekilde ilerleyebilmesi semen dondurma ve çözme prosedüründe membran hasarları nedeniyle önemli bir problemdir. Semen dondurması spermatozoanın iç faktörleriyle spermatozoayı etkileyen dilüsyon yapıcılarının konsantrasyonu, krioprotektif ajanın konsantrasyonu, dilüsyon oranı soğutmanın derecesi ve çözme aşamasındaki yöntemler sebebiyle sperm kapasitesini etkileyerek bu problemin oluşmasını sağlamaktadır. Dondurma sırasında oluşan oksidatif stres başlarda üretilen ROS nedeniyle özellikle motilite olmak üzere kapasite ve oosit ile fizyolojik azalmaktadır. Sperm hücrelerinin oldukça gelişmiş bir antioksidan kapasitesi bulunmasına rağmen bu denge aşıldığında spermde hasar dönüşümsüz olmaktadır. Yapılmış birçok çalışmada farklı antioksidanlar kullanılarak oksidatif stresin önlenildiği gösterilmiştir (Patil, Patil, Patil, & Nikam, 2014). Diyabete bağlı hasar ile oksidatif stres ve apoptoz a zorlama ile indüklediğimiz sperm motilite bozukluğunda MKH ve nişinin tüm parametreler içerisinde en anlamlı etkiyi gösterdiği bulundu. Bir çalışmada MKH nin insan sperminde vakuol ve dna fragmentasyon oluşumu iyileştirdiği belirtilmiştir (Bader, Ibrahim, & Mourad, 2019). Önceki çalışmalarda benzer bulgular olmasına karşı

çalışmamızda kullandığımız süreler ve zorlama düşünüldüğünde MKH ve nişinin katkısı UYTE merkezlerinde kullanımlarını sağlayabilecek şekilde kalite germ hücresi elde edebileceğini göstermektedir.

Kriyoprezervasyonun sıçan sperm hasarındaki etkisinin incelendiği bir çalışmada MKH kökenli ekzozom etkisi araştırılmış. Çözdürme sonrası canlılık, hareket, antioksidan kapasite parametreleri bakıldığında etkili bir uygulama olduğu görülmüştür. MKH için IL-OM, TGF beta, PG-e2, NO gibi anfilamatuar faktörler ile anti apoptozik faktörler statino kalsin -1, VEGF, EGF, IGF ve PGF2 ile etki oluşmaktadır. MKH tarafından salgılanan ekzozomlar ise hücre tarafından atılan mikrovezüküller olup parakrin etki ile çalışmakta ve birçok biyoaktif birleşik içermektedir. Ekzozomlar bir başka hücreye yapıştığında epigenetik ve fenotipik değişikliklere neden olur. Birçok trofik faktörü ve adezyon moleküllerini etkiledikleri bilinmektedir. Bu etkilerin çözdürülmüş spermlerdeki hasarı azalttığı düşünülmektedir. Oksidatif stresin sperm hücresinde yaptığı hasar antioksidanlar ile dengelenebilmektedir. MKH ekzozomlarının hem bu antioksidan etkiyi tetiklemekte, hemde antioksidan faktörlerin üretimi artırmaktadır. Ayrıca sperm membranının hidrofobik karakterini değiştirdiği düşünülmektedir. Bu etkinin oluşmasında CD29, CD44, CD54 ve CD106 üzerinden adezyon moleküllerini etkileyip membran yapısında değişiklik oluşturmaktadır. Adezyon moleküllerinde oluşan bu değişikliğin sadece çözdürme sonrası sperm hasarını azaltmakla kalmayıp aynı zamanda oosite yapışma kapasitesini artırıp fertilizasyondada etkili olduğu düşünülmüştür. Tüm bu etkiler ile ekzozomların potansiyali olan ve erkek infertilitesinde başarıyı artıracak bir ürün olabileceği düşünülmektedir (Mokarizadeh A. ve Ark. 2013). Bulgularımızda oksitafi stres belirteci olarak kullandığınız E-NOS için hasarda zamana bağlı olarak arttığı ve MKH ile niş kullanımı ile anlamlı bir şekilde azaldığı gösterildi.

Dondurma ve çözme işleminin sperm üzerinde önemli bir oksidatif stres oluşturduğu bilinmektedir. Farelerde yapılan bir çalışmada L-carnitine kullanılarak altı aylık dondurma sonrasında kromotin ve akrozom bütünlüğü, ROS ve GSH düzeyleri, mitokondrial aktivite ile Bax ve Bcl-2 mRNA düzeylerine bakıldığında tüm parametrelerde düzelmenin görüldüğü apoptozun gerilediği ve hareketin arttığı saptanmıştır (N. & Ark, 2020). Dondurma besiyerine eklenen biyoinositolün çözdürme sonrası sperm kalitesini artırıldığına gösterildiği bir çalışmada antioksidan kapasitenin arttığı TUNEL boyama ile gösterilmiş DNA fragmentasyonun önleniği

görülmüştür. Böylelikle normal morfoloji ve artmış hareketlilik olan spermeler elde edilmiştir (Mohammedi & ve Ark, 2019). Benzer şekilde dışarıdan dondurma besiyerine dışardan eklenen antioksidanların biyokimyasal oksidatif parametreleri azalttığı annexin işaretleme ve TUNEL yöntemi ile apoptozu önlediği ve dolayısı ile hareketliliği ve morfolojisi yüksek spermeler elde edildiği gösterilmiştir (Trzcińska & Bryła, 2015). Oksidatif strese bağlı olarak gelişen apoptoz sadece diabete bağlı hasarda geçerli bir mekanizması olmayıp erkek infertilitesine bağlı çoğunluk hastalıkta gerçekleşen bir mekanizmadır. TUNEL yöntemi ile ortaya koyduğumuz apoptotik ölüm zamana ve dondurma işlemine bağlı artışı MKH ve niş uygulaması ile germ hücrelerinin apoptozdan korunduğu bulundu.

KH; kendilerini yenileyebilme, sınırsız çoğalabilme, kendilerinden başka hücrelere farklılaşabilme, hasarlı dokuya verildiğinde hasarlı yapıyı onarabilme özellikleri ile tanımlanan hücre tipidir. KH bol miktarda bulunmaları, kolay elde edilebilmeleri, birçok hücre tipine farklılaşarak çoğalabilmeleri, alıcılara güvenli ve etkin bir şekilde nakledilebilmeleri nedeniyle rejeneratif tıp uygulamalarında tercih edilmektedir. MKH transplantasyonunun böbrek, kalp, barsak ve akciğer gibi dokulara uygulanmasıyla İ/R durumlarında antiinflamatuvar, antioksidan ve antiapoptotik etkiye bağlı olarak doku hasarlarının azaldığı gösterilmiştir. TNF alfa, interferon gama, interlökin ve immün hücreler üzerinden etkisi vardır. Diabetik hasar sonrası KH kullanılması oksidatif stress ve apoptozu azaltarak sperm hücrelerini korumakta ve benzer etki ve olumlu katkı sağlayarak daha da önemli bir fonksiyon sağlamaktadır.

MKH farklılaşmamış hücre grubu olup kanıta dayalı tıpta faz çalışmalarını geçip özellikle dermatoloji, plastik cerrahi ve ortopedi olmak üzere tıbbın her alanında giderek artan bir şekilde hücresel tedavi ürünü olarak kullanılmaktadır. MKH için uluslararası standart olarak CD73, 90 ve 105'i eksprese etmesi ancak CD11b, 14, 19, 34, 45 ve 79'a y1 eksprese etmemesi istenmektedir. Bir çalışmada MKH nin testise verilmesi artan LH ve FSH düzeylerinin MKH uygulaması ile anlamlı bir şekilde geriletildiği gösterilmiştir. Araştırmacılar TNF α , IFN γ , interlökinler ve immün sistem belirteçlerinin değişmemesinin MKH için bu hasarda antiinflamatuvar etkinin olmaması şeklinde yorumlamışlardır (Azizollahi S. , Aflatoonian, Gilani, & Behnam, 2016).

Yine farklı bir çalışmada 43 ° C' yüksek sıcaklık stresine maruz kalan testiste sperm sayısının morfoloji ve testis yapısının bozulduğu görüldü. MKH uygulamasından 12 gün sonra testiküler seminifer

tübüllerindeki spermatojenik hücreler, düzensiz ve gevşek bağ dokusu yapısı, azalmış mezenkimal hücreler ve artmış otofaji gösterdinin giderildiği gösterildi (Ma, et al., Efficient and safe recipient preparation for transplantation of mouse spermatogonial stem cells: pretreating testes with heat shock, 2011). Yapılan çalışmada Kemoterapik tedavi ajanlarının uygulanması sonrası oluşan testiküler hasar modelinde BM-MSc (2x10⁶ tek bir doz intravenöz olarak enjekte edilmiştir 6 hücre).

Üçüncüsü, intraperitoneal olarak tek bir Dox dozu (ağırlıkça 5 mg / kg) enjekte edildi. BM-MSc'ler, sperm konsantrasyonunu artırarak ve anormal sperm oranını azaltarak Dox'un vücut, testis ağırlığı ve sperm kalitesi üzerindeki zararlı etkilerine karşı iyileştirici rol oynadı. BM-MSc'ler yüksek malondialdehit seviyesini azaltarak ve antioksidan kapasitesini artırarak testiküler oksidatif stresi önemli ölçüde azalttı. Histolojik olarak, testiküler atrofi, spermatogenezde ciddi hasar ve Dox'ın neden olduğu seminifer tübüllerin çapının ve üreyen hücresi tabakası kalınlığının önemli ölçüde azalması BM-MSc'lerin uygulanmasından sonra önemli ölçüde iyileşti (Abdelaziz, Salah EL-Din, El-Dakdoky, & Ahmed, 2019).

MKH etkisinin overdeki torsiyon uygulaması için yapılan bir çalışmada 1x10⁶MKH 2 saatlik torsiyon sonunda ovaryumlara enjekte edildiğinde medulla bölgesinde olan şiddetli hemorajin, primordial folikül sayısında azalmanın ve atriyal folikül sayısında artmanın yanı sıra apoptotik indekste ve MDA miktarında artış gibi bulguları tersine çevrildiği saptanmıştır. Bu anlamda en az bilinen etkisi üreme sisteminde olup erkek infertilitesi açısından daha da az bilgi bulunmaktadır. Yapılan bir sıçan deneyinde MKH transplantasyonu yapılarak steril testislerde etkisi incelenmiştir. Busülfan ile endojen spermatogenezin durdurulduğu testislerde BrDU ile işaretlenmiş hücreler testise transplante edildiğinde 25 spermatogonia 55 spermatosit ve 5x10⁶ spermatozoanın bulunduğu bir testis elde edilmiştir. Kontrol grubundaki 33 spermatogonia 64 spermatosit ve 10x10⁶ spermatozoanın sayıları ile karşılaştırıldığında MKH için oldukça anlamlı bir etkinin bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca spermatogenez üzerindeki etkisi çok daha etkili olup 32 sayısının 63'e çıkartmıştır. İşaretlenmiş hücrelerin spermatogonia ve spermatozoaya farklandığı hem seminifer tübüller içerisinde hem de interstisyel hücreler arasında bulundukları gösterilmiştir. Bir başka çalışmada 7200 ve 24 saatlik torsiyon uygulanan grupta 2x10⁶ MKH 0,5 ml insülin enjektörü ile testis içine enjekte edilerek 0 ile 3 arasında johnsen skoru olarak oluşan hasar az miktarda düzelme göstermiştir. 2 saatlik torsiyonu takiben spermatogonial kök hücrelerin transplante edildiği farelerde 8 hafta sonrasında

epididim sperm profilinin, johnsen skorunun, plzf, GFRA-1, SCF-1 ve TEKT ekspresyonlarının bozulan hasarlı testislerde geri döndürüldüğü saptanmıştır (Azizollahi S. , Aflatoonian, Sedigi-Gilani, Jafarabadi, & Behnam, 2014) (Cao, Xue, Jia, & Xu, 2011). Benzer şekilde kökenli endotelyal progenitör kök hücreler transplante edildiğinde de seminifer tübül epitelinin ve apoptotik hücrelerin düzeldiği gösterilmiştir (Sekerci, Tanidir,, Sener, & Sener, 2017).

Diabetin testis ve sperm üzerindeki hasarı uzun zamandan beri bilinmekte olup infertilite ile ilişkisi ortaya konmuştur. Erkek infertilitesinde tübüllerinde hücre bozulmaları, sertori ve spermatogonia da vakolizasyon ve azalan sperm konsantrasyonları birçok çalışmada gösterilmiştir. Sperm dondurma ve çözme işlemi diabetik vakalarda daha da önemli hale gelmektedir. IVF işlemi için istenilen düzeyde sperm eldesinde o hasarların azaltılması için birçok farklı ekstrak denenmiş ve yararlı oldukları gösterilmiştir (Niven M.J ve ark 1995) (Coleripourd M.J. ve ark 2011). Diabetik hasarın spermelerde literatüre paralel şekilde sperm hareketlilik düzeyleri, sperm ölüm sayısı ve zamana bağlı hasarı MKH uygulamamız bu hasarlarının gerilemesi sağlayarak sperm kalitesi, hayatta kalma süresi ve dölleme kapasitesini iyileştirdiği görüldü (Shimizu, Tsounapi, Dimitriadis,, Higashi, & Shimizu, 2016) (Razi, et al., 2020).

Sperm grupları hareket kabiliyeti, sperm kalitesi, canlılığı ve apoptoz düzeyi değerlendirildiğinde yirmidört saatlik değişimde bu gruplardan sadece kök hücre ve nişinin uygulandığı gruplarda hasarlanma daha az olduğu ortaya kondu. Kök hücre, Niş in sperm kalitesi hareket kabiliyetine sperm olgunlaşmasına canlılık süresinin uzatılmasına önemli etkisi olduğunu gözlenledik. İVF açısından kök hücrenin ve nişinin sperm canlılığına önemli ölçüde katkı sağladığını gösterdik.

Sonuç olarak kök hücre uygulamalarının infertiliteye yönelik tedavi için bir umut olmakla kalmayıp koruyucu bir yaklaşım olarak kullanılabileceği görüldü. Ayrıca mezenkimal kök hücre tedavisinin zarar vermeme anlamında etkinliği ve güvenilirliği çalışmamızın sonuçlarını daha da önemli hale getirmektedir. Kök hücre uygulamalarının germ hücresine yaptığı etkilerin mekanizmalarının anlaşılması IVF için hala yeterli olmayan başarının artmasını sağlamada büyük önem taşıyacaktır (Duran-Retamal, ve diğerleri, 2020).

Çalışmamızda MHK uygulamalar ile yapılan birçok çalışma ile uyumlu bulundu.

8. SONUÇ VE ÖNERİ

Bu çalışmada kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası diabetik besiyerinde zamana bağlı sperm hasarı incelendi. MKH ve ikigünlük besiyerinde salgıladıkları faktörler olan niş koşullu besiyeri olarak kullanıldı. İstatistiksel olarak anlamlı bir biçimde sperm canlılığını ve hareketini olumlu yönde etkilediği görüldü.

MKH uygulamasının diabetik besiyeri ortamında sperme verdiği hasarı antioksidan ve antiapoptotik etki yaparak azalttığı ve böylece iyileştirici bir etkiye bulunduğu gösterildi. İmmünohistokimyasal analizlerin verileri ile eNOS sonucu oluşan oksidatif stres ve TUNEL ile gösterilen apoptozun MKH ve MKH nişi birlikte kullanımlarına bağlı anlamlı bir şekilde azaldığını saptadı.

Yaptığımız spermatozoon morfoloji ve sayım analizlerinde ile morfoloji, sayı ve hareket bozukluklarının MKH ve özellikle birlikte kullanımlarına bağlı anlamlı bir şekilde düzeldiği ortaya kondu.

Bulgularımız klinikte önemli bir sorun olan invitro ortamda zaman bağlı hasara uğrayan spermelerin MKH ve nişi birlikte kullanımlarının yüksek glikoz ve normal glikoz ortamda etkili bir tedavi olabileceğini göstererek spermelerin invitro yaşam süresini uzatmıştır.

Bu gözlemler oligosperm gibi erkek infertilitesi durumlarında çok kıymetli olan yaşayan az spermelerin hayatta kalabilmesi için invitro ortamda dondurma çözündürme solüsyonlarına eklenebilecek ayrıca IVF besiyerlerinde kullanılabilecek bir ürün olarak MKH ve nişinin maliyetlerin azaltılması anlamında infertil olabilecek erkekler için sosyal yönü ile anlamlı bir katkı sağlayacakları düşünüldü.

Gelecek için önemli bir öneri olarak MKH'nin uygulanması toksik ve yan etkisinin bulunmadığı için tüp bebekte invitro insan çalışmalarının başlatılması gerektirdiğine işaret etmektedir.

9. KAYNAKÇA

Abdelaziz, M. H., Salah EL-Din, E. Y., El-Dakdoky, M. H., & Ahmed, T. A. (2019). The impact of mesenchymal stem cells on doxorubicin-induced testicular toxicity and progeny outcome of male prepubertal rats. *Birth defects research*, 906-919.

Agarwal, A., Majzoub, A., & Baskaran, S. (2020). Sperm DNA fragmentation: A new guideline for clinicians. *The World Journal of Men's Health*, 412.

ark, Z. v. (2019).

Aydın, İ., Berber, N., & Cevahir, Ç. (2019). *Gömeç M, Siçanlarda Ganoderma lucidumun mezenter iskemi- reperfüzyon hasarı üzerindeki iyileştirici etkileri, 2017*. Denizli: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi AD.

Ayvaz, S., Inan, M., Aksu, B., Karaca, T., Cemek, M., Ayaz, A., & Pul, M. (2014). Desferrioxamine effectively attenuates testicular tissue at the end of 3 h of ischemia but not in an equal period of reperfusion. . *Journal of pediatric urology*, 550-558.

Azizollahi, S., Aflatoonian, R., Gilani, M., & Behnam, B. (2016). Alteration of spermatogenesis following spermatogonial stem cells transplantation in testicular torsion-detorsion mice. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 771-781.

Azizollahi, S., Aflatoonian, R., Sedigi-Gilani, M. A., Jafarabadi, M. A., & Behnam, B. (2014). Recruiting testicular torsion introduces an azoospermic mouse model for spermatogonial stem cell transplantation. *Urology journal*, 1648-1655.

Bader, R., Ibrahim, J., & Mourad, A. (2019). Improvement of Human Sperm Vacuolization and DNA Fragmentation Co-Cultured with Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Secretome: In Vitro Effect. *International journal of stem cells*, 388.

Barry, F., & Murphy, J. (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 568-584.

Bingöl, S., Deprem, T., Koral Taşçı, S., & Kocamış, H. (2011). Immunohistochemical localization of catalase in geese . liver. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 77-81.

Branco, C., Garcez, M., Pasqualotto, F., & Erdtman, B. (2010). Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. *Cryobiology*, 235-237.

Brock, D. (2006). Is a consensus possible on stem cell research? Moral and political obstacles. *Journal of Medical Ethics*, 36-42.

Buffone, M., Ijiri, T., Cao, W., & Merdiushev, T. (2012). Heads or tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility. *Molecular reproduction and development*, 4-18.

Bunge, R., & Sherman, J. (1953). Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature*, 767-768.

C., Y., & Ark, v. (2019).

Câmara, D., Silva, S., Almeida, F., & Nunes, J. (2011). Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. *Theriogenology*, 342-350.

Cao, P., Xue, J. X., Jia, R. P., & Xu, L. W. (2011). Effects of endothelial progenitor cells on spermatogenic functions in testicular detorsion in rats. *Zhonghua yi xue za zhi*, 2135.

Celik, S., Ozkavukcu, S., & Celik-Ozenci, C. (2020). Altered expression of activator proteins that control follicle reserve after ovarian tissue cryopreservation/transplantation and primordial follicle loss prevention by rapamycin. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2119-2136.

Chiu, P., Chung, M., Tsang, H., & Koistinen, R. (2005). Glycodelin-S in human seminal plasma reduces cholesterol efflux and inhibits capacitation of spermatozoa. *Journal of Biological Chemistry*, 25580-25589.

Cohen-Bacrie, P., Belloc, S., Ménézo, Y., Clement, P., & Hamidi, J. (2009). Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1,633 patients. *Fertility and sterility*, 1801-1805.

  elik, S. (tarih yok). *Askorbik asit, glutatyon ve taurin kompleksinin sperm kriyoprezervasyonuna motilite ve DNA fragmentasyonu açısından etkisi* . Master's thesis, Maltepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

  etin, C., &   etin, M. (2014). Dünden Bugüne Yardımla   reme Teknikleri. *Ar ıv Kaynak Tarama Dergisi*, 148-155.

Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., & Treviño, C. (2011). Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiological reviews*, 1305-1355.

Delilba ı, L. (2008). *  n Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Y  ntemleri*. Ankara: G  ne  Tıp Kitapevleri.

Duran-Retamal, M., Morris, G., Achilli, C., Gaunt, M., Theodorou, E., & Saab, W. (2020). Live birth and miscarriage rate following intracytoplasmic morphologically selected sperm injection vs intracytoplasmic sperm injection: An updated systematic review and meta-analysis. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, 24-33.

Ehmcke, J., & Schlatt, S. (2008). Animal models for fertility preservation in the male. *Reproduction*.

Elshal, M., El-Sayed, I., Elsaied, M., & El-Masry, S. (2009). Sperm head defects and disturbances in spermatozoal chromatin and DNA integrities in idiopathic infertile subjects: association with cigarette smoking. *Clinical biochemistry*, 589-594.

Erdoğan, D., Hatiboğlu, M., Görgün, M., & Ilgaz, C. (1996). *  zel Histoloji*. Ankara: Baskı SBAD Yayınları.

Erdoğan, M., Şahin, E., & Dinçel, S. (2013). EMBRİYO İMPLANTASYONUNUN MOLEKÜLER MEKANİZMASI. *Journal of Human Rhythm*, 311-322.

Eren, S., Zırh, E., & Zeybek, N. (2020). Effect of benzalkonium chloride addition to EDTA on attachment and proliferation of dental pulp stem cells on dentin and on transforming growth factor- β 1 release. *Odontology*, 1-8.

Eroschenko, V., & di Fiore. (2007). *Histoloji Atlası: Fonksiyonel İlişkileriyle*. Ankara: PALME YAYINCILIK.

Fattah, A., Sharafi, M., Masoudi, R., Shahverdi, A., & Esmaeili, V. (2017). 1-Carnitine in rooster semen cryopreservation: flow cytometric, biochemical and motion findings for frozen-thawed sperm. *Cryobiology*, 148-153.

Feldschuh, J., Brassel, J., Durso, N., & Levine, A. (2005). Successful sperm storage for 28 years. *Fertility and sterility*, 1017-e3.

Ferrari, S., Paffoni, A., Reschini, M., Noli, S., & Dallagiovanna, C. (2020). Variables affecting long-term usage rate of sperm samples cryopreserved for fertility preservation in cancer patients. *Andrology*.

Forum, E. o.-t. (2013). Soleimanzadeh, Ali, and Adel Saberivand. "Effect of curcumin on rat sperm morphology after the freeze-thawing process." *Veterinary Research Forum*. Vol. 4. No. 3. Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran, 2013. *In Veterinary Research Forum*, 185.

Fuchsberger, C., Teslovich, T., Flannick, J., Agarwala, V., & Koistinen, H. (2016). The genetic architecture of type 2 diabetes. *Nature*, 41-47.

Gatimel, N., Moreau, J., Parinaud, J., & Léandri, R. (2017). Sperm morphology: assessment, pathophysiology, clinical relevance, and state of the art in 2017. *Andrology*, 845-862.

Ghoryani, M., Shariati-Sarabi, Z., Tavakkol-Afshari, J., & Mohammadi, M. (2020). The Sufficient Immunoregulatory Effect of Autologous Bone Marrow-

Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation on Regulatory T Cells in Patients with Refractory Rheumatoid Arthritis. *Journal of Immunology Research*, 2020.

Gneist, N., Keck, G., Zimmermann, A., Trinkaus, I., Kuhlisch, E., & Distler, W. (2007). Glycodelin binding to human ejaculated spermatozoa is correlated with sperm morpholog. *Fertility and sterility*, 1358-1365.

Guz, J., Gackowski, D., Foksinski, M., Rozalski, R., & Zarakowska, E. (2013). Comparison of oxidative stress/DNA damage in semen and blood of fertile and infertile men. *PLoS One*, e68490.

He , Y., & ve ark. (2016).

Hess, R., & De Franca, L. (2009). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *In Molecular mechanisms in spermatogenesis* , 1-15.

Hezavehei M., & ve Ark. (2019).

Hinting, A., & Agustinus, A. (2019). *Recent updates of sperm cryopreservation technique: a literature review*.

Hsiao, C., Ji, A., Chang, C., & Chien, M. (2019). Mesenchymal stem cells restore the sperm motility from testicular torsion-detorsion injury by regulation of glucose metabolism in sperm. *Stem cell research & therapy*, 270.

Jangueria, L., Carneiro, J., & Kelley, O. (1998). Temel histoloji . BarıÇ kitabevi.

Jayendran, R., Van der Ven, H., & Zeneveld, L. (1992). The hypo-osmotic swelling test: an update. *Arch Androl*, 105-16.

Kapoor, R. (2021, 01 10). *Spermatogenesis*. slideshare: <https://www.slideshare.net/opkholwad/spermatogenesis-81924391> adresinden alındı

Kierszenbaum, A. (2006). *Histoloji ve hücre biyolojisi*. Ankara: Palme Yayıncılık.

Kim, S., & ve ark. (2016).

Lee SJ ve ark 2006. (tarih yok). P. A. Schover LR. içinde

Livak, K., & Schmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *methods*, 402-408.

Ma, W., An, L., Wu, Z., & Wang, X. (2020). Coating biomimetic nanoparticles with chimeric antigen receptor T cell-membrane provides high specificity for hepatocellular carcinoma photothermal therapy treatment. *Theranostics*, 1281.

Ma, W., An, L., Wu, Z., Wang, X., Guo, M., & Miao, K. (2011). Efficient and safe recipient preparation for transplantation of mouse spermatogonial stem cells: pretreating testes with heat shock. *Biology of reproduction*, 670-677.

Mohammedi , F., & ve Ark. (2019).

N., R., & Ark, v. (2020).

Nijs, M., & Ombelet, W. (2001). Cryopreservation of human sperm. *Human fertility*, 158-163.

Özcan, Ö. (2017). Streptozotosin (stz) ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda kuersetin'in testis dokusuna etkisi. *Master's thesis, ESOGÜ*.

Özdal-Kurt, F., Shariati-Sarabi, Z., Tavakkol-Afshari, J., & Mohammadi, M. (2020). The Sufficient Immunoregulatory Effect of Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation on Regulatory T Cells in Patients with Refractory Rheumatoid Arthritis. *Journal of Immunology Research*.

Özdal-Kurt, F., Şen , B., Tuğlu, I., Vatansever, S., & Türk, B. (2016). Attachment and growth of dental pulp stem cells on dentin in presence of extra calcium. *Arch Oral Biol*, 131-41.

Özdal-Kurt, F., Tuğlu, I., Vatansever, H., & Tong, S. (2015). The effect of autologous bone marrow stromal cells differentiated on scaffolds for caninetibial bone reconstruction. *Biotech Histochem*, 516-28.

Paasch, U., Sharma, R., Gupta, A., & Grunewald, S. (2004). Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biology of reproduction*, 1828-1837.

Partyka, A., Rodak, O., Bajzert, J., Kochan, J., & Nizański, W. (2017). The effect of L-carnitine, hypotaurine, and taurine supplementation on the quality of cryopreserved chicken semen. *BioMed research international*, 2017-2018.

Patil, S., Patil, A., Patil, M., & Nikam, P. (2014). Testicular hyperthermia in *Rattus norvegicus*: focus on gamatocytic alterations. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 93-103.

Qamar, A., Fang, X., Kim, M., & Cho, J. (2020). Improved viability and fertility of frozen-thawed dog sperm using adipose-derived mesenchymal stem cells. *Scientific Reports*, 1-10.

Rahiminia, T., Hosseini, A., Anvari, M., & Ghasemi-Esmailabad, S. (2017). Modern human sperm freezing: effect on DNA, chromatin and acrosome integrity. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 472-476.

Razi, M., Tavalaei, M., Sarrafzadeh-Rezaei, F., Moazamian, A., Gharagozloo, P., Drevet, J., & Nasr-Eshafani, M. (2020). Varicocoele and oxidative stress: New perspectives from animal and human studies. *Andrology*.

Rinaldi, M., Micali, A., Marini, H., & Adamo, E. (2017). Organ Toxicity and Therapeutic Approaches: A Review on Brain, Kidney and Testis Damage. *Curr Med Chem*, 3879-389.

Robinson, L., Gallos, I., Conner, S., & Rajkhowa, M. (2012). The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Human reproduction*, 2908-2917.

Sakkas, D., Mariethoz, E., & Manicardi, G. (1999). Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Reviews of reproduction*, 31-37.

Sallehi, & Ark, v. (2020).

Sancho., M., Pérez-Sánchez, F., Tablado, L., & De Monserrat, J. (1998). Computer assisted morphometric analysis of ram sperm heads: evaluation of different fixative techniques. *Theriogenology*, 27-37.

Santi, D., Spaggiari, G., & Simoni, M. (2018). Sperm DNA fragmentation index as a promising predictive tool for male infertility diagnosis and treatment management–meta-analyses. *Reproductive biomedicine online*, 315-326.

Sawyer, D., Mercer, B., Wiklendt, A., & Aitken, R. (2003). Sawyer DE, Mercer BG, Wiklendt AM, Aitken RJ. Quantitative of genespecific DNA damage in human spermatozoa. Mutation Research 2003. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 21-34.

Sekerci, C., Tanidir,, Y., Sener, T., & Sener, G. (2017).. Effects of platelet-rich plasma against experimental ischemia/reperfusion injury in rat testis. *Journal of pediatric urology*, 317-e1.

Setyawan, E., Kim, M., Oh, H., & Kim, G. (2015). Maintaining canine sperm function and osmolyte content with multistep freezing protocol and different cryoprotective agents. *Cryobiology*, 344-349.

Shekarriz, M., DeWire, D., Thomas Jr, A., & Agarwal, A. (1995). A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. *European urology*, 31-31.

Sherman, J. (1976). Clinical use of frozen human semen. *In Transplantation proceedings*, 165-170.

Shimizu, S., Tsounapi, P., Dimitriadis,, F., Higashi, Y., & Shimizu, T. (2016). testicular torsion–detorsion and potential therapeutic treatments: A possible role for ischemic postconditioning. *International Journal of Urology*, 454-463.

Shirota, K., Yotsumoto, F., Itoh, H., & Obama, H. (2016). Separation efficiency of a microfluidic sperm sorter to minimize sperm DNA damage. *Fertility and Sterility*, 315-321.

Simon, L., Zini, A., Dyachenko, A., Ciampi, A., & Carrell, D. (2017). A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian journal of andrology*, 80.

Sorahan, T., McKinney, P., Mann, J., & Lancashire, R. (2001). Childhood cancer and parental use of tobacco: findings from the inter-regional epidemiological study of childhood cancer. *British Journal of Cancer*, 141-146.

Sun, J., Jurisicova, A., & Casper, R. (1997). Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biology of reproduction*, 602-607.

Şen, C., & ve Ark. (2018).

Takeda, N., Yoshinaga, K., Furushima, K., Takamune, K., & Li, Z. (2016). Viable offspring obtained from Prm1-deficient sperm in mice. *Scientific reports*, 27409.

Thomson, L., Fleming, S., & Aitken, R. (2009). Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Human Reproduction*, 2061-2070.

Trzcińska, M., & Bryła, M. (2015). Fertility of boar semen cryopreserved in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Theriogenology*, 307-313.

Tunç., L., & Bozkırlı, İ. (2013). *Sperm Dondurma: Yardımcı Üreme Tekniklerindeki Uygulamalar*.

univercty of miami. (2021, 01 10). miami.edu:
http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/devel/animal_development.htm adresinden alındı

Unni, S., Kasiviswanathan, S., D'Souza, S., Khavale, S., & Mukherjee, S. (2012). Efficient cryopreservation of testicular tissue: effect of age, sample state, and concentration of cryoprotectant. *Fertility and sterility*, 200-208.

Valcarce, D., Cartón-García, F., Riesco, M., Herráez, M., & Robles, V. (2013). Analysis of DNA damage after human sperm cryopreservation in genes crucial for fertilization and early embryo development. *Andrology*, 723-730.

Wang, C., & Cheng, C. (2007). A seamless trespass: germ cell migration across the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *The Journal of cell biology*, 549-556.

Wetzels, A., Bras, M., Lens, J., Piederiet, M., & Rijnders, P. (1996). Laboratory aspects of in vitro fertilization. *Cryopreservation/Theory*, 229-244.

Xue, X., Wang, W., Shi, J., Zhang, S., & Zhao, W. (2014). Efficacy of swim-up versus density gradient centrifugation in improving sperm deformity rate and DNA fragmentation index in semen samples from teratozoospermic patients. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 1161-1166.

Yiğitbaşı, T. (2014). Sperm morfoloji değerlendirmesi. *XII.Ulusal Biyokimya kongresi*.

Zhang, Z., Zhu, L., Jiang, H., & Chen, H. (2015). Sperm DNA fragmentation index and pregnancy outcome after IVF or ICSI: a meta-analysis. *ournal of assisted reproduction and genetics*, 17-26.

Zribi, N., Chakroun, N., El Euch, H., Gargouri, J., Bahloul, A., & Keskes, L. (2010). Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertility and Sterility*, 159-166.

10. EKLER

EK 1.

Evrak Tarih ve Sayısı: 21.12.2018-E.108341



T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

Sayı : 28233352-302.14.01-
Konu : Kaan Çelen'in tez konusu.

SBE HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

Enstitümüzün 13.12.2018 tarih ve 44/34 sayılı Yönetim Kurulu Toplantısında, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı 171350002 numaralı öğrencisi Kaan ÇELEN'in tez konusunun, etik kurul onayı alınması kaydı ile **"Yüksek Glükozlu Besiyeri İle Deneyisel Diyabetik Modelde Hasara Uğratılmış Spermilere Dondurma Çözme İşlemi Sonrası Kök Hücre ve Nış Etkisi"** olarak belirlenmesine **OY BİRLİĞİ** ile karar verildi.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

e-imzalıdır

Prof. Dr. Bilal-i Habeş GÜMÜŞ
Enstitü Müdürü V.

Adres: Tıp Fakültesi Dekanlığı Zemin Kat Uzunboylu Kampüsü Manisa
Telefon: (0 236) 2360989 Faks: (0 236) 2362158
E-Posta: saglik.sukretirlik@cbu.edu.tr Elektronik Ağ: saglik@cbu.edu.tr

Bilgi İçin: Ayşe Ertik
Ünvanı: Bilişim Sorumlusu



Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK 2.**Etik Kurul Onayı**

T.C. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu				
KARAR TARİH / NO	21 / 05 / 2019 / 77.537.435			
ARAŞTIRMANIN ADI	Yüksek Glukozlu Besiyeri ile Kültür ortamında Deneysel Diyabetik Modelde Hazırlanmış Sıçan Spermlerinin Dondurma – Çözme İşlemi Sonrası Kök Hücre ve Niş uygulaması ile tedavisi			
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Prof. Dr. İbrahim TUĞLU			
ARAŞTIRMA TİPİ	Tezli Yüksek Lisans Öğrencisi Kaan Çelen			
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Uzmanlık Tezi ☐	Yüksek Lisans/Doktora ☒	Akademik ☐	Eğitim ☐
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	21 / 05 / 2019 / Tarih ve 23171 sayılı dilekçe			
KARAR NÜSHESİ	Araştırma başlığının değiştirilmesi konulu Dilekçe incelenmiş; bilimsel ve etik açıdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.			
Unvanı /Adı /Soyadı	İmza	Araştırma İle İlgili Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye	
Prof. Dr. Emin KURT Göç Hastalıkları AD		☐	☐	
Prof. Dr. İsmet TOPÇU Anestezi ve Reanimasyon AD		☐	☒	
Prof. Dr. Ertaç TATSUMAR Anatomi AD		☐	☐	
Prof. Dr. Kuvvet GÜNHAN DEHAN MD		☐	☐	
Dr. Öğr. Üyesi Selim ALTAN Tıp Tarihi ve Etik AD		☐	☐	
Yazıcı DEĞİR Veteriner Hekim		☐	☐	
Sakine ÖZKARA Sivil Toplam Üyesi	-----	☐	☒	
Etik Kararımızın kararı yukarıda belirtilmiştir. Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.				
		 Prof. Dr. Emin KURT Başkan		

EK 3. Tez Orjinallik Raporu

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tez Adı: Yüksek Glikozlu Besiyeri ile Deneysel Diyabetik Modelde Hasara Uğratılmış Spermlere Dondurma - Çözme İşlemi Sonrası Kök Hücre ve Niş etkisi

Tezime ilişkin 30/11/2020 tarihinde yapılan Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orjinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %16 dır.

Belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı : Kaan ÇELEN
Öğrenci No : 171350002
Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Programı : Yüksek Lisans

01.12.2020

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

(Unvan, Ad Soyad, İmza)

Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU

Açıklamalar

- 1- Tez Çalışması Orjinallik Raporu (TÇOR), TURNITIN İntihal Tespit Programı kullanımı için kişisel hesap alma hakkı bulunan tez danışmanları, Enstitülerde görevlendirilen personeller, Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı'nda görevlendirilen kütüphaneçiler tarafından alınır.
- 2- Sayfa sayısı 400'den az olan tezler için tez savunmasından önce ve başarılı olması durumunda düzeltmelerden sonra olmak üzere 2 kere TÇOR alınır. 400 sayıdan fazla olan tezler 400 ve katları şeklinde bölünerek Turnitin veri tabanına yüklenmesi gerekmektedir. Bu gibi durumlarda benzerlik oranının hesaplanmasına ilişkin detaylı forma, kütüphane web sayfasında bulunan Turnitin kullanım kılavuzlarının altından erişilebilir.
- 3- TÇOR, tezin yalnızca Kapak Sayfası, Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan kısmının tek bir dosya olarak intihal tespit programına yüklenmesi ile alınır.
- Programa yükleme yapılırken Dosya Başlığı (document title) olarak tez başlığının tamamı, Yazar Adı (author's first name) olarak öğrencinin adı, Yazar Soyadı (author's last name) olarak öğrencinin soyadı bilgisi yazılır.
- 4- TURNITIN İntihal tespit programına yüklenen dosyanın süzülmesinde, ilgili programdaki filtreleme seçenekleri aşağıdaki şekilde ayarlanır: - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 5 words)
- 5- Üsteğe bağlı ayarlar kısmında; "Ödevleri paraya gönder?" seçeneği mutlaka DEPO YOK şeklinde işaretlenmesi gerekmektedir; aksi durumda aynı tezin ikinci kez yüklenmesi durumunda benzerlik %100 çıkacaktır ve depodan tezi silmek çok uzun süreç gerektirecektir.
- 6- Raporlama işlemi tamamlandıktan sonra, kaydedilmiş olan ekranın görüntüsünü sağ üst köşesinde yüzdeler sayı olarak belirtilen "benzerlik oranı", raporlamaya tabi tutulmuş olan dosyanın "toplam sayfa sayısı" ve raporlama işleminin yapıldığı "tarih" bilgisi, "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orjinallik Raporu" formuna işlenir.
- 7- Benzerlik oranında tüm sorumluluk öğrenciye aittir.
- 8- Tez savunma sınavı sonrasında başarılı bulunan öğrenci, tez savunma sınavı tarihi sonrasında tezde yapılmış muhtemel değişiklikleri içeren dosya kullanılarak alınmış ikinci bir intihal raporundaki bilgiler kullanılarak hazırlanmış ve tez danışmanı tarafından onaylanarak imzalanmış ikinci bir "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orjinallik Raporu"nu Enstitüye teslim etmekle yükümlüdür.
- 9- Turnitin Hakkında Bilgiler: <http://kutuphane.cb.u.edu.tr/turnitin.9370.tr.html>

EK 4. ÖZGEÇMİŞ

Adı	KAAN	Soyadı	ÇELEN
Doğum Yeri	Bornova	Doğum Tarihi	
Uyruğu	TC	Tel	
E-mail			

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Manisa Celal Bayar Üniversitesi	2020
Lisans	Manisa Celal Bayar üniversite	2014
Lise	Cembakioğlu Anadolu lisesi	2005

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre
Biyolog	Ege üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi	2018-Devam Ediyor

Yabancı Dil

Yabancı Diller	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	İyi	İyi