

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN *IN VITRO* KOŞULLARDA TESTİS
MİKROÇEVRESİ VE SPERMATOGONYAL KÖK HÜCRE HAVUZUNUN
KORUNMASINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

SELİN ÖNEN

Kök Hücre Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA
2019

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN *IN VITRO* KOŞULLARDA TESTİS
MİKROÇEVRESİ VE SPERMATOGONYAL KÖK HÜCRE HAVUZUNUN
KORUNMASINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

SELİN ÖNEN

Kök Hücre Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Petek KORKUSUZ

İKİNCİ DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Sevil KÖSE

ANKARA

2019

**MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN *IN VITRO* KOŞULLARDA TESTİS MİKROÇEVRESİ VE
SPERMATOGONYAL KÖK HÜCRE HAVUZUNUN KORUNMASINA ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Öğrenci: Selin Önen

Danışman: Prof. Dr. Petek Korkusuz

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Sevil Köse

Bu tez çalışması 10 Temmuz 2019 tarihinde jürimiz tarafından “Kök Hücre Tezli Yüksek Lisans Programı” nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Duygu Uçkan Çetinkaya

(Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı)

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Petek Korkusuz

(Hacettepe Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı)

Üye: Prof. Dr. Çiler Çelik Özenci

(Akdeniz Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı)

Üye: Doç. Dr. Naciye Dilara Zeybek

(Hacettepe Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı)

Üye: Doç. Dr. Betül Çelebi Saltık

(Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

31 Temmuz 2019


Prof. Dr. Diclehan Orhan

Enstitü Müdürü

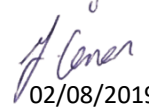
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾


02/08/2019

Selin ÖNEN

ⁱ¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Petek KORKUSUZ danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.




Selin ÖNEN

TEŞEKKÜR

Tanıştığımız günden bugüne bilgi ve tecrübeleriyle hayatımın her alanında beni destekleyen, multidisipliner bir bakış açısıyla araştırma yapma olanağı sağlayan, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum sayın danışmanım Prof. Dr. Petek Korkusuz'a; bilimsel kimliği ve insanlığını örnek aldığım, çalışmalarına katkılarını esirgemeyen değerli yardımcı danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Sevil Köse'ye; tez çalışmam öncesinde ve sırasında alanla ilgili bilgi ve birikimleriyle beni yönlendiren Arş. Gör. Nilgün Yersal'a; laboratuvar teknikleri ile ilgili bana çok şey katan ve her ihtiyacım olduğunda yardıma koşan Bio. Tülay Gülaşar ve Emrah Tosun'a; bilimde çok yönlü düşünmeyi ve ekip olmanın ne demek olduğunu bana öğreten sayın hocam Prof. Dr. Feza Korkusuz'a; birlikteyken disiplinli bir çalışma ekibi olmanın yanı sıra, birbirine sıkıca bağlı bir aile haline geldiğimiz değerli arkadaşlarım Merve Gizer, Özge Boyacıoğlu ve Eda Çiftci Dede'ye; bir amaca sahip olmanın ve bu amaca giden yolda azimle çalışabilmenin kıymetini bana öğreten değerli hocam Tarık Emre Başaran'a; Ankara'ya geldiğim ilk yıllardan bu zamana her daim desteğini hissettiğim on senelik değerli dostum Şilan Elmacı Akınç'a teşekkürü borç bilirim.

Bölümüm Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı ve tez çalışmalarımı yürüttüğüm Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki hocalarım ve arkadaşlarıma değerli katkıları için teşekkürlerimi sunarım.

Altı yıldır hayatımı bambaşka noktalara taşımama yardımcı olan, bana olan inancı, sevgisi ve desteğini her zaman hissettiğim Emre Gürcan'a teşekkür ederim. Sonsuz sevgi, güvenleriyle hayatımın her alanında beni destekleyen, hayallerimi öngörüp sonuna kadar arkasında duran canım ailem annem, babam ve kardeşlerime sonsuz teşekkür ederim. Doğduğum günden bugüne bana saygılı, yardımsever ve güçlü olmayı öğreten, torunu olmaktan gurur duyduğum, sonsuza dek kalbimde yaşayacak olan biricik dedeme teşekkürü borç bilirim.

Bu tez çalışması, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2018-17531 numaralı Yüksek Lisans Tez Destek Projesi kapsamında desteklenmiştir.

ÖZET

Önen, S. Mezenkimal Kök Hücrelerin *in vitro* Koşullarda Testis Mikroçevresi ve Spermatogonyal Kök Hücre Havuzunun Korunmasına Etkisinin Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara 2019. Çocukluk çağı kanserlerinde kemo-radyoterapi sonrası testiste germ hücresi hasarı sonucu hastalarda %46 oranında infertilite görülmektedir. Erkeklerde puberteye kadar spermatogenez başlamadığından testisten olgun sperm eldesi mümkün olmayıp, spermatogonyal kök hücrelerin, *in vitro* koşullarda uzun süreli kültürü sağlanamamaktadır. Mezenkimal kök hücreler, spermatogenezin devamlılığında asıl etkili Sertoli hücreleriyle embriyonik köken, gen ekspresyon profili ve farklılaşma potansiyeli açısından benzerdir. Sertoli hücrelerine kimyasal destek sunacak mezenkimal kök hücreler, *in vitro* koşulda testis nişinde kök hücre havuzunun korunmasına katkı sağlayabilir. Bu çalışmanın amacı, *in vitro* koşulda allojenik mezenkimal destekli hava sıvı interfaz tekniği ile tasarlanmış indirekt kokültür sistemindeki C57BL/6 türü yenidoğan fare testis şeritlerinde yapı, işlev ve spermatogonyal kök hücre canlılığının 1, 2, 4 ve 6 hafta süreyle korunmasıdır. Mezenkimal kök hücreler deneylerde kullanılmak üzere karakterize edilmiş; kokültür sisteminin etkinliği akım sitometrisi, histokimyasal ve immünohistokimyasal kantitatif yöntemlerle ortaya konmuştur. Mezenkimal kök hücreler, *in vitro* koşullarda indirekt kokültür ortamında 1-6 hafta arasında seminifer tübül ($p<0.05$) ve 2. 6. haftada lümen alanını ($p<0.05$) arttırıcı etki göstermiştir. Mezenkimal kök hücreler kokültür ortamında 1-6 haftalar arasında SALL4 ile işaretli; 1 ve 2. haftada PLZF ile işaretli spermatogonyal kök hücre; 6. haftada c-Kit işaretli ileri farklılaşmış spermatogenik seri hücre sayısını kontrole göre arttırmıştır ($p<0.05$). Sonuç olarak, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin *in vitro* kokültür sisteminde destekleyici etkisi ortaya konduğundan, klinikte gonadotoksik tedavi öncesi izole edilen testis şeritlerinin bu sistemle *in vitro* koşullarda korunabilmesinde kullanılabilecek tedavi stratejilerine iyi bir aday olabileceği saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: Testis, organ kültürü, kokültür, mezenkimal kök hücre, spermatogonyal kök hücre

ABSTRACT

Önen, S. Researching The Effect of Mesenchymal Stem Cells on the Testicular Microenvironment and the Spermatogonial Stem Cell Pool Under *in vitro* Conditions. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Master of Science Thesis in Stem Cell Programme, Ankara, 2019. Forty six percent of male patients display infertility due to germ cell damage induced by chemo-radiotherapy for treatment of childhood cancers. It is not possible to collect mature sperm from these patients since spermatogenesis is not present start until puberty. Monolayer long term culture of spermatogonial stem cells is challenging. Mesenchymal stem cells have a similar embryonic origin with the Sertoli cells that have a crucial role in regulation of spermatogenesis. Sertoli cells share gene expression profile and differentiation potential of mesenchymal stem cells. We hypothesized that mesenchymal stem cells can support the testicular niche and maintain the stem cell pool in an *in vitro* co-culture system by supporting Sertoli cells. The aim of this study is to protect stem cell viability of newborn C57BL/6 mice testes for 1, 2, 4 and 6 weeks by using an syngenic bone marrow derived mesenchymal stem cell supported indirect air liquid interphase co-culture system. The co-culture system has been set and maintained successfully using isolated mesenchymal stem cells of passage 3. The efficiency of mesenchymal stem cell contributed co-culture system was evaluated by histochemical, immunohistochemical and flow cytometric analyses. Mesenchymal stem cells increased seminiferous tubule area at week 1 to 6 and the luminal area at week 2 and 6 when compared to controls ($p<0.05$). The number of SALL4 labeled spermatogonial stem cells increased at week 1 to 6; PLZF labeled cells increased at week 1 and 2; and c-Kit labeled spermatogenic cells increased at week 6 ($p<0.05$) with mesenchymal support. In conclusion, this novel mesenchymal stem cell contributed air liquid interphase co-culture system presents a new tool for the *in vitro* maintenance of testis strips prior to gonadotoxic cancer treatment by providing moderate growth and development of testicular tubules.

Keywords: Testis, organ culture, coculture, mesenchymal stem cell, spermatogonial stem cell

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Çocukluk Çağı Kanseri Nedenli Erkek İnfertilitesi	4
2.2. Fare ve İnsanda Spermatogenez	5
2.3. Testisteki Spermatogonyal Kök Hücre Nişi	8
2.3.1. Sertoli Hücreleri	9
2.3.2. Leydig Hücreleri	11
2.3.3. Peritübüler ve İnterstitiyel Makrofajlar	11
2.3.4. Peritübüler Miyoid Hücreler	11
2.3.5. Endotel Hücreleri	12
2.3.6. Epididimdeki Beyaz Yağ Dokusu	12
2.3.7. Spermatogonyal Kök Hücre Nişinin Ekstrasellüler Matriks Bileşenleri	12
2.4. Mezenkimal Kök Hücreler	13
2.5. Mezenkimal Kök Hücreler ve Testis	13
3. GEREÇ ve YÖNTEM	17
3.1. Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin ve Testislerin Elde Edilmesi, MKH'lerin Karakterizasyonu ve Kültürü	19
3.1.1. Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu	19

3.1.2.	İzole Edilen Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Kültürü	20
3.1.3.	İzole Edilen Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	21
3.1.4.	Testis Dokularının İzole Edilmesi ve Kokültür için Hazırlanması	25
3.2.	Altı Günlük C57BL/6 Erkek Farelerden Elde Edilen Testislerin Mezenkimal Kök Hücrelerle Kokültürü	26
3.3.	Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Testisteki Spermatogonyal Kök Hücre Havuzuna Etkisinin Değerlendirilmesi	27
3.3.1.	Akım Sitometri ile Testis Dokularındaki Spermatogonyal Kök Hücre Miktarlarının Belirlenmesi	27
3.4.	Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin in vitro Koşullarda Testis Mikroçevresi Üzerindeki Koruyucu Etkisinin Değerlendirilmesi	28
3.4.1.	İmmünohistokimyasal ve İmmünofloresan Boyama ile Testis Mikroçevresinin in vitro Koşullarda Korunmasına Mezenkimal Kök Hücrelerin Katkısının Değerlendirilmesi	28
3.5.	Sonuçların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	29
4.	BULGULAR	31
4.1.	Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin ve Testis Dokusunun Elde Edilmesi, Kültürü ve Karakterizasyonu	31
4.1.1.	Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu	31
4.1.2.	İzole Edilen Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Kültürü	31
4.1.3.	İzole Edilen Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	31
4.1.4.	Testis Örneklerinin İzole Edilmesi ve Kokültür için Hazırlanması	34
4.2.	Altı Günlük C57BL/6 Erkek Farelerden Elde Edilen Testislerin Mezenkimal Kök Hücrelerle Kokültürü	34
4.3.	Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin in vitro Koşullarda Testis Mikroçevre Üzerindeki Koruyucu Etkisinin Değerlendirilmesi	35

4.3.1. Histokimyasal Boyama ve İmmünohistokimyasal İşaretleme ile Testis Mikroçevresinin in vitro Koşullarda Korunmasına Mezenkimal Kök Hücrelerin Katkısının Değerlendirilmesi	35
4.4. Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Testiste Bulunan Spermatogonyal Kök Hücre Havuzunun Korunması Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi	42
4.4.1. Akım Sitometrisi ile Testisteki Spermatogonyal Kök Hücre Miktarının Belirlenmesi	42
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇLAR	56
7. KAYNAKLAR	57
8. EKLER	66
EK-1: Hacettepe Üniversitesi Yerel Etik Kurulu Karar Yazısı	
EK-2: Birinci Hafta Kontrol Grubuna Ait Akım Sitometrisi Sonuçları	
EK-3: Birinci Hafta Kokültür Grubuna Ait Akım Sitometrisi Sonuçları	
EK-4: İkinci Hafta Kontrol Grubuna Ait Akım Sitometrisi Sonuçları	
EK-5: İkinci Hafta Kokültür Grubuna Ait Akım Sitometrisi Sonuçları	
EK-6: Dördüncü Hafta Kontrol Grubuna Ait Akım Sitometrisi Sonuçları	
EK-7: Dördüncü Hafta Kokültür Grubuna Ait Akım Sitometrisi Sonuçları	
EK-8: Altıncı Hafta Kontrol Grubuna Ait Akım Sitometrisi Sonuçları	
EK-9: Altıncı Hafta Kokültür Grubuna Ait Akım Sitometrisi Sonuçları	
EK-10: PE ve APC işaretli akım sitometrisi antikorları için kullanılan izotipik kontrol sonuçları	
EK-11: Tez çalışması orijinallik raporu	
EK-12: Dijital makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	81

SİMGELER VE KISALTMALAR

A_{al}	<i>A aligned spermatogonyum</i>
A_{pr}	<i>A paired spermatogonyum</i>
ARS	<i>Alizarin red s</i>
A_s	<i>A single spermatogonyum</i>
ASA	<i>Anti sperm antikor</i>
ATF-1	<i>Activating transcription factor 1</i>
BAX	<i>BCL2 associated X, apoptosis regulator</i>
BMP	<i>Bone morphogenic protein</i>
BMP4	<i>Bone morphogenic protein 4</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
c-Fos	<i>Fos proto-oncogene</i>
c-Kit	<i>KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase</i>
CREB-1	<i>Cyclic AMP-responsive element-binding protein 1</i>
DAB	<i>3,3'-Diaminobenzidine</i>
Dazl	<i>Deleted in azoospermia like gene</i>
Ddx4/VASA	<i>DEAD-box helicase 4</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetra acetic acid</i>
EGF	<i>Epithelial growth factor</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FSH	<i>Folikül uyarıcı hormon</i>
GDNF	<i>Glial cell drived neurotrophic factor</i>
HCl	<i>Hidroklorik asit</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HKH	<i>Hematopoetik kök hücre</i>
IBMX	<i>3- isobutyl-1-methylxantine</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
ITGA6	<i>Integrin subunit alpha 6</i>
Kİ	<i>Kemik iliği</i>
Kİ-MKH	<i>Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre</i>

KSR	<i>Knockout Serum Replacement</i>
LH	<i>Lüteinleştiren Hormon</i>
MCSF	<i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
MCSF-R	<i>Macrophage Colony Stimulating Factor Receptor</i>
MHCII	<i>Major histocompatibility complex-II</i>
MKH	<i>Mezenkimal kök hücre</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
Oct4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
ORO	<i>Oil red o</i>
PAS	<i>Periodic Acid Schiff</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PGP9.5	<i>Protein gene product 9.5</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PLZF	<i>Promyelocytic leukaemia zinc finger protein</i>
RA	<i>Retinoik asit</i>
RAR	<i>Retinoic Acid Receptor</i>
Ras	<i>Resistance to audiogenic seizures</i>
RXR	<i>Retinoid X Receptor</i>
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SDF-1	<i>Stromal derived factor-1</i>
SH	<i>Sertoli hücresi</i>
SKH	<i>Spermatogonyal kök hücre</i>
SRY	<i>Sex determining region Y</i>
Stra8	<i>Stimulated by retinoic acid 8 gene</i>
TGF-α	<i>Transforming growth factor-alpha</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TPO	<i>Thrombopoietin</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
1.1.	Çalışmanın şematik varsayımı.	2
2.1.	Günümüzde çocukluk çağı kanseri kaynaklı infertilite tedavisi için klinikte kullanılan yöntemler ve yapılan deneysel çalışmalar şematize edilmektedir.	5
2.2.	Testiste seminifer tübüllerde gerçekleşen spermatogenezin aşamaları gösterilmektedir.	8
3.1.	Yapılan çalışmadaki deney basamaklarına ait iş akışı şematize edilmiştir.	19
3.2.	Altı günlük yeni doğan fareden cerrahi izolasyon ile elde edilen testislerin kültür koşullarına hazırlanma aşamaları verilmektedir. (A) Altı günlük C57BL/6 farelerden cerrahi olarak izole edilen testisler (B) kültür besiyerine alınıp, (C) stereomikroskop altında (D) tunika albuginea tabakalarından arındırılmıştır. (E) Sonra, kültüre uygun boyut olan yaklaşık 1 mm ³ 'e getirmek amacıyla testisler 1-3 parçaya bölünüp yaklaşık 1mm ³ boyuta getirilerek, (F) önceden hazırlanıp en az 6 saat besiyerinde bekletilen agaroz jeller üzerine yerleştirilmiştir.	25
3.3.	(A) Agaroz jel üzerinde tek başına kültüre edilen testisleri ve (B) <i>transwell insert</i> sayesinde MKH ve testis hava sıvı interfaz yöntemli kokültür uygulaması şematize edilmektedir.	27
4.1.	Üçüncü pasaj mezenkimal kök hücreler inverte mikrograflarında kültür kabı tabanına tutunmakta ve iğsi-poligonal şekil göstermektedir. (A) x100, (B) x400.	31
4.2.	Yirmi birinci gündeki adipojenik farklılaşma analizinin kalitatif ve kantitatif ölçüm sonuçları verilmektedir. (A) Kontrol grubuna uygulanan ORO boyama protokolü sonucunda boyalı hücreye rastlanmamıştır (x100, ORO). (B) Adipojenik farklılaşma grubunda ise hücrelerdeki turuncu-kırmızı boyalı yağ damlacıkları gözlenmiştir (x100, ORO). (C) spektrofotometrik analiz sonuçları görülmektedir. Böylece, izole edilen ve üçüncü pasaja getirilen MKH'lerin yağ hücresine farklılaşabilme potansiyeli gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.	32

- 4.3.** Yirmi birinci günün sonunda yapılan osteojenik farklılaşma analizinin kalitatif ve kantitatif ölçüm sonuçları verilmektedir. Yapılan ARS boyaması ile, (A) kontrol kuyucuğundaki hücrelerde herhangi bir boyanma gözlenmemiştir (x100, ARS). (B) Osteojenik farklılaşma kuyusunda ise kemiğe farklılaşma sonucu meydana gelen kalsiyum çöküntüleri kırmızı boyalı olarak tespit edilmiştir (x100, ARS). (C) Yapılan spektrofotometrik analiz sonuçlarına göre osteojenik farklılaşma kuyucuklarında kontrol kuyucuklarına kıyasla kalsiyum miktarında anlamlı bir artış görülmüştür. 33
- 4.4.** C57BL/6 türü fare kemik iliğinden izole edilen üçüncü pasaj MKH'lerin yüzey belirteci analizi sonuçları verilmektedir. Hücrelerde MKH belirteci olan (A) CD44 ile %98.59, (B) CD140a ile %98.34 ve (C) Sca-1 ile %91.73 oranında; HKH belirteçleri olan (D) CD34 ile %2.03 ve (E) CD45 ile %0 oranında işaretlenme tespit edilmiştir. 34
- 4.5.** Bir haftalık kültür sonunda histomorfometrik analiz sonuçları verilmektedir. (A, C) Kontrol (x100, x400, PAS) ve (B, D) kokültür grubuna (x100, x400, PAS) ait testis mikrograflarında tübül ve lümen alanı ölçümleri alınmıştır. (E) Tübül alanı, (F) lümen alanına ait güven aralığı grafikleridir. 36
- 4.6.** İki haftalık kültür sonunda histomorfometrik analiz sonuçları verilmektedir. (A, C) Kontrol (x100, x400, PAS) ve (B, D) kokültür grubuna (x100, x400, PAS) ait testis mikrograflarında tübül ve lümen alanı ölçümleri alınmıştır. (E) Tübül alanı, (F) lümen alanına ait güven aralığı grafikleridir. 37
- 4.7.** Dört haftalık kültür sonunda histomorfometrik analiz sonuçları verilmektedir. (A, C) Kontrol (x100, x400, PAS) ve (B, D) kokültür grubuna (x100, x400, PAS) ait testis mikrograflarında tübül ve lümen alanı ölçümleri alınmıştır. (E) Tübül alanı, (F) lümen alanına ait güven aralığı grafikleridir. 38
- 4.8.** Altı haftalık kültür sonunda histomorfometrik analiz sonuçları verilmektedir. (A, C) Kontrol (x100, x400, PAS) ve (B, D) kokültür grubuna (x100, x400, PAS) ait testis mikrograflarında tübül ve lümen alanı ölçümleri alınmıştır. (E) Tübül alanı, (F) lümen alanına ait güven aralığı grafikleridir. 39

- 4.9.** (A) Kontrol ve (B) kokültür gruplarına ait testislerin 1, 2, 4 ve 6. Haftalarda SALL4 ile indirekt immün peroksidaz yöntemiyle işaretlenmelerini gösteren mikrograflardır. Bazal membrana tutunmuş, DAB kromojeniyle sitoplazmaları kahverengi renkli SALL4 immün reaktivitesi gösteren spermatogonyal kök hücreler okla işaretlenmiştir. 41
- 4.10.** Kontrol ve kokültür grubuna ait SALL4 immünohistokimyası sonuçları haftalara göre verilmektedir . 42
- 4.11.** Akım sitometrisinde 1, 2, 4 ve 6. haftada A) kontrol ve kokültür gruplarında PLZF ve c-Kit işaretli hücre yüzdelerindeki değişimler kutu çizgi grafiğiyle ve B) zamana bağlı olarak kontrol ve kokültür grupları içindeki değişimler güven aralığı grafiğiyle gösterilmektedir . 43
- 5.1.** Allojenik Kİ-MKH'lerin *in vitro* ortamda testis mikroçevresi ve SKH havuzunun korunmasına etkisi ve elde edilen sonuçların geleceğe yönelik olası translasyonel uygulamaları. Tez kapsamında yapılan çalışmalar ile, Kİ-MKH'lerin *in vitro* indirekt kokültür koşulunda parakrin sinyaller aracılığı ile testis seminifer tübül ve lümen alanını arttırıcı; SKH havuzunu koruyucu ve SKH'leri prolifer ettirici ve farklılaştırıcı etkisi gösterilmiştir. Gelecekte bu sayede *in vitro* koşulda korunan mikroçevrede sayıca arttırılan SKH'lerin testisten izole edilerek veya testis şeridi olarak kriyoprezervasyon teknikleriyle kullanılacak güne kadar saklanabilmesi ve sitotoksik tedavi gören çocuklar erişkin yaşa gelip çocuk sahibi olmak istediklerinde elde edilen otojenik SKH'den zengin şeritlerin veya direkt olarak izole edilen SKH'lerin bireylerin testislerine enjekte edilmesi, bu sayede spermatogenezin başlatılabilmesi beklenmektedir. 55

TABLÖLAR

Tablo		Sayfa
2.1.	Mezenkimal kök hücrelerin hasarlı testis üzerindeki etkileri ve testis mikroçevresindeki hücrelere farklanma kapasiteleri ile ilgili makaleler özetlenmektedir.	15
3.1.	İş paketlerinde 1, 2, 4 ve 6 hafta olmak üzere her zaman aralığına ait kontrol ve deney grubu için kullanılan testis ve hayvan sayıları şematize edilmiştir.	18
4.1.	Histolojik boyalı kesitler üzerinde yapılan 1, 2, 4 ve 6. haftalara ait seminifer tübül ve lümen alanlarının histomorfometrik ölçüm sonuçları verilmektedir.	35
4.2.	Bir, 2, 4, 6 haftalık kültür sürelerine ait PLZF ve c-Kit işaretli hücre yüzdelerini gösteren akım sitometrisi sonuçları gösterilmektedir.	43

1. GİRİŞ

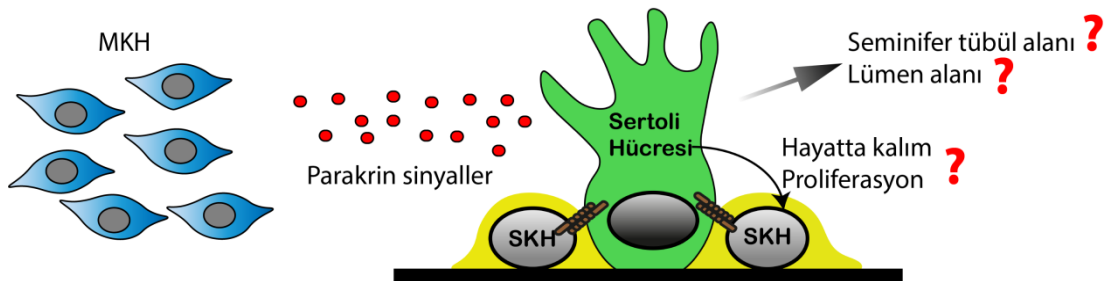
Her yıl dünyada 6500 çocuktan biri kanser tanısı almaktadır (1). Bu hastalarda düşük mortalite, yüksek morbidite görülmektedir (2, 3). En önemli morbidite unsurlarından biri, testiste germ hücresi kaybına bağlı erkek hastaların %46'sında ortaya çıkan **infertilite**dir (4). Seminifer tübül epiteli kanser tedavisinde radyasyon ve alkilleyici ajan uygulamalarına bağlı olarak geri dönüşsüz şekilde hasarlanabilir (5). Erişkin erkeklerden kanser tedavisi öncesi sperm elde edilip, uygun koşullarda saklanması mümkünken (6); puberte öncesi spermatogenez başlamadığından bu dönemde ortaya çıkan kanserlerde hastalardan olgun sperm eldesi mümkün değildir (7). Gonadotoksik kanser tedavisi öncesi, spermelerin öncül hücresi **spermatogonyal kök hücrelerin** (SKH) sayı ve işlevce korunması, kanser hastası çocukların tedavi sonrası süreçte erişkin çağa geldiklerinde biyolojik çocuklarına sahip olabilmeleri için tek yol olarak görülmektedir (7). Ancak, fertilitenin korunması amacıyla günümüzde kullanılan kriyoprezervasyon yöntemleriyle testiste kısıtlı miktarda bulunan SKH'ler yeterince korunamamaktadır (8). Diğer bir yöntem olarak, tedavi öncesi izole edilen SKH'lerin *in vitro* kültür ortamında çoğaltılması hedeflenmektedir. Ancak SKH'lerin üç boyutlu karmaşık mikroçevre koşulları sağlanamadığından, vücut dışında klasik yöntemlerle iki boyutlu ortamda uzun süreli kültürleri mümkün değildir (9). Testiste seminifer tübüllerin bazal membranına tutunarak varlıklarını sürdüren SKH'ler, başta Sertoli hücreleri olmak üzere, Leydig hücreleri, peritübüler-intersisiyel makrofajlar ve peritübüler miyoid hücrelerle desteklenir. Seminifer tübül bazal membranında yerleşim gösteren SKH'ler ile fiziksel temas halindeki Sertoli hücreleri, SKH'lerin devamlılığı, kendini yenileme ve farklılaşma süreçlerini düzenler (10). **Mezenkimal kök hücreler** (MKH), vücutta birçok organ ve sistemde yerleşik multipotent erişkin kök hücrelerdir. Antiapoptotik ve proliferatif etki gösteren MKH'ler (11, 12) embriyolojik gelişim sürecinde, mezoderm germ yaprağından köken alarak yüzey epitelinden farklılaşmaktadır (13). Sertoli hücrelerinin de, genital kabartıları çevreleyen yüzey epitelinden köken aldığı, öncüllerinin mezenkimal kökenli olduğu bilinmektedir (14). Sertoli hücrelerinin, adipojenik, osteojenik ve kondrojenik

farklılaşma kapasiteleri, kültür ortamındaki hücre proliferasyon endeksi ve VEGF, TPO, SCF gibi genlerin ifadesi açısından MKH'lerle benzerlik gösterdiği, farklılaşma sürecindeki MKH'ler olabilecekleri öne sürülmüştür (15). Bununla birlikte, MKH'lerin immatür testis mikroçevresi ve SKH devamlılığına etkisi ile ilgili bilgiler sınırlıdır. Allojenik MKH'lerin, vücut dışında üç boyutlu kültürü sağlanan, yeni doğan fare testis mikroçevresinde SKH havuzunun devamlılığına olumlu etkileri ortaya konulabilirse, bu sistem çocukluk çağı kanser hastalarında fertilitenin devamlılığının sağlanmasında yeni bir tedavi yöntemi olarak kullanılabilir. Bu varsayımı test etmek amacıyla C57BL/6 yeni doğan fare allojenik kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler (Kİ-MKH) ile altı günlük C57BL/6 yeni doğan fare testis kokültürünün, testis mikroçevresi ve SKH havuzu üzerindeki etkileri histokimya, immün işaretleme ve akım sitometrisi yöntemleriyle değerlendirilmiştir.

Bu amaç kapsamında **aşağıdaki araştırma hedefleri** tanımlanmıştır:

1. Altı günlük C57BL/6 türü fare kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu, kültürü ve karakterizasyonu; yeni doğan farelerden elde edilen testis şeritlerinin allojenik mezenkimal kök hücrelerle kokültürünün oluşturulması;
2. Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin testis mikroçevresinin korunmasına etkisinin histomorfometrik yöntemlerle değerlendirilmesi;
3. Kemik iliği kökenli MKH'lerin SKH havuzunun korunmasına etkisinin akım sitometrisi ve immünhistokimyasal işaretleme yöntemleriyle değerlendirilmesi.

Şekil 1.1.'de, varsayım (araştırma soruları) şematize edilmiştir.



Şekil 1.1. Çalışmanın şematik varsayımı.

Sertoli hücrelerinin embriyonik köken ve gen ifade profili bakımından MKH'lere benzer olduğu, ayrıca MKH'lerin *in vivo* ortamda testiste apoptotik gen ifadesini regüle edici rolü olduğu bilinmektedir. Bu tez kapsamında, Kİ-MKH'lerinin *in vitro* koşulda Sertoli hücreleri üzerinden SKH'lerin hayatta kalım, proliferasyon ve mikroçevresi üzerindeki etkileri araştırılmıştır.



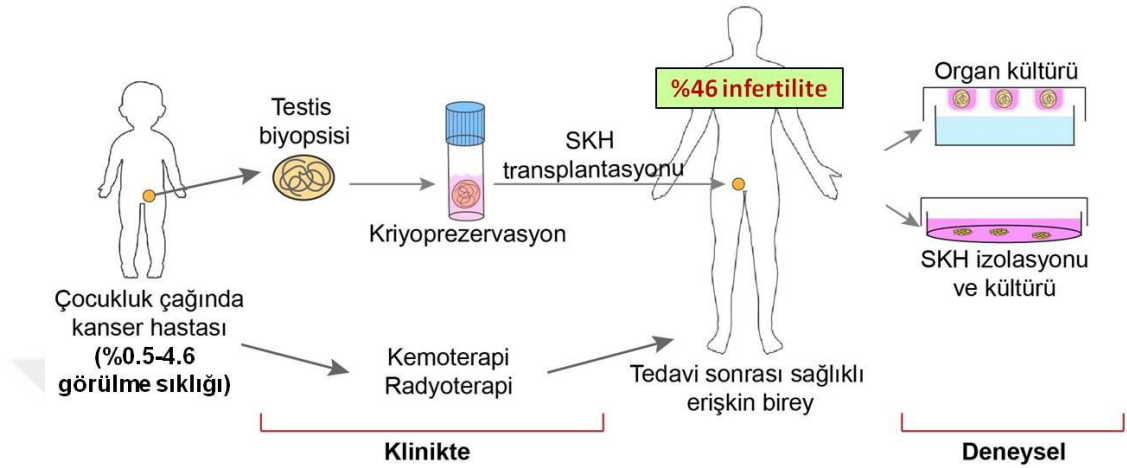
2. GENEL BİLGİLER

Aşağıda; çalışmaya gerekçe oluşturan **anahtar sözcüklere ait literatür bilgileri** “Çocukluk Çağı Kanseri Nedenli Erkek İnfertilitesi”, “Farede ve İnsanda Spermatogenez”, “Testisdeki Spermatogonyal Kök Hücre Nişi”, “Mezenkimal Kök Hücreler” ve “Mezenkimal Kök Hücreler ve Testis” başlıkları altında verilmektedir.

2.1. Çocukluk Çağı Kanseri Nedenli Erkek İnfertilitesi

İnfertilite genel olarak bireylerin doğal yollarla çocuk sahibi olamaması olarak tanımlanır. Erkek infertilitesi, genetik, anatomik, sistemik veya nörolojik hastalık, enfeksiyon, travma, iyatrojenik hasar veya gonadotoksin kaynaklı olabilir (16). Kanseri tedavisinde, kemoterapi ve radyoterapide kullanılan alkilleyici ajanlar gonadotoksinlere örnek olarak gösterilebilir. Kemoterapi ve radyoterapinin hedefi hızlı bölünen hücreler olduğundan, bu tedaviler sadece kanser hücrelerini değil, proliferatif germ hücrelerini de etkilemektedir (17). Tedavi sırasında testis epitelinin bütünlüğü ve spermatogonyal seri hücreleri geri dönüşsüz hasarlandığından, erişkin bireylerden tedavi öncesinde sperm izolasyonu yapıp, kriyoprezervatif yöntemlerle saklanarak, ileride çocuk sahibi olmaları sağlanmaktadır. Ancak puberte öncesi dönemde henüz spermatogenez başlamadığından, çocukluk çağı kanserlerinde tedavi öncesinde sperm izolasyonu mümkün değildir. Dünyada kanserlerin yaklaşık %0.5 - 4.6’sını oluşturan çocukluk çağı kanserleri, genellikle düşük mortalite (Türkiye’de %70, yüksek gelirli ülkelerde %85 oranında uzun süreli hayatta kalım) ve yüksek morbidite ile seyreder (18, 19). Bu tür erkek hastalarda %46 oranında sitotoksik tedaviye bağlı infertilite ortaya çıkmaktadır (4). Klinikte bu tür hastaların kendi çocuklarına sahip olabilmeleri için kanser tedavisi öncesi testislerinden doku alınarak kriyoprezervasyon uygulanmakta, dondurulan doku parçaları çözülerek rutin yöntem ile korunabilen az sayıdaki SKH’nin testise enjeksiyon sonrası spermatogeneze girerek spermleri oluşturması beklenmektedir (17). Ancak, kullanılan yöntemlerle SKH mikroçevresi oluşturulamadığından, bu yolla hastaların büyük çoğunluğunda fertilité sağlanamamaktadır (4). Bu hastaların ileride biyolojik çocuklarına sahip olabilmeleri için, kemoterapi ve radyoterapi öncesi alınan testis

örneklerinin üç boyutlu mikroçevrenin korunacağı kültür ortamında, SKH havuzunun genişletilip, spermatojenik seri hücre kaybının en aza indirileceği etkili bir sistem henüz geliştirilememiştir (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Günümüzde çocukluk çağı kanseri kaynaklı infertilite tedavisi için klinikte kullanılan yöntemler ve yapılan deneysel çalışmalar şematize edilmektedir.

Testis mikroçevresinin uzun vadede korunarak germ hücrelerinin hastaya geri verilmesi, çocukluk çağı kanserlerinin tedavisine bağlı erkek infertilitesinin çözümünü kalıcı olarak sağlayabileceğinden önemlidir.

2.2. Farede ve İnsanda Spermatogenez

Spermatogenez, erkeklerde testis seminifer tübül bazal membranında bulunan SKH'lerin proliferasyonunu, bu hücrelerin asimetrik bölünme ile farklanarak spermatositleri, spermatositlerin ise mayoz bölünme ile spermatidleri oluşturması, yuvarlak spermatidlerin olgunlaşması ve özelleşmiş olgun spermatozoonların lümene dökülmesi sürecini kapsayan puberte ile başlangıç gösteren olaydır (20). İnsanda ortalama on iki yaşında puberte ile başlayan spermatogenez, farede doğum sonrası yedinci günde başlangıç gösterir (20). Bir spermatogenez siklusu insanda ortalama 74 gün, farede 34.5 gün sürmektedir. Spermatogonyal kök hücreler, embriyonik dönemde iç hücre kitlesini oluşturan epiblastlardan gelişerek, gonadal kabartılara göç eden primordiyal germ hücrelerinin testislere yerleşerek gonositlere

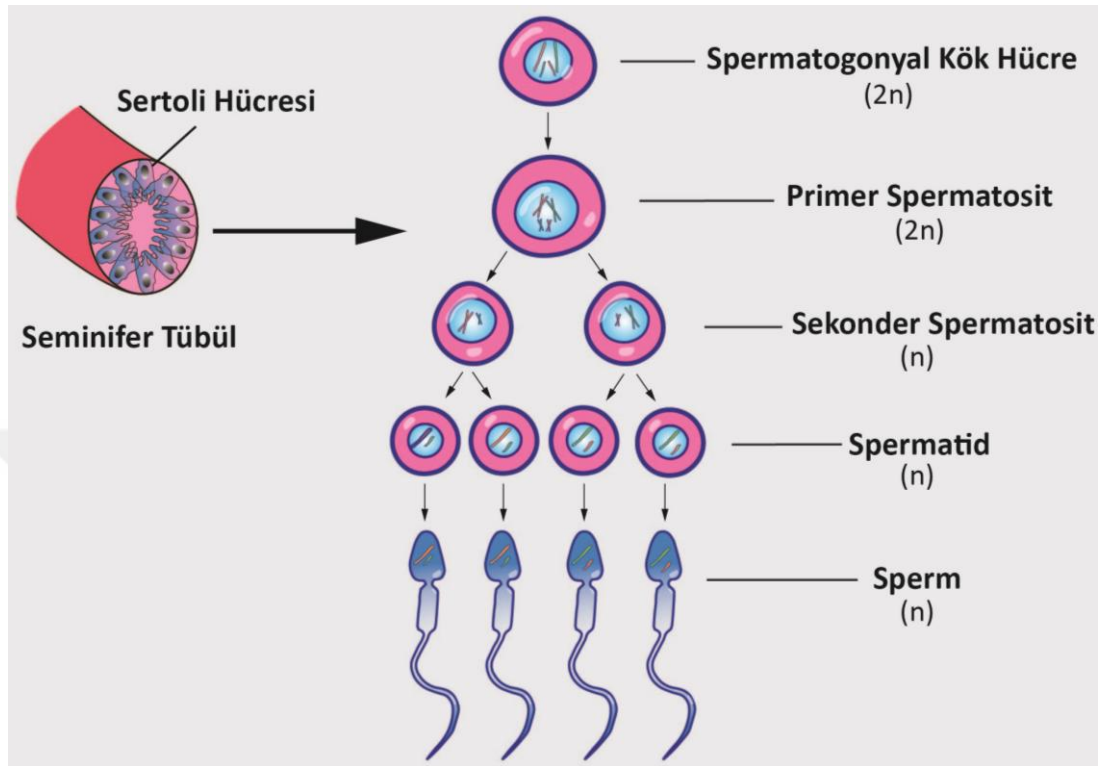
farklılaşması sonrası oluşur (21). Doğumdan önce seminifer hücre kordonlarının merkezinde sessizliklerini koruyan gonositler, doğumdan sonra proliferasyonlarını sürdürür; bazal membrana doğru göç edip orada SKH'lere dönüşür (22, 23). Spermatogonyal kök hücreler, testislerdeki spermatozoon oluşumuna öncülük eden, kendini yenileme ve spermatojenik seri hücrelerine farklılaşabilme kapasitesine sahip hücrelerdir (24). Kendi kendini yenileme ve farklılaşma dengesinin korunması fertilitenin devamlılığı için oldukça önemlidir (24).

Farede, doğumdan sonra yaklaşık ilk 10 günde SKH havuzu genişler ve elde edilen bu havuz, yaşam boyu spermatogenezin sürdürülmesini sağlar. Toplamda A_s , A_{pr} ve A_{al} olarak isimlendirilen spermatogonyumlara “farklılaşmamış spermatogonyumlar” adı verilmektedir ve fare testislerindeki germ hücrelerinin %0,3’ünü bu hücreler oluşturmaktadır. Farklılaşmamış spermatogonyumların %10’luk kısmını ise A_{single} spermatogonyumlar meydana getirmektedir (25). Doğumdan sonra, SKH etkinliğinin genel olarak *single* spermatogonyum (A_{single} veya A_s) adı verilen hücre popülasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. A_{single} spermatogonyumlar üç günde bir kez bölünmekte ve faredeki toplam germ hücresi kitlesinin %0,03’lük kısmını oluşturmaktadır. Bu hücreler mitoz bölünmeyle bir spermatogonyum çifti oluşturur. Oluşan hücre çiftlerine A_{paired} spermatogonyum (A_{pr}) adı verilmektedir. A_{paired} spermatogonyumlar sitokenezlerini tamamlayıp iki yeni *Asingle* spermatogonyum oluşturarak kendi kendini yenileyebilir. Bundan sonraki mitoz bölünmede hücreler bir intrasitoplazmik köprü ile bağlı kalıp, dörtlü zincir şeklinde $A_{aligned}$ spermatogonyumları da (A_{al}) oluşturabilir. A_{al4} olarak isimlendirilen 4 hücreli bu yapı, daha fazla mitoz bölünmeye uğrayıp 8, 16, hatta 32 hücreli A_{al} spermatogonyumları oluşturabilmektedir (26). $A_{aligned}$ spermatogonyumların intrasitoplazmik köprülerle bağlanmalarıyla oluşturdukları hücre zincirine “klon” adı verilmektedir. Testiste, daha büyük A_{al} spermatogonyum klonları A_1 spermatogonyuma farklanır. A_1 spermatogonyumlardan sonra, ardışık bölünmeler ile sırasıyla A_2 , A_3 , A_4 , *Intermediate* ve B spermatogonyumlar oluşturulur. B spermatogonyumlar ise bölünerek primer spermatositleri meydana getirmektedir. Mitoz bölünmelerin buraya kadar olan kısmı seminifer tübüllerin

bazal kompartmanında meydana gelirken, buradan sonraki kısmı apikal kompartmanda gerçekleşir. Elde edilen diploid primer spermatositlerden 1. mayoz ile sekonder spermatositler, II. mayoz ile spermatidler elde edilmektedir. Primer spermatositlere kadar tüm spermatogenik seri diploid ($2n$) yapıdayken, sekonder spermatosit ve spermatidler haploid (n) hücre yapısındadır. Spermatidler, spermiyogenez ismi verilen farklılaşma süreciyle matür spermiyumları meydana getirmektedir (25, 27).

İnsanda spermatogenez, pubertede, yani doğumdan 10-13 yıl sonra aktivite göstermeye başlar. Sperm üretimi spermatogenez ile birlikte bu dönemde başlayıp, yaşam boyu devam eder. Farede A_s , A_{pr} ve A_{al} olmak üzere üç çeşit farklılaşmamış spermatogonyum vardır ve spermatogenezin oldukça fazla bölünme aşaması varken; (26) insanda bu durum farklılık göstermektedir. İnsan testisinde, A_{dark} ve A_{pale} olmak üzere iki tür farklılaşmamış spermatogonyum bulunmaktadır. A_{dark} spermatogonyum, kök hücre rezervini oluşturan hücre çeşididir. A_{pale} spermatogonyumlar ise, sürekli kendilerini yenileyen, çoğalan hücrelerdir. A_{dark} spermatogonyumlar normal şartlarda nadir olarak bölünmelerine rağmen, herhangi bir hasar veya hastalık durumunda bölünmeleri tetiklenebilir ve kendilerini yenileyebilir (25, 26). Bu iki hücre, isimlerini hematoksilen eozin ile boyanma yoğunluklarının farklılıklarından ve çekirdek morfolojilerinden alır. A_{dark} spermatogonyumlar, daha küçük, küresel veya oval hücrelerdir ve homojen bir biçimde boyanmış çekirdeklerinde yoğun ve koyu boyanmış kromatin bulundurulur. A_{pale} spermatogonyumlar, görece daha büyük, oval hücrelerdir ve daha soluk renkli ve uzun, çekirdek kromatinleri granüler yapıdadır (25). A_{pale} spermatogonyumlar bölünerek B spermatogonyumları, B spermatogonyumlar ise bölünerek primer spermatositleri meydana getirir. Faredekine benzer şekilde, spermatogenez bu aşamaya kadar seminifer tübüllerin bazal kompartmanında meydana gelirken, bundan sonraki mayoz bölünme ve spermiyogenez evreleri seminifer tübüllerin apikal kompartmanında devam etmektedir. Primer spermatositler mayoz bölünme ile sekonder spermatositleri ve spermatidleri oluşturmaktadır. Ardından

spermatidler spermiyogenez ile olgun spermiyumları meydana getirmektedir (28) (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Testiste seminifer tübüllerde gerçekleşen spermatogenezin aşamaları gösterilmektedir.

2.3. Testisteki Spermatogonyal Kök Hücre Nişi

Testiste SKH'ler özelleşmiş bir mikroçevre içinde varlığını sürdürmektedir. Seminifer tübüllerde bulunan bazal laminada yuvalanarak varlıklarını sürdüren SKH'lerin, bu bölgede sessizliklerini koruma, kendini yenileme ve asimetric bölünerek ileri spermatogenik seri hücrelerini oluşturma süreçleri, mikroçevrede bulunan hücreler tarafından salgılanan parakrin sinyaller, sıcaklık, pH, biyomekanik kuvvetler ve ekstrasellüler matriks bileşenleri tarafından kontrol edilir (29). Sertoli Hücreleri, Leydig Hücreleri, peritübüler miyoid hücreler ve damar endoteli hücreleri testisteki niş ortamını oluşturan ve SKH'lerin kaderinde rol oynayan hücresel niş bileşenleridir.

2.3.1. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri, seminifer tübüllerin bazal membranına tutunan iri yapılı hücrelerdir. Sertoli hücreleri, SKH'ler ile fiziksel temas halinde onların devamlılığı, kendini yenileme ve farklılaşma süreçlerini düzenler. (10). Bu hücreler, germ hücrelerine yapısal destek ve gerekli besin maddelerini sunmalarının yanı sıra, testis nişinde spermatogenezi etkileyen farklı birçok yapısal ve düzenleyici role sahiptir. Sertoli hücreleri, seminifer tübüldeki spermatojenik fonksiyonu kontrol eden hormonal ağın ana hedefidir. Fertilitenin devamlılığını sağlayan FSH, testosteron, T_3 gibi hormon sinyallerini alıp SKH'lere ileterek spermatogenezin başlangıç zamanlamasını ve devamlılığını kontrol eder. Embriyonik gelişim sürecinde Sertoli hücreleri, genital kabartıları çevreleyen mezodermal yüzey epitelinden köken almaktadır (14). Genital kabartılardaki SRY geni ifadesi, bu bölgede bulunan destek hücresi öncüllerinin Sertoli hücresine farklılaşmasına neden olup testis gelişimini başlatır. Farklanan Sertoli hücreleri gelişmekte olan testise göç eder. Memelilerde testis gelişimini başlatan üç ana olay: 1) Cinsiyet belirleyici SRY geninin ifadesi ile birlikte mezenkimal kökenli pre Sertoli hücrelerinin Sertoli hücrelerine farklılaşması, 2) Endotel hücrelerinin komşu mezonefrozdaki göç etmesi ve 3) Sertoli hücrelerinden meydana gelen testis tübüllerinin oluşması, şeklinde sıralanmaktadır (14). Sertoli hücreleri, neonatal ve peripübertyal dönemde çoğalmaya devam eder. Pübertye yaklaştıkça proliferatif etkinliğini kaybedip, olgunlaşır. Bu dönemde kan testis bariyeri oluşur (30). Sertoli hücreleri, seminifer tübüllerin bazal membranı boyunca yan yana dizilir ve çeşitli bağlantı birimleriyle birbirlerine bağlı halde varlıklarını sürdürür. Seminifer tübüllerde; sıkı bağlantı, zonula adherens, oluklu bağlantı ile Sertoli hücrelerini birbirlerine bağlayan diğer protein komplekslerinden oluşan yapıya kan testis bariyeri adı verilmektedir. Bu yapı, SKH mikroçevresinde fiziksel olarak seminifer tübül epitelini bazal ve apikal olmak üzere iki bölüme ayırdığından kritik bir öneme sahiptir (30, 31). Sistemik dolaşım ile etkileşim halinde olan bazal kompartman, SKH'ler ve spermatogonyumları barındırmaktadır. Apikal kompartman sistemik dolaşımdan uzak bir bölgedir ve mayoz bölünen veya

mayoz sonrası germ hücrelerini içermektedir. Spermatogonyal kök hücreler, bazal membrandan apikal kompartmana doğru Sertoli hücrelerinin arasından olgun germ hücrelerine farklılaşarak ilerlemektedir (31).

Sertoli hücreleri, SKH'lerin kendini yenileme, farklılaşma ve apoptozunu düzenleme özelliğine sahiptir (10). Sertoli hücreleri, yapısal desteğe ek olarak parakrin faktörler aracılığıyla kimyasal olarak SKH'ler üzerinde etkilidir. *Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor* (GDNF), *Bone Morphogenetic Protein* (BMP), *Fibroblast Growth Factor* (FGF) ve *Stem Cell Factor* (SCF) gibi, SKH kaderinde *in vitro* ve *in vivo* koşullarda etkili büyüme faktörleri Sertoli hücreleri tarafından sentezlenmektedir. *Transforming Growth Factor Beta* (TGF β) ailesinin bir üyesi olan GDNF, Sertoli hücrelerine ait başlıca büyüme faktörlerinden biridir. Sentezlenen GDNF, Ras/ERK1/2 yolağı ve *Cyclic AMP-responsive element-binding protein 1* (CREB-1), *Activating Transcription Factor 1* (ATF-1), c-Fos gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu aracılığıyla SKH proliferasyonunu uyarmaktadır (32). A vitamini kökenli retinoik asit (RA) Sertoli hücrelerinde sentezlenen diğer moleküldür. *In vitro* koşullarda retinoik asitin spermatogonyumlardaki KIT ekspresyonunu arttırdığı ve mayoz bölünmeyi uyardığı gösterilmiştir. Retinoik asitin, *Retinoic Acid Receptor* (RAR) ve *Retinoid X Receptor* (RXR) isimli iki çeşit reseptörü bulunmaktadır. Her iki reseptör de α , β , γ olmak üzere üçer çeşit alt tipe sahiptir (32).

Sertoli hücrelerinden sentezlenen bir başka faktör SCF'dir. *Stem Cell Factor* reseptörü KIT, spermatogenezde ilk olarak A₁ spermatogonyumlarda ifade edilmektedir. Bu hücreler spermatogenezdeki ilk farklılaşmış hücreler olduğundan, KIT ekspresyonu farklılaşmamış spermatogonyumdan farklılaşmış spermatojenik seri hücrelerine geçiş belirteci olarak kabul edilmektedir. SCF/c-KIT sinyal yolağı, PI3K/Akt yolağı aracılığıyla A tipi spermatogonyumların DNA sentezini arttırmaktadır. Ayrıca, *in vitro* ve *in vivo* koşullarda spermatogonyumlardan spermatide farklılaşmanın gerçekleşmesi için SCF'ye ihtiyaç duyulduğu gösterilmiştir (33). *Bone Morphogenetic Protein 4* (BMP4), Sertoli hücreleri tarafından, postnatal

dönemin başlangıcında yüksek seviyede, puberteye yakın dönemde azalarak seyreden bir ekspresyona sahiptir (34).

2.3.2. Leydig Hücreleri

Leydig hücrelerinin ana görevi, testosteron hormonunun üretimidir. Seminifer tübüllerin aralarındaki interstisiyel bağ dokusunda yerleşik Leydig hücreleri, doğumdan önce gebeliğin dokuzuncu haftasında testosteron salgılamaya başlamaktadır (35). Bu hücreler, Lüteinleştirilen Hormon (LH) reseptörlerini bulundurur ve LH ve Folikül Uyarıcı Hormon (FSH) gibi gonodotropinler, Sertoli hücreleri ve Leydig hücrelerinin uyarımını sağlamaktadır. Leydig hücrelerinin ve Sertoli hücrelerinin birbirleriyle etkileşimi, spermatogenezi düzenlemektedir. Lüteinleştirici hormon, Leydig hücrelerini uyarıp testosteron üretmelerini sağlamaktadır (36). Leydig hücrelerinden salgılanan büyüme faktörleri, spermatogonyumların çoğalmasını sağlamaktadır. Leydig hücrelerinden sentezlenen EGF-benzeri büyüme faktörü, özellikle A tipi spermatogonyumlar olmak üzere spermatogonyumların proliferasyonunu arttırmaktadır (37).

2.3.3. Peritübüler ve İnterstisiyel Makrofajlar

Peritübüler ve interstisiyel makrofajlar SKH'lerin kendilerini yenileme ve farklılaşmalarını sağlayan faktörlerin üretiminde görev aldıklarından, SKH kaderinin belirlenmesinde rol oynar. Hem peritübüler hem de interstisiyel makrofajlar, *Macrophage Colony Stimulating Factor* (MCSF) sentezleyip SKH'lerin kendilerini yenilemelerini tetiklemektedir (38). Ayrıca, her iki makrofaj türü de SKH farklılaşmasından sorumlu olan RA biyosentezinde görev almaktadır (38). Bu iki tür makrofajı birbirlerinden ayıran başlıca özellik *Macrophage Colony Stimulating Factor Receptor* (MCSF-R) ve *Major Histocompatibility Complex-II* (MHCII) ekspresyon seviyeleri arasındaki farktır (39).

2.3.4. Peritübüler Miyoid Hücreler

Testisteki peritübüler miyoid hücreler, seminifer tübüllerin çevresini sararak, kasılma özellikleri sayesinde, tübüllerde sperm taşınmasını sağlamaktadır (40).

Yapısal desteklerinin yanı sıra, SKH'lerle aralarında sadece tübül bazal membranı bulunduğundan, sağladıkları biyokimyasal faktörler ile parakrin etki yaratarak testiküler homeostazın sürdürülmesine katkı sağlamaktadır (40). Miyoid hücreler, testosteron aracılı GDNF salımı ile SKH'lerin kendilerini yenilemelerine katkıda bulunur ve CSF1 salgısı aracılığıyla SKH kaderini düzenler. Bu nedenle miyoid hücreler erkek fertilitesi için önem taşır. Sıçanlarda, seminifer tübüller tek kat peritübüler miyoid hücreler ile çevriliyken, insanda çok katlı bir oluşum gözlenmektedir (41).

2.3.5. Endotel Hücreleri

Testislerin damar desteği, testiküler arter tarafından sağlanmaktadır. Seminifer tübülleri çevreleyen bağ dokusu içindeki damar ağı SKH'lerin yerleşim yerinde etkilidir. Spermatogonyal kök hücreler, damarlara yakın bazal membran bölgelerinde yerleşirken, ileri spermatojenik seri hücrelerine farklılaştıkça bazal membrandan uzaklaşıp lümene doğru ilerlemektedir (42).

2.3.6 Epididimdeki Beyaz Yağ Dokusu

Epididimdeki beyaz yağ dokusu, salgıladığı faktörler nedeniyle testis homeostazında oldukça önemlidir. Bu doku testisten ayrıldığında spermatogenezin aksadığı; GDNF ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (43). Epididim kökenli beyaz yağ dokusunda bulunan adipositler, salgıladıkları androjenlerle Sertoli hücreleri ve peritübüler miyoid hücreler üzerindeki reseptörler aracılığıyla bu hücrelerdeki GDNF salgısını uyarmaktadır (44, 45). Böylece, SKH'lerin kendini yenileme aktivitesini desteklemekte ve spermatogenezin yürütülmesine katkı sağlamaktadır (44).

2.3.7. Spermatogonyal Kök Hücre Nişinin Ekstrasellüler Matriks Bileşenleri

Testiküler nişte bulunan ekstrasellüler matriks bileşenleri spermatogenezin kontrolünde önemli rol oynar (46). Seminifer tübüllerin bazal membranı, Sertoli hücreleri ve peritübüler miyoid hücreler tarafından sentezlenen kollagen $\alpha 1$ (IV), $\alpha 2$ (IV), $\alpha 3$ (IV), laminin, entaktin ve heparin sülfat gibi diğer matriks bileşenleri sayesinde oluşturulmaktadır. Spermatogonyal kök hücrelerin, bazal membranda

yerleşimini sağlayan *homing* etkisine, SKH'ler tarafından ifade edilen $\alpha 6$ and $\beta 1$ integrinler katkı göstermektedir. $\beta 1$ integrindeki hasarın, SKH transplantasyonu sonrası spermatogenezin yeniden yapılandırılmasını engellediği bildirilmiştir (47-49).

2.4. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MKH), kemik iliği, göbek kordonu, yağ dokusu, plasenta gibi kaynaklardan elde edilebilen, mezoderm kökenli, somatik, erişkin, multipotent kök hücrelerdir (50). Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (*ISCT/The International Society for Cellular Therapy*) MKH olma koşullarını iğsi, fuziform yapı gösterme, kültür plağının tabanına tutunma, özgün yüzey belirteçlerini bulundurma (insanda, CD73, CD90, CD105; farede CD44, Sca-1, CD29, CD49e, CD90, CD105, CD140a) hematopoetik hücrelere özgü belirteçleri taşımama; adipojenik ve osteojenik ve kondrojenik yönde farklılaşma olarak tanımlamıştır (51, 52) Kemik iliğinden elde edilmelerinin daha kolay olması nedeniyle, çalışmalarda kemik iliği kökenli MKH'ler sıklıkla tercih edilmektedir. Bu hücreler yüksek farklılaşma potansiyelleri sayesinde rejenerasyon ile hücresel tedavi amacıyla kullanıma uygundur (53-56).

Mezenkimal kök hücreler farklılaşma kapasitelerinin yanı sıra salgıladıkları faktörler sayesinde komşu hücrelerde çoğalmayı uyarıcı inflamasyon ve apoptozu baskılayıcı etki gösterebilmektedir (50). Bu faktörlere, *Stromal Derived Factor-1* (SDF-1), *Hepatocyte Growth Factor* (HGF), *Insulin-like Growth Factor 1* (IGF-1), *Epithelial Growth Factor* (EGF), *Nerve Growth Factor* (NGF), *Transforming Growth Factor-alpha* (TGF-a) ve *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) örnek gösterilebilir (57, 58).

2.5. Mezenkimal Kök Hücreler ve Testis

Yakın zamanda MKH'lerin hasar görmüş testiste spermatogenezin yeniden kazanılmasına katkısı ile ilgili bazı çalışmalar yapılmıştır (59, 60). Hasarlı testiste MKH uygulaması ile seminifer tübül ve germinal epitelin genişliği ve germ hücre sayısının arttığı, spermatogenezin düzeldiği, Bim, Bax, *Caspase 3* gibi apoptozla ilgili genlerin

ifadesinin azaldığı ve anti-apoptotik Bcl-2 geninin ifadesinin arttığı, oksidatif stresin azaldığı ve testosteron salgısının arttığı bildirilmiştir (61-65). Testis rüptürü sonrası KI-MKH'lerin parakrin etkisiyle antisperm antikoru (ASA) miktarının azaldığı, böylece spermelere karşı gelişen hümmoral immün yanıt ve otoimmünitenin baskılandığı gösterilmiştir (66). Diğer çalışmada, kimyasal hasarlı fare testisine MKH enjekte edildiğinde, hücrelerin seminifer tübüllerin dışında ve içinde lokalize olabildikleri, içerideki MKH'lerin germ hücresi yönünde farklılaşabildikleri ve spermatojenik hücrelere özgü Vasa, Dazl, Stra8, PLZF gibi genleri ifade etmeye başladıkları öne sürülmüştür (67, 68). Mezenkimal kök hücrelerin, testise enjekte edildiklerinde Sertoli hücresi, Leydig hücresi ve germ hücresi yönünde farklılaşma potansiyeli gösterebileceği öne sürülmüştür (69, 70).

İnsan testisinde MKH benzeri özellikler bulunduran hücrelerin varlığı bildirilmiştir (71). Spermatogonyal kök hücrelere mekanik ve kimyasal destek sağlayan Sertoli hücreleri, çoğalma ve farklılaşma yeteneği, kromatin agregasyonu, yüzey belirteçleri (CD29, CD44 ve CD45) ve sitokin salgılama (TPO, SCF ve VEGF) özellikleri açısından farklılaşma sürecine girmiş bir tür MKH olabilecekleri öne sürülmüştür (15). Mezenkimal kök hücrelerin *in vitro* koşulda Sertoli hücreleri ile kokültüre edildiklerinde germ hücresi yönünde farklılaşma potansiyeli gösterdikleri, SKH benzeri koloni oluşturabildikleri ve germ hücresi spesifik faktörler Oct4, Stella, Ddx4, Dazl, PGP9.5, Stra8, and ITGα6 ifade ettikleri öne sürülmüştür (72-76). Farklı kaynaklardan elde edilen MKH'lerin hasarlı testisteki etkilerine ait araştırmalar Tablo 2.1.'de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Mezenkimal kök hücrelerin hasarlı testis üzerindeki etkileri ve testis mikroçevresindeki hücelere farklanma kapasiteleri ile ilgili makaleler özetlenmektedir.

Deney Düzenegi	Hasar modeli	Etki	Kaynak
Kİ-MKH'nin testise <i>in vivo</i> enjeksiyonu	Büsülfan	GFP-transgenik farelerde Leydig, Sertoli ve germ hücrelerine farklanma	(69)
Erişkin insan testisinden olası MKH izolasyonu ve kültürü	Yok	Testisten hematopoetik ve spermatogonyal belirteçleri bulundurmayan, MKH benzeri multipotent hücre eldesi	(71)
Ad-MKH ve Kİ-MKH'lerin testise <i>in vivo</i> enjeksiyonu	Büsülfan	Sıçanda fonksiyonel spermlere transdiferansiyon; Seminifer tübül ve lümen genişliği, germ hücresi sayısında artış	(61, 67)
Kİ-MKH'nin testise <i>in vivo</i> enjeksiyonu	Kurşun (II) Nitrat	Sıçanda, antioksidan enzimlerin gen ifadesinde artma, serbest radikallerin etkisinde azaltma	(62)
GK-MKH'nin testise <i>in vivo</i> enjeksiyonu	Büsülfan	İnsan MKH'lerin fare testisine enjeksiyonu ile testiste germ hücresi spesifik gen ekspresyonunda artış	(73)
Kİ-MKH'nin Sertoli hücreleri ile kokültürü GK-MKH ve Kİ-MKH'nin testise <i>in vivo</i> enjeksiyonu	Büsülfan	Bazal membrana yerleşim gösterme, SKH benzeri hücelere farklanma, hasarlı bölgeyi onarma, testiste germ hücresi spesifik gen ifadesini arttırma	(72, 74)
Kİ-MKH'nin testise <i>in vivo</i> enjeksiyonu	Skrotum duvarı insizyonu	Farede, antisperm antikoru ifadesinde azalma, parakrin sinyalizasyonla immün yanıt regülasyonu	(66)
Kİ-MKH'nin testise <i>in vivo</i> enjeksiyonu	Büsülfan	Hamsterde testis mikroçevresini koruma, spermatogenezi yeniden başlatma; hasarlı testiste germ hücresi oluşturma	(63, 77)
YD-MKH'nin testise <i>in vivo</i> enjeksiyonu	Büsülfan	Sıçan testislerinde spermatogenezi yeniden başlatma	(78)
YD-MKH ve Kİ-MKH'nin testise <i>in vivo</i> enjeksiyonu	Testis torsiyonu	Sıçan hasarlı testisinde oksidatif stresi azaltma ve testosteron salgısını arttırma; germ hücrelerine farklanabilme ve hasarlı tübülü onarma	(59, 64)
Kİ-MKH'nin testise <i>in vivo</i> enjeksiyonu	Kadmiyum	Sıçanda, Bim, Bax, Caspase3 apoptotik genlerinin ifadesini azaltma ve antiapoptotik Bcl2 geninin ifadesini arttırma	(65)
GK-MKH'nin Sertoli hücreleriyle kokültürü ve testise <i>in vivo</i> enjeksiyonu	Yok	İnsanda, PLZF, Stra8 (pre-miyotik germ hücresi belirteci), Prm1 (haploid hücre belirteci) gen ifadesinde artma	(68)

Sonuç olarak, MKH'ler olası farklanma potansiyellerin yanı sıra Sertoli hücrelerine parakrin mekanizma ile destek olarak SKH havuzunun korunmasına katkı sağlayabilir. Bu tez çalışmasında, immatür testis dokularının MKH'lerle in vitro koşullarda kokültürünün sağlanmasının testis mikroçevresi ve SKH havuzunun korunmasına katkısı olabileceği varsayımını test etmek üzere **yöntem bölümündeki** iş paketleri planlanmıştır.



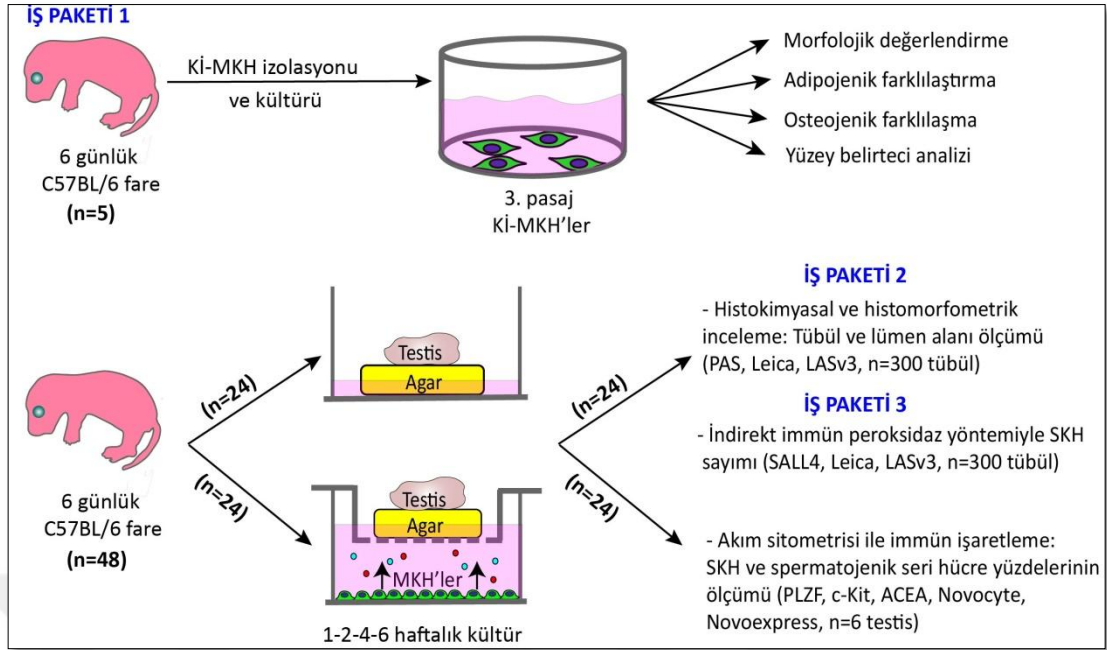
3. GEREÇ VE YÖNTEM

Deney Tasarımı: Çalışma; disiplinlerarası, rastgele seçilmiş (randomize), kontrol grubu içeren, ileriye yönelik (prospektif) *in vitro* deneysel araştırma şeklinde planlanmıştır. Bağımlı değişkenler; çalışmaya ait ölçüm parametreleri (hücre sayısı, testis dokusunda seminifer tübül ve lümenlerin histomorfometrik ölçümleri), bağımsız değişkenler; zaman (1, 2, 4, 6 hafta) ve deney koşulları (MKH ile kokültüre edilmiş ve tek başına kültüre edilmiş immatür testis) olmak üzere çalışmaya ait ölçüm parametreleridir. Çalışma, testis organ kültürü ve *transwell* sistemiyle kokültür yöntemleri ile ilgili olarak referans alınan makalelerden yola çıkılarak *in vitro* koşullarda doğrulayıcı hipotez testi çalışması düzeninde altı tekrarlı olarak, deney ve kontrol gruplarını içerecek biçimde tasarlanmıştır (76, 79, 80). Çalışma, literatürde her deney tekrarı için gerekli minimum testis sayısı ve gerekli olan MKH sayısının elde edileceği minimum hayvan sayısı gözetilerek planlanmıştır (81, 82). İstatistiksel olarak güç analizi “bağımlı gruplarda t-testi” yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Yapılan hesaplamalara göre deney ve kontrol gruplarının oluşturulması için kullanılacak hayvan sayısı $n=48$ olarak belirlenmiştir. Etki büyüklüğü=0.3 (orta), güç=%80, hata payı=%5 ile yapılan hesaplamada *G-power* 3.0.10 programı minimum hayvan sayısı olarak $n=48$ değerini vermiştir. Bu nedenle, 2 set deneyin yürütüleceği 1, 2, 4, 6 hafta olmak üzere dört gözlem noktasında, deney ve kontrol grubunun her birine eşit sayıda testis (her gruba 6 testis) dağılımı için hayvan sayısı $n=48$ (96 testis) olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak tek başına kültüre edilen testis kültür ortamı; deney grubu olarak ise MKH’ler ile kokültüre edilen testis kültür ortamı kullanılmıştır. İstenen sayıda MKH’nin elde edilebilmesi için $n=5$ sayıda hayvan kullanılmıştır (81, 82). Deney planına göre her gruptaki tekrar sayısının planı Tablo 3.1’de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. İş paketlerinde 1, 2, 4 ve 6 hafta olmak üzere her zaman aralığına ait kontrol ve deney grubu için kullanılan testis ve hayvan sayıları şematize edilmiştir.

	KONTROL GRUBU (n=Hayvan sayısı)				KOKÜLTÜR GRUBU (n=Hayvan sayısı)			
	1.Hafta	2.Hafta	4.Hafta	6.Hafta	1.Hafta	2.Hafta	4.Hafta	6.Hafta
İş Paketi 3 Ki-MKH'lerin SKH Havuzuna Etkisi	n=3 Testis Sayısı: 6	n=3 Testis Sayısı: 6	n=3 Testis Sayısı: 6	n=3 Testis Sayısı: 6	n=3 Testis Sayısı: 6	n=3 Testis Sayısı: 6	n=3 Testis Sayısı: 6	n=3 Testis Sayısı: 6
İş Paketi 4 Ki-MKH'lerin Testis Nişine Etkisi	n=3 Testis Sayısı: 6	n=3 Testis Sayısı: 6	n=3 Testis Sayısı: 6	n=3 Testis Sayısı: 6	n=3 Testis Sayısı: 6	n=3 Testis Sayısı: 6	n=3 Testis Sayısı: 6	n=3 Testis Sayısı: 6
MKH izolasyonu	Kullanılacak Hayvan Sayısı				n= 5			
	Kullanılacak toplam testis ve hayvan sayısı (Toplam Hayvan Sayısı= N)				48 (96 Testis, 48 Hayvan) + 5 Hayvan → N= 53 Hayvan			

Bu tez çalışması, 04.09.2018 tarihli ve 52338575-96 numaralı Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu izniyle (EK-11), Hacettepe Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'na ait alt yapı, laboratuvar ve teknik donanım kullanılarak, Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı kapsamında gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya ait iş akış şeması Şekil 3.1.'de gösterilmektedir.



Şekil 3.1. Yapılan çalışmadaki deney basamaklarına ait iş akışı şematize edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında sorulan araştırma soruları **aşağıdaki iş paketleriyle** cevaplanmıştır:

3.1. Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin ve Testislerin Elde Edilmesi, MKH'lerin Karakterizasyonu ve Kültürü

3.1.1. Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu

Kemik iliği izolasyonu için 6 günlük, C57BL/6 türü farelere işlem öncesi servikal dislokasyon uygulanmıştır. Servikal dislokasyon sonrası fareler, 100 mm'lik petri kabında bulunan 100 ml %70 etanol içinde 3 dk bekletilerek steril hale getirilmiştir. Arka bacaklarını gövdeye bağlayan bölgelere birer kesi oluşturulup, bölge üzerindeki deri sıyrılarak uzaklaştırılmıştır. Arka bacaklar gövdeden femura zarar verilmeyecek şekilde omurilik paralelinde kesilip, tibia ve femur kemikleri çıkarak steril gazlı bez üzerine koyulmuştur. Elde edilen kemik örnekler, %1 penisilin streptomisin (pen-strep) (Biological Industries, ABD) içeren 10 ml *Phosphate buffered saline* (PBS), (pH=7.4, Thermo Fisher Scientific, ABD) içinde soğuk zincir korunarak laboratuvar ortamına taşınmıştır. Laminar akım kabini içinde örnekler 100 mm'lik petri kabına alınıp, steril penset ve bistüri yardımıyla burada kas ve bağ dokusundan iyice arındırılıp, iki kez %1 pen-strep içeren PBS ile yıkanmıştır. Kemikler

yıkanmalarının ardından %15 *fetal bovine serum* (FBS) (Biological Industries, ABD), %1 pen-strep içeren *α -Minimum Essential Medium* (α -MEM) (Biological Industries, ABD) besiyerine alınmıştır. Burada kemikler tek tek penset ile tutularak ilik kavitelerinin sonundan bistüri yardımıyla kesilmiştir. Beş ml enjektöre besiyeri çekilmiştir. Ardından enjektör iğnesi kemik kavitelerine yerleştirilip, besiyeri ile her biri 3'er kez yıkanmıştır. Böylelikle, kavite içinde her alan hücrelerin besiyerine akıtılması sağlanmıştır. Yıkamanın sonunda 100 mm'lik petri içinde elde edilmiş olan hücre-besiyeri solüsyonu 2 adet T75 kültür flaskına alınmış ve 4 gün boyunca %5 CO₂ içeren ortamda 37°C'de inkübe edilmiştir. Birinci günde kültür kabına yapışan hücrelerin gözlenmeye başlandığı kültürün dördüncü gününde kültür kabının içindeki besiyeri boşaltılarak taze besiyeri eklenmiştir. Böylece kültür kabına yapışmayan hematopoetik hücreler elimine edilmiş ve sadece adeziv hücre özelliğinde olan MKH'ler çoğaltılmaya devam edilmiştir. Yedinci günde ise hücreler %70-90 oranında kültür kaplarını doldurmuştur. Konfluensiye ulaşmış olan hücreler pasajlama amacıyla PBS ile yıkanıp, %0.25 Trypsin-EDTA (Gibco, ABD) ile kültür ortamından kaldırılmış, 1:3 oranında bölünerek yeni T75 kültür kaplarına pasajlanmıştır. Hücreler, %15 FBS ve %1 pen-strep içeren α -MEM (Biological Industries, Amerika) besiyeri ile 37 °C'de, %5 CO₂ içeren inkübatöre yerleştirilip kültüre edilmiştir. Pasajlama ve kullanılan besiyeri sayesinde, hematopoetik seriye ait olup adezyon gösteren ve göstermeyen monosit kökenli hücreler de elimine edilmiştir (83).

3.1.2. İzole Edilen Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Kültürü

C57BL/6 türü fare kemik iliğinin yıkanması ile elde edilen hücrelerinin kültüre edilmesini takiben 24 saat içinde kültür kabının yüzeyine yapışmaya başlayan MKH'ler gözlenmiştir. Kültürün dördüncü gününde ilk kez kültür kabının içerisindeki besiyeri boşaltılarak taze besiyeri eklenmiştir. Böylece kültür kabına yapışmayan hematopoetik hücreler elimine edilip, sadece adeziv hücre özelliğinde olan MKH'ler çoğaltılmıştır. Yedinci günün sonunda adeziv hücrelerin çoğalarak kültür kabını %70-90 oranında doldurması sağlanmıştır. Yedinci günde pasajlama için, kültür kabını

%70-90 oranında dolduran iğsi-biçimdeki hücreler üzerindeki eski besiyeri uzaklaştırılmış, hücreler PBS ile yıkanmıştır. Sonrasında, FBS'li besiyeri tamamen uzaklaştırılmış olan hücreler %0.25 tripsin-EDTA (Gibco, ABD) ile 2 dk boyunca 37 °C'de inkübe edilmiş ve kültür ortamından kalkmaları sağlanmıştır. Hücrelerin %0.25 tripsin-EDTA ile 2 dk'dan uzun süre inkübe edilmesi hem hücrelere hasar vereceğinden, hem de MKH olmayıp yüzeye yapışma özelliği gösteren hücrelerin kalkmasını sağlayacağından inkübasyon süresinin geçilmemesine özen gösterilmiştir. Sürenin sonunda enzim aktivitesi serumlu besiyeri ile durdurulmuş, hücreler 800 g'de 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Ardından süpernatant uzaklaştırılıp, hücreler taze besiyeri ile resüspanse edilmiştir. Sonrasında elde edilen hücreler 1:3 oranında bölünmüş, her T75 flasktan elde edilen hücreler 3'er ayrı T75'e eşit miktarlarda bölünmüştür. Böylece, birinci pasaj MKH'ler elde edilmiştir. Hücreler, 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatöre yerleştirilip kültüre edilmiştir. Üç günde bir hücrelerin besiyeri taze ile değiştirilmiş, %70 konfluensiye ulaşıldığında hücrelerin bir kısmı pasajlanmış, pasajlama sonrası geri kalan hücreler ise %50 besiyeri, %40 FBS ve %10 DMSO (Applichem, Almanya) içeren dondurma besiyeri (v/v) ile dondurularak -196 °C'lik sıvı azot tankında saklanmıştır. Bu süre içerisinde besiyeri değişimi ile birlikte hematopoetik seriye ait olup adezyon gösterebilen monosit kökenli hücreler de elimine edilmiştir. Aynı işlem hücreler 3. pasaja gelene kadar tekrarlanmıştır (83).

3.1.3. İzole Edilen Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Tüm hücre karakterizasyonu çalışmaları hücreler üçüncü pasaja ulaştıklarında gerçekleştirilmiştir.

3.1.3.1. İzole Edilen Kemik İliği Kaynaklı MKH'lerin Morfolojik Analiz ile Karakterizasyonu

Elde edilen üçüncü pasaj MKH'ler plastik kültür kabı yüzeyine yapışma ve iğsi-poligonal şekle sahip olma özelliklerine bakılarak ışık mikroskobu altında morfolojik olarak değerlendirilmiştir.

3.1.3.2. İzole Edilen Kemik İliği Kaynaklı MKH'lerin Adipojenik Yönde Farklılaşma Analizi

Adipojenik farklılaşma için başlangıçtaki ideal fare Kİ-MKH yoğunluğu 2.0×10^4 hücre/cm² şeklindedir. Bu nedenle üçüncü pasaja gelen MKH'ler 6 kuyucuklu kültür kaplarına, 190.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin %100 yoğunluğa geldiği dört günün sonunda farklılaşma kuyucuğu olarak belirlenen kuyulardaki hücrelerin üzerindeki besiyeri, manuel olarak hazırlanmış olan adipojenik farklılaşma besiyeri ile değiştirilmiştir. Kontrol kuyularında MKH kültür besiyeri kullanılmaya devam edilmiştir. Adipojenik farklılaşma besiyeri, 10^{-8} M deksametazon, 10 µg/ml insülin, 50 µM indometazin ve 0.5 µM IBMX (*3-isobutyl-1-methylxantine*) içeren α-MEM besiyeri ile kullanımdan önce taze olarak hazırlanmıştır (83). Besiyerinin değiştirildiği gün, adipojenik farklılaşmanın indüklenmesinin sıfıncı günü olarak belirlenmiştir. Hücreler bu şekilde 21 gün boyunca kültüre edilmiştir. Yirmi bir günün sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri çekilmiş, her bir kuyucuk 1'er ml PBS ile yıkanmıştır. Ardından, kuyucuklara 1'er ml %10 formol (Sigma, ABD) eklenip 20-25 dk boyunca oda sıcaklığında bekletilerek hücrelerin fiksasyonu sağlanmıştır. Formolün uzaklaştırılmasının ardından kuyular 2 kez dH₂O ile yıkanmış ve her kuyuya 1 ml *Oil Red O* boyası (ORO) eklenip 30 dk boyunca oda sıcaklığında inkübasyon sağlanmıştır. Sürenin sonunda kuyulardaki boyalar çekilmiş ve kuyular 3'er kez dH₂O ile yıkanmıştır. Kuyucukların, dijital görüntüleme sistemi (Olympus, Japonya) ile fotoğrafları çekilmiştir. Kantitatif sonuç için ise, kuyucuklara deterjan özelliğinde %2 igepal/izopropanol (v/v) (Sigma-Aldrich, ABD; DOP Organik Kimya Sanayi, Türkiye) eklenerek 2 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu işlem ile boyanın hücrelerden ekstraksiyonu sağlanmış, 2 saat sonra igepal-boya karışımı elde edilmiştir. Her bir kuyucukta elde edilen karışımlar, spektrofotometrik mikropilaka okuyucusunda (Tecan, Avustralya) okutulmak üzere 96 kuyucuklu kültür kaplarına aktarılmıştır. Standart grafiğinin çizilmesi amacıyla ORO boyası kullanarak hazırlanan dilüsyonlar standartlar kullanılmıştır. Örnekler, 492 nm dalga boyunda okutulmuş ve değerler standart grafiğinden faydalanılarak mg/ml cinsinden sonuçlara dönüştürülmüştür.

3.1.3.3. İzole Edilen Kemik İliği Kaynaklı MKH'lerin Osteojenik Yönde Farklılaşma Analizi

Osteojenik farklılaşma için başlangıçta ekilmesi gereken ideal hücre yoğunluğu 0.5×10^4 hücre/cm² şeklindedir (84). Bu nedenle üçüncü pasaj MKH'ler 24 kuyucuklu kültür kaplarına, 10.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Hücre ekiminin dördüncü gününde hücreler %70 yoğunluğa geldiğinde farklılaşma kuyucuğu olarak belirlenen kuyulardaki hücrelerin üzerindeki kültür besiyeri, manuel olarak hazırlanmış olan osteojenik farklılaşma besiyeri ile değiştirilmiştir. Kontrol kuyularında MKH kültür besiyeri kullanılmaya devam edilmiştir. Adipojenik farklılaşma besiyeri, 10 nM deksametazon, 50 mM L-askorbik asit ve 20 mM β -Gliserofosfat içeren α -MEM besiyeri ile kullanımdan önce taze olarak hazırlanmıştır (85). Besiyerinin değiştirildiği gün, osteojenik farklılaşmanın indüklenmesinin sıfırıncı günü olarak belirlenmiştir. Hücreler bu şekilde 21 gün boyunca kültüre edilmiştir. Yirmi bir günün sonunda, farklılaşma analizi için kontrol ve farklılaşma gruplarındaki hücrelerin üzerindeki besiyeri çekilmiş, her bir kuyucuk 1'er ml PBS ile yıkanmış, %10 formol ile 20 dk boyunca fikse edilen hücrelere, *Alizarin Red S* boyası (pH=4.2, Sigma, ABD) eklenerek 10 dk bekletilmiştir. Ardından, kuyucuklar 1'er ml dH₂O ile yıkanmış ve dijital görüntüleme sistemi (Olympus, Japonya) ile kontrol ve farklılaşma kuyucuklarının fotoğrafları çekilmiştir. Kuyucuklardaki osteojenik farklılaşmanın kantitatif olarak değerlendirilmesi amacıyla *Quantichrom Calcium Assay* kiti (Bioassay Systems, ABD) kullanılarak kuyucuklardaki kalsiyum miktarı ölçülmüştür. Bu amaçla, 21 gün kültürün sonunda kontrol ve deney grubundaki hücrelerin üzerindeki besiyeri çekilmiş, kuyucuklar 1'er ml PBS ile yıkanmıştır. Sonrasında, kuyucuklara 1'er ml 0.6 M HCl koyulup, oda sıcaklığında 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda her bir kuyucuktaki örnekler hafifçe pipetlendikten sonra ayrı tüplere alınıp, örnek bilgileri ile etiketlenmiştir. Kit içinden çıkan A ve B solüsyonları 1:1 oranında karıştırılmış, elde edilen karışım 96 kuyucuklu kültür plağına her bir kuyucuğa 200 μ l gelecek şekilde bölünmüştür. Örneklerden kuyucuklara 5'er μ l ilade edilip pipetaj yapılmasının ardından elde edilen karışım, 612 nm dalga boyunda okutulmuştur. Kit içinde bulunan standart solüsyonundan

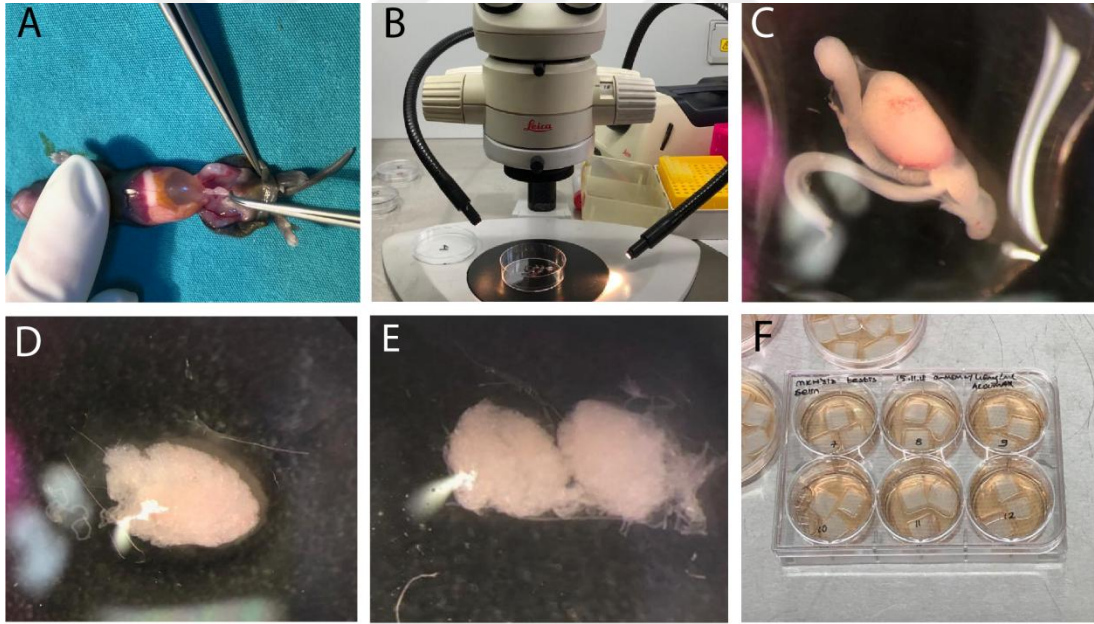
belirli dilüsyonlar oluşturulup okutularak standart grafiği çizilmiştir. Elde edilen veriler bu grafik kullanılarak mg/dl cinsinden değerlere dönüştürülmüştür.

3.1.3.4. Hücre Yüzey Belirteçlerinin Analizi ile MKH Karakterizasyonu

Üçüncü pasajdaki hücreler T75 doku kültür kabından kazınarak mekanik olarak kaldırılmış ve sayılmıştır. 350 g'de 5 dk santrifüj yapılan hücreler süpernatanın uzaklaştırılmasının ardından yıkama tamponu ile resüspanse edilip tüp başına 2×10^5 hücre olacak şekilde 4 adet FACS tüpüne bölünmüştür. 350 g'de 5 dk boyunca santrifüj edilerek FBS içeren besiyerinin hücrelerden tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır. Süpernatanın uzaklaştırılmasının ardından hücreler 100'er µl yıkama tamponu ile resüspanse edilmiştir. Tüp başına 300 µl fiksasyon solüsyonu (Biolegend, ABD) eklenerek hücreler 20-40 dk boyunca +4 °C'de inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda fiksatifin hücrelerden uzaklaştırılması amacıyla 2.5 ml yıkama tamponu eklenerek tüpler santrifüj edilmiş ve ardından 100 µl yıkama tamponu ile hücreler resüspanse edilmiştir. Ardından, hücre geçirgenliğinin sağlanması amacıyla hücrelere 2 ml permeabilizasyon tamponu (Biolegend, ABD) eklenmiş ve hücreler 20 dk +4 °C'de inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda tüpler 350 g'de 5 dk santrifüj edilerek fazla permeabilizasyon solüsyonu uzaklaştırılmıştır. Ardından süpernatant uzaklaştırılıp hücrelere 100'er µl permeabilizasyon solüsyonu ile birlikte antikorlardan 5'er µl eklenmiş ve homojenize edilen hücreler +4 °C'de 15 dk inkübe edilmiştir. Fare Kİ-MKH yüzey belirteçleri olarak CD44 (BD Biosciences, ABD), CD140a (BD Biosciences, ABD) ve Sca-1 (BD Biosciences, ABD); fare hematopoetik kök hücre yüzey belirteçleri olarak ise CD34 (BD Biosciences, ABD) ve CD45 (BD Biosciences, ABD); izotipik kontrol olarak ise sırasıyla PE konjuge Sıçan IgG_{2b}, APC konjuge Sıçan IgG_{2a}, PE konjuge Sıçan IgG_{2a}, PE konjuge Sıçan IgG_{2a}, FITC konjuge Sıçan IgG_{2b} antikorları kullanılmıştır. Süre sonunda hücreler yıkama tamponu ile yıkanmış ve işaretlenmiş hücrelerin yüzey belirteçlerinin analizi toplam 10,000 olgu okutularak Novocyte (ACEA Biosciences, ABD) akım sitometrisi cihazı ile yapılmıştır. Analiz için Novoexpress 1.3.0. (ACEA Biosciences, ABD) yazılımı kullanılmıştır.

3.1.4. Testis Örneklerinin İzole Edilmesi ve Kokültür için Hazırlanması

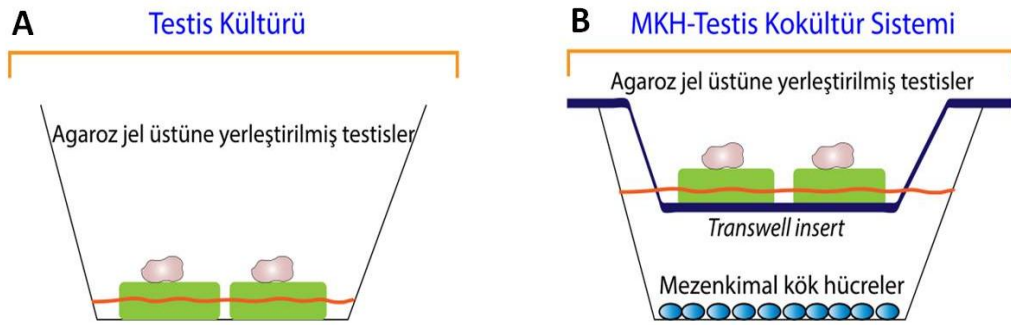
6 günlük C57BL/6 erkek farelere servikal dislokasyon yapılmasının ardından, cerrahi yöntemle testisler izole edilmiş, ardından %1 pen-strep içeren +4°C HBSS tampon solüsyonu içeren 15 ml falkonlara alınmıştır. Her bir hayvan için ayrı bir tampon solüsyonu hazırlanmış, testisler tüplere ikiyeşerli olarak alınmıştır.. Ardından, laminar akım kabine alınarak testisler, numaralandırılarak ayrı ayrı 35 mm'lik petri kaplarında 1ml 40 mg/ml AlbuMAX I (Gibco, ABD), %1 pen-strep içeren α -MEM besiyerine alınmıştır. Testisi dıştan saran kapsül yapısındaki tunika albuginea stereomikroskop altında mikrodiseksiyon pensetleri yardımıyla parankimden ayrılarak seminifer tübüller açığa çıkarılmıştır. Sonrasında tübüller bu pensetler yardımıyla boyutları yaklaşık olarak 1 mm olacak şekilde 1- 3 parçaya bölünerek kültüre hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Altı günlük yeni doğan fareden cerrahi izolasyon ile elde edilen testislerin kültür koşullarına hazırlanma aşamaları verilmektedir. (A) Altı günlük C57BL/6 farelerden cerrahi olarak izole edilen testisler (B) kültür besiyerine alınıp, (C) stereomikroskop altında (D) tunika albuginea tabakalarından arındırılmıştır. (E) Sonra, kültüre uygun boyut olan yaklaşık 1 mm³'e getirmek amacıyla testisler 1-3 parçaya bölünüp yaklaşık 1mm³ boyuta getirilerek, (F) önceden hazırlanıp en az 6 saat besiyerinde bekletilen agaroz jeller üzerine yerleştirilmiştir.

3.2. Altı Günlük C57BL/6 Erkek Farelerden Elde Edilen Testislerin Mezenkimal Kök Hücrelerle Kokültürü

Mezenkimal kök hücre ve testis kokültürünün oluşturulabilmesi için deneyden 4 gün önce kokültür grubundaki her kuyucuğa 50.000 hücre ekilmiştir. Bu süre aralığında hücreler α -MEM MKH besiyeri ile %5 CO₂ içeren ortamda 37 °C'de inkübe edilmiştir. Testislere yataklık edecek agaroz jel tabakasının oluşturulması için 1.5 gr Agarose I (VWR, ABD) tozu, 100 ml distile suya eklenip ısıtılarak yüzde 1.5 (w/v) jel çözeltisi elde edilip 2 atm basınçla 121 °C'de 20 dk otoklavlanmıştır. Karışım sıcakken 100 mm'lik petri kaplarına yükseklikleri 5 mm olacak şekilde (33 ml/100 mm petri) dökülüp soğutularak jelleştirilmesi sağlanmıştır. Sonra, petri ağzları sıkıca parafilmlenerek deneye hazır şekilde +4 °C'de bekletilmiştir. Testis izolasyonundan bir gün önce jelden 10x10x5 mm'lik (genişlik x genişlik x yükseklik) boyutlarda parçalar kesilerek kültür besiyerinin içine aktarılıp, en az 6 saat bekletilmiştir. Böylelikle jel içindeki suyun besiyeri ile yer değiştirmesi sağlanmıştır. *Transwell* (Corning, ABD) *insert*leri deneyden bir gece önce PBS içine alınarak ısıtılmıştır. Altı saat besiyerinde bekletilen jel parçaları kontrol grubundaki testisler için 6 kuyucuklu kültür plakalarının tabanına, kokültür grubundakiler için ise *transwell* insertlerinin tabanına yerleştirilmiştir. Kokültür grubundaki kuyucuklarda bulunan MKH besiyeri çekilip, hücreler PBS ile yıkanmıştır. Ardından, testis dokuları her jele 1 ile 3 arası dokusu parçası denk gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Yüzde 10 KSR (*Knockout Serum Replacement*) (Gibco, ABD), %1 pen-strep içeren α -MEM testis kültürü besiyerinin yüksekliği agaroz jellerin 1/2'si ile 4/5'i arasında bir seviyeye ayarlanmıştır (Şekil 3.3.). Haftada bir kere besiyeri değişikliği yapılmış ve oluşturulan testis organ kültürü ve MKH testis kokültürü 34 °C'de %5 CO₂ oranı ile muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.3. (A) Agaroz jel üzerinde tek başına kültüre edilen testisleri ve (B) *transwell insert* sayesinde MKH ve testis hava sıvı interfaz yöntemli kokültür uygulaması şematize edilmektedir.

3.3. Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Testisteki Spermatogonyal Kök Hücre Havuzuna Etkisinin Değerlendirilmesi

3.3.1. Akım Sitometrisi ile Testiste Spermatogonyal Kök Hücre Miktarının Belirlenmesi

Kültür süresini tamamlayan testisler 30 mm'lik petri kaplarına alınıp 1 ml HBSS içinde enjektör iğneleri yardımıyla mekanik olarak parçalanmıştır. Ardından hacimce %10 DNaz I ve %90 0.25 EDTA-Tripsin solüsyonuna alınarak kimyasal sindirim ile tek hücre süspansiyonu haline getirilmiştir. Ardından hücre süspansiyonu 40 µm filtreden geçirilip FACS tüplerine alınmıştır. 350 g'de 5 dk santrifüj yapılan tüplerdeki pellet 100 µl HBSS ile resüspanse edilmiştir. Homojenize edilen hücrelerin üzerine 'PBS-BSA-Na Azide' (PBN) ile birlikte yüzey belirteci APC ile işaretli rat anti fare CD117 (c-Kit) antikoru (BD Biosciences, ABD) eklenmiştir. İzotipik kontrol olarak APC işaretli Sıçan IgG_{2b} antikoru kullanılmıştır. Tüpler +4 °C'de ve karanlıkta 30 dk inkübe edilmiş; inkübasyon bitiminde 2 kez PBS-BSA-Na Azid ile yıkama yapılmıştır. Ardından, hücre içi yerleşimli PLZF antikoru ile bağlanma sağlanabilmesi için permeabilizasyon ve fiksasyon gerçekleştirilmiştir (Biolegend, ABD). Daha sonra 350 g'de 5 dk santrifüj edilen hücreler 100 µl permeabilizasyon solüsyonu ile resüspanse edilmiş, hücrelere 5'er µl PE işaretli rat anti fare PLZF antikoru (BD Biosciences, ABD) eklenerek 20 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İzotipik kontrol olarak Sıçan IgG2a antikoru kullanılmıştır. Süre sonunda 2 kez HBSS ile yıkanan hücreler 350 g'de santrifüjün ardından 200 µl HBSS ile resüspanse edilip,

akım sitometrisi cihazı ile okutulmuştur. İşaretlenmiş hücrelerin yüzey belirteçlerinin analizi Novocyte (ACEA, Biosciences, ABD) akım sitometri cihazında toplam 10,000 olgu okutularak Novoexpress 1.3.0. (ACEA Biosciences, ABD) programı kullanılmıştır. Deneyler 2 paralelli ve 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.4. Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin *in vitro* Koşullarda Testis Mikroçevresi Üzerindeki Koruyucu Etkisinin Değerlendirilmesi

3.4.1. İmmünohistokimyasal ve İmmünofloresan Boyama ile Testis Mikroçevresinin *in vitro* Koşullarda Korunmasına Mezenkimal Kök Hücrelerin Katkısının Değerlendirilmesi

Histokimyasal boyama ve immün işaretleme çalışmalarının yapılabilmesi için kültür süresini tamamlayan testisler ışık mikroskobu takibine alınmış ve parafin bloklar elde edilmiştir.

3.4.1.1. Histokimyasal inceleme

Kültürden alınan örnekler biyopsi torbalarına yerleştirilip 24 saat boyunca +4 °C'de *Bouin* çözeltisi ile fikse edildikten sonra, sabit vakumlu doku takip cihazında (Leica, Almanya) dereceli alkollerden geçirilerek parafin istasyonunda (Leica, Almanya) parafine gömülmüştür. Kızaklı mikrotomda (Leica, Almanya) polilizin kaplı lamlara (Sigma Aldrich, ABD) 3 µm'lik seri kesitler alınmıştır. Etüvde 60 °C'de bir gece süreyle deparafinize edilen kesitler dereceli alkollerde rehidrate edilip, Periodic Acid Schiff (PAS) (Mucin Stain) (Abcam, Birleşik Krallık) yöntemiyle boyanmıştır. Elde edilen kesitler ışık mikroskobu ataşmanlı dijital kamera (Leica DMR 6000, Almanya) ve ilişkili görüntü analiz sistemi (LASv3 Leica, Almanya) aracılığıyla incelenmiştir. Her kesitte 50 adet seminifer tübül kaydedilerek tübül ve lümen alanları dijital ortamda kantitatif olarak hesaplanmıştır (86). Her örnek için toplam tübül ve lümen alanları bilgisayar ortamına aktarılarak değerlendirilmiştir.

3.4.1.2. Testis Tübüllerindeki Spermatogonyal Kök Hücrelerin İmmünohistokimyasal İşaretlenmesi

İmmünohistokimyasal işaretleme için deparafinize edilen kesitler ve dereceli alkollerde rehidrate edilmiştir. Kesitlere ısı ile antijen geri çağırma yöntemi uygulanmıştır. Bunun için, kesitler sitrat tamponu çözeltisi (pH=6.5) (Abcam, ABD) içinde düdüklü tencerede kaynatıldıktan sonra 7 dk süreyle bekletilmiştir. PBS ile 3 kez yıkama sonrası sekonder antikorun hazırlandığı keçi serumuyla (Abcam, ABD) 10 dk oda ısısında protein blokajı yapılmıştır. Ardından kesitler, Sıçan Anti Fare SALL4 (Abcam, ABD) primer antikoruna ile 15-30 dk boyunca oda ısısında nemli odacıkta inkübe edilmiştir. Kesitler PBS ile yıkandıktan sonra Keçi Anti Sıçan IgG-HRP sekonder antikor (Abcam, ABD) ile 15 dk süreyle oda ısısında inkübe edilmiştir. PBS ile yıkanan kesitlere kromojen olarak DAB damlatılmış, negatif ve pozitif kontrol kesitlerinin ışık mikroskobu altında incelenmesi ile işaretleme takibi yapılarak 5-7 dk boyunca oda ısısında inkübe edilmiştir. Negatif kontrol için primer antikorun damlatılmadığı, pozitif kontrol için de primer antikorun çalıştığı bilinen dokular kullanılarak işaretleme yapılmıştır. DAB ile inkübasyonun hemen ardından kesitler PBS ile yıkanmış ve 30 sn inkübasyon ile hematoksilende çekirdek boyaması yapılmıştır. Ardından yıkanıp dereceli alkoller ile dehidrate edilen kesitler entellan ile kapatılmıştır. İşaretlenen kesitler, invertte ışık mikroskobu (Leica DM 6000 BM, Almanya) ile incelenmiş ve LASv3 yazılımı kullanılarak her kesitte 50 tübüldeki kahverengi işaretlenmiş hücrelerin sayımı yapılarak kantitatif sonuçlar elde edilmiştir.

3.5. Sonuçların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Deney paketlerinden elde edilen verilerde normal dağılımın varlığı test edildikten sonra sonuçlar parametrik ya da parametrik olmayan testler kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışmada kantitatif sonuç vermek üzere uygulanan deneyler 2 paralelli ve 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bağımlı değişkenler; çalışmaya ait ölçüm parametreleri (hücre sayısı, testis dokusunda seminifer tübül ve lümenlerin histomorfometrik ölçümleri), bağımsız değişkenler; zaman (1, 2, 4, 6 hafta) ve deney

koşullarıdır (MKH ile kokültüre edilmiş ve tek başına kültüre edilmiş immatür testis şeritleri) çalışmaya ait ölçüm parametreleridir. Bağımlı ve bağımsız değişkenlere ait tanımsal istatistikler parametrik ya da parametrik olmayan testlerin uygulanmasına göre ortanca, minimum maksimum ya da ortalama değerleri $\pm$ SD ile sunulmuştur. Yüzde doksan beşlik güven aralığı ve yüzde beşlik hata payı ile yapılan analizler için SPSS 16.0 Bivariate Correlation A programı kullanılmıştır.



4. BULGULAR

4.1. Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin ve Testis Dokusunun Elde Edilmesi, Kültürü ve Karakterizasyonu

4.1.1. Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu

Kullanılan yöntem ile altı günlük C57BL/6 türü farelerden MKH'ler başarılı bir şekilde izole edilmiş ve üçüncü pasaja getirildiklerinde kokültür gruplarında kullanılmıştır.

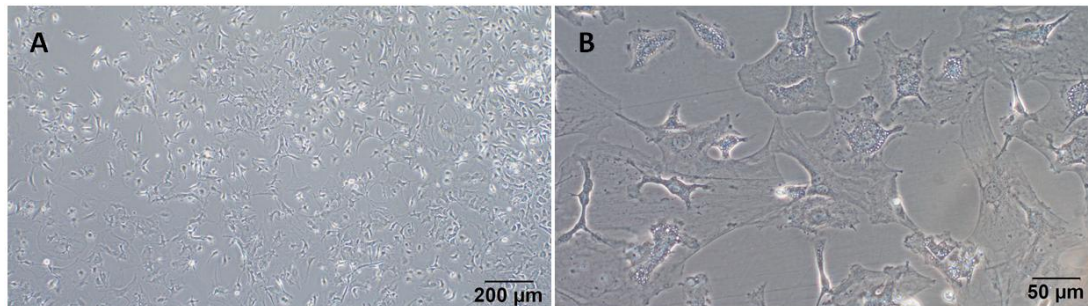
4.1.2. İzole Edilen Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Kültürü

İzole edilen Kİ-MKH'lerin ilk pasaj ile birlikte kültür flasksındaki homojenitesi sağlanmış, 3 günde bir yapılan düzenli besiyeri değişimi ve kültür ortamında %70 yoğunluk görüldüğünde yapılan pasajlamalar ile hücre morfolojileri korunmuştur.

4.1.3. İzole Edilen Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

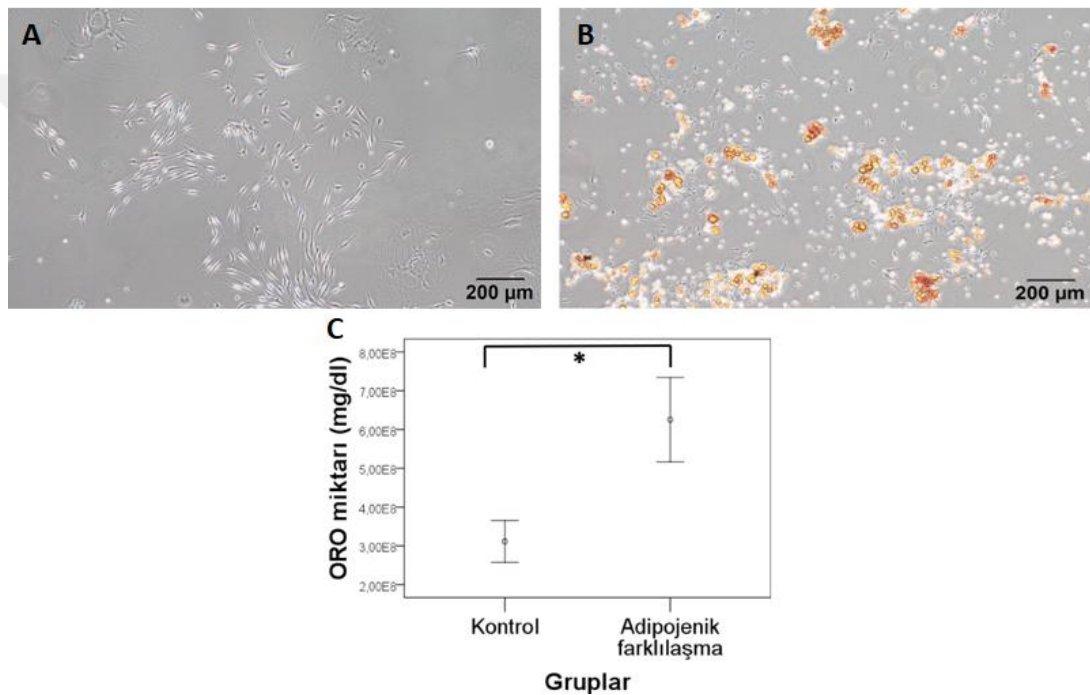
Bütün karakterizasyon işlemleri MKH'ler üçüncü pasaja geldiklerinde başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Morfolojik Değerlendirme; Hücreler beklendiği üzere plastik kültür kaplarına tutunmuş ve iğsi-poligonal yapı göstermişlerdir. Üretilen MKH'lere ait örnek mikrograflar Şekil 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Üçüncü pasaj mezenkimal kök hücreler invert mikograflarında kültür kabı tabanına tutunmakta ve iğsi-poligonal şekil göstermektedir. (A) x100, (B) x400.

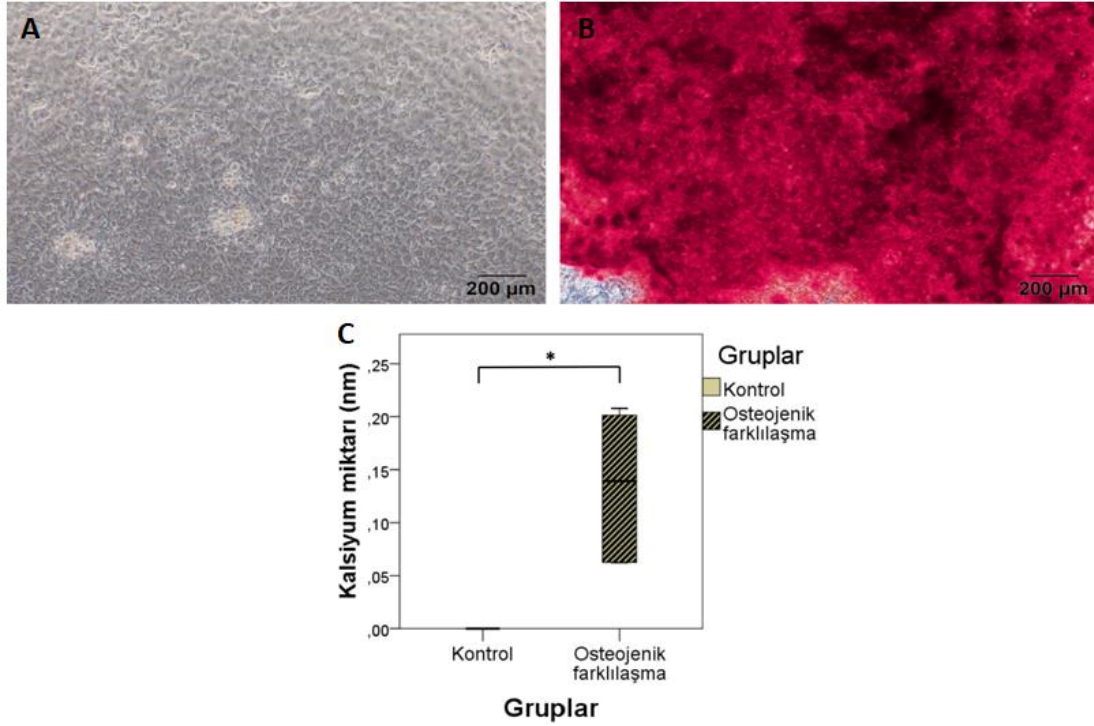
Adipojenik Farklılaştırma; Uygulanan kültür koşulları ile üçüncü pasaj Kİ-MKH'lerin yağ hücrelerine farklılaşması sağlanmıştır. Yirmi bir gün boyunca adipojenik farklılaştırma besiyeri uygulanan MKH'lerde, *Oil Red O* (ORO) ile yağ damlacıklarının olduğu gözlenmiştir. Spektrofotometrik analiz ile ORO boya miktarının; adipojenik yönde farklılaştırılan hücrelerde (0.74 ± 0.05) kontrole (0.37 ± 0.03) göre anlamlı şekilde fazla olduğu görülmüştür ($p < 0.05$, Şekil 4.2.). Böylece, izole edilen ve üçüncü pasaja getirilen MKH'lerin yağ hücresine farklılaşabilme potansiyeli gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 4.2. Yirmi birinci gündeki adipojenik farklılaşma analizinin kalitatif ve kantitatif ölçüm sonuçları verilmektedir. (A) Kontrol grubuna uygulanan ORO boyama protokolü sonucunda boyalı hücreye rastlanmamıştır (x100, ORO). (B) Adipojenik farklılaşma grubunda ise hücrelerdeki turuncu-kırmızı boyalı yağ damlacıkları gözlenmiştir (x100, ORO). (C) spektrofotometrik analiz sonuçları görülmektedir (n=18, * $p < 0.05$). Böylece, izole edilen ve üçüncü pasaja getirilen MKH'lerin yağ hücresine farklılaşabilme potansiyeli gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

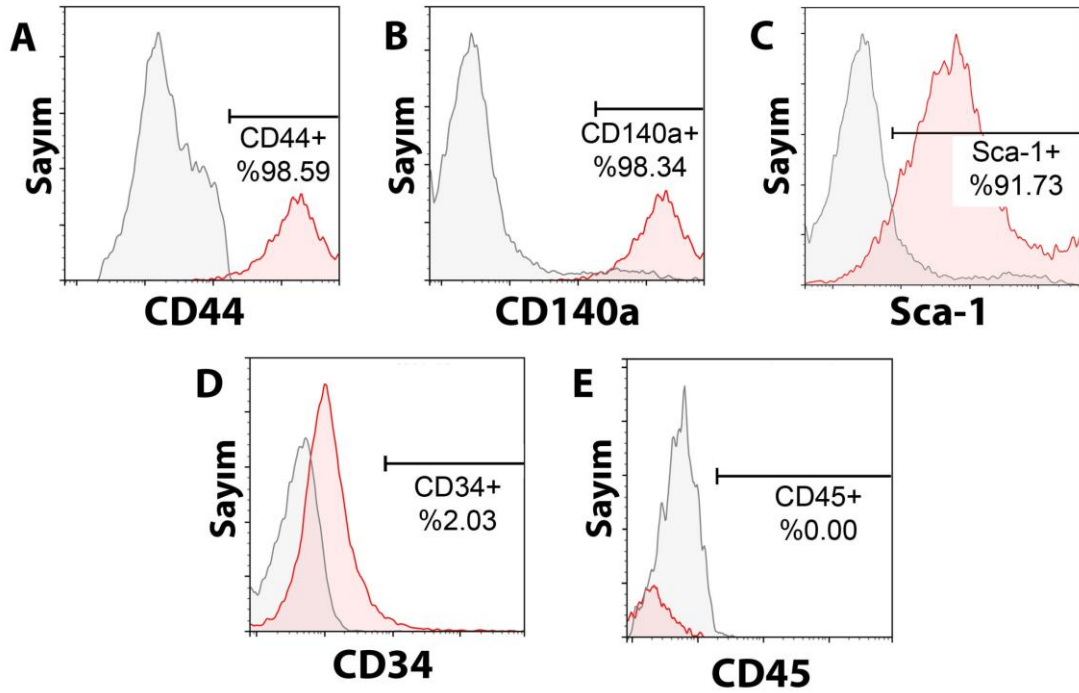
Osteojenik Farklılaştırma: Üçüncü pasajdaki Kİ-MKH'lerin kemik hücrelerine farklılaşması sağlanmıştır. Yirmi bir gün boyunca kemik hücrelerine farklılaşma besiyeri uygulanan üçüncü pasaj MKH'lerin *Alizarin Red S* (ARS) ile invertte ışık mikroskopunda kalsiyum kristallerini biriktirdiği gözlenmiştir (Şekil 4.3.).

Spektrofotometrik analiz ile osteojenik olarak farklılaştırılan hücrelerin içerdiği kalsiyum miktarının (ortanca: 1.50, minimum: 1.00, maksimum: 2.00) kontrol hücrelerine (ortanca: 0.03, minimum: 0.00, maksimum: 0.21) oranla anlamlı biçimde yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.05$).



Şekil 4.3. Yirmi birinci günün sonunda yapılan osteojenik farklılaşma analizinin kalitatif ve kantitatif ölçüm sonuçları verilmektedir. Yapılan ARS boyaması ile, (A) kontrol kuyucuğundaki hücrelerde herhangi bir boyanma gözlenmemiştir (x100, ARS). (B) Osteojenik farklılaşma kuyusunda ise kemiğe farklılaşma sonucu meydana gelen kalsiyum çöküntüleri kırmızı boyalı olarak tespit edilmiştir (x100, ARS). (C) Yapılan spektrofotometrik analiz sonuçlarına göre osteojenik farklılaşma kuyucuklarında kontrol kuyucuklarına kıyasla kalsiyum miktarında anlamlı bir artış görülmüştür ($n=18$, $*p<0.05$).

Hücre Yüzey Belirteçlerinin Analizi ile MKH Karakterizasyonu: İzole edilip üçüncü pasaja getirilen Kİ-MKH'lerin karakteristik belirteçleri CD44 ile %98.59, CD140a ile %98.34 ve Sca-1 ile %91.73 oranında; hematopoietik belirteçler olan CD34 ile %2.03 ve CD45 ile %0 oranında işaretlendiği saptanmıştır. Bu immün fenotipik profil MKH olma özelliğini ortaya koymaktadır (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. C57BL/6 türü fare kemik iliğinden izole edilen üçüncü pasaj MKH'lerin yüzey belirteci analizi sonuçları verilmektedir. Hücrelerde MKH belirteci olan (A) CD44 ile %98.59, (B) CD140a ile %98.34 ve (C) Sca-1 ile %91.73 oranında; HKH belirteçleri olan (D) CD34 ile %2.03 ve (E) CD45 ile %0 oranında işaretlenme tespit edilmiştir.

4.1.4. Testis Örneklerinin İzole Edilmesi ve Kokültür için Hazırlanması

Altı günlük farelerin testisleri başarılı bir şekilde izole edilerek, stereomikroskop altında tunika albuginea tabakalarından başarıyla arındırılıp kültür için yaklaşık 1 mm³lük uygun boyuta getirilmiş ve ileri iş paketlerinde kullanılmıştır.

4.2. Altı Günlük C57BL/6 Erkek Farelerden Elde Edilen Testislerin Mezenkimal Kök Hücrelerle Kokültürü

Testislere yataklık etmek üzere agaroz jel dökülüp uygun boyutlarda kültüre hazır hale getirilmiş ve deneylerden 4 gün önce MKH ekimi yapılarak tez önerisinde ön görülen sayıda yeni doğan testisi ile 1, 2, 4 ve 6 hafta boyunca kokültür protokolü başarılı şekilde uygulanarak tamamlanmıştır.

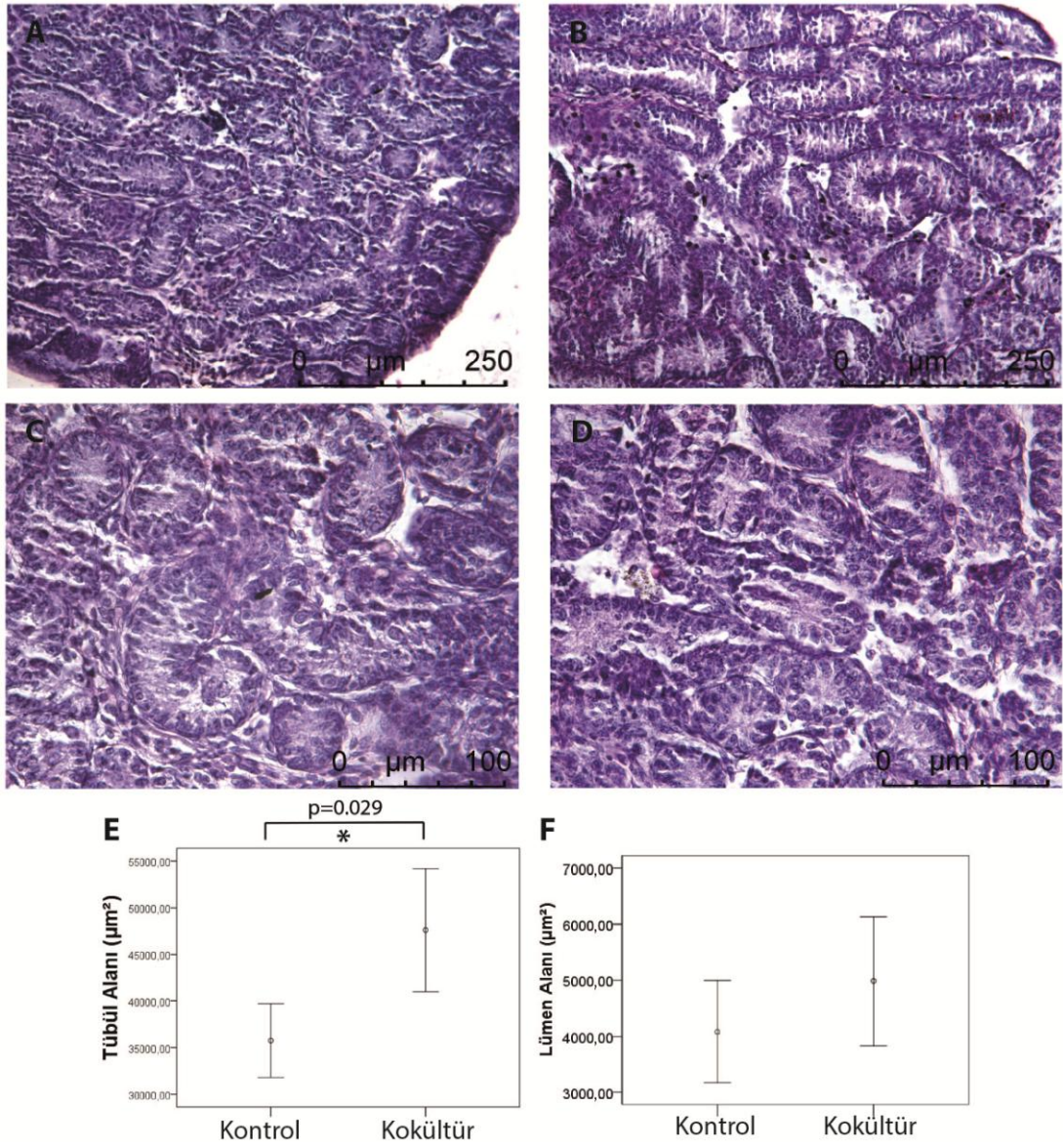
4.3. Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin *in vitro* Koşullarda Testis Mikroçevre Üzerindeki Koruyucu Etkisinin Değerlendirilmesi

4.3.1. Histokimyasal Boyama ve İmmünohistokimyasal İşaretleme ile Testis Mikroçevresinin *in vitro* Koşullarda Korunmasına Mezenkimal Kök Hücrelerin Katkısının Değerlendirilmesi

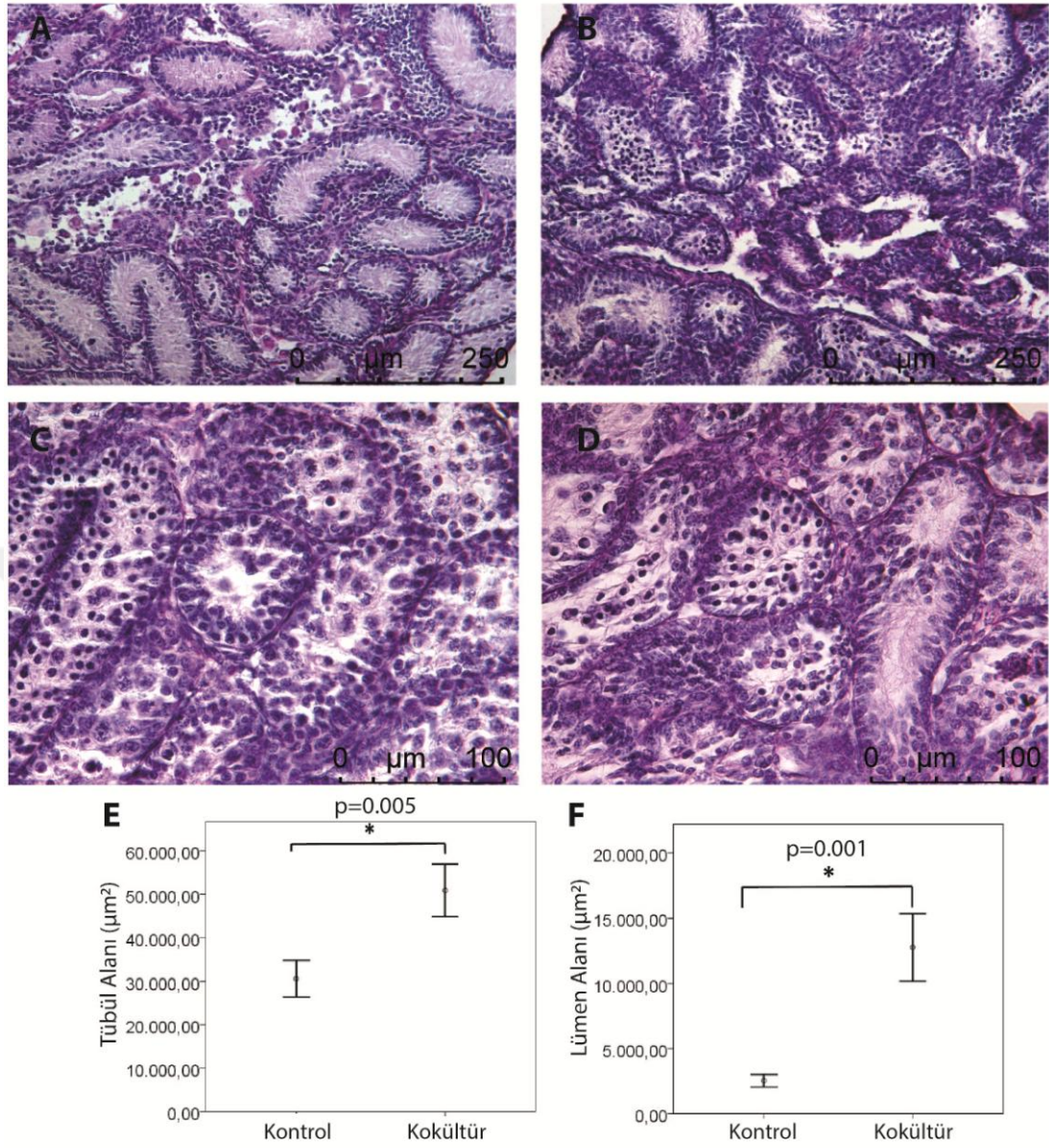
Histokimyasal inceleme: Kokültür grubundaki testisler kontrol grubundaki örneklerle karşılaştırıldığında histokimya sonuçlarına göre 1 (p=0.029), 2 (p=0.005), 4 (p=0.001) ve 6. (p=0.001) haftada tübül alanı; 2 (p=0.001) ve 6. (0.017) haftada lümen alanında kontrole göre anlamlı artış gözlenmiştir (Şekil 4.5.-4.8.). Tablo 4.1’de tübül ve lümen alanı ölçümlerine ait tanımlayıcı istatistik verileri sunulmaktadır.

Tablo 4.1. Histolojik boyalı kesitler üzerinde yapılan 1, 2, 4 ve 6. haftalara ait seminifer tübül ve lümen alanlarının histomorfometrik ölçüm sonuçları verilmektedir (*p<0.05, n=300).

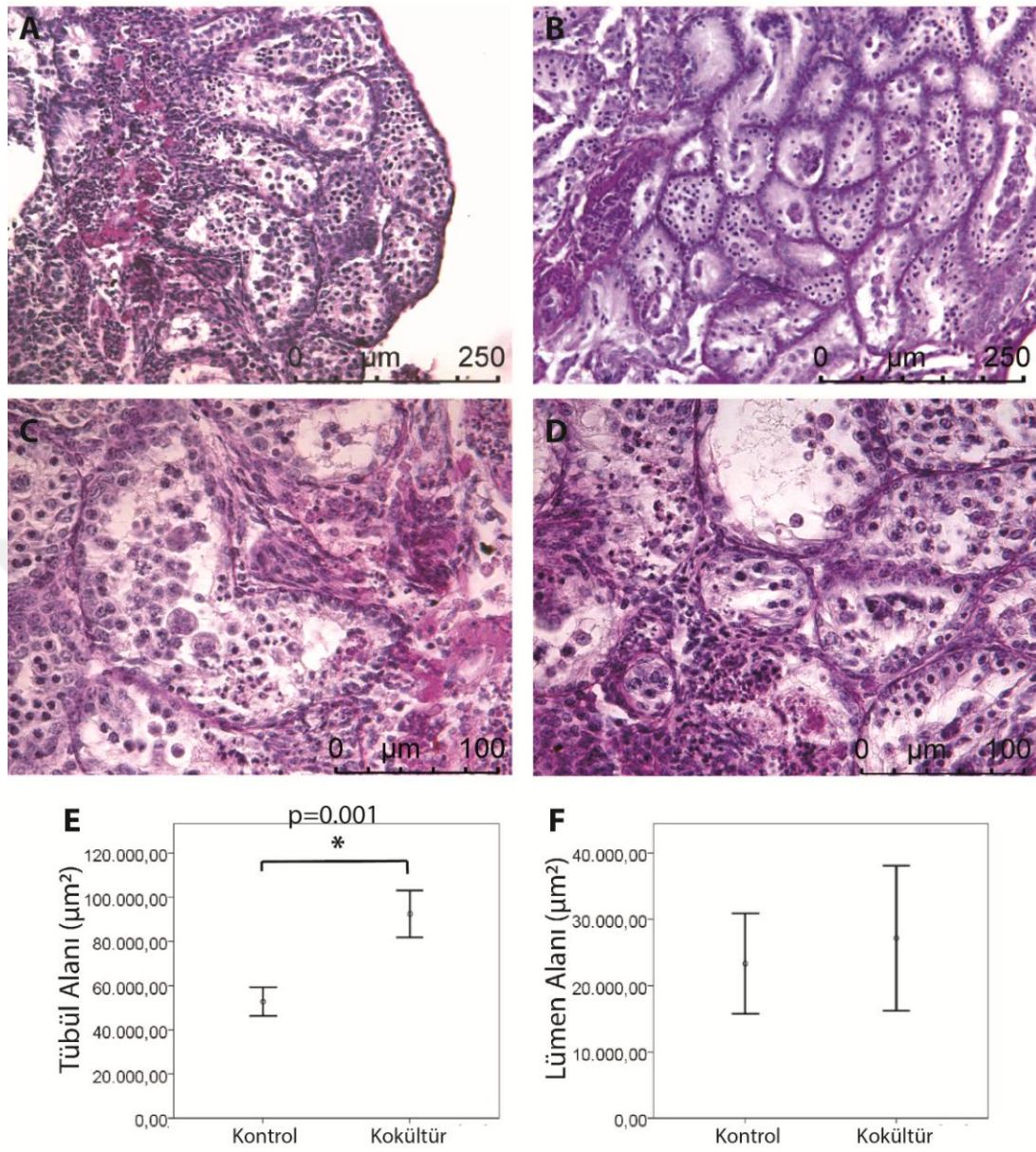
← Hafta	TÜBÜL ALANI (μm^2) (Ortalama $\pm$ Standart Sapma)		LÜMEN ALANI (μm^2) (Ortalama $\pm$ Standart Sapma)	
	Kontrol	Kokültür	Kontrol	Kokültür
1	35388,68 $\pm$ 13838,92	48053,14 $\pm$ 22937,64*	4083,90 $\pm$ 2170,92	5073,86 $\pm$ 2808,12
2	31943,02 $\pm$ 17762,14	50271,14 $\pm$ 23863,96*	2071,64 $\pm$ 863,52	13068,48 $\pm$ 7187,71*
4	52531,44 $\pm$ 16562,19	92310,70 $\pm$ 32466,25*	21516,80 $\pm$ 16681,98	28477,06 $\pm$ 25094,86
6	39784,00 $\pm$ 18563,19	91300,10 $\pm$ 42220,08*	13203,57 $\pm$ 7245,88	32352,18 $\pm$ 30426,36*



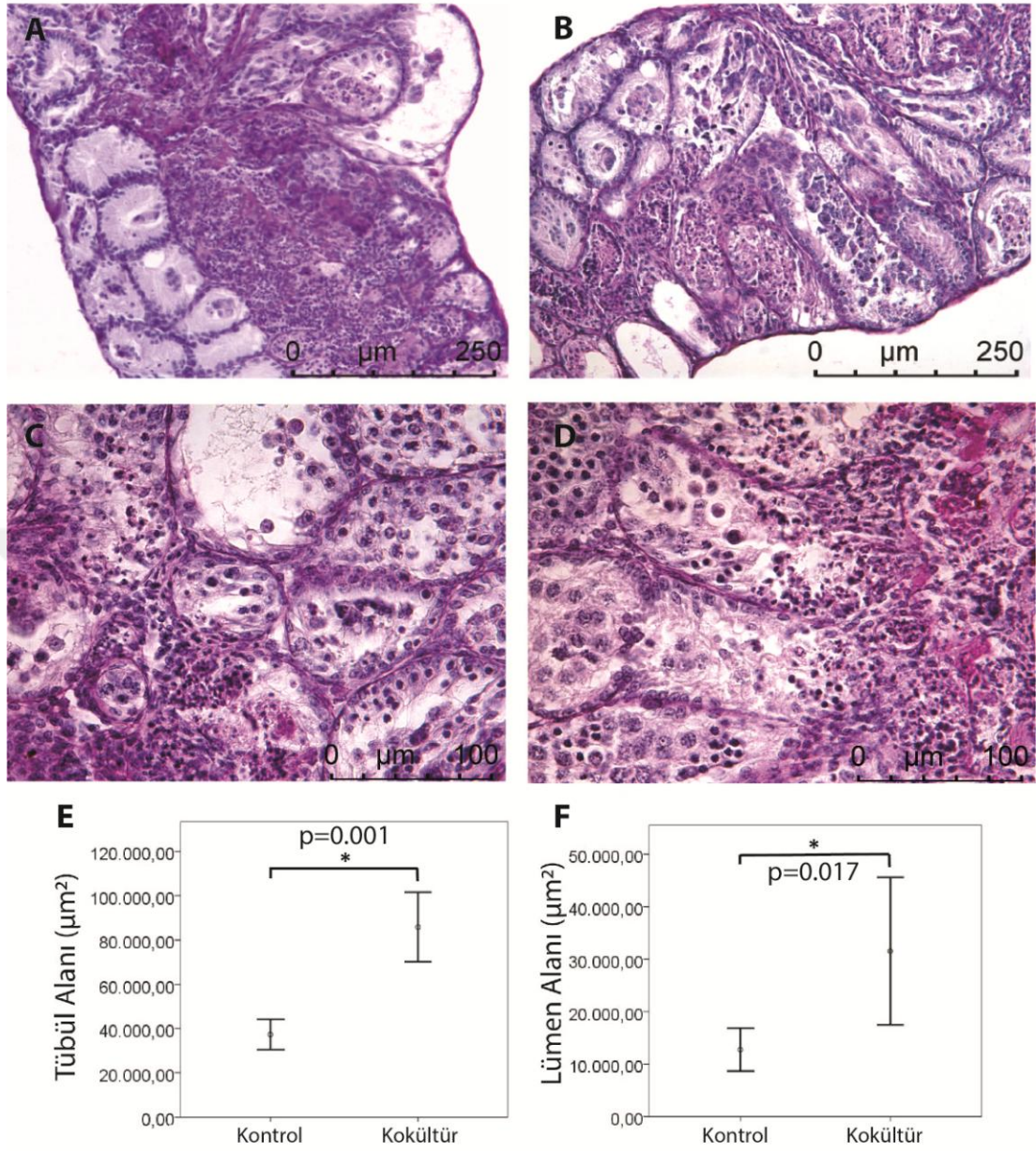
Şekil 4.5. Bir haftalık kültür sonunda histomorfometrik analiz sonuçları verilmektedir. (A, C) Kontrol (x100, x400, PAS) ve (B, D) kokültür grubuna (x100, x400, PAS) ait testis mikrograflarında tübül ve lümen alanı ölçümleri alınmıştır. (E) Tübül alanı, (F) lümen alanına ait güven aralığı grafikleridir. (n=6 testis, 300 tübül, *p<0.05)



Şekil 4.6. İki haftalık kültür sonunda histomorfometrik analiz sonuçları verilmektedir. (A, C) Kontrol (x100, x400, PAS) ve (B, D) kokültür grubuna (x100, x400, PAS) ait testis mikrograflarında tübül ve lümen alanı ölçümleri alınmıştır. (E) Tübül alanı, (F) lümen alanına ait güven aralığı grafikleridir. (n=6 testis, 300 tübül, *p<0.05)



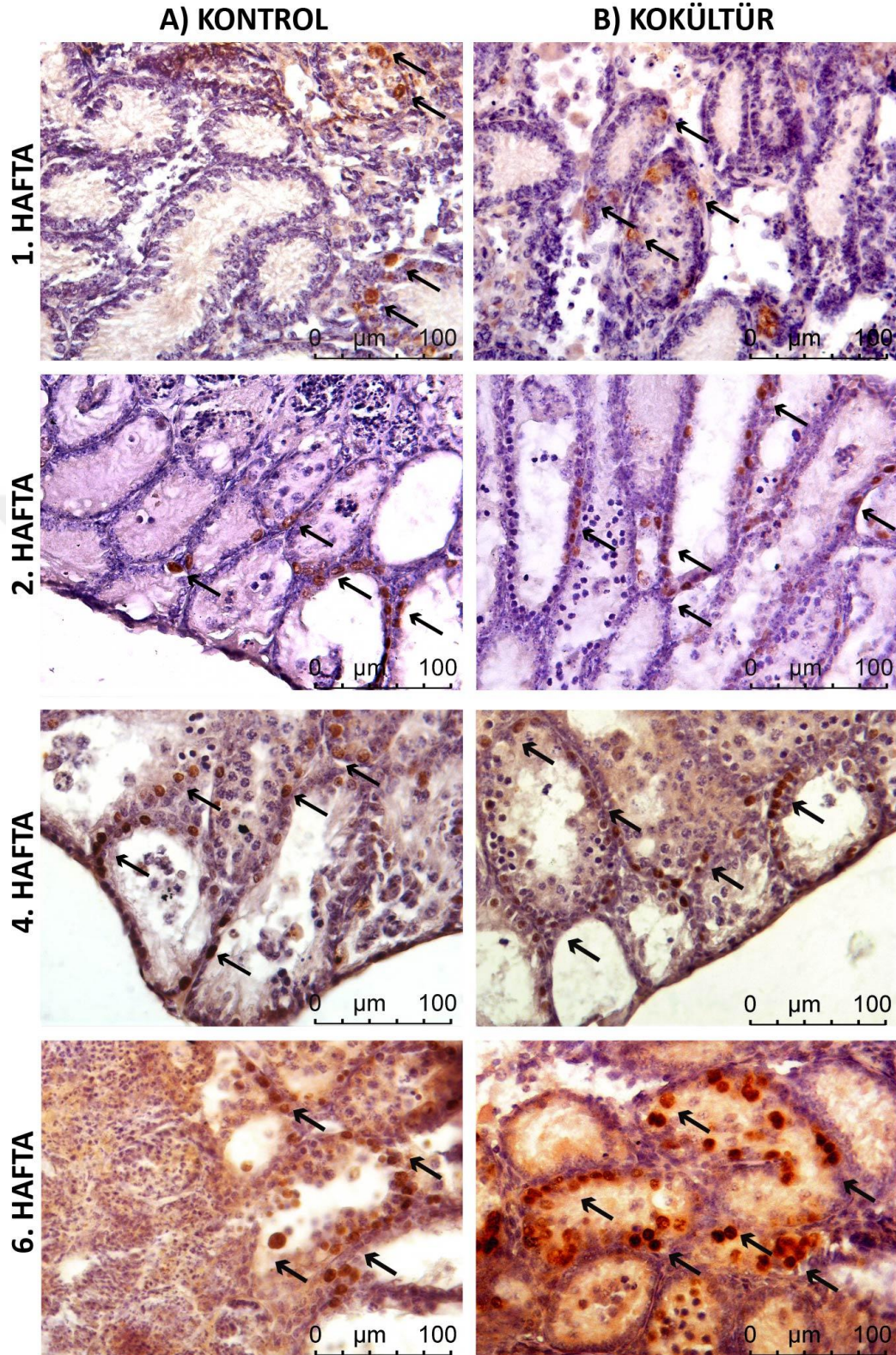
Şekil 4.7. Dört haftalık kültür sonunda histomorfometrik analiz sonuçları verilmektedir. (A, C) Kontrol (x100, x400, PAS) ve (B, D) kokültür grubuna (x100, x400, PAS) ait testis mikrograflarında tübül ve lümen alanı ölçümleri alınmıştır. (E) Tübül alanı, (F) lümen alanına ait güven aralığı grafikleridir. (n=6 testis, 300 tübül, *p<0.05)



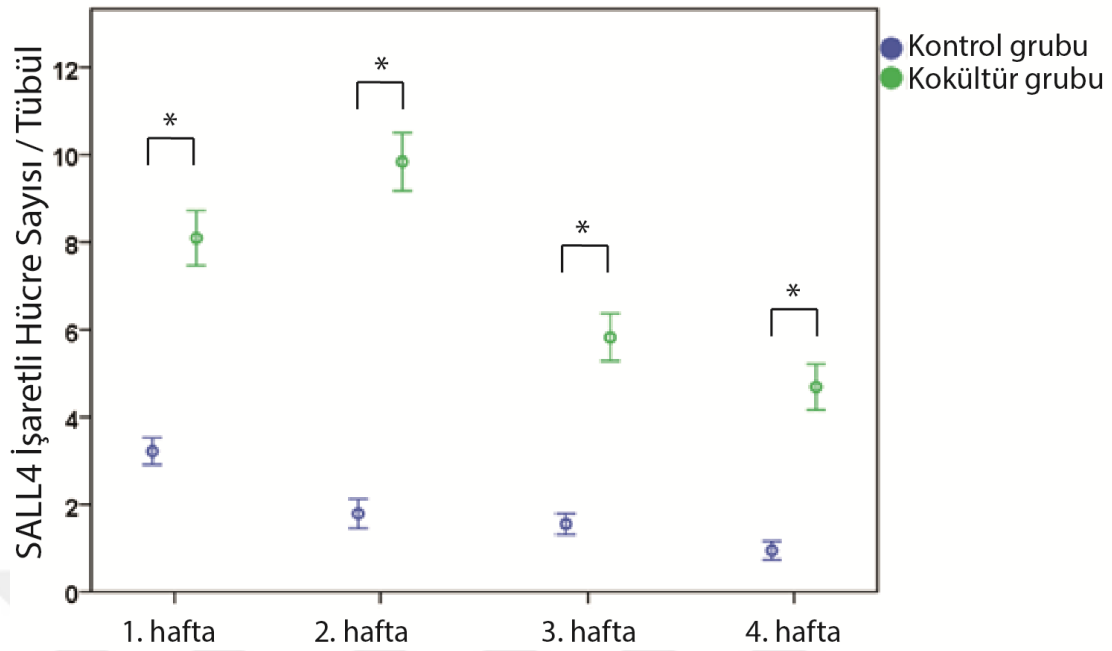
Şekil 4.8. Altı haftalık kültür sonunda histomorfometrik analiz sonuçları verilmektedir. (A, C) Kontrol (x100, x400, PAS) ve (B, D) kokültür grubuna (x100, x400, PAS) ait testis mikrogramlarında tübül ve lümen alanı ölçümleri alınmıştır. (E) Tübül alanı, (F) lümen alanına ait güven aralığı grafikleridir. (n=6 testis, 300 tübül, * $p<0.05$)

İmmünohistokimyasal işaretleme: Kokültür grubundaki testisler kontrol grubundaki örneklerle karşılaştırıldığında immünohistokimya sonuçlarına göre (Şekil 4.9.) 1 ($p<0.001$), 2 ($p<0.001$), 4 ($p<0.001$) ve 6 ($p<0.001$) haftalık kültür sürelerinin tümünde SALL4 ile işaretli SKH sayısında kontrole göre anlamlı artış gözlenmiştir (Şekil 4.10.).





Şekil 4.9. (A) Kontrol ve (B) kokültür gruplarına ait testislerin 1, 2, 4 ve 6. Haftalarda SALL4 ile indirekt immün peroksidaz yöntemiyle işaretlenmelerini gösteren mikrograflardır. Bazal membrana tutunmuş, DAB kromojeniyle sitoplazmaları kahverengi renkli SALL4 immün reaktivitesi gösteren spermatogonyal kök hücreler okla işaretlenmiştir (x400, n=6).



Şekil 4.10. Kontrol ve kokültür grubuna ait SALL4 immünohistokimyası sonuçları haftalara göre verilmektedir (* $p < 0.001$, $n = 6$ testis, 300 túbül).

4.4. Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Testiste Bulunan Spermatogonyal Kök Hücre Havuzunun Korunması Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi

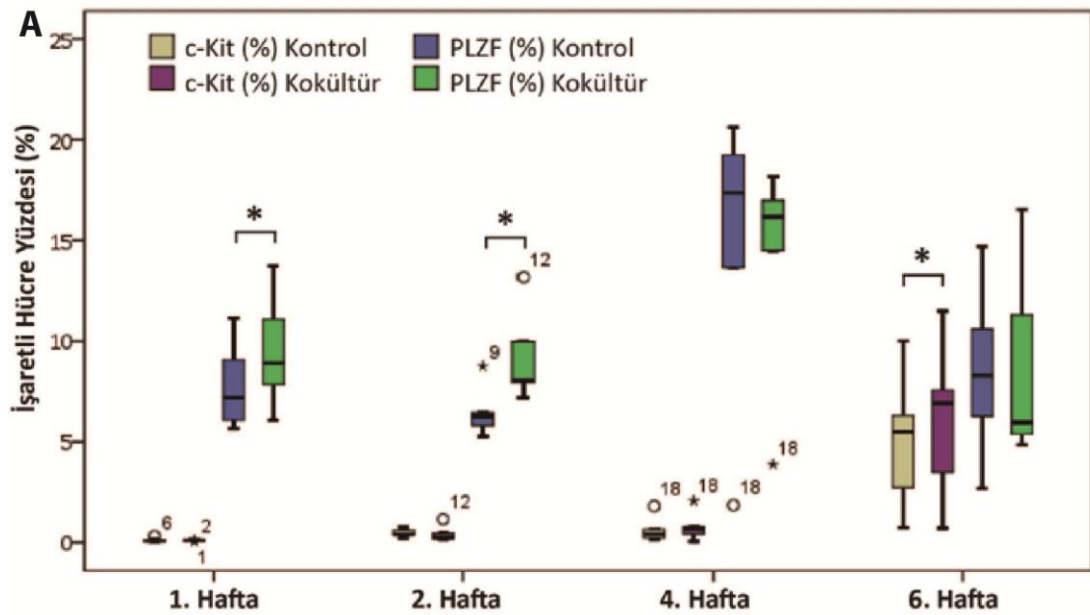
4.4.1. Akım Sitometrisi ile Testisteki Spermatogonyal Kök Hücre Miktarının Belirlenmesi

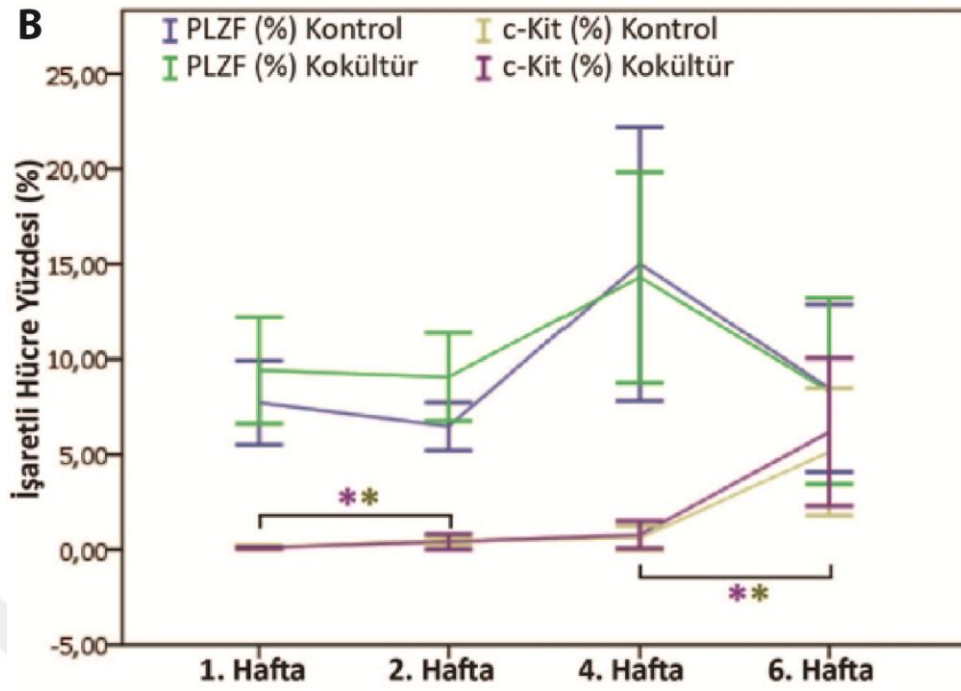
Bir, 2, 4 ve 6 haftalık kültür süreleri sonunda testislere uygulanan kimyasal sindirim ve mekanik parçalama ile elde edilen tek hücre süspansiyonu PE işaretli Sıçan Anti Fare PLZF ve APC işaretli Sıçan Anti Fare c-Kit antikorum ile ikili olarak değişen oranlarda işaretlenme göstermiştir (EK-2-9). İzotipik kontrol olarak PLZF antikoruna için PE konjuge Sıçan IgG2a ve c-Kit antikoruna için APC konjuge Sıçan IgG2b antikorumları kullanılmıştır (EK-10). Birinci ($p = 0.028$) ve 2. haftada ($p = 0.028$) kokültür grubunda PLZF ile işaretli spermatogonyal kök hücre yüzdesi kontrol grubuna göre anlamlı artış göstermiştir. Altıncı haftada c-Kit ile işaretli ileri farklılaşmış spermatogonyal seri hücre yüzdesi kontrol grubuna göre artış göstermiştir ($p = 0.046$). Dört ve 6. haftalarda PLZF; 1, 2 ve 4. haftalarda c-Kit ile işaretlenen hücre yüzdelerinde iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir.

(Şekil 4.11.). Tablo 4.2.'de akım sitometrisi sonuçlarına ait tanımlayıcı istatistik verileri sunulmaktadır.

Tablo 4.2. Bir, 2, 4, 6 haftalık kültür sürelerine ait PLZF ve c-Kit işaretli hücre yüzdeleri gösteren akım sitometrisi sonuçları gösterilmektedir (* $p < 0.05$, $n = 6$).

Hafta ↓	PLZF (%)					
	Kontrol			Kokültür		
	Medyan	Min	Max	Medyan	Min	Max
1	7,19	5,65	11,14	8,90 *	6,07	13,73
2	6,27	5,28	8,75	8,07 *	7,18	13,18
4	17,35	1,86	20,61	16,18	3,88	18,16
6	8,31	2,69	14,69	5,94	4,86	16,54
Hafta ↓	C-Kit (%)					
	Kontrol			Kokültür		
	Medyan	Min	Max	Medyan	Min	Max
1	0,08	0,06	0,32	0,10	0,05	0,12
2	0,41	0,22	0,77	0,25	0,15	1,16
4	0,42	0,15	1,81	0,68	0,06	2,07
6	5,50	0,74	10,02	6,91 *	0,71	11,50





Şekil 4.11. Akım sitometrisinde 1, 2, 4 ve 6. haftada A) kontrol ve kokültür gruplarında PLZF ve c-Kit işaretli hücre yüzdelerindeki değişimler kutu çizgi grafiğiyle ve B) zamana bağlı olarak kontrol ve kokültür grupları içindeki değişimler güven aralığı grafiğiyle gösterilmektedir (* $p < 0.05$, $n=6$).

5. TARTIŞMA

Bu tez kapsamında, planlanan hedeflere ulaşarak 6 günlük C57BL/6 türü farelerden izole edilen MKH'lerin karakterizasyonu morfolojik yapı, yüzey belirteçlerinin varlığı ve farklılaşma potansiyelinin değerlendirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Yeni doğan fare testislerinin allojenik KI-MKH'ler ile 1, 2, 4 ve 6 hafta süreyle kokültürü gerçekleştirilmiş, MKH'lerin seminifer tübül ve lümen alanlarındaki değişime olan parakrin etkisi histomorfometrik ölçümler ile ortaya konmuştur. Kokültür sisteminde MKH'lerin 1, 2, 4 ve 6. haftalarda testiste SKH ve ileri farklılaşmış spermatojenik seri hücre popülasyonuna etkisi sırasıyla PLZF ve c-Kit işaretli hücre yüzdeleri ile belirlenmiş ve kokültür sisteminde belirli zaman aralıklarında PLZF ve c-Kit işaretli hücre yüzdesinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde fazla olduğu tespit edilmiştir. PLZF ile elde edilen akım sitometrisi sonuçları SALL4 immün işaretleme ile doğrulanmış; elde edilen veriler, aşağıda araştırma hedeflerine ait başlıklar altında sırasıyla tartışılmaktadır.

İlk araştırma hedefi kapsamında altı günlük C57BL/6 türü fare kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler izole ve karakterize edilip; testis şeritleriyle kokültür sistemi başarıyla oluşturulmuş, hedeflenen kültür süresine ulaşılabilmiştir. Yenidoğan farelerden uygun yöntemle izole edilen KI-MKH'ler morfolojik yapı, yüzey belirteçlerinin varlığı, osteojenik ve adipojenik farklılaşma potansiyellerinin değerlendirilmesi sonucu başarı ile karakterize edilerek sonraki iş paketlerinde güvenle kullanılmıştır. Tüm iş paketlerinde karakterizasyonun gerçekleştiriliği üçüncü pasaj hücrelerin kullanılmasına özen gösterilmiştir. Bu pasaj sayısı MKH'lerin literatürde güvenli olarak kullanıldığı çalışmalarla uyumludur (87-90).

Literatürde, asılı damla ve hava sıvı interfaz sistemi olmak üzere iki tür statik testis kültür düzeneği tanımlanmıştır (91-93). Bu tez çalışmasında, testis organ kültürünün MKH'ler ile oluşturulacak indirekt kokültür sistemine adapte edilebilmesi için ekibimizce hava sıvı interfaz sisteminin kullanılması uygun görülmüştür. Bu konvansiyonel testis organ kültür sistemi, testislerin tunika albuginea tabakasından

arındırılıp altı kuyucuklu kültür kabı tabanındaki agaroz jel üzerine yerleştirilmesi ve besiyeri seviyesinin agaroz jel yüksekliğinin 1/2 ile 4/5'i arasında tutulmasıyla elde edilmektedir (93). Kültür sisteminde kullanılan besiyerinin testisle direkt teması yoktur ve testis şeritleri agaroz jel ile temas ettiği bölgelerden difüzyon yardımıyla beslenir. Difüzyonla besin maddeleri, büyüme faktörleri, kemokin ve sitokinlerin kültür ortamındaki testisin her bölgesine nüfuz etmesi ve organ canlılığının korunması için testis parçalarının boyutu önem taşır (94). Literatürde, statik koşulda agaroz jel üzerinde hava sıvı interfaz yöntemiyle kültüre edilen testislerin difüzyonla beslenebilmesi için uygun boyutun 1 mm³ olduğu bildirilmiştir (93, 95). Literatürle uyumlu biçimde çalışmamızda da testisler stereomikroskop altında kültüre hazırlanırken 1 mm³'lük boyutlarda parçalara bölüneler agaroz jeller üzerine yerleştirilmiştir.

Tez çalışmasında kontrol grubundaki testislerin kültüründe yukarıda açıklanan konvansiyonel sistem kullanılmıştır (93). Kokültür sisteminde konvansiyonel yöntemden farklı olarak bir kuyuya 100.000 hücre gelecek şekilde allojenik Kİ-MKH'ler altı kuyucuklu kültür kabı tabanına ekilmiş ve testislerin muhafaza edileceği hava sıvı interfaz ortamı kullanılan *transwell insert*leri üzerinde oluşturulmuştur. Böylece elde edilen indirekt kokültür sistemiyle, allojenik MKH'lerin parakrin sinyaller aracılığıyla testis mikroçevresi ve SKH havuzunun korunmasına optimal katkı sağlayabileceği varsayılmıştır. Literatürde, *in vivo* koşulda MKH'lerin testisteki parakrin immünite (66) ve gen ifadesi düzenleyici (65), germ hücresi sayısı (73), seminifer tübül ve lümen çapını arttırıcı (61) etkileri; *in vitro* koşulda Sertoli hücresine transdiferansiyasyona uğrayabildiklerini (69) gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Ancak bu tez kapsamında *in vitro* koşullarda oluşturulan kokültür sistemine benzer tasarımda Kİ-MKH'lerin testis seminifer tübül ve lümen alanı, SKH'lerin hayatta kalımı, proliferasyonu ve farklılaşması üzerindeki etkileri daha önce bildirilmemiştir.

Bu tez çalışmasında, kültür besiyeri olarak, testis organ kültürü sırasında spermatogenezi desteklemesi yönüyle literatürde kabul görmüş %10 KSR (v/v) içerikli α -MEM kullanılmıştır (96). Literatürde, KSR katkılı α -MEM besiyeriyle

sürdürülen sıçan testis kültüründe 4 hafta süreyle %5, %10 ve %15 KSR (v/v) içeren α -MEM besiyerinin 4 hafta seminifer tübül alanına zamana bağlı etkisi incelenmiş, %10 KSR katkısının diğer iki gruba göre tübül alanının anlamlı şekilde artış gösterdiği bildirilmiştir (97). Yayında belirlenen %10 KSR katkılı besiyerinin uygulandığı ve aynı kültür koşullarına sahip olan kontrol grubunda tübül alanında ilk 4 haftada zamana bağlı artış gözlenmiş, ancak 4 ve 6. haftalar arasında düşüş gerçekleşmiştir. İlk 4 haftada elde edilen bulgular Liu vd.'nin çalışması ile uyumludur (97). Dördüncü haftadan sonraki ileri kültür süresinde tübül alanında düşüş görülmesi 4 hafta sonrasında kontrol grubundaki kültür koşullarının yetersiz gelmesiyle ilgili olabilir. Tez çalışmasına ait bu ilk iş paketi, sonraki araştırma hedeflerinin temelini oluşturduğundan, çalışmanın temel standardını sağlamıştır. Çalışmamızda testis kültürünün statik koşullarda yürütülmesi ve difüzyonla beslenmeye dayalı bu sistemde kan damarlarıyla sağlanan sıvı akışının oluşturduğu biyomekanik kuvvetlerin taklit edilememesi bu iş paketinin sınırlamasını oluşturmaktadır. Biyomekanik kuvvetlerin taklit edildiği mikroakışkan sistemle testis kültürünün statik konvansiyonel agaroz jel yönteminden daha etkili olduğunu gösteren 3 çalışma bulunmaktadır (98-100). İlk çalışmada, spermatojenik seri hücreleri GFP ile işaretli yenidoğan fare testisinde pompalı mikroakışkan sistemde spermatogenezin konvansiyonel agaroz jel yöntemine göre daha etkili bir biçimde uzun süreyle korunduğu gösterilmiştir. Üretilen mikroakışkan sistemde ve kontrolü olarak agaroz jel üzerinde testisler 168 gün boyunca kültüre edilmiştir (98). GFP işaretli spermatojenik seri hücreleri içeren testislerin kullanıldığı çalışmada 84. günden itibaren agaroz jel kültür koşulunda GFP ifadesi tamamen sıfırlanırken, mikroakışkan kültür koşulunda gen ifadesi 168 gün boyunca devam ettirilmiştir. Çalışmada statik kontrol grubundaki GFP geni ifadesinde erken dönemde düşüş görülmesi bu sistemde testislerin hava ile direkt etkileşimde olmasına bağlanmıştır (98). Pompasız mikroakışkan sisteminin geliştirildiği ikinci çalışmada, 7 hafta süreyle kültüre edilen testislerde mayozdaki germ hücresi (tübüllerin %85'inde), yuvarlak (%44) ve uzun spermatid (%28) sayısında konvansiyonel agaroz jel yöntemine göre (sırasıyla %45,

%10, %10) anlamlı artış sağlanmıştır (99). İleri bir çalışma hedefi olarak grubumuzca kokültür düzeneğinin mikroakışkan sistemle desteklenmesi planlanmıştır.

İkinci araştırma hedefi kapsamında kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin parakrin yolla testis mikroçevresinin korunmasında destekleyici rol oynadığı ortaya konmuştur. Bu tez çalışmasında, yeni doğan fare testisleri allojenik Kİ-MKH'ler ile kültüre edildiklerinde MKH'lerin 1, 2, 4 ve 6. haftalarda, tübül alanında kontrol grubuna göre anlamlı bir artışa neden olduğu görülmüştür. Yeni doğan fare testisinde seminifer tübüllere tutunan Sertoli hücrelerinin çoğalma ve olgunlaşmasıyla lümenin oluşumu başlar; buna koşut olarak tübül alanında artış meydana gelir (101). Sertoli hücrelerinin olgunlaşmasının tamamlanamadığı veya çoğalmasının puberte öncesinde durduğu durumlarda tübül ve lümen alanının gelişime bağlı artışında aksaklık görülebilir (102). Seminifer tübüllerde fonksiyonel spermatozoonların üretimi testiste spermatogonyumların mitoz ve mayoz geçirmeleri sonucu gerçekleşse de, spermatogenezin devamlılığı ortamdaki germ hücreleriyle Sertoli hücrelerinin etkileşimine bağlıdır (103). Testiste bulunan toplam Sertoli hücresi ve Sertoli hücresi başına düşen spermatid sayılarına bakılarak, günlük spermatozoon üretimi miktarının doğrudan ve kesin bir şekilde hesaplanabileceği bildirilmektedir (103). Buradan yola çıkarak tez çalışmasında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ortaya konan tübül alanındaki artış, kokültür ortamında Sertoli hücreleri desteklenerek SKH mikroçevresinin daha iyi korunduğunun ölçütü olarak yorumlanmıştır.

Farklı kökenlere sahip MKH'lerin testise enjeksiyonunun *in vivo* koşullarda hasarlı seminifer tübüllerin çapını arttırıcı etkileri bildirilmiştir (61, 94, 104). *Sprague-Dawley* türü erişkin sıçanda *in vivo* koşullarda 21 günlük bösülfan uygulaması ile azoospermi modeli oluşturulduktan sonra 35. günde seminifer tübüllere tek doz olarak, 10^6 adet allojenik Ad-MKH enjeksiyonu yapılmıştır. İki ay sonra hematoksilen eozin ile boyanan testis kesitlerinde tübül alanında MKH enjeksiyonu yapılan grupta (n=5) enjeksiyon yapılmayan negatif kontrol grubuna göre (n=5) anlamlı artış bildirilmiştir (63). Wistar sıçanlara 40 mg/kg tek doz bösülfan

uygulaması ile testislerde hasar oluşturulduktan sonra tek testise 1.75×10^5 sayıda allojenik Kİ-MKH uygulanmıştır. Sekizinci haftada Kİ-MKH enjeksiyonu yapılan grupta negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tübül alanında artış gözlenmiştir (61). Dört haftalık Kunming farelere intraperitoneal 40 mg/kg būsülfan enjeksiyonu ile sterilite sağlandıktan 4 hafta sonra seminifer tübüle 2.5×10^5 adet insan göbek kordonu kökenli MKH enjeksiyonu 30 ve 120. günlerde gerçekleştirilen histolojik değerlendirmede MKH uygulanan testislerde tübül çapının kontrol grubuna göre anlamlı artış (%34) gösterdiği gözlenmiştir (105). Diğer çalışmada, *Sprague-Dawley* sıçanda *in vivo* koşullarda tek doz 7 mg/kg sisplatin ile oluşturulan testis hasarının ertesı günü testise 2×10^6 sayıda Kİ kaynaklı allojenik MKH uygulanmıştır. Uygulamanın, 7 gün sonra seminifer tübüllerde kontrole göre alan artışına neden olduğu gözlenmiştir (104). Bu tez çalışmasında *in vitro* koşullarda oluşturulan kokültür sisteminde allojenik Kİ-MKH'lerin seminifer tübül alanına parakrin etkileri 1, 2, 4 ve 6. haftada değerlendirilmiştir. Elde edilen histomorfometrik iyileşme bulguları, literatürde MKH'lerin *in vivo* ortamda testise doğrudan uygulandığı yayınlara ait bulgularla kısmen uyum göstermektedir. *In vitro* koşullarda statik kültür ortamında damarlanması olamayan ve yalnız difüzyon yoluyla beslenen testis şeritlerinin kokültür gruplarında 6. haftaya kadar canlılığının sağlanması ve aynı zamanda tübüllerdeki alan artışı, allojenik Kİ-MKH'lerin parakrin etkisinin güçlü olduğunu göstermektedir. Diğer yandan etki profilinin ortaya konabilmesi ve kişiselleştirilmiş bir zeminde kontrol edilebilmesi için, kromatografik ya da metabolomik analizlerle kültür süpernatantında MKH'lerin neden olduğu parakrin etki içeriğinin gösterilmesi gerekmektedir.

Tez çalışmasında 2 ve 6. haftalarda MKH'lerle kokültür gruplarında lümen alanının kontrol gruplarına göre anlamlı biçimde arttığı saptanmıştır. Seminifer tübül lümeninin boyutu spermatogenik aktivite ile doğrudan ilişkilidir (101). Spermatogenik hücrelerin etkinliğinin yüksek yani spermatogenezin aktif olduğu testislerde lümen alanının geniş olduğu bildirilmiştir (106). Tez çalışmasında MKH kokültürü gruplarında 2 ve 6. haftalarda lümen alanının kontrole göre daha geniş

olması, MKH'lerin parakrin etkiyle spermatogenezi uyardığı yönünde açıklanabilir (106). Bir ve 4. haftalarda lümen alanı yani spermatogenik aktivitenin MKH'lerle kokültür gruplarında kontrol gruplarıyla benzer olarak saptanmıştır. *In vivo* koşullarda Sprague-Dawley türü erişkin sıçanda 21 günlük bösulfan uygulaması ile azoospermi modeli oluşturulmasının ardından 35. Günde seminifer túbüllere tek doz 10^6 adet allojenik Ad-MKH enjeksiyonu yapılmıştır. İki ay sonra hematoksilen eozin ile boyanan kesitlerde túbül lümeni çapı, MKH enjeksiyonu yapılan grupta (n=5) enjeksiyon yapılmayan negatif kontrol grubuna göre (n=5) anlamlı artış göstermiştir (63). Adı geçen çalışmada *in vivo* koşullarda 8 hafta sonunda elde edilen olumlu etki, tez kapsamında 6. haftadaki kokültür sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Buradan yola çıkarak tez çalışmasında MKH'lerin parakrin etkisiyle elde edilen zaman bağımlı alan artışının (túbül büyümesi), Sertoli hücresi canlılığını desteklemesi niteliğiyle SKH ve tüm germ hücrelerine ait mikroçevreye yapılmış önemli bir katkı olarak değerlendirilmelidir.

Kontrol grubuna ait testislerde en uzun kültür süresi olan 6. haftada 4. haftaya göre lümen alanında anlamlı düşüş meydana gelirken, Kİ-MKH ve testis kokültüründe bu düşüşün görülmemesi, tez hedefi olarak ortaya konan varsayımın sağlandığını ifade etmektedir. Literatürde *in vitro* statik koşullarda túbüllerin yaşamsallığının korunabildiği statik testis kültür süresi 30 gün olarak bildirilmektedir (107). Bu teze ait verilerin, *in vitro* organ kültür ortamında testis morfolojisinin korunabildiği sürenin MKH'lerle 42 güne uzatılabileceğine ait orijinal veri sunması bakımından literatüre yeni bir bakış açısı kazandırabildiği sonucuna varılmıştır. Fare Kİ-MKH'lerin *in vitro* kokültür ortamında testis seminifer túbül ve lümen alanı üzerindeki etkisinin literatürde daha önce bildirilmemiş olması, bu tez çalışmasının ilgili verilerini orijinal kılmaktadır. Diğer yandan, testis morfolojisindeki değişimin Sertoli hücresi matürasyonu ve canlılığı ile ilişkilendirildiği bu tez çalışmasında sınırlı bütçe olanakları nedeniyle Sertoli hücrelerinin immün işaretleme ile sayımının gerçekleştirilmemiş olması; çalışmaya ait önemli bir sınırlamadır. Bütçe desteği sağlanabilirse Sertoli hücrelerinin işaretlenmesi planlanmaktadır.

Üçüncü araştırma hedefi kapsamında Kİ-MKH'lerin parakrin yolla SKH havuzunun korunmasına katkı sağladığı ortaya konmuştur. Bu tez çalışmasında 1, 2, 4 ve 6 hafta süreyle yürütülen yeni doğan fare testisi ve allojenik Kİ-MKH kokültür sisteminin SKH ve ileri farklılaşmış spermatojenik seri hücrelerinin korunmasına olumlu etkisi, sırasıyla PLZF ve c-Kit yüzey belirteçleri üzerinden akım sitometrisi yöntemiyle ile gösterilmiştir. Ek olarak, allojenik MKH'lerin *in vitro* ortamda SKH devamlılığına olumlu etkisi, SKH belirteci SALL4 transkripsiyon faktörünün immün işaretlenmesi ile ortaya konmuştur. Literatürde SALL4 ve PLZF transkripsiyon faktörlerinin SKH belirteci olduğu, ikili immünohistokimyasal işaretlemelerinin kolokalizasyonu ile gösterilmiştir (108). Böylece, PLZF ve SALL4 transkripsiyon faktörlerinin testiste aynı germ hücresi popülasyonuna, SKH'lere, spesifik oldukları ortaya konmuştur (108). Bu tez kapsamında, akım sitometrisinden elde edilen PLZF pozitif hücre yüzdesi ve immünohistokimyasal değerlendirmeden elde edilen SALL4 pozitif hücre sayısı sonuçları 1 ve 2. haftada birbirleriyle uyum göstermiştir. Dört ve altıncı haftalardaki akım sitometrisi sonuçlarına göre PLZF pozitif hücrelerin oranında kontrol ve kokültür grupları arasında anlamlı bir farklılık yokken; bu haftalarda immünohistokimyasal işaretleme sonuçlarına göre SALL4 pozitif hücre sayısının kokültür gruplarında kontrol gruplarına göre anlamlı şekilde fazla olduğu görülmüştür. C-Kit ile işaretli hücre sayısında 4 hafta boyunca iki grup arasında fark yokken; 6. haftada kokültür grubunda işaretli hücre sayısının kontrol grubuna göre anlamlı şekilde fazla olduğu görülmüştür.

Akım sitometrisi ölçümleri için, kültür süresini tamamlayan testis parçaları enzimatik sindirim ve mekanik parçalama ile tek hücre süspansiyonu haline getirildiğinden bu yöntem, heterojenik bir hücre popülasyonu içinde bulunan işaretli hücrelerin yüzde bazında değerini sunmaktadır (109). Elde edilen yüzdeler sonuçların, hazırlanan hücre süspansiyonunda bulunan işaretli hücreler haricindeki hücre gruplarının sayısal üstünlüklerine göre farklılık gösterebilmesi, akım sitometrisi ve immünohistokimyasal işaretleme ile elde edilen sonuçlar dört ve altıncı haftalarda paralellik göstermemesinin nedeni olabilir (109, 110). Allojenik Kİ-

MKH'ler, kokültür ortamında bulunan testislerde SKH mikroçevresine ait Sertoli hücrelerini destekleyerek canlılıklarının korunmasına destek sağlayarak, dokuda SKH haricinde bulunan hücrelerin sayıca artışına neden olmuş olabilir. Bu durum, akım sitometrisi ile elde edilen yüzde değerlerinin immünohistokimyasal işaretleme ile elde edilen sayı değerleri ile istatistiksel olarak paralellik göstermemesini açıklayabilir (109). Literatüre göre, PLZF ve SALL4 transkripsiyon faktörleri SKH'lerin devamlılığının sağlanmasında birlikte rol oynamaktadır (111, 112). PLZF, orada bulunan kök hücrelerin farklılaşp c-Kit ifade etmesini engellerken, proliferatif SKH belirteci SALL4'ün ifadesinin artmasıyla PLZF'nin bu aktivitesi baskılanır ve SKH'lerin spermatojenik seri hücrelerine farklılaşarak c-Kit ifade etmeleri sağlanır (111). Yayında PLZF ve SALL4 ile işaretlenen hücrelerin kolokalizasyonu gösterilse de, aralarındaki bu iletişim ve fonksiyonel farklılık, iki transkripsiyon faktörüne yönelik işaretleme birbiriinden farklı sonuçlar vermesini açıklayabilir.

Tez çalışmasında konvansiyonel agaroz jel kültür sistemi kullanılarak oluşturulan kontrol grubunda SALL4 pozitif hücre miktarında zamana bağlı olarak düzenli bir azalma gözlenmiştir. Allojenik MKH'ler ile kokültür grubunda ilk 2 haftada SKH miktarında anlamlı artış gözlenmiştir. Buna göre kokültür sisteminin ilk iki hafta boyunca yalnızca SKH'lerin devamlılığına katkı sağlamayıp, aynı zamanda germ hücre proliferasyonlarına neden olduğu sonucuna ulaşılabilir. Kokültür sisteminde 4 ve 6. Haftada SKH miktarı 2. haftaya göre anlamlı şekilde azalma göstermiştir. Bu durum, testislerin doğal ortamlarında maruz kaldıkları biyomekanik kuvvetler ve kan damarlarıyla beslenme rutinlerinin statik kültür koşullarında sağlanamaması göz önünde bulundurularak açıklanabilir. Nitekim pompalı ve pompasız mikroakışkan sistemlerle oluşturulan kokültür sistemlerinde spermatogenezin statik koşullara göre daha uzun süreli ve etkili olarak devam ettirilebildiğine ait yayınlar bulunmaktadır (99, 100, 113). Literatürde, c-Kit farklılaşma yoluna girmiş spermatojenik seri hücrelerinin moleküler belirteci olarak kullanılmaktadır (114). Altıncı haftada kokültür grubunda c-Kit işaretli hücre sayısının kontrol grubuna göre anlamlı şekilde fazla olmasına bakılarak kültür

ortamında MKH'lerin SKH farklılaşmasını desteklediği yorumu yapılabilir. Bir başka bakış açısıyla, MKH desteğiyle genişletilen SKH havuzu ileri dönemde kültür ortamında ileri farklılaşmış spermatojenik seri hücre popülasyonunda artışa neden olmuş olabilir. Literatürde konvansiyonel hava sıvı interfaz sisteminde seminifer tübül kültürüyle 40 gün boyunca c-Kit ifadesinin sürdürüldüğü ile ilgili bir yayın bulunmaktadır (115). Yapılan çalışmada oluşturulan kültür sistemiyle 40. günde c-Kit ifadesi varlığına bakılmış ancak, zaman içindeki değişimi ile ilgili bir değerlendirme yapılmamıştır. Farklılaşma yoluna girmiş spermatojenik seri hücrelerinin *in vitro* kültür ortamında zamana bağlı değişimi ile ilgili bir yayın bulunmamaktadır. Mezenkimal kök hücre katkılı kokültür sisteminin 6 haftalık kültür süresinde testiste SKH farklılaşmasına sağladığı katkı ilk kez bu çalışma ile gösterilmiştir.

Literatürde, MKH'lerin testiste PLZF, c-Kit veya SALL4 gen ifadesine etkisini araştıran *in vitro* veya *in vivo* koşulda gerçekleştirilmiş herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Tez çalışması kapsamında MKH'lerin PLZF ve SALL4 işaretli SKH ve c-Kit işaretli ileri farklılaşmış spermatojenik seri hücre popülasyonunda artışa neden olduğunun gösterilmesi yenilikçi bir bulgudur. İleri çalışmalarda, immünohistokimyasal işaretleme sonuçlarının qRT-PCR ve Western blot analizleri ve daha uzun kültür süreleri ile desteklenmesi planlanmaktadır. Yeni doğan fare testislerinin allojenik MKH'ler ile kokültürünün SKH canlılığına olan etkisini gösteren herhangi bir yayına rastlanmamıştır. Bu anlamda, belirli kokültür sürelerinin sonunda akım sitometrisi ve immün işaretleme ile SKH canlılığının kontrol grubuna göre daha yüksek oranda korunduğunun gösterilmesinin literatüre yenilikçi bir katkı sunduğu görüşüne varılmıştır.

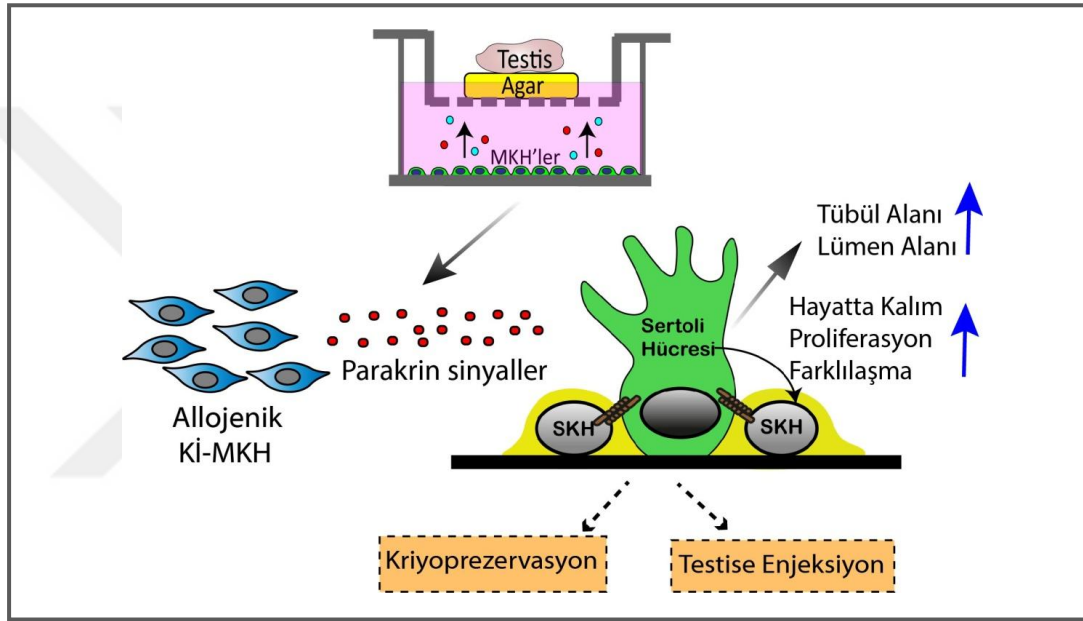
Bu tez kapsamında elde edilen veriler *in vitro* ortamda hava sıvı interfaz sistemine göre kurulmuş statik kültür koşullarıyla sınırlıdır. Elde edilen sonuçların biyomekanik kuvvetlerin taklit edildiği mikroakışkan sistemlerde ve *in vivo* koşullarda gerçekleştirilecek hayvan modellerinde tasarlanacak çalışmalarla

doğrulanması gerekmektedir (110). Çocukluk çağı kanserlerinde uygulanacak gonadotoksik tedavi öncesi SKH'lerin üç boyutlu niş ortamlarının korunarak elde edilmesi ve tedavi sonrası testisleri hasarlanmış hastalar çocuk sahibi olmak istediklerinde sayıca arttırılarak kendilerine geri verilmesi gerekmektedir (116).

Günümüzde klinikte erkek hastalardan çocukluk döneminde kanser tedavisi öncesi testis biyopsileri alınarak kriyoprezervasyon yöntemleriyle dondurulmak suretiyle saklanmaktadır (117). Ancak bu örnekler çözüldüklerinde SKH içerikleri oldukça düşük olarak saptanmakta ve gerçekleştirilecek fertilité için yeterli olamamaktadır (118). Bu tez çalışmasında *in vitro* ortamda testis kültürü kurularak niş bütünlüğü bozulmadan SKH'ler üzerindeki olumlu etkinin devamlılığının sağlanması mümkün olmuştur. Bu yönüyle çalışma tek katmanlı hücre kültürü ile karşılaştırıldığında gerçek ortamı yansıtmada görece başarılı ve klinik için oldukça umut vadedicidir.

Tez kapsamında tasarlanan, fiziksel koşulları optimize edilen kokültür sistemi dondurma, çözme ve *in vivo* koşullarda hayvan modellerine uygulanma aşamalarından başarıyla geçmek durumundadır. Bu aşamalardan geçerek geçerlilik ve güvenilirlik testleri tamamlandıktan sonra klinikte kişiye özel olarak uygulanabilecek hale getirilebilirse, çocukluk çağı kanserlerinde kemoterapi ve radyoterapi gibi gonadotoksik tedaviler öncesinde hastalardan testis biyopsisi alınabilir ve kemik iliğinden otojenik MKH izolasyonu yapılabilir; kokültür ortamında SKH ekspansiyonu sağlanarak, kültür sonunda büyük hücre popülasyonu içeren testis şeritleri kriyoprezervasyon teknikleriyle bireylerin erişkin reproduktif yaşa gelecekleri döneme kadar saklanabilir. Bireyler erişkin yaşa geldiklerinde dondurulmuş testis şeritleri çözülüp, testislerden SKH izolasyonu yapılabilir; elde edilen hücrelerin testise enjeksiyonu ile spermatogenez başlatılabilir. Ayrıca, kokültür ortamında sayıca arttırılan SKH'lerin ileri farklılaşmalarının desteklenmesiyle yeterli sayıda sperm elde edilebilirse *in vitro* fertilizasyon teknikleriyle bireylerin çocuk sahibi olmaları sağlanabilir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, C57BL6 türü farelerden Kİ-MKH izolasyonu yapılmış ve üçüncü pasajda karakterize edilen hücreler deneylerde aynı pasajla güvenle kullanılmıştır. Mezenkimal kök hücreler, *in vitro* koşullarda indirekt kokültür ortamında altı hafta süresince seminifer tübül ve lümen alanını arttırıcı etki göstermiştir. Kültür süresince Kİ-MKH'ler testis mikroçevresi ve SKH havuzunu koruyucu etki göstermiş, SKH proliferasyonunda ve farklılaşmasında olumlu rol oynamıştır. Şekil 5.1.'de tez kapsamında yanıtlanan araştırma soruları ve geleceğe ait olası translasyonel uygulama bakış açısı şematize edilmiştir.



Şekil 5.1. Allojenik Kİ-MKH'lerin *in vitro* ortamda testis mikroçevresi ve SKH havuzunun korunmasına etkisi ve elde edilen sonuçların geleceğe yönelik olası translasyonel uygulamaları. Tez kapsamında yapılan çalışmalar ile, Kİ-MKH'lerin *in vitro* indirekt kokültür koşulunda parakrin sinyaller aracılığı ile testis seminifer tübül ve lümen alanını arttırıcı; SKH havuzunu koruyucu ve SKH'leri proliferere ettirici ve farklılaştırıcı etkisi gösterilmiştir. Gelecekte bu sayede *in vitro* koşulda korunan mikroçevrede sayıca arttırılan SKH'lerin testisten izole edilerek veya testis şeridi olarak kriyoprezervasyon teknikleriyle kullanılacak güne kadar saklanabilmesi ve sitotoksik tedavi gören çocuklar erişkin yaşa gelip çocuk sahibi olmak istediklerinde elde edilen otojenik SKH'den zengin şeritlerin veya direkt olarak izole edilen SKH'lerin bireylerin testislerine enjekte edilmesi, bu sayede spermatogenezin başlatılabilmesi beklenmektedir.

SONUÇLAR

1. İzole edilen Kİ-MKH'ler morfolojik yapı, yüzey belirteci varlığı ve farklılaşma potansiyelleri değerlendirilerek karakterize edilebilmiş, *transwell* ve hava sıvı interfaz sistemi temelli Kİ-MKH'lerle testis kokültür ortamı oluşturulmuştur.
2. Kemik iliği kaynaklı MKH'ler *in vitro* ortamda parakrin yolla testiste seminifer tübül alanını arttırıcı etki göstermiştir.
3. Kemik iliği kaynaklı MKH'ler *in vitro* ortamda parakrin yolla testiste tübül lümeni alanını arttırıcı etki göstermiştir.
4. Kemik iliği kaynaklı MKH'ler *in vitro* ortamda parakrin etkiyle testiste SKH canlılığının korunmasına katkı sağlamış, SKH'lerin çoğalmasını arttırarak kök hücre ve farklılaşmış seri hücre havuzunu genişletmiştir.

KAYNAKLAR

1. In: Hewitt M, Weiner SL, Simone JV, editors. *Childhood Cancer Survivorship: Improving Care and Quality of Life*. Washington (DC)2003.
2. Smith MA, Altekruze SF, Adamson PC, Reaman GH, Seibel NL. Declining childhood and adolescent cancer mortality. *Cancer*. 2014;120(16):2497-506.
3. Phillips SM, Padgett LS, Leisenring WM, Stratton KK, Bishop K, Krull KR, et al. Survivors of childhood cancer in the United States: prevalence and burden of morbidity. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2015;24(4):653-63.
4. Wasilewski-Masker K, Seidel KD, Leisenring W, Mertens AC, Shnorhavorian M, Ritenour CW, et al. Male infertility in long-term survivors of pediatric cancer: a report from the childhood cancer survivor study. *J Cancer Surviv*. 2014;8(3):437-47.
5. Skaznik-Wikiel ME, Gilbert SB, Meacham RB, Kondapalli LA. Fertility Preservation Options for Men and Women With Cancer. *Rev Urol*. 2015;17(4):211-9.
6. Williams DH. Sperm banking and the cancer patient. *Ther Adv Urol*. 2010;2(1):19-34.
7. Levine JM. Preserving Fertility in Children and Adolescents with Cancer. *Children (Basel)*. 2014;1(2):166-85.
8. Lee SH, Shin CH. Reduced male fertility in childhood cancer survivors. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*. 2013;18(4):168-72.
9. Huleihel M, Nourashrafeddin S, Plant TM. Application of three-dimensional culture systems to study mammalian spermatogenesis, with an emphasis on the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Asian J Androl*. 2015;17(6):972-80.
10. Chen SR, Liu YX. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by Sertoli cell signaling. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2015;149(4):R159-67.
11. Ayala-Cuellar AP, Kang J-H, Jeung E-B, Choi K-C. Roles of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration and Immunomodulation. *Biomol Ther (Seoul)*. 2019;27(1):25-33.
12. Iyer SS, Rojas M. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: novel concept for future therapies. *Expert opinion on biological therapy*. 2008;8(5):569-81.
13. Carmona R, Cano E, Mattiotti A, Gaztambide J, Muñoz-Chápuli R. Cells derived from the coelomic epithelium contribute to multiple gastrointestinal tissues in mouse embryos. *PLoS One*. 2013;8(2):e55890-e.

14. Albrecht KH, Eicher EM. Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Developmental biology*. 2001;240(1):92-107.
15. Gong D, Zhang C, Li T, Zhang J, Zhang N, Tao Z, et al. Are Sertoli cells a kind of mesenchymal stem cells? *American journal of translational research*. 2017;9(3):1067-74.
16. Pourmasumi S, Sabeti P, Rahiminia T, Mangoli E, Tabibnejad N, Talebi AR. The etiologies of DNA abnormalities in male infertility: An assessment and review. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*. 2017;15(6):331-44.
17. Onofre J, Baert Y, Faes K, Goossens E. Cryopreservation of testicular tissue or testicular cell suspensions: a pivotal step in fertility preservation. *Hum Reprod Update*. 2016;22(6):744-61.
18. Kutluk MT, Yesilipek A. Pediatric cancer registry Turkey: 2009-2016 (TPOG & TPHD). *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(15_suppl):e22015-e.
19. Hudson MM. Reproductive outcomes for survivors of childhood cancer. *Obstet Gynecol*. 2010;116(5):1171-83.
20. Griswold MD. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol Rev*. 2016;96(1):1-17.
21. Neto FT, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol*. 2016;59:10-26.
22. Manku G, Culty M. Mammalian gonocyte and spermatogonia differentiation: recent advances and remaining challenges. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2015;149(3):R139-57.
23. Yoshida S, Sueno M, Nakagawa T, Ohbo K, Nagamatsu G, Suda T, et al. The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. *Development*. 2006;133(8):1495-505.
24. Komeya M, Ogawa T. Spermatogonial stem cells: Progress and prospects. *Asian J Androl*. 2015;17(5):771-5.
25. Fayomi AP, Orwig KE. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem Cell Res*. 2018;29:207-14.
26. Waheeb R, Hofmann MC. Human spermatogonial stem cells: a possible origin for spermatocytic seminoma. *Int J Androl*. 2011;34(4 Pt 2):e296-305; discussion e.
27. Guo Y, Hai Y, Gong Y, Li Z, He Z. Characterization, isolation, and culture of mouse and human spermatogonial stem cells. *J Cell Physiol*. 2014;229(4):407-13.
28. von Kopylow K, Spiess AN. Human spermatogonial markers. *Stem Cell Res*. 2017;25:300-9.

29. Kose S, Yersal N, Onen S, Korkusuz P. Comparison of Hematopoietic and Spermatogonial Stem Cell Niches from the Regenerative Medicine Aspect. *Advances in experimental medicine and biology*. 2018;1107:15-40.
30. Kaur G, Thompson LA, Dufour JM. Sertoli cells--immunological sentinels of spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2014;30:36-44.
31. Schrade A, Kyronlahti A, Akinrinade O, Pihlajoki M, Fischer S, Rodriguez VM, et al. GATA4 Regulates Blood-Testis Barrier Function and Lactate Metabolism in Mouse Sertoli Cells. *Endocrinology*. 2016;157(6):2416-31.
32. Hai Y, Hou J, Liu Y, Liu Y, Yang H, Li Z, et al. The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2014;29:66-75.
33. Yang S, Ping P, Ma M, Li P, Tian R, Yang H, et al. Generation of haploid spermatids with fertilization and development capacity from human spermatogonial stem cells of cryptorchid patients. *Stem Cell Reports*. 2014;3(4):663-75.
34. Ciller IM, Palanisamy SK, Ciller UA, McFarlane JR. Postnatal expression of bone morphogenetic proteins and their receptors in the mouse testis. *Physiol Res*. 2016;65(4):673-82.
35. Griswold SL, Behringer RR. Fetal Leydig cell origin and development. *Sex Dev*. 2009;3(1):1-15.
36. Ramaswamy S, Weinbauer GF. Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone. *Spermatogenesis*. 2014;4(2):e996025.
37. Shiraishi K, Matsuyama H. Gonadotropin actions on spermatogenesis and hormonal therapies for spermatogenic disorders [Review]. *Endocr J*. 2017;64(2):123-31.
38. DeFalco T, Potter SJ, Williams AV, Waller B, Kan MJ, Capel B. Macrophages Contribute to the Spermatogonial Niche in the Adult Testis. *Cell Rep*. 2015;12(7):1107-19.
39. Meistrich ML, Shetty G. The New Director of "the Spermatogonial Niche": Introducing the Peritubular Macrophage. *Cell Rep*. 2015;12(7):1069-70.
40. Albrecht M. Insights into the nature of human testicular peritubular cells. *Ann Anat*. 2009;191(6):532-40.
41. Mayerhofer A. Human testicular peritubular cells: more than meets the eye. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2013;145(5):R107-16.
42. Oatley MJ, Racicot KE, Oatley JM. Sertoli cells dictate spermatogonial stem cell niches in the mouse testis. *Biology of reproduction*. 2011;84(4):639-45.
43. Chu Y, Huddleston GG, Clancy AN, Harris RB, Bartness TJ. Epididymal fat is necessary for spermatogenesis, but not testosterone production or copulatory behavior. *Endocrinology*. 2010;151(12):5669-79.

44. Hansel W. The essentiality of the epididymal fat pad for spermatogenesis. *Endocrinology*. 2010;151(12):5565-7.
45. Jalali AS. Epididymal White Adipose Tissue: Endocrine Backbone of Spermatogonial Stem Cells Maintenance. *Journal of Stem Cell Biology and Transplantation*. 2017;01(03).
46. Eslahi N, Hadjighassem MR, Joghataei MT, Mirzapour T, Bakhtiyari M, Shakeri M, et al. The effects of poly L-lactic acid nanofiber scaffold on mouse spermatogonial stem cell culture. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:4563-76.
47. Yadegar M, Hekmatimoghaddam SH, Nezami Saridar S, Jebali A. The viability of mouse spermatogonial germ cells on a novel scaffold, containing human serum albumin and calcium phosphate nanoparticles. *Iran J Reprod Med*. 2015;13(3):141-8.
48. Yu Y, Alkhawaji A, Ding Y, Mei J. Decellularized scaffolds in regenerative medicine. *Oncotarget*. 2016;7(36):58671-83.
49. Baert Y, De Kock J, Alves-Lopes JP, Soder O, Stukenborg JB, Goossens E. Primary Human Testicular Cells Self-Organize into Organoids with Testicular Properties. *Stem Cell Reports*. 2017;8(1):30-8.
50. Rohban R, Pieber TR. Mesenchymal Stem and Progenitor Cells in Regeneration: Tissue Specificity and Regenerative Potential. *Stem cells international*. 2017;2017:5173732-.
51. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
52. Houlihan DD, Mabuchi Y, Morikawa S, Niibe K, Araki D, Suzuki S, et al. Isolation of mouse mesenchymal stem cells on the basis of expression of Sca-1 and PDGFR- α . *Nature Protocols*. 2012;7:2103.
53. Dimarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. Mesenchymal stem cells in tissue repair. *Front Immunol*. 2013;4:201.
54. Rohban R, Pieber TR. Mesenchymal Stem and Progenitor Cells in Regeneration: Tissue Specificity and Regenerative Potential. *Stem Cells Int*. 2017;2017:5173732.
55. Neirinckx V, Coste C, Rogister B, Wislet-Gendebien S. Concise review: adult mesenchymal stem cells, adult neural crest stem cells, and therapy of neurological pathologies: a state of play. *Stem Cells Transl Med*. 2013;2(4):284-96.
56. Klinker MW, Wei CH. Mesenchymal stem cells in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases in experimental animal models. *World J Stem Cells*. 2015;7(3):556-67.
57. Rhee KJ, Lee JI, Eom YW. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Effects of Tumor Support or Suppression. *Int J Mol Sci*. 2015;16(12):30015-33.
58. Ayala-Cuellar AP, Kang JH, Jeung EB, Choi KC. Roles of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration and Immunomodulation. *Biomol Ther (Seoul)*. 2018.

59. Zhou XY, Ma YZ, Wang XH, Liu DJ, Ren Y, Ji XP. [Bone marrow mesenchymal stem cells to repair the reproductive system of male azoospermia rats]. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2015;21(8):692-7.
60. Elbaghdady HAM, Alwaili MA, El-Demerdash RS. Amelioration of cadmium-induced testes' damage in rats by the bone marrow mesenchymal stem cells. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2018;148:763-9.
61. Monsefi M, Fereydouni B, Rohani L, Talaei T. Mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous tubules of sterile rats. *Iran J Reprod Med*. 2013;11(7):537-44.
62. Hassan AI, Alam SS. Evaluation of mesenchymal stem cells in treatment of infertility in male rats. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(6):131.
63. Tamadon A, Mehrabani D, Rahmanifar F, Jahromi AR, Panahi M, Zare S, et al. Induction of Spermatogenesis by Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells in Busulfan-induced Azoospermia in Hamster. *International journal of stem cells*. 2015;8(2):134-45.
64. Hsiao CH, Ji AT, Chang CC, Cheng CJ, Lee LM, Ho JH. Local injection of mesenchymal stem cells protects testicular torsion-induced germ cell injury. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:113.
65. Wang YJ, Yan J, Zou XL, Guo KJ, Zhao Y, Meng CY, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells repair cadmium-induced rat testis injury by inhibiting mitochondrial apoptosis. *Chem Biol Interact*. 2017;271:39-47.
66. Aghamir SM, Salavati A, Yousefie R, Tootian Z, Ghazaleh N, Jamali M, et al. Does bone marrow-derived mesenchymal stem cell transfusion prevent antisperm antibody production after traumatic testis rupture? *Urology*. 2014;84(1):82-6.
67. Cakici C, Buyrukcu B, Duruksu G, Haliloglu AH, Aksoy A, Isik A, et al. Recovery of fertility in azoospermia rats after injection of adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells: the sperm generation. *Biomed Res Int*. 2013;2013:529589.
68. Ghaem Maghami R, Mirzapour T, Bayrami A. Differentiation of mesenchymal stem cells to germ-like cells under induction of Sertoli cell-conditioned medium and retinoic acid. *Andrologia*. 2018;50(3).
69. Lue Y, Erkkila K, Liu PY, Ma K, Wang C, Hikim AS, et al. Fate of bone marrow stem cells transplanted into the testis: potential implication for men with testicular failure. *Am J Pathol*. 2007;170(3):899-908.
70. Zhang ZY, Liu K, Xing XY, Ju GQ, Zhong L, Sun J. [Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into Leydig cells in the rat testis interstitium: An experimental study]. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2016;22(8):680-5.
71. Gonzalez R, Griparic L, Vargas V, Burgee K, Santacruz P, Anderson R, et al. A putative mesenchymal stem cells population isolated from adult human testes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;385(4):570-5.

72. Zhang D, Liu X, Peng J, He D, Lin T, Zhu J, et al. Potential spermatogenesis recovery with bone marrow mesenchymal stem cells in an azoospermic rat model. *Int J Mol Sci.* 2014;15(8):13151-65.
73. Yang R-F, Liu T-H, Zhao K, Xiong C-L. Enhancement of mouse germ cell-associated genes expression by injection of human umbilical cord mesenchymal stem cells into the testis of chemical-induced azoospermic mice. *Asian J Androl.* 2014;16(5):698-704.
74. Chen H, Tang QL, Wu XY, Xie LC, Lin LM, Ho GY, et al. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into germ-like cells in mouse seminiferous tubules. *Mol Med Rep.* 2015;12(1):819-28.
75. Luo Y, Xie L, Mohsin A, Ahmed W, Xu C, Peng Y, et al. Efficient generation of male germ-like cells derived during co-culturing of adipose-derived mesenchymal stem cells with Sertoli cells under retinoic acid and testosterone induction. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):91.
76. Ghorbanlou M, Abdanipour A, Shirazi R, Malekmohammadi N, Shokri S, Nejabatbakhsh R. Indirect Co-Culture of Testicular Cells with Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Leads to Male Germ Cell-Specific Gene Expressions. *Cell journal.* 2019;20(4):505-12.
77. Ghasemzadeh-Hasankolaei M, Batavani R, Eslaminejad MB, Sayahpour F. Transplantation of Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into the Testes of Infertile Male Rats and New Germ Cell Formation. *International journal of stem cells.* 2016;9(2):250-63.
78. Mehrabani D, Hassanshahi MA, Tamadon A, Zare S, Keshavarz S, Rahmanifar F, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous tubules of busulfan-induced azoospermic rats. *J Hum Reprod Sci.* 2015;8(2):103-10.
79. Nakamura N, Merry GE, Inselman AL, Sloper DT, Del Valle PL, Sato T, et al. Evaluation of Culture Time and Media in an In Vitro Testis Organ Culture System. *Birth defects research.* 2017;109(7):465-74.
80. Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, et al. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature.* 2011;471(7339):504-7.
81. Fafian-Labora J, Fernandez-Pernas P, Fuentes I, De Toro J, Oreiro N, Sangiao-Alvarellos S, et al. Influence of age on rat bone-marrow mesenchymal stem cells potential. *Sci Rep.* 2015;5:16765.
82. Zhu H, Guo ZK, Jiang XX, Li H, Wang XY, Yao HY, et al. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. *Nat Protoc.* 2010;5(3):550-60.
83. Huang S, Xu L, Sun Y, Wu T, Wang K, Li G. An improved protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *J Orthop Translat.* 2015;3(1):26-33.

84. Meirelles Lda S, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *British journal of haematology*. 2003;123(4):702-11.
85. Zhang T, Lee YW, Rui YF, Cheng TY, Jiang XH, Li G. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote growth and angiogenesis of breast and prostate tumors. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(3):70.
86. Hasanin NA, Sayed NM, Ghoneim FM, Al-Sherief SA. Histological and Ultrastructure Study of the Testes of Acrylamide Exposed Adult Male Albino Rat and Evaluation of the Possible Protective Effect of Vitamin E Intake. *J Microsc Ultrastruct*. 2018;6(1):23-34.
87. Sareen N, Sequiera GL, Chaudhary R, Abu-El-Rub E, Chowdhury SR, Sharma V, et al. Early passaging of mesenchymal stem cells does not instigate significant modifications in their immunological behavior. *Stem Cell Research & Therapy*. 2018;9(1):121.
88. Tamadon A, Mehrabani D, Rahmanifar F, Rahmanifar F, Jahromi AR, Panahi M, et al. Induction of Spermatogenesis by Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells in Busulfan-induced Azoospermia in Hamster. *International journal of stem cells*. 2015;8(2):134-45.
89. Drela K, Stanaszek L, Nowakowski A, Kuczynska Z, Lukomska B. Experimental Strategies of Mesenchymal Stem Cell Propagation: Adverse Events and Potential Risk of Functional Changes. *Stem Cells Int*. 2019;2019:7012692.
90. Yang YK, Ogando CR, Wang See C, Chang TY, Barabino GA. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):131.
91. Kojima K, Sato T, Naruse Y, Ogawa T. Spermatogenesis in Explanted Fetal Mouse Testis Tissues. *Biology of reproduction*. 2016;95(3):63.
92. Sanjo H, Komeya M, Sato T, Abe T, Katagiri K, Yamanaka H, et al. In vitro mouse spermatogenesis with an organ culture method in chemically defined medium. *PLoS One*. 2018;13(2):e0192884.
93. Yokonishi T, Sato T, Katagiri K, Ogawa T. In Vitro Spermatogenesis Using an Organ Culture Technique 2013. 479-88 p.
94. Gholami K, Pourmand G, Koruji M, Ashouri S, Abbasi M. Organ culture of seminiferous tubules using a modified soft agar culture system 2018.
95. de Michele F, Poels J, Vermeulen M, Ambroise J, Gruson D, Guiot Y, et al. Haploid Germ Cells Generated in Organotypic Culture of Testicular Tissue From Prepubertal Boys. *Frontiers in Physiology*. 2018;9(1413).
96. Nakamura N, Merry GE, Inselman AL, Sloper DT, Del Valle PL, Sato T, et al. Evaluation of Culture Time and Media in an In Vitro Testis Organ Culture System. *Birth defects research*. 2017;109(7):465-74.

97. Liu F, Cai C, Wu X, Cheng Y, Lin T, Wei G, et al. Effect of KnockOut serum replacement on germ cell development of immature testis tissue culture. *Theriogenology*. 2016;85(2):193-9.
98. Komeya M, Kimura H, Nakamura H, Yokonishi T, Sato T, Kojima K, et al. Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device. *Scientific Reports*. 2016;6:21472.
99. Komeya M, Hayashi K, Nakamura H, Yamanaka H, Sanjo H, Kojima K, et al. Pumpless microfluidic system driven by hydrostatic pressure induces and maintains mouse spermatogenesis in vitro. *Scientific Reports*. 2017;7(1):15459.
100. Yamanaka H, Komeya M, Nakamura H, Sanjo H, Sato T, Yao M, et al. A monolayer microfluidic device supporting mouse spermatogenesis with improved visibility. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;500(4):885-91.
101. Walczak-Jedrzejowska R, Slowikowska-Hilczek J, Marchlewski K, Oszukowska E, Kula K. During seminiferous tubule maturation testosterone and synergistic action of FSH with estradiol support germ cell survival while estradiol alone has pro-apoptotic effect. *Folia Histochem Cytobiol*. 2007;45 Suppl 1:S59-64.
102. Rebourcet D, Darbey A, Monteiro A, Soffientini U, Tsai YT, Handel I, et al. Sertoli Cell Number Defines and Predicts Germ and Leydig Cell Population Sizes in the Adult Mouse Testis. *Endocrinology*. 2017;158(9):2955-69.
103. Franca LR, Godinho CL. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biology of reproduction*. 2003;68(5):1554-61.
104. Sherif I, Sabry D, Abdel-Aziz A, Sarhan O. The role of mesenchymal stem cells in chemotherapy-induced gonadotoxicity 2018.
105. Chen H, Tang Q-L, Wu X-Y, Xie L-C, Lin L-M, Ho G-Y, et al. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into germ-like cells in mouse seminiferous tubules. *Mol Med Rep*. 2015;12(1):819-28.
106. Okano T, Onuma M, Ishiniwa H, Azuma N, Tamaoki M, Nakajima N, et al. Classification of the spermatogenic cycle, seasonal changes of seminiferous tubule morphology and estimation of the breeding season of the large Japanese field mouse (*Apodemus speciosus*) in Toyama and Aomori prefectures, Japan. *J Vet Med Sci*. 2015;77(7):799-807.
107. Sato T, Katagiri K, Yokonishi T, Kubota Y, Inoue K, Ogonuki N, et al. In vitro production of fertile sperm from murine spermatogonial stem cell lines. *Nat Commun*. 2011;2:472.
108. Hobbs RM, Fagoonee S, Papa A, Webster K, Altruda F, Nishinakamura R, et al. Functional antagonism between *Sall4* and *Plzf* defines germline progenitors. *Cell stem cell*. 2012;10(3):284-98.

109. de Almeida Santiago M, de Paula Fonseca E, Fonseca B, da Silva Marques CdF, Domingos da Silva E, Bertho AL, Nogueira ACMdA. Flow Cytometry as a Tool for Quality Control of Fluorescent Conjugates Used in Immunoassays. *PLoS One*. 2016;11(12):e0167669-e.
110. Morgan-Bathke M, Harteneck D, Jaeger P, Sondergaard E, Karwoski R, Espinosa De Ycaza A, et al. Comparison of Methods for Analyzing Human Adipose Tissue Macrophage Content. *Obesity (Silver Spring)*. 2017;25(12):2100-7.
111. Hobbs RM, Fagoonee S, Papa A, Webster K, Altruda F, Nishinakamura R, et al. Functional antagonism between Sall4 and Plzf defines germline progenitors. *Cell stem cell*. 2012;10(3):284-98.
112. Yang J, Chai L, Gao C, C Fowles T, Alipio Z, Dang H, et al. Sall4 Is a Key Regulator of Survival and Apoptosis in Human Leukemic Cells. *2008*. 805-13 p.
113. Komeya M, Kimura H, Nakamura H, Yokonishi T, Sato T, Kojima K, et al. Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device. *2016*. 21472 p.
114. Zhang L, Tang J, Haines CJ, Feng HL, Lai L, Teng X, et al. c-kit and its related genes in spermatogonial differentiation. *Spermatogenesis*. 2011;1(3):186-94.
115. Gholami K, Pourmand G, Koruji M, Ashouri S, Abbasi M. Organ culture of seminiferous tubules using a modified soft agar culture system. *Stem cell research & therapy*. 2018;9(1):249-.
116. Sadri-Ardekani H, Atala A. Testicular tissue cryopreservation and spermatogonial stem cell transplantation to restore fertility: from bench to bedside. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(3):68.
117. Ginsberg JP, Li Y, Carlson CA, Gracia CR, Hobbie WL, Miller VA, et al. Testicular tissue cryopreservation in prepubertal male children: an analysis of parental decision-making. *Pediatric blood & cancer*. 2014;61(9):1673-8.
118. Hussein AA, Tran ND, Smith JF. Fertility preservation for boys and adolescents facing sterilizing medical therapy. *Transl Androl Urol*. 2014;3(4):382-90.

EKLER

EK-1 Hacettepe Üniversitesi Yerel Etik Kurulu Karar Yazısı



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

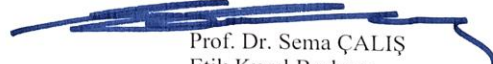
Sayı : 52338575-56

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 04.09.2018 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2018/08
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2018/48
KARAR NUMARASI	: 2018/48 – 05
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Prof. Dr. Petek KORKUSUZ
HAYVAN DENEYLERİNDE	: Selin ÖNEN, Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI, Dr. Öğr.
GÖREVLİ ARAŞTIRMACILAR	: Üyesi Sevil KÖSE, Arş. Gör. Nilgün YERSAL
DİĞER YARDIMCI	:
ARAŞTIRMACILAR	:
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve	53 Adet C57BL/6 Fare (6 günlük)
SAYISI	:

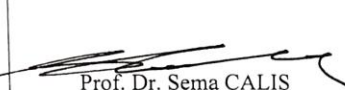
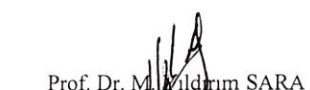
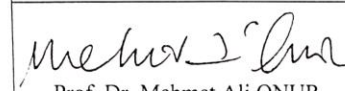
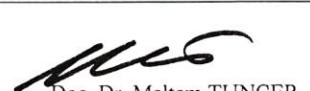
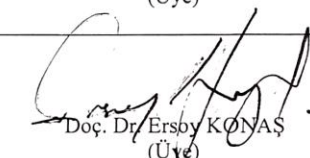
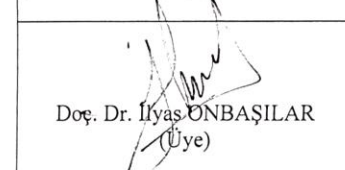
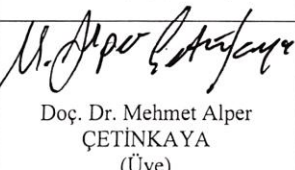
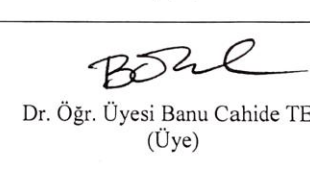
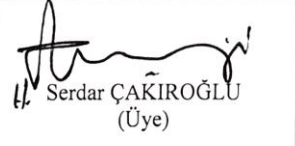
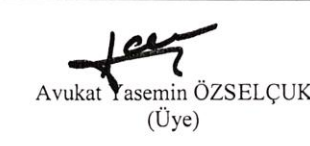
Üniversitemiz Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Petek KORKUSUZ'un araştırma yürütücüsü olduğu 2018/48 kayıt numaralı "*Mezenkimal Kök Hücrelerin in vitro Koşullarda Testis Mikroçevresi ve Spermatogonyal Kök Hücre Havuzunun Korunmasına Etkisinin Araştırılması*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir. Kurul üyesi Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI çıkar çatışması nedeni ile tartışma ve oylamaya katılmamıştır.

Araştırma yürütücüsü Kurulumuza araştırma projesinin bitiş tarihini bildirmek ve proje sonuç raporunu sunmak ile yükümlüdür.

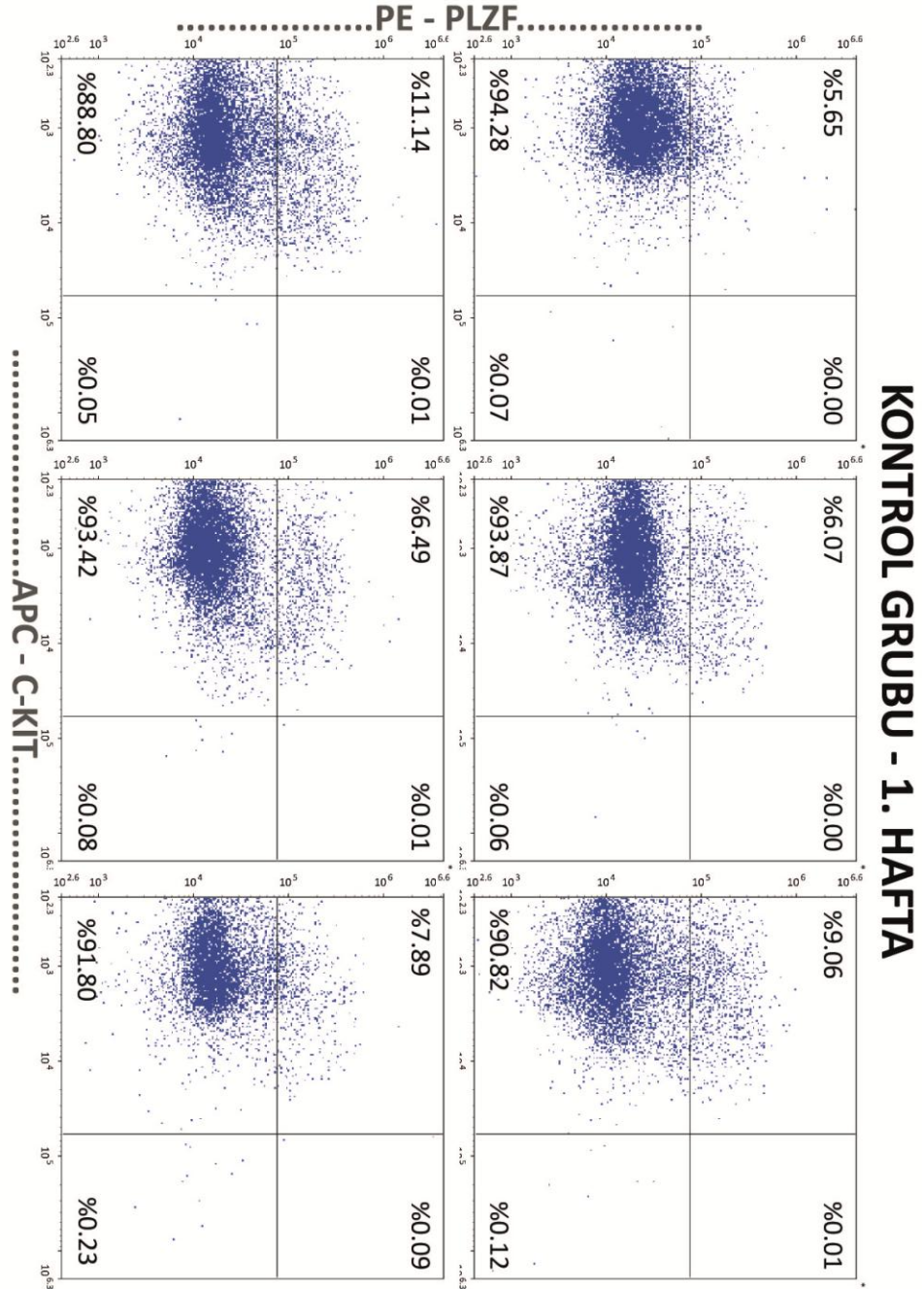

 Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
 Etik Kurul Başkanı

EK-1 Hacettepe Üniversitesi Yerel Etik Kurulu Karar Yazısı (devamı)

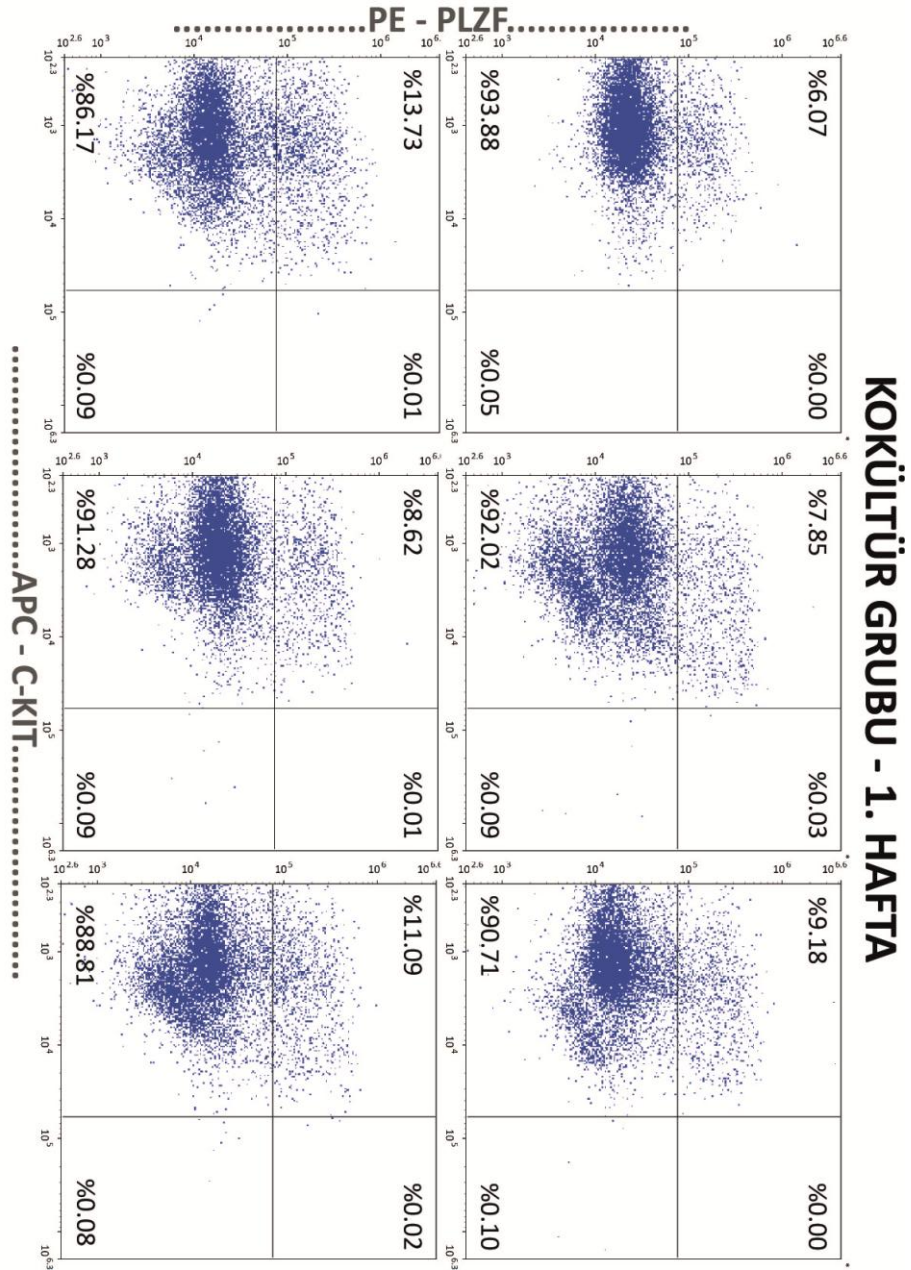
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU GÜNDEMİ - İMZA SİRKÜLERİ
TOPLANTI TARİHİ : 04.09.2018 (SALI)
TOPLANTI SAYISI : 2018/08
TOPLANTI SAATİ : 10.00

 Prof. Dr. Sema ÇALIŞ (Başkan)	 Prof. Dr. Nüket Örnek BÜKEN (Üye)	 Prof. Dr. M. Yıldırım SARA (Üye)
 Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR (Üye)	(İZİNLİ) Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI (Üye)	 Doç. Dr. Meltem TUNCER (Üye)
(İZİNLİ) Doç. Dr. A. Cevdet AKMAN (Üye)	(İZİNLİ) Doç. Dr. Aytekin AKYOL (Üye)	 Doç. Dr. Ersoy KONAŞ (Üye)
 Doç. Dr. İlyas ONBAŞILAR (Üye)	 Doç. Dr. Mehmet Alper ÇETİNKAYA (Üye)	 Dr. Öğr. Üyesi Banu Cahide TEL (Üye)
 Mevlüt ÖKSÜZÖĞLU (Üye)	 Serdar ÇAKIROĞLU (Üye)	 Avukat Yasemin ÖZSELÇUK (Üye)

EK-2: Birinci Hafta Kontrol Grubuna Ait Akım Sitometrisi Sonuçları

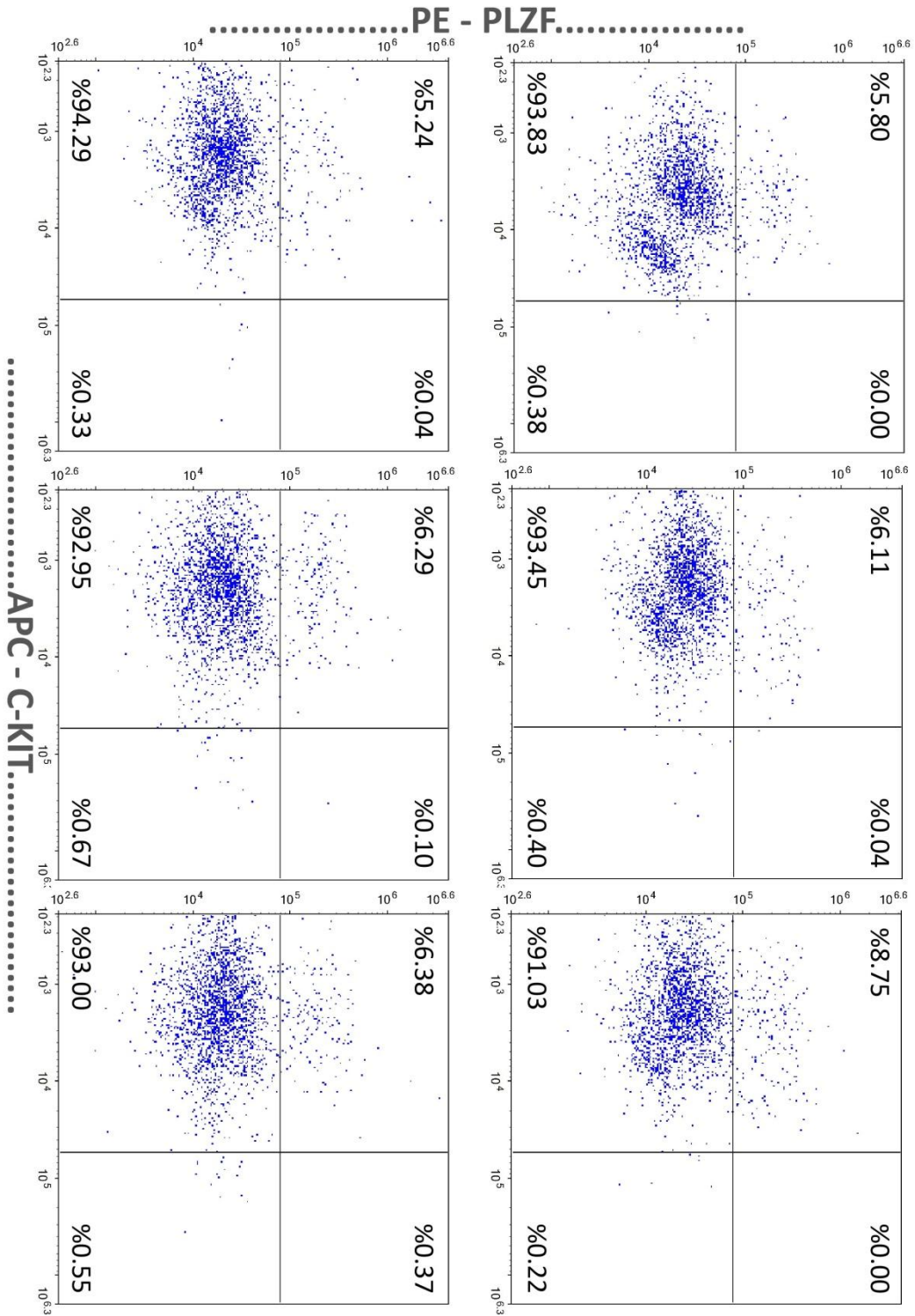


EK-3: Birinci Hafta Kokültür Grubuna Ait Akım Sitometrisi Sonuçları

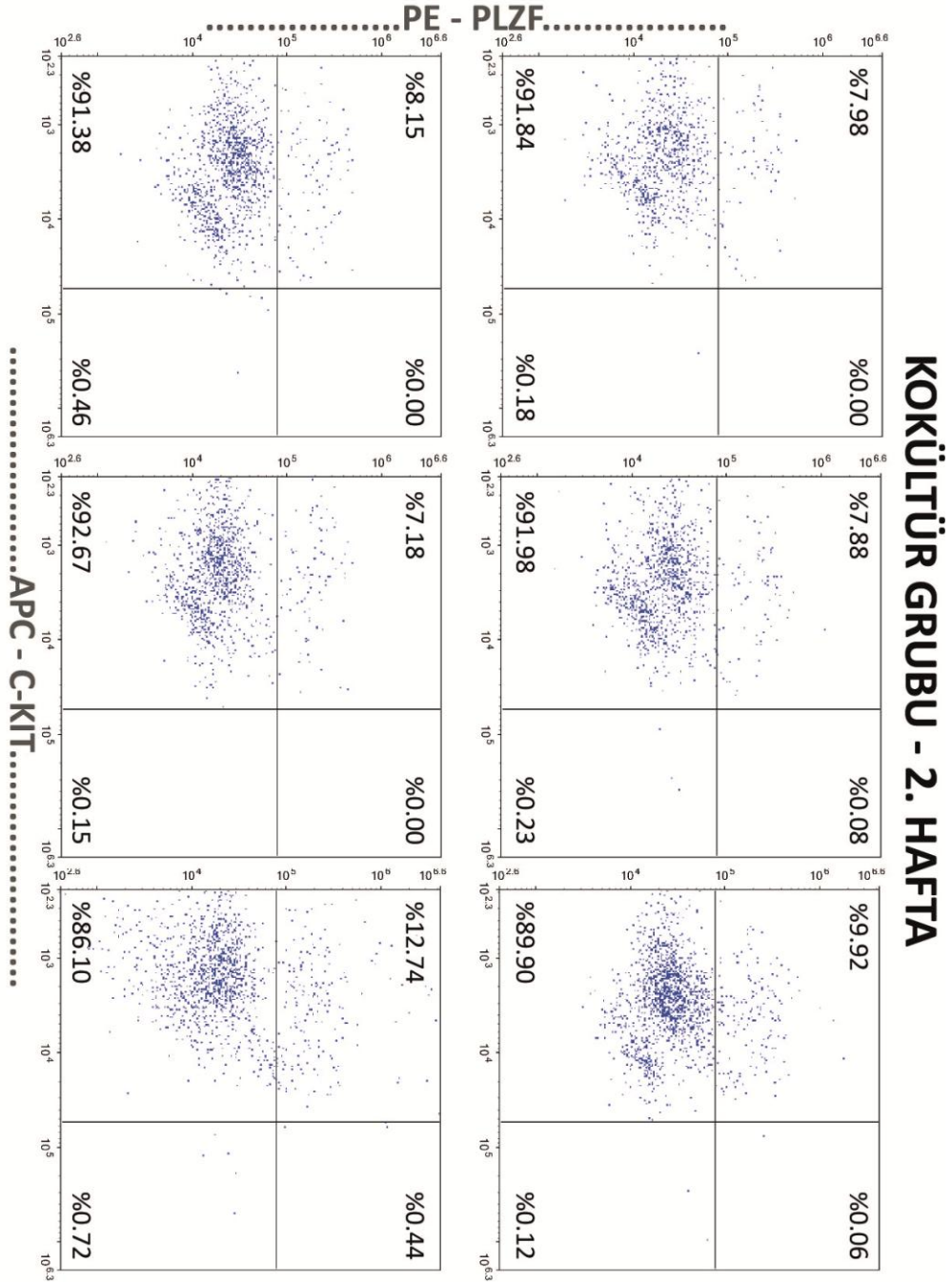


EK-4: İkinci Hafta Kontrol Grubuna Ait Akım Sitometrisi Sonuçları

KONTROL GRUBU - 2. HAFTA

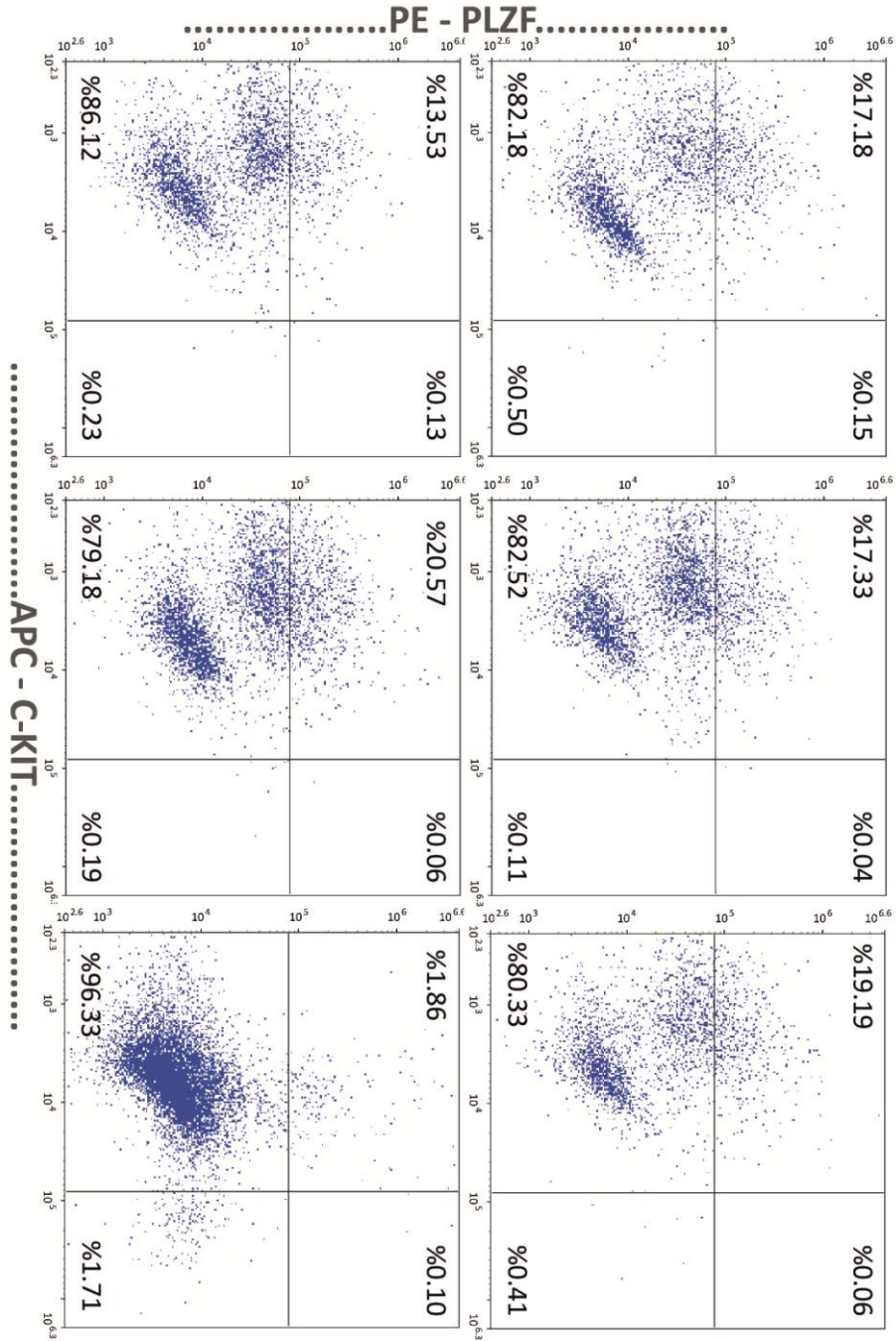


EK-5: İkinci Hafta Kokültür Grubuna Ait Akım Sitometrisi Sonuçları

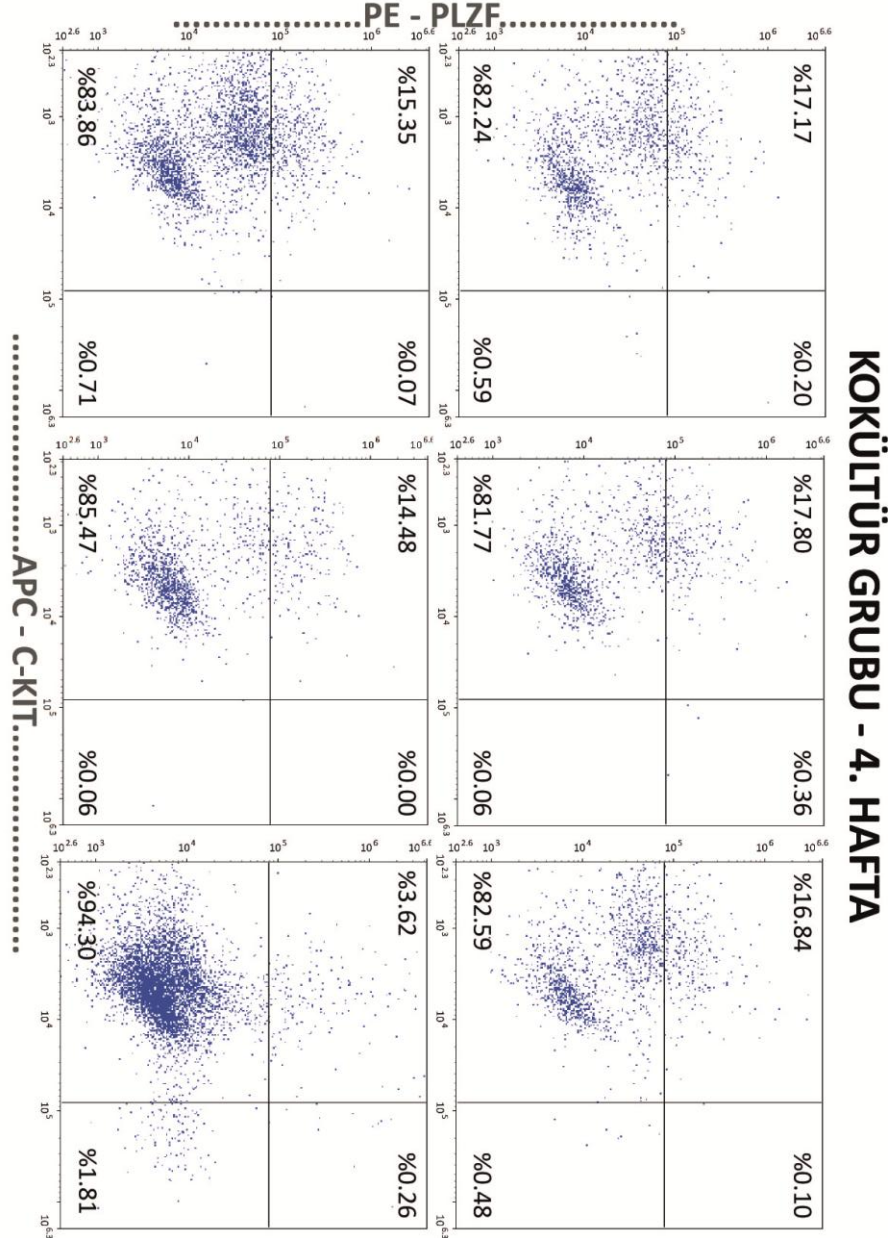


EK-6: Dördüncü Hafta Kontrol Grubuna Ait Akım Sitometrisi Sonuçları

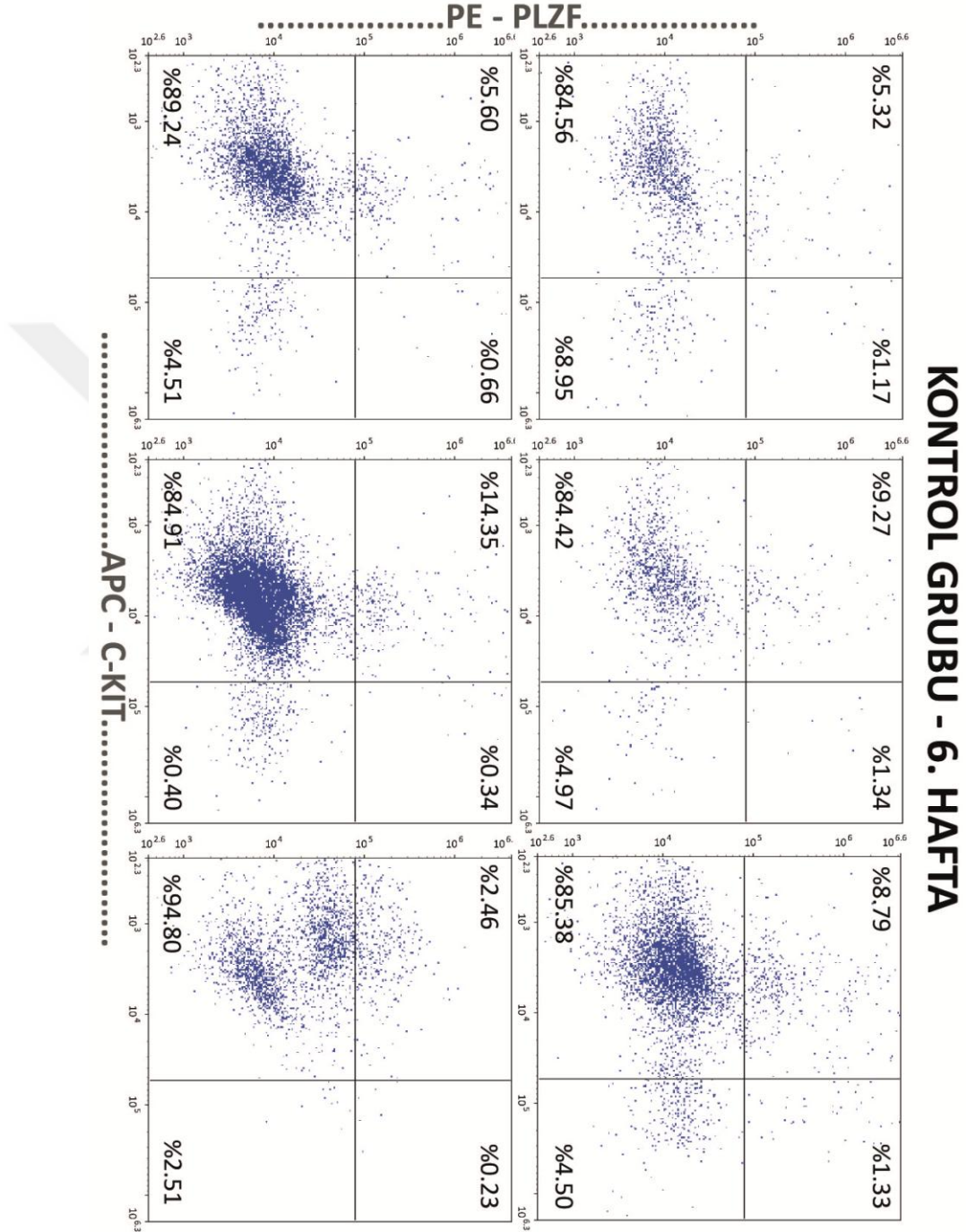
KONTROL GRUBU - 4. HAFTA



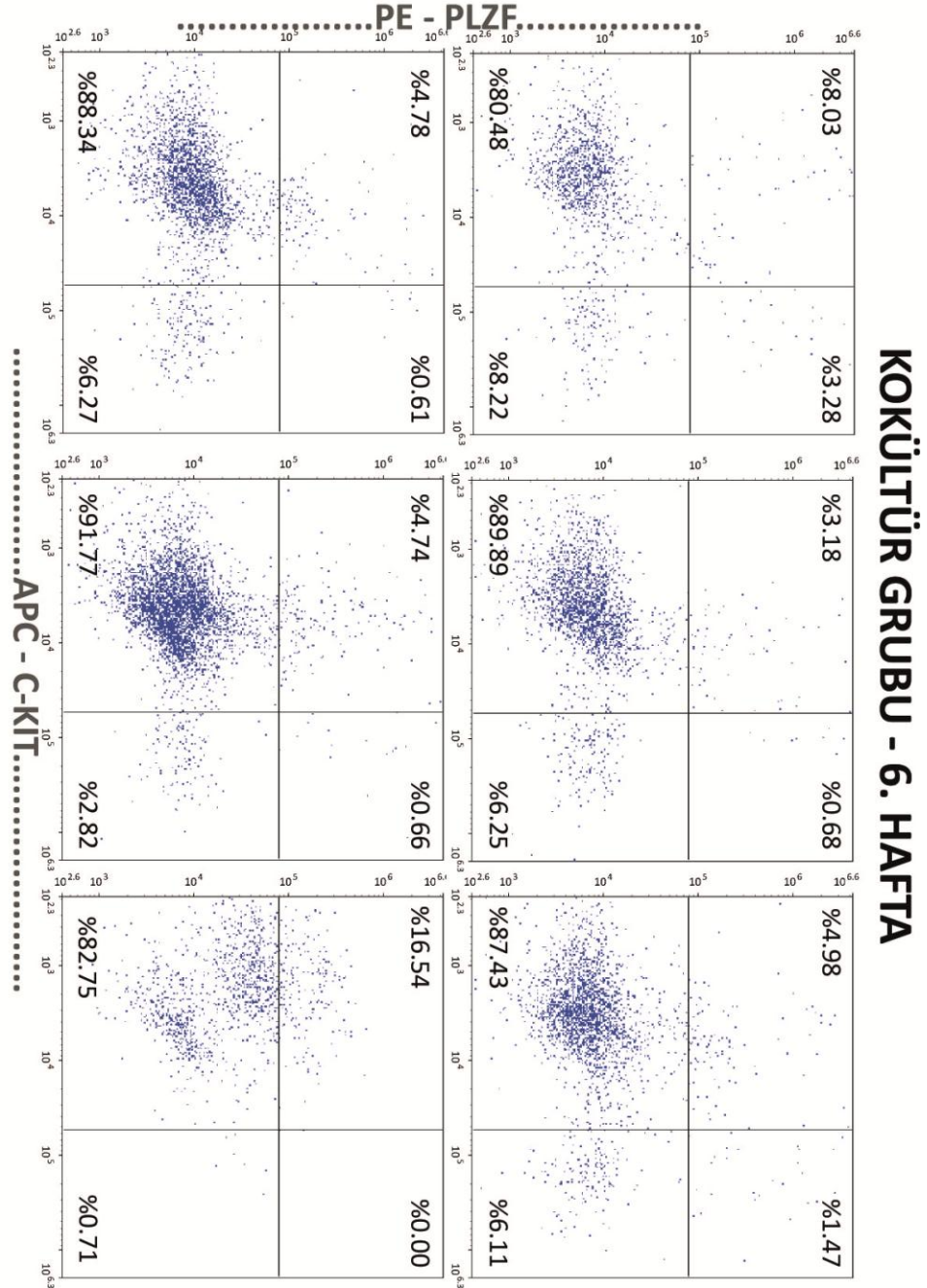
EK-7: Dördüncü Hafta Kokültür Grubuna Ait Akım Sitometrisi Sonuçları



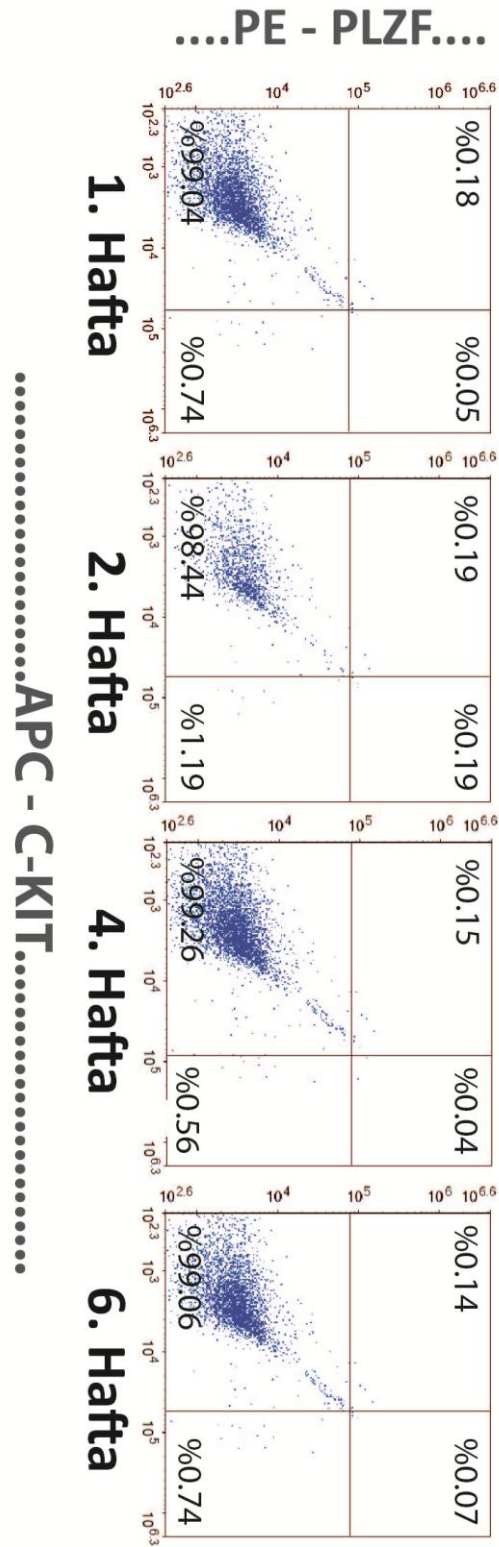
EK-8: Altıncı Hafta Kontrol Grubuna Ait Akım Sitometrisi Sonuçları



EK-9: Altıncı Hafta Kokültür Grubuna Ait Akım Sitometrisi Sonuçları



EK-10: PE ve APC işaretli akım sitometrisi antikorları için kullanılan izotipik kontrol sonuçları



EK-11: Tez çalışması orijinallik raporu

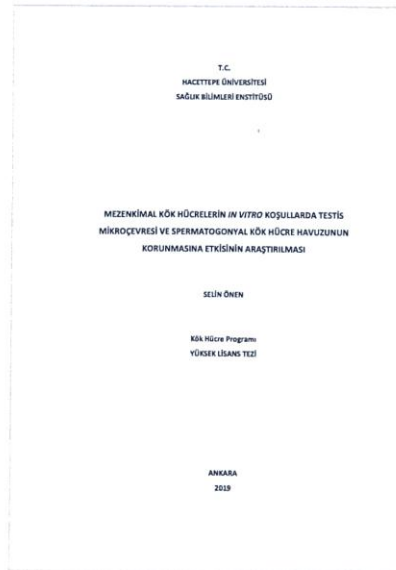
	T.C. HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORİJİNALLİK RAPORU	FORM: 
Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne		Tarih: 30/7/2019
Adı Soyadı: Selin Önen		
Öğrenci No: N17139866		
Anabilim Dalı: Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı		
Programı: Tezli Yüksek Lisans Programı		
Statüsü: ☒ Y.Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.		
Tez Başlığı / Konusu: MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN IN VITRO KOŞULLARDA TESTİS MİKROÇEVRESİ VE SPERMATOGONYAL KÖK HÜCRE HAVUZUNUN KORUNMASINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI		
Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler ve d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 86 sayfalık kısmına ilişkin, 30/7/2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 1 'olarak tespit edilmiştir. Uygulanan filtrelemeler: 1- Kaynakça hariç 2- Alıntılar hariç / dahil 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç Hacettepe Üniversitesi "Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları"nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda 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. Gereğini saygılarımla arz ederim.  Ad Soyad, İmza Selin Önen		
Ek: 1 Adet, tezin tam başlığını öğrencinin ad soyad bilgisini ve dosyanın toplam sayfa sayısını gösterecek şekilde Raporlama işlemi tamamlandıktan sonra alınacak ekran görüntüsü Örnek: Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları Madde 5 (4) Ek 1		
<u>DANIŞMAN ONAYI</u>		UYGUNDUR. 30/7/2019 (Ünvan, Ad Soyad, Tarih İmza) Prof. Dr. Petek Korkusuz 
Detaylı Bilgi: http://www.saglikbilimleri.hacettepe.edu.tr Telefon: (312) 305 10 90 – 91 Fax: (312) 309 31 90 E-Posta: sbe@hacettepe.edu.tr		

EK-12: Dijital Makbuz**Dijital Makbuz**

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Selin Onen
Ödev başlığı: SELİN TEZ
Gönderi Başlığı: MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN İ..
Dosya adı: YAL_K_K_H_CRE_HAVUZUNUN_K..
Dosya boyutu: 40.69M
Sayfa sayısı: 86
Kelime sayısı: 15,436
Karakter sayısı: 105,020
Gönderim Tarihi: 30-Tem-2019 12:56PM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1156196343



EK-12: Dijital Makbuz (devamı)

MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN IN VITRO KOŞULLARDA TESTİS MİKROÇEVRESİ VE SPERMATOGONYAL KÖK HÜCRE HAVUZUNUN KORUNMASINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ORIJİNALLIK RAPORU

% **1**

BENZERLİK ENDEKSİ

% **0**

İNTERNET
KAYNAKLARI

% **0**

YAYINLAR

% **0**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

Submitted to TechKnowledge Turkey

Öğrenci Ödevi

<% **1**

2

www.uludagtezmerkezi.com

İnternet Kaynağı

<% **1**

3

Submitted to Akdeniz University

Öğrenci Ödevi

<% **1**

4

Submitted to Erciyes Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

<% **1**

5

www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

<% **1**

6

Submitted to Monash University

Öğrenci Ödevi

<% **1**

7

Wang, Jun-Jie, Yu-Liang Liu, Yuan-Chao Sun,
Wei Ge, Yong-Yong Wang, Paul W. Dyce, Rong
Hou, and Wei Shen. "Basic Fibroblast Growth

<% **1**

EK-12: Dijital Makbuz (devamı)

Factor Stimulates the Proliferation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Giant Panda (*Ailuropoda melanoleuca*)", PLoS ONE, 2015.

Yayın

8

Submitted to Hacettepe University

Öğrenci Ödevi

<% 1

9

Submitted to Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

<% 1

Alıntıları çıkart

Kapat

Eşleşmeleri çıkar

< 5 words

Bibliyografyayı Çıkart

üzerinde

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : Selin Önen

Doğum Yeri ve Tarihi : Artvin / 16.05.1993

İletişim Adresi: Saimekadın Mahallesi, Bildik Sokak, 8/8 Abidinpaşa
Mamak/ANKARA

Telefon: +90 506 276 45 46

E-posta : selin.onen@hacettepe.edu.tr

II. Eğitim

2017-... : Hacettepe Üniversitesi, Kök Hücre, Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Yüksek Lisans Programı), Ankara, Türkiye; Ağırlıklı Not Ortalaması (GPA): 3.79/4.00

2013-2017 : Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyolojik Bilimler Bölümü, Fen Edebiyat Fakültesi (Lisans Programı), Ankara, Türkiye; Ağırlıklı Not Ortalaması (GPA): 3.01/4.00

2007-2011 : Ankara Atatürk Anadolu Lisesi, Ankara, Türkiye

III. Nitelikler

Dil:

Türkçe : Anadil

İngilizce : Okuma Becerisi: İleri düzey; Yazma Becerisi: İleri Düzey; Konuşma Becerisi: Orta düzey

IV. Laboratuvar Deneyimi ve İlgili Alanları

- Hücre Kültürü Teknikleri (hücre kültürü, pasajlama, dondurma, çözme, doku ve organdan hücre izolasyonu, mikroskopta görüntüleme), immünohistokimyasal işaretleme ve histokimyasal boyama teknikleri, spektrofotometri, akım sitometrisi, organ izolasyonu ve kültürü, kokültür.

- Erkek infertilitesi ile ilgili araştırmalar, kokültür ve mikroakışkan cihaz tasarımı, mezenkimal kök hücrelerin rejeneratif potansiyeli

V. Bilimsel Faaliyet

Yayınlar

- Sevil Köse, Nilgün Yersal, Selin Önen, and Petek Korkusuz, Comparison of Hematopoietic and Spermatogonial Stem Cell Niches from the Regenerative Medicine Aspect Adv Exp Med Biol – Cell Biology and Translational Medicine https://doi.org/10.1007/5584_2018_21
- Petek Korkusuz, Sevil Kose, Nilgün Yersal, Selin Önen. Magnetic-Based Cell Isolation Technique for the Selection of Stem Cells. Methods in Molecular Biology, DOI: 10.1007/7651_2018_151, Springer 2018

Projeler

- Osteoindüktif nanoseramikler ve kemik morfojenik proteini (BMP) kombinasyonu ile kemik rejenerasyonu için yeni bir teknolojinin geliştirilmesi, Yürütölen Kuruluş: Hacettepe Üniversitesi Tıp Faköltesi, Histoloji ve Embriyoloji ABD, Destek Alınan Kuruluş: TÜBİTAK Bilim Kurulu (Yurt içi), TÜBİTAK ikili işbirliğı destekleri programı, Proje no: 215S834, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 15.11.2016 - 15.11.2018.
- Mezenkimal Kök Hücrelerin *in vitro* Koşullarda Testis Mikroçevresi ve Spermatogonyal Kök Hücre Havuzunun Korunmasına Etkisinin Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Yüröyen Tez Desteğı Projesi, Proje No: TYL-2018-17531, Proje Tarihleri: 13.11.2018 – 13.06.2019
- Allojenik mezenkimal kök hücreler ve mikroakışkan sistemle vücut dışında testisteki spermatogonyal kök hücre mikroçevresinin devamlılığının sağlanması,

Yürütülen Kuruluş: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji ABD, Destek Alınan Kuruluş: TÜBİTAK Bilim Kurulu (Yurt içi), TÜBİTAK 1001 projesi, Proje no:218S421, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 15.03.2019 – 15.03.2021.

Katılan Kurslar ve Kongreler

- Deney Hayvanı Kullanımı Kursu (2018, Hacettepe Üniversitesi, Ankara / Türkiye)
- İnverte Mikroskop Kullanım Eğitimi (2018, OLYMPUS - Hacettepe Üniversitesi, Ankara / Türkiye)
- Akım Sitometri Tekniğinin Üreme Biyoteknolojisinde Kullanım Alanları Kursu (Beckman Coulter Life Sciences, 5 Ocak 2018, Ankara / Türkiye)

Tezden Üretilmiş Yayınlar/Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

- Selin Önen, Sevil Köse, Petek Korkusuz, Mezenkimal Kök Hücreler İle Testis Kokültürünün Spermatogonyal Kök Hücre Mikroçevresine Koruyucu Etkisi, 24-26 Nisan 2019, 24. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, Sözlü Sunum.
- Selin Önen, Sevil Köse, Petek Korkusuz, Mesenchymal Stem Cells Protect Testicular Spermatogonial Stem Cell Niche In Vitro, International Society of Stem Cell Research (ISSCR) 2019, Annual Meeting, 26-29 Haziran 2019, Los Angeles, California, United States of America, Poster Presentation.

