



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANNESÜTÜ KAYNAKLI MİKROKİMERİZMDE KİMERİK  
HÜCRELERİN TESTİSTE BELİRLENMESİ, KİMYASAL VE  
FİZİKSEL HASAR MODELLERİNDEKİ ROLÜ**

OLGU ENİS TOK  
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN  
PROF. DR. FERİHA ERCAN  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL- 2023



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANNESÜTÜ KAYNAKLI MİKROKİMERİZMDE KİMERİK  
HÜCRELERİN TESTİSTE BELİRLENMESİ, KİMYASAL VE  
FİZİKSEL HASAR MODELLERİNDEKİ ROLÜ**

OLGU ENİS TOK  
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN  
PROF. DR. FERİHA ERCAN  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL- 2023

## **BEYAN**

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

Olgu Enis TOK

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin başından beri her türlü ilgisini ve desteğini gördüğüm, her zaman bilgisinden yararlandığım çok kıymetli danışman hocam ve Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Feriha Ercan'a,

Eğitim ve tez hayatımda bilgi, beceri ve deneyimlerini bizden esirgemeyen, her zaman yanımızda olan çok değerli hocalarım Prof. Dr. Şule Çetinel'e, Prof. Dr. Serap Şirvancı'ya ve Prof. Dr. Dilek Akakın'a,

Tez çalışmam boyunca ilgi ve desteklerini esirgemeyen, tez izleme komitesinde bulunan değerli hocalarım Prof. Dr. Gözde Erkanlı Şentürk'e ve Doç. Dr. Özlem Tuğçe Çilingir Kaya'a,

Tez çalışmam için gerekli imkânların kullanılmasına olanak veren ve fikri desteğini esirgemeyen değerli hocam, İstanbul Medipol Üniversitesi Sağlık Bilimleri ve Teknolojileri Araştırma Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e,

Tez hayatım boyunca bilgi, destek ve yardımlarını esirgemeyen, yuva sıcaklığında yakınlık kurduğumuz sevgili arkadaşlarım Dr. Mehmet Şerif Aydın, Dr. Esra Nur Yiğit, doktora öğrencileri Ayşe Server Sezer ve Emre Vatandaşlar'a,

Hayatım boyunca desteklerini her zaman hissettiğim, arkamda hep itici güç olan canım ailem, babam Hüseyin Tok, annem Süheyla Tok ve kardeşim Taylan Tok'a,

Desteği ve sevgisi ile her zaman benimle olan, hayatımı paylaştığım sevgili eşim Pınar ve zamanından çaldığım, hayatımın anlamı, biricik kızım Derin'e sonsuz teşekkürler...

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi tarafından TDK-2020-10047 numaralı proje ile desteklenmiştir.

# İÇİNDEKİLER

|                                                                  |            |
|------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>KISALTMALAR LİSTESİ .....</b>                                 | <b>I</b>   |
| <b>TABLO LİSTESİ.....</b>                                        | <b>II</b>  |
| <b>ŞEKİL LİSTESİ .....</b>                                       | <b>III</b> |
| <b>1. ÖZET .....</b>                                             | <b>1</b>   |
| <b>2. SUMMARY .....</b>                                          | <b>2</b>   |
| <b>3. GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>                                    | <b>3</b>   |
| <b>4. GENEL BİLGİLER .....</b>                                   | <b>6</b>   |
| <b>4.1 Meme Bezi ve Laktasyon .....</b>                          | <b>6</b>   |
| 4.1.1 Meme bezi histolojisi.....                                 | 6          |
| 4.1.2 Meme bezi gelişimi.....                                    | 8          |
| 4.1.3 Laktasyon evreleri.....                                    | 10         |
| <b>4.2 Anne Sütü.....</b>                                        | <b>11</b>  |
| 4.2.1 Anne sütü bileşimindeki makro besin maddeleri.....         | 12         |
| 4.2.2 Anne sütü bileşimindeki mikro besin maddeleri .....        | 13         |
| 4.2.3 Anne sütü bileşimindeki biyoaktif maddeler .....           | 16         |
| <b>4.3 Anne Sütünde Bulunan Hücre Popülasyonları .....</b>       | <b>18</b>  |
| 4.3.1 Kan kaynaklı hücreler .....                                | 19         |
| 4.3.1.1 İmmün hücreler.....                                      | 19         |
| 4.3.1.2 Hematopoetik kök hücreler .....                          | 19         |
| 4.3.2 Meme bezi kaynaklı hücreler.....                           | 20         |
| 4.3.2.1 Epitelyal hücreler.....                                  | 20         |
| 4.3.2.2 Kök hücreler .....                                       | 20         |
| 4.3.3 Probiyotik Bakteriler.....                                 | 21         |
| <b>4.4 Mikrokimerizm.....</b>                                    | <b>21</b>  |
| 4.4.1 Fetal mikrokimerizm.....                                   | 22         |
| 4.4.2 Maternal mikrokimerizm .....                               | 23         |
| 4.4.3 Anne sütündeki maternal mikrokimerik hücrelerin göçü ..... | 24         |
| <b>4.5. Testis ve Gelişimi.....</b>                              | <b>25</b>  |
| 4.5.1 Testis morfolojisi .....                                   | 26         |
| 4.5.2 Cinsiyet belirlenmesi ve testis gelişimi .....             | 29         |
| <b>5. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>                                  | <b>31</b>  |

|                                                                                              |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>5.1 Deney Hayvanları ve Deney Modeli .....</b>                                            | <b>31</b> |
| <b>5.2 GFP+ Farelerin Mikroskop Altında Doğrulanması ve Genotipleme .....</b>                | <b>31</b> |
| <b>5.3 Deney Grupları.....</b>                                                               | <b>33</b> |
| <b>5.4 DNA İzolasyonu ve Kantitatif PCR (qPCR) Yöntemi .....</b>                             | <b>35</b> |
| <b>5.5 Akım Sitometrisi Analizi .....</b>                                                    | <b>37</b> |
| <b>5.6 Mikroskopik İnceleme .....</b>                                                        | <b>39</b> |
| 5.6.1 Akım sitometrisi sonrası elde edilen hücrelerin konfokal mikroskopik incelenmesi ..... | 39        |
| 5.6.2 Testis dokusundan alınan kalın kesitlerin konfokal mikroskopik incelenmesi .....       | 40        |
| 5.6.3 Testis dokusunun lightsheet mikroskobu ile incelenmesi.....                            | 40        |
| <b>6. BULGULAR .....</b>                                                                     | <b>42</b> |
| <b>6.1 qPCR Sonuçları .....</b>                                                              | <b>42</b> |
| <b>6.2 Akım Sitometrisi Analizi .....</b>                                                    | <b>45</b> |
| <b>6.3 Mikroskopik Bulgular.....</b>                                                         | <b>51</b> |
| 6.3.1 Akım sitometrisi ile elde edilen hücrelerin konfokal mikroskopi bulguları.....         | 51        |
| 6.3.2 Testis doku örneklerinin konfokal mikroskopi bulguları .....                           | 54        |
| 6.3.3 Testis doku örneklerinin lightsheet mikroskobu bulguları .....                         | 56        |
| <b>7. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>                                                            | <b>63</b> |
| <b>8. KAYNAKLAR.....</b>                                                                     | <b>72</b> |
| <b>9. ÖZGEÇMİŞ .....</b>                                                                     | <b>82</b> |
| <b>10. BİLİMSEL FAALİYETLER .....</b>                                                        | <b>83</b> |
| <b>11. EKLER .....</b>                                                                       | <b>94</b> |

## KISALTMALAR LİSTESİ

|         |   |                                                       |
|---------|---|-------------------------------------------------------|
| BDNF    | : | Beinden tüeyen nörotrofik faktör                      |
| CK14    | : | Sitokeratin 14                                        |
| CNTF    | : | Silier nörotrofik faktör                              |
| DMSO    | : | Dimetil sülfoksit                                     |
| EFSA    | : | Avrupa Gıda Güvenliğı Otoritesi                       |
| EGF     | : | Epidermal büyüme faktörü                              |
| EKH     | : | Embriyonik kök hücrelerinin                           |
| EPCAM   | : | Epitelyal hücre adezyon molekülü                      |
| FHM     | : | Fetal hücre mikrokimerizmi                            |
| GDNF    | : | Gliyal hücre kökenli nörotrofik faktör                |
| GFP     | : | Yeşil floresan protein                                |
| hBmSC   | : | Anne sütü kök hücreleri                               |
| IGF-I   | : | İnsülin benzeri büyüme faktörü-I                      |
| iPSC    | : | Uyarılmış pluripotent kök hücreler                    |
| İSO     | : | İnsan sütü oligosakkaritleri                          |
| MEDİTAM | : | İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi |
| MHM     | : | Maternal hücre mikrokimerizmi                         |
| MIF     | : | Müllerian-inhibisyon faktörü                          |
| MKH     | : | Meme kök hücreleri                                    |
| PFA     | : | Paraformaldehit                                       |
| PE      | : | Phycoerythrin                                         |
| ROS     | : | Reaktif oksijen türlerinin                            |
| SMA     | : | Düz kas aktin                                         |
| TDF     | : | Testis belirleyici faktör                             |
| TDLU    | : | Terminal kanal lobüler birim                          |
| TGF-β   | : | Dönüştürücü büyüme faktörü-β                          |
| WHO     | : | Dünya Sağlık Örgütü                                   |

## **TABLO LİSTESİ**

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.</b> Kolostrum ve olgun sütteki makro ve mikro elementlerin miktarı ..... | 14 |
| <b>Tablo 2.</b> Anne sütünde bulunan biyoaktif bileşenler .....                      | 16 |
| <b>Tablo 3.</b> Tek bir örnek için PCR karışımı.....                                 | 32 |
| <b>Tablo 4.</b> Kullanılan primer dizileri. ....                                     | 32 |
| <b>Tablo 5.</b> Thermal Cycler PCR protokolü.....                                    | 33 |
| <b>Tablo 6.</b> GFP gen amplifikasyonu için qPCR bileşenleri. ....                   | 37 |
| <b>Tablo 7.</b> qPCR döngü koşulları.....                                            | 37 |
| <b>Tablo 8.</b> qPCR analizi sonuçları .....                                         | 43 |

## ŞEKİL LİSTESİ

|                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. Laktasyon döneminde kadın memesinin şematik çizimi .....                                                               | 6  |
| Şekil 2. Meme bezi morfolojisinin şematik ve histolojik görünümü .....                                                          | 8  |
| Şekil 3. Doğum sonrası meme bezi gelişimi şeması. ....                                                                          | 9  |
| Şekil 4. Anne sütü bileşenleri.....                                                                                             | 12 |
| Şekil 5. Anne sütünde bulunan hücre tipleri .....                                                                               | 18 |
| Şekil 6. Anne sütü kaynaklı hücrelerinin emzirilen yavru vücuduna yayılması .....                                               | 24 |
| Şekil 7. İnsan testisinin midsagital şematik çizimi .....                                                                       | 26 |
| Şekil 8. İnsan seminifer epitelinin şematik çizimi .....                                                                        | 28 |
| Şekil 9. Testis gelişim aşamalarının şematik diyagramı. ....                                                                    | 30 |
| Şekil 10. Deney grupları için gerekli farelerin elde edilmesi.....                                                              | 31 |
| Şekil 11. Deney gruplarının ve uygulamalarının şematik gösterimi. ....                                                          | 35 |
| Şekil 12. pEGFP-N3 plazmidine ait restriksiyon haritası ve klonlama bölgeleri. ....                                             | 36 |
| Şekil 13. pEGFP-N3 plazmidi ile elde edilen standart eğri grafiği.....                                                          | 42 |
| Şekil 14: qPCR analizine göre deney gruplarındaki GFP+ kimerik hücrelerin sayısı.....                                           | 44 |
| Şekil 15. GFP+ hücre analizi için gerekli olan kapıların seçilmesi. ....                                                        | 46 |
| Şekil 16. Negatif ve pozitif kontrol testis dokularının akım sitometrisi analizi.....                                           | 47 |
| Şekil 17. 7 Günlük Kontrol grubuna ait testis dokusunun akım sitometrisi analizi.....                                           | 47 |
| Şekil 18. 30 Günlük Kontrol grubuna ait testis dokusunun akım sitometrisi analizi.....                                          | 48 |
| Şekil 19. 60 Günlük Kontrol grubuna ait testis dokusunun akım sitometrisi analizi.....                                          | 48 |
| Şekil 20. Busulfan grubuna ait testis dokusunun akım sitometrisi analizi.....                                                   | 49 |
| Şekil 21. IR grubuna ait testis dokusunun akım sitometrisi analizi. ....                                                        | 49 |
| Şekil 22. Akım sitometrisi analizine göre deney gruplarındaki GFP+ kimerik hücrelerin oranı .....                               | 50 |
| Şekil 23. 7 Günlük Kontrol grubunda akım sitometrisi analizi sonrası elde edilen hücrelerin konfokal mikroskopik görüntüsü..... | 52 |

|                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 24.</b> 30 Günlük Kontrol grubunda akım sitometrisi analizi sonrası elde edilen hücrelerin konfokal mikroskopik görüntüsü..... | 52 |
| <b>Şekil 25.</b> 60 Günlük Kontrol grubunda akım sitometrisi analizi sonrası elde edilen hücrelerin konfokal mikroskopik görüntüsü..... | 53 |
| <b>Şekil 26.</b> Busulfan grubunda akım sitometrisi analizi sonrası elde edilen hücrelerin konfokal mikroskopik görüntüsü.....          | 53 |
| <b>Şekil 27.</b> IR grubunda akım sitometrisi analizi sonrası elde edilen hücrelerin konfokal mikroskopik görüntüsü.....                | 54 |
| <b>Şekil 28.</b> 30 Günlük Kontrol grubuna ait testis dokusundan alınan konfokal mikroskobu görüntüsü .....                             | 55 |
| <b>Şekil 29.</b> Busulfan grubuna ait testis dokusundan alınan konfokal mikroskobu görüntüsü ....                                       | 55 |
| <b>Şekil 30.</b> Busulfan grubuna ait testis dokusundan alınan konfokal mikroskobu görüntüsü ....                                       | 56 |
| <b>Şekil 31.</b> 30 Günlük Kontrol grubuna ait testis dokusundan alınan lightsheet mikroskobu görüntüsü .....                           | 57 |
| <b>Şekil 32.</b> 30 Günlük Kontrol grubuna ait testis dokusundan alınan lightsheet mikroskobu görüntüsü .....                           | 58 |
| <b>Şekil 33.</b> 30 Günlük Kontrol grubuna ait testis dokusundan alınan lightsheet mikroskobu görüntüsü .....                           | 59 |
| <b>Şekil 34.</b> Busulfan grubuna ait testis dokusundan alınan lightsheet mikroskobu görüntüsü ...                                      | 61 |
| <b>Şekil 35.</b> Busulfan grubuna ait testis dokusundan alınan lightsheet mikroskobu görüntüsü ...                                      | 62 |

## 1. ÖZET

**Tezin başlığı :** Annesütü Kaynaklı Mikrokimerizmde Kimerik Hücrelerin Testiste Belirlenmesi, Kimyasal ve Fiziksel Hasar Modellerindeki Rolü

**Öğrencinin Adı Soyadı :** Olgu Enis Tok

**Danışmanın Adı Soyadı :** Prof. Dr. Feriha Ercan

**Programın Adı :** Histoloji ve Embriyoloji Doktora Programı

**Amaç:** Mikrokimerizm, immün yanıt gerçekleştirmeden bir bireye başka bir bireyden az miktarda hücrelerinin geçişidir. Gebelikte annenin hücrelerinin yavrulara geçmesine ise maternal mikrokimerizm adı verilir. Anne sütüne bağlı mikrokimerizm ile ilgili olarak oldukça az yayına rastlanmaktadır. Çalışmamızda hedef organ olan testis ile ilgili mikrokimerizm çalışması bulunmamaktadır. Bu projede emzirme yoluyla yavru testis dokusuna geçen kimerik hücrelerin tanımlanması ve kimyasal ve fiziksel hasar modellerindeki rolünün aydınlatılması amaçlandı.

**Gereç ve Yöntem:** Farelerle gerçekleştirilecek proje temel olarak hücrelerindeki aktin filamentinde yeşil floresan protein (GFP) eksprese eden transgenik hayvanlar ile deney yapmaya dayanmaktadır. Bu bağlamda GFP+ transgenik anneden normal yavruya anne sütü aracılığıyla geçen kimerik hücreler 7, 30, 60 Günlük kontrol ve Busulfan, İskemi/Reperfüzyon gruplarında araştırıldı. GFP+ kimerik hücre gruplarına ait testis doku örneklerinde akım sitometrisi ve qPCR metodu ile analiz edildi. Testis doku incelemeleri ise konfokal ve lightsheet mikroskopları aracılığıyla yapıldı.

**Bulgular:** Yapılan qPCR ve akım sitometrisi analizleri sonucunda tüm gruplara ait testis dokularına anne sütü kaynaklı kimerik hücrelerin geçişi gözlemlendi. Konfokal ve lightsheet mikroskopik incelemelerde GFP+ kimerik hücrelerin testiste hem seminifer tübül içerisinde hem de interstisyel bağ doku içerisinde görüntülendi. Bütün analizler değerlendirildiğinde özellikle 30 Günlük Kontrol ve Busulfan hasar grubunda daha fazla GFP+ kimerik hücre popülasyonu gözlemlendi.

**Sonuç:** Anne sütü kaynaklı kök hücrelerin yavruya geçerek testis dokusuna göç ederek yerleştiği farklı metodlar kullanılarak ispatlandı. Hipotezimizi normal şartlarda bir hücrenin geçişi bile ispatlayacakken özellikle Busulfan hasar grubunda daha fazla sayıda bulundu. Anne sütü hücrelerinin girişimsel olmayan yöntemlerle elde edilebilmesi ve hücresel farklılaşma potansiyelleri göz önüne alındığında bu hücrelerin kullanımına yönelik araştırma ihtiyacı ortaya çıkmaktadır. Anne sütü yoluyla yavruya geçen hücrelerin, yavrunun dokularına geçebilme yeteneği, anne sütünün beklenenden daha büyük bir biyolojik öneme sahip olabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Mikrokimerizm, anne sütü, anne sütü kaynaklı kök hücre, testis

## 2. SUMMARY

**Title of Thesis:** Determination of Breastmilk Induced Microchimerism in Testis, Its Role in Chemical and Physical Damage Models

**Student Name, Surname:** Olgu Enis Tok

**Supervisor Name :** Prof. Dr. Feriha Ercan

**Program Name :** Histology and Embryology PhD Program

**Objective:** Microchimerism refers to the presence of a small number of cells from one organism in another organism without eliciting an immune response. Maternal microchimerism occurs when the mother's cells pass to the offspring during pregnancy. There is limited literature on microchimerism associated with breast milk. In our study, we aimed to investigate microchimerism related to breast milk, specifically focusing on the testis as the target organ. We aimed to detect chimeric cells that migrate from the mother to the offspring's testis through breastfeeding, characterize their phenotype and differentiation properties, and elucidate their role in chemical and physical damage models.

**Materials and Methods:** The fundamental experimental approach of this project with mice relies on using transgenic animals that express green fluorescent protein (GFP) in all their cells. GFP+ chimeric cells transferred from GFP+ mothers to normal offspring through breastfeeding were investigated in control groups at 7, 30, and 60 days, as well as in Busulfan-induced damage and ischemia-reperfusion groups. Testis samples from the GFP+ chimeric cell groups were analyzed using flow cytometry and qPCR methods. Testis tissue examinations were conducted using confocal and lightsheet microscopes.

**Results:** Analysis by qPCR and flow cytometry confirmed the presence of breast milk-derived chimeric cells in the testis tissues of all groups. Confocal and lightsheet microscopic examinations revealed the presence of GFP+ chimeric cells within seminiferous tubules and interstitial connective tissue in the testis. Overall, especially in the 30-Day Control and Busulfan damage groups, a higher population of GFP+ chimeric cells was observed.

**Conclusion:** The migration and engraftment of stem cells from breast milk to the offspring's testis were demonstrated using different methods. Our hypothesis was supported by the presence of these cells, even though their numbers were particularly higher in the Busulfan damage group. Considering the non-invasive methods for obtaining breast milk cells and their potential for cellular differentiation, there is a need for further research on the use of these cells. The ability of cells transferred to the offspring's tissues through breastfeeding suggests that breast milk may have biological significance beyond current understanding.

**Keywords:** Microchimerism, breastmilk, breastmilk derieved stem cell, testis

### 3. GİRİŞ ve AMAÇ

Mikrokimerizm, bir bireye ait hücre ya da genetik materyalin, immün yanıt oluşturmada genetik olarak farklı bireyde gözlenmesidir. Bu durumun en sık görüldüğü kaynak gebelik sürecidir. Gebelik sırasında, fetal hücreler kan dolaşımı ve plasenta yoluyla annenin dolaşımına geçer ve bu duruma fetal hücre mikrokimerizmi (FHM) denir. Maternal hücre mikrokimerizmi (MHM) ise gebelik süresince anneye ait hücrelerin yavruya geçişidir. Gebelik sırasında iki fetüs arasındaki hücre geçişi mikrokimerizmin başka bir türüdür (van Dijk ve ark., 1996).

Anne sütü ile beslenme sadece beslenme sürecinde değil, ilerleyen yaşlarda da olumlu etkiler sağlar. Anne sütü ile beslenme, enfeksiyon hastalıkları gibi birçok hastalığın görülme sıklığını azaltmaktadır (Gartner, 1997). Anne sütü, suyun yanı sıra çeşitli proteinler, vitaminler, mineraller ve yağlar gibi maddeler içerir. Ayrıca oligosakkaritler, hormonlar, enzimler, immünoglobülinler, laktoferrin, büyüme faktörleri, sitokinler, antiinflamatuvar ajanlar ve mikrobiyal faktörler gibi immün sistem gelişiminde etkili olabilecek biyoaktif maddeleri de içerir (Walker, 2010). Anne sütü içerisinde meme bezini oluşturan hücrelerin yanı sıra kan dolaşımındaki hücreler de bulunabilir. Ayrıca, laktogenez sürecinde meme bezinin oluşumunu sağlayan kök hücrelerin de anne sütünde bulunduğu tespit edilmiştir (Hassiotou ve ark., 2012). Bu kök hücreler, pluripotent kök hücre belirteçlerini ifade ederek nöronlar, hepatositler, kalp kası hücreleri ve osteositler gibi farklı hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğine sahiptir (Hassiotou ve ark., 2012). Anne sütünde bu özellikteki kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri ve emzirme sonrası yavruyla olan ilişkilerinin araştırılması ilgi çekici bir konudur. Ayrıca, anne sütünün, yavrunun beslenme ihtiyacının ötesinde daha fazla etkisi olduğunu düşündürmektedir.

Meme kök hücreleri (MKH) ve farklılaşma kapasiteleri ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. MKH'nin meme bezinde bulunan alveolar hücrelere, kanal hücrelerine ve süt boşaltılmasına yardımcı olan mioepitelyal hücrelere dönüşebildiği belirtilmektedir (Visvader ve ark., 2009). Transgenik olarak işaretlenmiş MKH'lerin farelere transplantasyonu yapıldığında, bu hücrelerden tamamen yeni bir meme oluşumu gözlemlenmiştir. Transplantasyon sonrasında MKH'lerinden mioepitelyal hücreler ve gebelik sırasında fonksiyonel hale gelebilen alveolar ünitelerin oluştuğu gösterilmiştir (Shackleton ve ark., 2006). Meme içindeki MKH'lerin epitel ve mioepitel hücrelerin genel özelliklerine ve immünohistokimyasal işaretlenme kapasitelerine sahip olduğu bilinmektedir, ancak bu hücreler arasındaki gelişimsel etkileşimler hala belirsizliğini korumaktadır (Hassiotou ve ark., 2013).

Meme kök hücreleri (MKH) ve diğer meme hücreleri, hücre göçü, hücre döngüsü ve/veya emzirme sırasındaki mekanik etki yoluyla anne sütüne geçebilir. İnsan sütüyle yapılan çalışmalarda, anne sütü içinde meme bezi hücre işaretleyicileri (CK14, CK18, CK19 ve  $\beta$ -casein) dışında embriyonik kök hücre işaretleyicileri (OCT4, SOX2, NANOG) ve nöronal kök hücre işaretleyicisi (nestin) ile işaretlenebilen hücrelerin varlığı gösterilmiştir (Cregan ve ark., 2007). Bu bulgular, süt içinde bulunan kök hücrelerin lökositler gibi yavrunun dolaşımına katılarak çeşitli organlara göç edebilmesi ve orada farklı hücre tiplerine dönüşebilmesiyle mikrokimerizme yol açabileceğini düşündürmektedir. Anne sütü kaynaklı maternal mikrokimerizm hakkındaki bilgiler oldukça sınırlıdır. Süt yoluyla çeşitli hücrelerin ve hücre materyallerin yavruya geçişi ile çeşitli sinyal aktive olabilmektedir.

Anne sütünün yenidoğan bebekler için vazgeçilemez bir besin kaynağı olduğu şüphesizdir. Bununla ilgili anne sütünün besinsel içeriği ve yavru için faydaları konusunda birçok çalışma yapılmıştır. Anne sütünün besinsel değerinin dışında hücresel içeriğinin şimdiye kadar bilinmeyen özellikleri ortaya çıkmaya başlamıştır. Özellikle son birkaç yılda anne sütünün hücresel içeriği ile ilgili çalışmalar hız kazanmaya başlamıştır. Bu konuda oldukça kısıtlı çalışma olmasına karşı anne sütü içerisindeki kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri üzerinde önemli bulgular elde edilmiştir. Bu veriler anne sütünün hücresel özellikleri ve bu hücrelerin çeşitli tedavi yöntemlerinde kullanılabilmesi konusunda kapsamlı araştırma gereğini ortaya koymuştur.

Son yıllarda erkek infertilitesinde sperm üretim bozukluğunun olduğu olgularda hücresel tedavi yöntemleri büyük bir umut ışığı olmaktadır. Günümüzdeki hücresel tedavi yöntemleri ile ilgili girişimler ve araştırmalar düşünüldüğünde anne sütü içerisindeki kök hücrelerin de bu alandaki yöntemlerin geliştirilmesi ve olgunlaştırılmasında yer alması heyecan vericidir. Kök hücre alanındaki araştırmalara bakıldığında iPSC ve mezenşimal kök hücreler gibi konuların yanında anne sütü –son yıllarda ortaya çıkarılmış olması nedeniyle- gerektiği ilgiyi görememiştir. Bu alandaki çalışmalar da genellikle in vitro farklılaşma özellikleri ve fenotipik hücresel özelliklerin belirlenmesi ile kısıtlı kalmıştır.

Anne sütü içerisindeki hücrelerin, doğal düzeninde olduğu gibi, anneden yavruya emzirme yoluyla geçiş mekanizmaları ve yavru içerisindeki organizasyonları belirsizliğini korumaktadır. Bu nedenle ilk olarak bu hücrelerin anne-yavru arasındaki fizyolojik işleyişinin ortaya çıkarılması gerekmektedir.

Çalışmamız ile bu konudaki temel eksikliklerin giderilerek bu hücrelerin anne-yavru arasındaki doğal sürecinin ortaya çıkarılarak kimerik hücrelerin testise yerleşimini göstermek amaçlamaktadır. Bu sürecin daha önce testiste incelenmemesi ve in vivo yöntemlerle çalışılacak olmasıyla bu alanda literatürdeki önemli bir boşluğun doldurulması planlanmaktadır. qPCR ve akım sitometrisi yöntemi ile miktarı az sayıda olan kimerik hücrelerin varlığı ispatlanmaktadır. Özellikle kulanacağımız doku şeffaflaştırma yöntemleri ve ileri mikroskopi görüntüleme teknikleri ile birlikte bu alanda daha önce hiç elde edilmemiş verilere ulaşılması sağlanacaktır. Hücre terapisi pek çok hastalıkta ümit vadeden yeni bir tedavi yöntemidir. Bu yöntemdeki stratejilerden biri dokudaki mevcut kök hücreleri hasar durumunda rejenerasyon ve restorasyonu için harekete geçirmektir. Bu projenin konusu olan anne sütü içerisindeki hücreler bu bağlamda yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için bir başlangıç noktası olabileceği düşünülmektedir.

Projenin birincil amacı, anne sütü içerisinde bulunan farklılaşma kapasitesine sahip mikrokimerik hücrelerin emzirme yoluyla yavrusuna ait testis dokusuna geçişini göstermek ve farklılaşma özelliklerini belirlemektir. İkincil amacı ise busulfan ile oluşturulmuş kimyasal hasar modelinde ve iskemi-reperfüzyon ile oluşturulmuş fiziksel hasar modelinde mikrokimerik hücrelerin yerleşim ve farklılaşma potansiyellerinin tanımlanmasıdır.

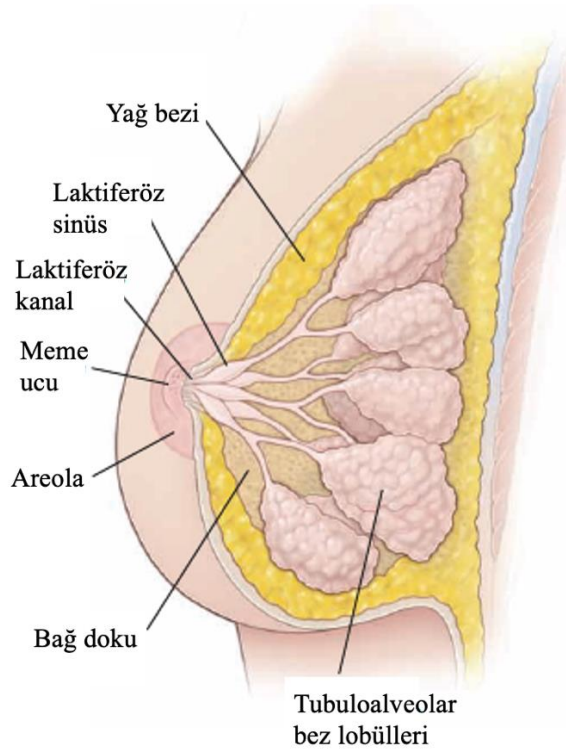
## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1 Meme Bezi ve Laktasyon

Meme bezi, ergenlik ve üreme döngüsü sırasında epitel hücrelerinde çok sayıda değişiklikler meydana gelen oldukça dinamik bir organdır (Fu ve ark., 2020). Süt sentezi ve laktasyon, dallanmış epitelyal ekzokrin bir organ olan meme bezi tarafından sağlanır (Hannan ve ark., 2023).

#### 4.1.1 Meme bezi histolojisi

Meme bezleri, modifiye edilmiş tubuloalveolar apokrin ter bezleridir. Epidermisin içerisinde yer alan modifiye edilmiş ter bezlerinden türeyen tubuloalveolar meme bezleri, deri altı dokuda bulunur. İnaktif yetişkin meme bezi, fibroz bağ doku bantlarıyla ayrılmış 15 ila 20 düzensiz lobdan oluşur. Bu loblar meme başı veya etrafından yayılır ve terminal kanal lobüler birimleri (TDLU) olarak bilinen birçok lobüle bölünmüştür. Dermis ile bağlantılı olan süspansiyon veya Cooper bağları adı verilen bazı fibroz bantlar vardır. Yoğun bağ doku arasında, aralobüler alanlarda bol miktarda yağ dokusu bulunur (Ross, 2016) (Şekil 1).



Şekil 1. Laktasyon döneminde kadın memesinin şematik çizimi (Ross, 2016).

Her bez, bir konstrikte açıklığa sahip olan bir laktiferöz kanal ile sonlanır ve meme başına açılır. Areola'nın altında, meme başını çevreleyen pigmentli bölge, her kanalın genişlemiş bir kısmı olan laktiferöz sinüsüne sahiptir. Laktiferöz kanallarının açıklıklarına yakın olan bölümleri, çok tabakalı yassılaştırmış keratinize epitelyum ile kaplıdır. Kanalin epitelyal astarı, çok katlı yassı epitelden, laktiferöz sinüste iki katlı küboidal epitele ve kanal sisteminin geri kalanında tek katlı prizmatik veya küboidal epitele doğru dereceli geçiş gösterir (Ross, 2016).

Yetişkin meme başı ve areolasının epidermisi oldukça pigmentlidir ve biraz kıvrıktır ve derinin yüzeyine uzanan uzun dermal papillalar içerir. Keratinize olmuş çok tabakalı yassı epitelyum ile kaplıdır. Meme başının pigmentasyonu ergenlik döneminde artar ve meme başı daha belirgin hale gelir. Gebelik sırasında, areola daha büyük hale gelir ve pigmentasyon derecesi daha da artar. Areolanın ve meme başının derininde, yoğun bağ dokuda ve laktiferöz kanallar boyunca düzgün kas lifi demetleri radyal ve dairesel olarak düzenlenmiştir. Bu kas lifleri, meme başının çeşitli uyarıcılara tepki olarak dikleşmesini sağlar (Ross, 2016).

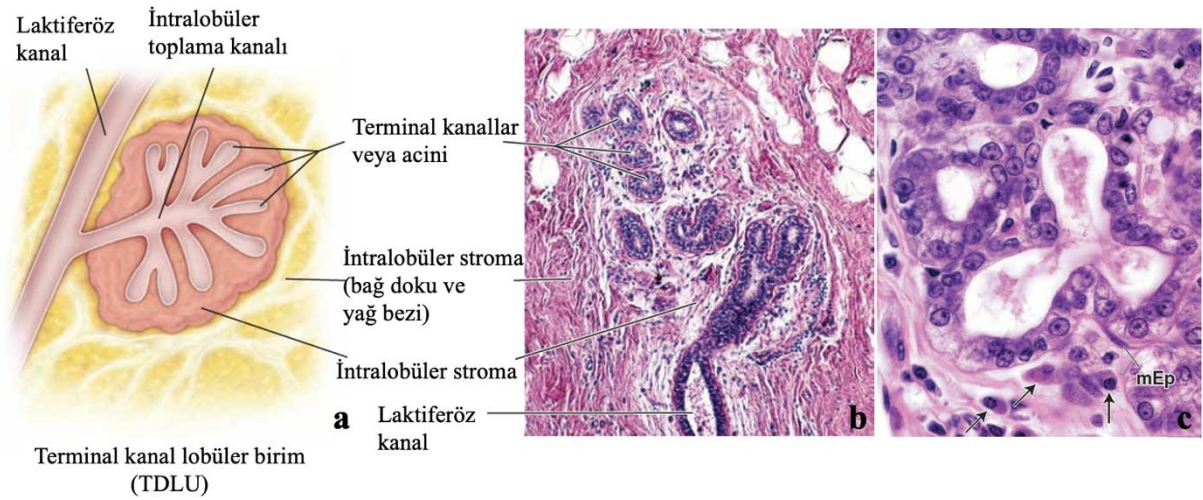
Areola, yağ bezleri, ter bezlerini ve modifiye edilmiş meme bezlerini (Montgomery bezleri) içerir. Bu bezler, ter bezleri ile gerçek meme bezleri arasında bir yapıya sahiptir ve areola yüzeyinde küçük kabartılar oluştururlar. Montgomery bezlerinin cildin pH'ını değiştiren ve mikrobiyal büyümeyi engelleyen bir yağlama ve koruyucu salgı ürettiği düşünülmektedir. Meme başında birçok duyuşal sinir ucu bulunurken, areola daha az duyuşal sinir ucu içerir (Ross, 2016).

Meme bezindeki TDLU'lar, süt bezinde küçük salgı yapan alveollerin (laktasyon durumunda) veya terminal kanalların (pasif bezde) intralobüler stroma ile çevrili kümelenmesini temsil eder. Laktiferöz kanalların ardışık dallanması TDLU'ya yol açar. Her TDLU, üzüm salkımına benzer küçük alveollerden oluşan bir lobülü oluşturan bir kümelenmeyi temsil eder ve terminal kanal, intralobüler toplama kanalı, intralobüler stromayı içerir (Şekil 2). Terminal kanallar, pasif bezde bulunur. Gebelik ve doğumdan sonra, sekretuar hücrelerle döşeli olan terminal kanalların epiteli, süt üreten tamamen işlevsel alveollere farklılaşır. İntralobüler toplama kanalı alveoler salgıları laktiferöz kanala taşır. İntralobüler stroma, terminal kanal ve alveollerin etrafını saran hormonal olarak duyarlı gevşek bağ dokusudur. İntralobüler bağ dokusu az miktarda yağ hücresi içerir (Ross, 2016).

Meme bezi kanalları ve lobülleriyle ilişkili en önemli hücreler glandüler epitelyal ve miyoepitelyal hücrelerdir. Glandüler epitelyal hücreler kanal sisteminin içini döşerken, miyoepitelyal hücreler epitelyal hücrelerle bazal lamina arasında derinlemesine bulunurlar.

Sekretuar bezin hücrelerinden oluşan bu sepet benzeri ağ düzenlemesi, glandüler yapıların sekretuar bölgelerinde bulunur (Ross, 2016).

Meme bezinin salgı yapan bölümünün morfolojisi menstrual döngüye bağlı olarak değişir. Pasif bezde, bez yapısı seyrek ve çoğunlukla kanallardan oluşur. Menstrual döngü sırasında, pasif meme hafif döngüsel değişikliklere uğrar. Folliküler fazın başlarında, intralobüler stroma daha az yoğundur ve terminal duktüller, kübik şekilli epitelyal hücreler tarafından oluşturulan lümensiz veya çok az lümenli kordonlar şeklinde görünür. Luteal faz sırasında, epitelyal hücreler boyca artar ve salgılar biriken küçük miktarda lümenlerde görünür. Ayrıca bağ dokusunda sıvı birikir. Bu, menstrual döngünün son birkaç gününde ani involüsyon ve apoptoz ile devam eder ve menstrual döngü başlamadan önce gerçekleşir. Gebelik sırasında, glandüler dokudaki değişiklikler bağ dokusu ve yağ dokusunun miktarında azalmaya neden olur (Ross, 2016) (Şekil 2).



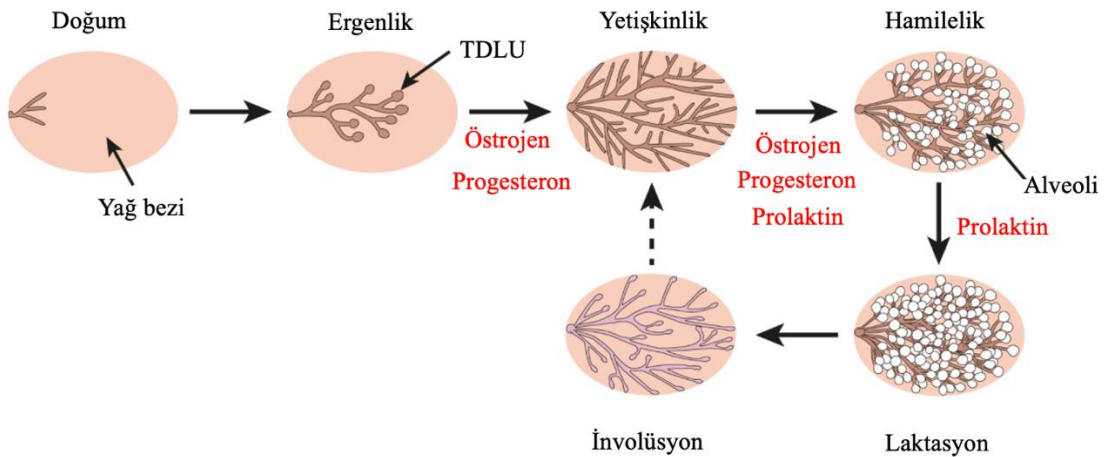
**Şekil 2.** Meme bezi morfolojisinin şematik ve histolojik görünümü **a.** Terminal kanal lobüler birim (TDLU). **b.** İnaktif meme bezi. **c.** Aktif meme bezinde miyoepitel hücre (mEp) (Ross, 2016).

Meme bezinde salgı yapan hücreler, bol miktarda granüler endoplazmik retikulum, orta sayıda büyük mitokondri, supranükleer bir Golgi cisimciği ve bir dizi yoğun lizozom içerir. Süt üretiminde hem merokrin hem de apokrin salgıya katılır. Salgı durumuna bağlı olarak, apikal sitoplazmada büyük lipid damlacıkları ve salgı kesecikleri bulunabilir (Ross, 2016).

#### 4.1.2 Meme bezi gelişimi

Meme bezi gelişiminin üç ana aşaması vardır: embriyonik, ergenlik ve üreme dönemi. Embriyogenez sırasında memeli bezi belirginleşmesi ve şekillenmesini sağlayan kesin süreçler

henüz belirsizdir, ancak mezenkimal hücrelere yönelik indüktif sinyaller, meme bezi hücrelerini oluşturmak için yerel göç veya agregasyonu yönlendirebilir (Fu ve ark., 2020). Ergenlik dönemine kadar hem dişi hem de erkek meme bezleri benzer şekilde gelişir. Erkeklerde ergenlik başlangıcında testosteron, mezenkimal hücreler üzerinde etki ederek meme bezlerinin daha fazla büyümesini engeller. Aynı zamanda, kadınlarda ise meme bezleri, östrojen ve progesteron hormonlarının etkisi altında daha fazla gelişir. Östrojen, mezenkimal hücrelerin daha fazla gelişmesini uyarır. Meme bezleri, interlobüler yağ dokusunun büyümesi nedeniyle daha da büyür. Kanallar, genişleyen bağ doku stromasına doğru uzar ve dallanır. Epitelyal hücrelerin çoğalması, epitelyum ile özelleşmiş intralobüler hormon duyarlı gevşek bağ dokusu stroması arasındaki etkileşimlerle kontrol edilir. Yetişkinlik dönemine gelindiğinde, meme bezinin tam kanal yapısı oluşmuştur. Meme bezleri, gebelik dönemine kadar pasif bir durumda kalır. Gebelik sırasında, meme bezleri morfolojik ve fonksiyonel olgunluğunu tamamlar. Bu, başlangıçta korpus luteumdan ve daha sonra plasentadan salgılanan östrojen ve progesteron, hipofiz bezinden salgılanan prolaktin ve adrenal korteksten üretilen gonadokortikoidler tarafından uyarılır. Gebeliğin sonunda, epitelyal hücrelerde salgı vezikülleri bulunur, ancak yüksek progesteron seviyeleri nedeniyle süt üretimi inhibe edilir. Süt salgılanmasının gerçek başlangıcı doğumdan hemen sonra, adenohipofiz tarafından salgılanan prolaktin tarafından indüklenir. Sütün memeden atılması, nörohipofiz tarafından salgılanan oksitosin tarafından uyarılır. Menopozdaki hormonal ortam değişikliğiyle birlikte, meme bezinin glandüler bileşeni geriler ve yağ ve bağ doku ile değiştirilir. (Ross, 2016) (Şekil 3).



**Şekil 3.** Doğum sonrası meme bezi gelişimi şeması (Fu ve ark., 2020).

#### 4.1.3 Laktasyon evreleri

Laktogenez, süt salgılama yeteneğinin gelişme sürecidir ve alveolar hücrelerin olgunlaşmasını içerir. İki aşamada gerçekleşir: salgı başlangıcı ve salgı aktivasyonu.

I. Aşama olan laktogenez (salgı başlangıcı), gebeliğin ikinci yarısında gerçekleşir (Pillay ve Davis, 2021). Meme bezinin kazein ve laktoz gibi belirli süt bileşenlerini salgılamak için yeterince farklılaşmasını sağlar. Artan laktos ve  $\alpha$ -laktalbumin plazma konsantrasyonları ölçülerek tespit edilebilir (Arthur ve ark., 1991). Laktogenez I. aşaması tamamlandığında meme bezleri süt salgılamak için yeterince farklılaşmıştır (Kuhn, 1977). Plasenta, yüksek miktarda progesteron sağlar ve bu salgılanan progesteron yeterince farklılaşan meme bezlerinin daha da farklılaşmasını engeller (Pillay ve Davis, 2021). Gebeliği devam eden kadınların meme bezlerinden kolostrum adı verilen salgı ürünü alınabilir (Allen ve ark., 1991; Kulski ve Hartmann, 1981). Kolostrum içerisinde yüksek konsantrasyonda sodyum ve klorür bulunurken, immünglobülinler ve laktoferrin gibi koruyucu maddeler de içerir (Neville ve ark., 2001). Bu dönemde kolostrumda kazein bulunmaz (Chen ve ark., 1998; Patton ve ark., 1986), laktoz konsantrasyonu ise düşüktür (Allen ve ark., 1991).

II. Aşama olan laktogenez (salgı aktivasyonu), doğumdan sonra bol miktarda süt üretimiyle başlar. Doğumda plasantanın çıkarılmasıyla progesteronun ilk 4 gün içinde yaklaşık 10 kat azalması (Chen ve ark., 1998; Neville ve ark., 1988), prolaktin, kortizol ve insülin seviyelerinin artışı bu aşamayı uyarır (Pillay ve Davis, 2021). Progesteronun yüksek oranda azalması meme epitelinde programlanmış bir dönüşümü tetikler, bu da doğumdan itibaren 5 gün boyunca yenidoğana günlük 500-750 ml arasında süt transferinin gerçekleşmesini sağlar (Chen ve ark., 1998; Neville ve ark., 1988).

Bu dönüşüm, epitel hücreleri arasındaki paraselüler yolun geçirgenliğindeki değişiklikler dahil olmak üzere çeşitli işlemlerde uyumlu bir değişiklik gerektirir; immünoglobulinler, laktoferrin ve kompleks karbonhidratlar gibi koruyucu maddelerin salgılanmasındaki değişiklikler, ve tüm süt bileşenlerinin artan salgılanma oranı (Neville ve ark., 2001). Genellikle doğum sonrası 2. veya 3. günlerde çoğu kadın meme şişmesi ve bol miktarda süt üretimi yaşar. Bu durumda laktogenezin II. aşaması, bol miktarda süt örneklerinin kolay elde edilebilmesi sayesinde, süt yapısındaki değişikliklerle izlenebilir (Neville ve ark., 1991). İlk 4 gün postpartum ve doğumdan sonraki 4 ila 10 gün arasındaki süreçte meme salgısı ürününü tanımlamak için geleneksel olarak kolostrum ve geçiş sütü terimleri kullanılmaktadır, ancak bu terimler süt bileşimindeki kesin zamansal değişiklikleri tanımlamaz ve yararlı ayrımlar değildir. Bunun yerine, doğum sonrası süt bileşiminde meydana gelen değişiklikler, doğumun ilk 4 gününde

hızlı değişikliklerin ardından laktasyon süresince farklı bileşenlerde yavaş değişikliklerin meydana geldiği bir süreklilik olarak değerlendirilmelidir (Neville ve ark., 2001).

#### 4.2 Anne Sütü

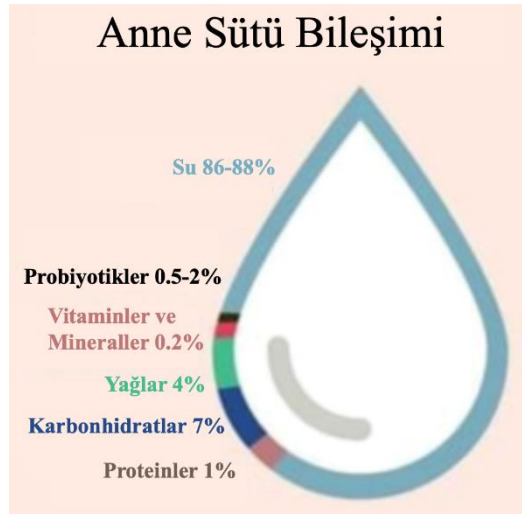
Anne sütü doğumla birlikte bebeklerin büyümesi ve gelişmesi için önemlidir (Agostoni ve ark., 2009). Bu nedenle Dünya Sağlık Örgütü ve Birleşmiş Milletler Çocuklara Yardım Fonu, yeni doğan bebekler için anne sütünü ideal besin olarak tanımlayıp ilk altı ay sadece anne sütü ile beslenmesini önermektedirler (Organization, 2013). Amerikan Pediatri Akademisi en az 12 ay süreyle emzirmeyi önerirken (Eidelman, 2012), Beslenme ve Diyetetik Akademisi sadece anne sütü ile ilk altı ay ve altı aydan sonra en az 12 aya kadar tamamlayıcı gıdalarla birlikte emzirmenin ideal beslenme şekli olduğunu tanımlamıştır (Lessen ve Kavanagh, 2015). Kapsamlı veriler, sadece anne sütü ile beslenen çocukların, akut veya kronik pek çok hastalıkta daha düşük bir görülme sıklığına sahip olduğunu göstermektedir. Bunlar arasında, orta kulak iltihabı, akut ishal, alt solunum yolu enfeksiyonları, ani bebek ölüm sendromu, inflamatuvar bağırsak hastalığı, juvenil lösemi, diyabet, obezite, astım ve atopik dermatit bulunmaktadır (Agostoni ve ark., 2009; Eidelman, 2012). Anne sütünün sindirim sistemi, bağışıklık sistemi ve beyin gelişimini değiştiren çeşitli makro ve mikro besin maddeleri, immün proteinler, hormonlar ve büyüme/farklılaşma faktörleri gibi biyoaktif maddeler, mikroRNA'lar, mikrobiyota ve kök hücreler içerdiği çok sayıda çalışma tarafından desteklenmektedir (Ballard ve Morrow, 2013; Geddes ve ark., 2021; Kim ve Yi, 2020; Savino ve ark., 2013) (Tablo 1, 2).

Anne sütünde emzirme dönemine, ırka, emziren annenin diyetine ve bölgeye özgü çevresel kimyasallara göre değişimler gösterilmektedir (Kim ve ark., 2019; Martin ve ark., 2016). Doğumdan sonra salgılanan ilk süte kolostrum denir ve hacim, görünüm ve bileşim açısından farklıdır. Kolostrum, yaklaşık doğumdan sonraki ilk 5 gün boyunca düşük miktarlarda üretilen çok değerli bir besindir. Doğum sonrasındaki ilk günlerde düşük miktarlarda üretilen kolostrum, sekretuar IgA, laktoferrin, lökositler gibi immünolojik bileşenler ve epidermal büyüme faktörü gibi gelişimsel faktörler açısından zengindir ve olgun anne sütündeki yağ içeriğinden daha az yağ içermektedir (Castellote ve ark., 2011; Pang ve Hartmann, 2007). Doğumdan sonraki 6-15 gün arasında geçiş dönemi sütü üretilir ve hızla büyüyen bebeğin beslenme ve gelişimsel ihtiyaçlarını desteklemek için "artırılmış" süt üretimi dönemini temsil etmektedir. Bu dönemde, süt daha yüksek seviyelerde laktoz, yağ, su bazlı vitaminler ve daha az miktarda immünolojik bileşenlerle üretilir. Anneler arasındaki en yüksek bileşim değişkenliği geçiş sütünde gözlemlenmektedir. Anne sütü, doğumdan sonraki 15. günden

itibaren neredeyse olgun ve doğumdan 4-6 hafta sonra tamamen olgun olarak kabul edilmektedir. (Fields ve Demerath, 2012).

#### 4.2.1 Anne sütü bileşimindeki makro besin maddeleri

Elde edilen anne sütü, su hariç (%87-88) en temel bileşenleri olan karbonhidratlar, proteinler ve yağlar açısından zengindir (Kim ve Yi, 2020) (Şekil 4, Tablo 1). Bu makro besinler, bebek büyümesi ve gelişimi için gerekli olan temel besin desteğini sağlar ve 100 mL'de 65-70 kalori enerji sağlar. Anne sütünün bileşenleri, laktasyon dönemlerine ve tek bir beslenme sürecinde emzirme seanslarına göre dinamik olarak değişir ve laktasyonun durumuna veya çocuğun büyümesine göre çeşitli ihtiyaçlar için uygun hale gelmektedir (Martin ve ark., 2016).



Şekil 4. Anne sütü bileşenleri (Kim ve Yi, 2020).

Karbonhidrat, insan sütünün yaklaşık %7'sini (60-70 g/L) oluşturur ve toplam kalori rezervinin %40'ını oluşturur. İnsan sütündeki ana karbonhidrat laktottur ve laktaz-flozin hidrolaz tarafından monosakkaritler (glukoz ve galaktoz) halinde ayrıştırılır ve emilir. Laktoz, insan beyninin yüksek enerji gereksinimlerini karşılar ve bebek kilo alımıyla pozitif ilişki gösterir. Ayrıca oligosakkaritler, mineraller ve kalsiyum gibi biyoaktif bileşenlerin emilimini ve bağlanmasını da kolaylaştırır ve insan sütünün osmolaritesine büyük katkı sağlar. İnsan sütündeki laktoz konsantrasyonu, kolostrumdan geçiş sütüne ve olgun sütüne kadar hafifçe artar ve olgun sütte nispeten sabit bir konsantrasyonda kalır, böylece insan sütü sabit osmotik basıncı korur (Eriksen ve ark., 2018; Hester ve ark., 2012; Mosca ve Gianni, 2017).

Anne sütü proteini whey, kazein ve çeşitli peptitlerin karışımından oluşan ve bebek büyümesi ve gelişmesi için zorunlu olan önemli amino asitleri, ayrıca birçok işlev için hayati öneme sahip

biyoaktif protein ve peptitleri sağlar. Kazeinler, midede peynir veya pıhtı şeklinde var olan miseller halinde bulunur ve anne sütündeki kalsiyum ve fosfatın ana kaynağıdır. Whey protein ise çözelti halinde bulunur. Alfa-laktalbumin, beta-kazein, folat bağlayıcı protein, haptokorin, safra tuzu uyarılı lipaz, amilaz, alfa-1 antitripsin ve laktotransferrin gibi bazı proteinler, diğer besin maddelerinin sindirimi ve kullanımına yardımcı olurlar (De Luca ve ark., 2016; Mosca ve Gianni, 2017). Protein, anne sütünün yaklaşık %1'ini (8-10 g/L) oluşturur ve doğumun başlangıcında 14-16 g/L gibi yüksek miktarda bulunurken, 3-4 ayda 8-10 g/L'ye, 6 aydan sonra ise 7-8 g/L'ye düşer (Kim ve Yi, 2020).

Bebeklerin besin kaynağının neredeyse %50'sini oluşturan yağ, anne sütündeki ikinci en yaygın makro besindir ve bebek büyümesi ve merkezi sinir sistemi gelişimi için önemlidir (Delplanque ve ark., 2015). Genel olarak, anne sütü %3,5-4,5 yağ içerir, bunun %95-98'i trigliserid formundadır. Yağ içeriği, beslenme alışkanlıklarındaki farklılıklar, anne diyeti, hamilelik sırasındaki kilo değişimi ve son emzirme zamanı dahil olmak üzere pek çok faktöre bağlıdır. Kolostrum, 15-20 g/L yağ içerir, ancak emzirme süresiyle artarak olgun sütte 40 g/L'ye kadar ulaşır (Saarela ve ark., 2005). Anne sütü aracılığıyla sağlanan ve az miktarda bulunan uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri bebeklerin retina ve beyin korteks gelişimini etkiler (Mosca ve Gianni, 2017). Uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinin sütteki bulunma oranı bebek vücut yağ yüzdesi ile pozitif bir ilişki gösterir ve bebek adipositesini etkiler (Delgado-Noguera ve ark., 2015). Anne sütündeki kısa zincirli yağ asitleri, bebek büyümesi için önemli kalori kaynaklarından biridir ve gastrointestinal olgunlaşmada önemli rol oynar (Peng ve ark., 2009).

#### **4.2.2 Anne sütü bileşimindeki mikro besin maddeleri**

Anne sütü, bebek beslenmesi için normatif standartta makro besin sağlar, ancak, vitaminler ve mineraller gibi birçok mikro besin, annenin diyetine ve vücut depolarına bağlı olarak değişmektedir (Tablo 1), (Greer, 2001). Anne sütü, bebek büyümesini desteklemek için çoğu vitamini yeterli miktarda içerirmesine rağmen D ve K vitaminleri açısından yetersizdir. Bu yüzden hamilelikte ve emzirme esnasında takviye olarak alınmaları önerilmektedir (Guo, 2014). Yağda çözünen vitaminler, süt-yağ globül membranı içinde bulunurken, vitamin D whey proteine bağlı bulunmaktadır. İnsan sütü, vitamin A içeriğinde bulunan retinol esterleri ile zenginleştirilmiştir ve kriptoksantin,  $\alpha$  ve  $\beta$ -karotenoidler ve karotenoid içerir. A vitamini içeriği anne diyetine duyarlıdır ve kolostrumdan olgun süte doğru azalır. Anne sütünde vitamin E'nin alfa-tokoferol formu bol miktarda bulunur ve olgun sütte kolostruma göre daha yüksek miktardadır. Diğer önemli vitamin sınıfı ise suda çözünen vitaminlerdir. Bunlar C vitamini ile tiamin (B1), riboflavin (B2), niyasin (B3), piridoksin (B6), biyotin, pantotenik asit, folik asit ve

siyanokobalamin (B12) gibi sekiz B vitaminidir. Suda çözünen vitaminlerin konsantrasyonu, annenin diyetine ve vitamin takviyesi kullanımına bağlıdır. C vitamini konsantrasyonu, kolostrumdan olgun süte kadar büyük ölçüde değişmez (Krachler ve ark., 1998; Monaco ve ark., 2015).

Anne sütü içerisindeki mineral ve iz element konsantrasyonları, laktasyon süreci boyunca değişiklik gösterir ve kolostrumda olgun süttten daha yüksek seviyededir. Mineral ve iz elementlerin taşınması sıkı bir şekilde düzenlenir ve genellikle annenin serum mineral konsantrasyonu veya diyet alımı ile anne sütü içeriği arasında bir ilişki bulunmamaktadır. Ancak selenyum, flor ve iyot gibi bazı özel durumlarda ilişki gözlemlenebilir. Anne sütü içerisindeki birçok mineral proteinlere bağlıdır, bu da onların biyoyararlanılabilirliklerini arttırmaktadır. Anne sütünün başlıca makromineral bileşenleri kalsiyum, fosfor, magnezyum, sodyum, potasyum ve kloriddir. Kalsiyumun çoğu whey proteininde bulunurken, %15'i kazein misellerinde fosfor ile bağlıdır. Kalsiyum ve fosfor arasındaki bağlantı yüksek kalsiyum biyoyararlanabilirliğine yol açar. Anne sütündeki iz elementler arasında demir, çinko, manganez, selenyum, bakır, krom, bor, flor ve iyot bulunur. Laktoferrin ve C vitamini, bu elementlerin anne sütünden alınmasını kolaylaştırabilir. Anne sütündeki demir konsantrasyonu düşüktür ama yüksek demir biyoyararlanabilirliği sayesinde ilk altı ay demir eksikliği ve kansızlık için koruyucu düzeydedir. Çinko ve manganez de laktasyonun ilk günlerinden sonra azalmaktadır. Ancak, selenyum, flor ve iyot gibi mineraller sütte, annenin gıda alımıyla ilişkilidir ve coğrafi konuma ve mineral açısından zengin gıdaların bulunabilirliğine bağlı olarak farklılık göstermektedir (Krachler ve ark., 1998; Monaco ve ark., 2015).

**Tablo 1.** Kolostrum ve olgun sütteki makro ve mikro elementlerin miktarı (Kim ve Yi, 2020).

| Bileşenler ( $I^{-1}$ )             | Kolostrum | Olgun Süt |
|-------------------------------------|-----------|-----------|
| <b>Enerji (kcal)</b>                | 535       | 578       |
| <b>Toplam Karbonhidrat (g)</b>      | 50-70     | 70-84     |
| Laktoz (g)                          | 30-50     | 67-71     |
| Oligosakkaridler (g)                | 22-24     | 5-16      |
| Glikoz (g)                          | 0.2-1.0   | 0.2-0.3   |
| <b>Toplam Yağ (g)</b>               | 15-20     | 35-47     |
| Trigliserid (g)                     | 14.5-19.5 | 34-48     |
| Yağ Asitleri (g)                    | 13-17     | 30-41     |
| Kolesterol (g)                      | 0.2-0.3   | 0.1-0.2   |
| Kolesterol Esteri (g)               | 0.05      | 0.01      |
| Fosfolipidler ve sfingolipidler (g) | N.R.      | 0.25-0.30 |
| <b>Toplam Nitrojen (g)</b>          | 3.0       | 1.91      |
| Nonprotein Nitrojen (g)             | 0.5       | 0.46      |
| Protein Nitrojen (g)                | 2.5       | 1.44      |
| <b>Toplam Protein (g)</b>           | 15-20     | 8-12      |
| Kazein (g)                          | 3.8       | 3-5       |

|                                                    |          |           |
|----------------------------------------------------|----------|-----------|
| •β-Kazein (g)                                      | 2.6      | 3-4       |
| •κ-Kazein (g)                                      | 1.2      | 1-2       |
| Whey Proteinleri (g)                               | 11-15    | 5-7       |
| •α-Laktalbumin (g)                                 | 3.7      | 2-3       |
| •IgM (g)                                           | 0.02     | 0.01      |
| •IgG (g)                                           | 0.01     | 0.05      |
| •Laktoferrin (g)                                   | 3.5      | 1-3       |
| •Lizozim (g)                                       | 0.1-0.2  | 0.1       |
| •Sekretuar IgA (g)                                 | 2.0      | 0.5-1.0   |
| •Serum Albumin                                     | 0.4      | 0.3       |
| <b>Yağda Çözünebilen Vitaminler</b>                |          |           |
| <b>Vitamin A ve Karotenoidler</b>                  |          |           |
| Retinol Esterleri (μmol)                           | 1.45-2.0 | 1.21      |
| Toplam Karotenoidler (μmol)                        | 5.36     | 1.8-3.2   |
| •α-Karoten (μmol)                                  | 0.18     | 0.02-0.03 |
| •β-Karoten (μmol)                                  | 0.43     | 0.04-0.07 |
| •β- kriptoksantin (μmol)                           | 0.22     | 0.03-0.06 |
| •Lutein/zeaksantin (μmol)                          | 0.2      | 0.05-0.9  |
| •Likopen (μmol)                                    | 0.5      | 0.02-0.06 |
| <b>Vitamin D<sub>3</sub> (kolekalsiferol) (μg)</b> | 0.1-0.3  | 0.5-2.0   |
| <b>Vitamin E</b>                                   |          |           |
| α-Tokoferol (mg)                                   | 15       | 3-5       |
| γ-Tokoferol (mg)                                   | 1.5      | 1.0       |
| <b>Vitamin K</b>                                   |          |           |
| Filokinon, K <sub>1</sub> (μg)                     | 0.64-3.7 | 0.86-3.8  |
| Menakinon, K <sub>2</sub> (μg)                     | 1.8-2.6  | 1.2-2.0   |
| <b>Suda Çözünebilen Vitaminler</b>                 |          |           |
| Askorbik Asit (mg)                                 | 80-105   | 40-105    |
| Biotin (μg)                                        | 4.5      | 5-9       |
| Vitamin B <sub>12</sub> (μg)                       | 1.2-1.5  | 0.5-0.8   |
| Folat (μg)                                         | 5-10     | 50-100    |
| Niasin (mg)                                        | 0.5      | 1.5-2.0   |
| Pantotenik Asit (mg)                               | 2.5      | 2.0-2.4   |
| Piridoksin, B <sub>6</sub> (μg)                    | 20-45    | 90-300    |
| Ribofilavin, B <sub>2</sub> (μg)                   | 500      | 300-400   |
| Tiamin, B <sub>1</sub> (μg)                        | 20       | 160-210   |
| <b>Makromineraler</b>                              |          |           |
| Kalsiyum (mg)                                      | 250      | 200-250   |
| Klorür (mg)                                        | 600-850  | 400-450   |
| Magnezyum (mg)                                     | 30-35    | 30-35     |
| Fosfor (mg)                                        | 120-160  | 120-140   |
| Potasyum (mg)                                      | 600-650  | 400-550   |
| Sodyum (mg)                                        | 300-450  | 150-250   |
| <b>Mikromineraler</b>                              |          |           |
| Bor (μg)                                           | 30       | 28        |
| Krom (μg)                                          | 17       | 25-75     |
| Bakır (mg)                                         | 0.5-0.8  | 0.1-0.3   |
| Florür (μg)                                        | 5-20     | 4-15      |
| İyot (μg)                                          | 40-55    | 140-150   |
| Demir (mg)                                         | 0.5-1.0  | 0.3-0.75  |
| Manganez (μg)                                      | 5-12     | 3-4       |
| Selenyum (μg)                                      | 25-33    | 10-25     |
| Çinko (mg)                                         | 5-12     | 1-3       |

#### 4.2.3 Anne sütü bileşimindeki biyoaktif maddeler

Biyoaktif maddeler, biyolojik süreçler veya maddeler üzerinde etkiler gösteren ve böylece vücut fonksiyonunu veya durumunu ve nihayetinde sağlığı etkileyen elementler olarak tanımlanır (Schrezenmeir ve ark., 2000). İnsan sütü, bu süreçleri düzenleyen büyüme faktörleri, hormonlar ve immünolojik faktörler gibi birkaç temel biyoaktif bileşen içermektedir (Tablo 2). Bazı biyoaktif moleküller memenin epitelyumu tarafından üretilir ve salgılanırken, bazıları anne sütü içerisindeki hücreler tarafından üretilir ve diğerleri maternal serumdan gelir ve reseptör aracılığıyla memenin epitelyumundan geçebilirler (Vass ve ark., 2019). Bebeğin ihtiyaçlarına yanıt olarak, bu biyoaktif bileşenlerin varlığı, yokluğu ve miktarı, prematüre ve zamanında doğumda veya emzirme sürecinde değişebilir. Bu bileşenlerin bağışıklık fonksiyonunu, enfeksiyona yanıtı, bağırsak bakteri kolonizasyonunu ve gelişimi düzenlediği düşünülmektedir (Cheng ve ark., 2021).

**Tablo 2.** Anne sütünde bulunan biyoaktif bileşenler (Cheng ve ark., 2021).

| Anne Sütünde Bulunan Biyoaktif Bileşenler  |                             |
|--------------------------------------------|-----------------------------|
| Epidermal Büyüme Faktörü                   | İmmunoglobulinler           |
| Nöronal Büyüme Faktörü                     | Hormonlar                   |
| •Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör          | Anne Sütü Oligosakkaridleri |
| •Hücre Hattı Kaynaklı Nörotrofik Faktör    | Beyaz Kan Hücreleri         |
| •Siliyer Nörotrofik Faktör, S100B Proteini | Peptidler                   |
| İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Üst Ailesi  | Sitokinler                  |
| Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü         | Kemokinler                  |
| Eritropoietin                              | miRNA                       |
| Adiponektin                                |                             |

İnsan sütü, sindirim sistemi, damar sistemi, sinir sistemi ve endokrin sistem üzerinde geniş etkilere sahip birçok büyüme faktörü içermektedir. Epidermal büyüme faktörü (EGF) bağırsak ve mukoza olgunlaşması için önemlidir ve sağlam bir bağırsak bariyer fonksiyonunun gelişimine katkı sağlayıp hem anne sütünde hem de amniyotik sıvıda bulunur (Wagner ve ark., 2008). EGF' nin anne sütündeki konsantrasyonu, laktasyon süresince azalmaktadır. Çok erken doğan bebeklerin annelerinin sütündeki EGF konsantrasyonu, tam zamanında doğan bebeklerin annelerinin sütündeki konsantrasyona göre %50-80 daha yüksektir ve bu, prematüre bebeklerde mukoza olgunlaşmasının iyileşmesiyle doğrudan ilişkilidir (Dvorak, 2010; Dvorak ve ark., 2003). İnsülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I), IGF-II ve IGF bağlayıcı proteinler (IGFBP) de insan sütünde bulunur ve oksidatif stres kaynaklı bağırsak hasarını önlemede rol oynamaktadırlar (Blum ve Baumrucker, 2002). IGF seviyeleri kolostrumda en yüksek

düzydedir ve laktasyon süresi boyunca azalır (Hoeflich ve Meyer, 2017). Ayrıca, lenfatik damar gelişimi için önemli olan vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) de anne sütünde bulunur. VEGF'nin konsantrasyonu kolostrumda en yüksek seviyededir (Secker ve Harvey, 2015). Yenidoğan bağırsağının olgunlaşmamışlığı, enteral sinir sisteminin de olgunlaşmamış olmasını gerektirir ve bu olgunlaşma için beyinden türeyen nörotrofik faktör (BDNF) ve gliyal hücre kökenli nörotrofik faktör (GDNF) gerekmektedir (Rodrigues ve ark., 2011). BDNF, prematüre bağırsakta bozulan peristaltizmi artırabilir (Boesmans ve ark., 2008). BDNF, GDNF ve ilgili bir protein olan silier nörotrofik faktör (CNTF), doğumdan sonra 90 güne kadar insan sütünde tespit edilmektedir (Fichter ve ark., 2011; Li ve ark., 2011).

Eritropoietin (Epo) de anne sütünde bulunmaktadır ve konsantrasyonu laktasyon süresince artar. İlk 1-2 ayda 4-5 mU/mL aralığındayken, laktasyon süresi boyunca 100-150 mU/mL'ye yükselmektedir (Kling ve ark., 1998; Semba ve Juul, 2002). Epo bağırsak sıkı bağlantılarını artırarak bariyer fonksiyonunun ve bağırsak gelişiminin sağlanmasına katkıda bulunur, ayrıca nekrotizan enterokolitin önlenmesiyle ilişkilidir (Shiou ve ark., 2011). Adiponektin, anne sütünde büyük miktar bulunur ve bağırsak bariyerini geçerek metabolizmayı düzenler ve enflamasyonu inhibe eder (Newburg ve ark., 2010). Kalsitonin ve öncülü prokalsitonin, sütte büyük miktarlarda bulunmaktadır (Struck ve ark., 2002). Enterik sinir hücreleri, gebeliğin son dönemlerinden başlayarak bebeklik dönemine kadar kalsitonin reseptörü immünoreaktivitesini ifade eder (Wookey ve ark., 2012). Anne sütünde etkili miktarlarda bulunan leptin, resistin ve ghrelin gibi diğer metabolizmayı düzenleyen hormonlar enerji dönüşümünü, vücut kompozisyonunu ve iştah kontrolünü düzenlemede önemli bir rol almaktadır (Savino ve Liguori, 2008).

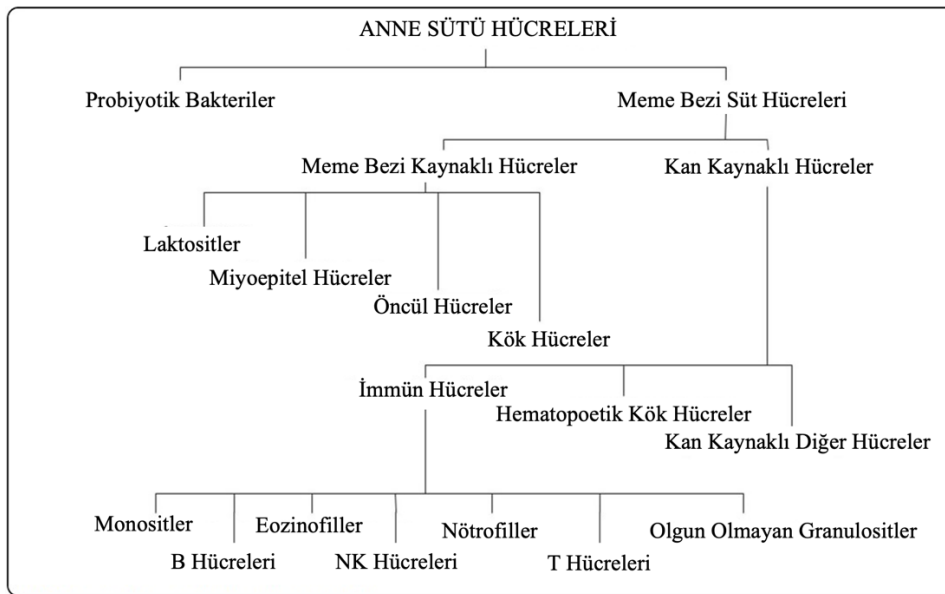
İmmüoglobülinler ve sitokinler anne sütünde bulunan önemli biyoaktif maddelerdendir. Sekretuar IgA (sIgA), anne sütünde en bol miktarda bulunan ve biyolojik olarak aktif olan immüoglobülinidir. sIgA, mikrobiyal antijenlere bağlanarak patojenlerin epitelyal hücrelere yapışmasını engeller, fagositozu artırır ve yerel bağışıklık fonksiyonunu düzenler. IgG ve IgM ise anne sütünde çok daha az miktarlarda bulunur. İmmün ve sindirim sistemlerinin gelişimini uyarıcı şekilde etkileyebilen birçok sitokin anne sütünde bulunur. Bunlar IL-1 $\beta$ , 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13, TGF- $\beta$  ve TNF- $\alpha$  iken, sitokinlerin meme bezinde üretilmektedir (Monaco ve ark., 2015).

Anne sütündeki en önemli biyoaktif maddelerden biri insan sütü oligosakkaritleri (İSO) yenidoğan bağışıklığının oluşumunda önemli rol oynamaktadır. İSO'lar, laktozdan sonra en yaygın bulunan karbonhidratlardır ve insan sütündeki en yaygın üçüncü bileşendir (Plaza-Díaz

ve ark., 2018). Doğumdan hemen sonra çeşitli enfeksiyonlara karşı bir bağışıklık sistemi oluşturmak, bebeklerin sindirim sisteminin steril olması nedeniyle önemlidir. İSO'lar, neonatal ince bağırsakta hidrolize dirençlidir, bu nedenle emilmezler ve kalın bağırsağa büyük ölçüde bozulmadan ulaşabilmektedirler (Thurl ve ark., 2017). İSO'lar, prebiyotikler ve metabolik substratlar olarak görev yaparlar, faydalı bağırsak bakterilerinin ve konak savunmasının büyümesini desteklerler (Jantscher-Krenn ve ark., 2012).

#### 4.3 Anne Sütünde Bulunan Hücre Popülasyonları

Anne sütü farklı hücre tiplerini içeren biyolojik bir sıvıdır. Anne sütünün hücresel bileşimi dinamikdir ve farklı hücre tiplerinin oranı laktasyon dönemi, sağlık durumu ve bebeğin beslenmesi gibi birçok faktör tarafından değişmektedir. Kolostrumda yaklaşık 1 milyon hücre/mL hücre bulunurken, doğumdan sonraki haftalarda bu sayı yaklaşık olarak 1000 hücre/mL'ye düşmektedir (Molès ve ark., 2018). Anne sütü çok sayıda yararlı probiyotik bakteriler ile birlikte süt hücresi olarak isimlendirilen farklı kökenli heterojenik hücre popülasyonu içermektedir. Süt hücreleri *meme bezi kaynaklı* ve *kan kaynaklı* olacak şekilde sınıflandırılmaktadır. Kan kaynaklı hücre popülasyonu bebeğin bağışıklık sistemini destekleyen çeşitli immün hücreler, hematopoetik kök hücreler ve muhtemel kan kaynaklı diğer hücrelerden oluşmaktadır. Meme bezi kaynaklı hücre popülasyonu ise anne sütünün üretiminde önemli rol oynayan meme bezi epiteli kökenli hücreleri (laktositler ve mioepitelyal hücreler) ve farklı tipte öncül/kök hücreleri içermektedir (Şekil 5), (Witkowska-Zimny ve Kaminska-El-Hassan, 2017).



**Şekil 5.** Anne sütünde bulunan hücre tipleri (Witkowska-Zimny ve Kaminska-El-Hassan, 2017).

### **4.3.1 Kan kaynaklı hücreler**

#### **4.3.1.1 İmmün hücreler**

Anne sütündeki immün hücreler, yeni doğanın bağışıklık sistemi gelişirken lümen içindeki patojenlere karşı koruma sağlamaktadır (Cacho ve Lawrence, 2017). Anne sütü lökositlerinin bebeğin sindirim sistemi geçişini sağladığını ve ardından sindirim sistemi üzerinden sistemik dolaşım aracılığıyla kan, lenf düğümleri, dalak ve karaciğer gibi uzak bölgelere taşınmaktadır (Cabinian ve ark., 2016). Aynı zamanda, fagositoz yoluyla patojenlere karşı savaşarak ve biyoaktif bileşenler üreterek yeni doğan bağışıklık sisteminin gelişimine yardımcı olarak veya bebeğin sindirim sistemi mikroortamını değiştirerek aktif bağışıklık sağladıkları bilinmektedir (Hanson, 2000).

İnsan kolostrumunda baskın lökositler makrofajlardır (%40-50), onları polimorfonükleer nötrofiller (%40-50) ve lenfositler (%5-10) takip eder (Hassiotou ve Geddes, 2015). Lenfositlerin çoğunluğunu T hücreleri oluşturur (%80'den fazla) ve B hücreleri daha azdır (Vieira Borba ve ark., 2018).

Laktasyon döneminde, sütteki lökosit kompozisyonunda önemli değişiklikler gerçekleşmektedir. Kolostrum yaklaşık 146.000 hücre/ml içerirken, geçiş döneminde (doğumdan sonraki 8-12. gün) ve olgun sütte (doğumdan sonraki 26-30. gün) sırasıyla 27.500 ve 23.650 hücre/ml'ye düşmektedir (Trend ve ark., 2015). Tanımlanan hücreler arasında, en yaygın lökositler miyeloid öncü hücreler (%9-20), nötrofiller (%12-27), olgunlaşmamış granülositler (%8-17) ve sitotoksik olmayan T hücreleridir (%6-7). Laktasyonun ilerlemesi ile major CD45<sup>+</sup> lökosit konsantrasyonunu, eozinofilleri, miyeloid ve B hücre öncülerini ve CD16<sup>-</sup> monositleri azalmaktadır. Nötrofillerin ve olgunlaşmamış granülositler ise kolostruma kıyasla olgun sütte önemli ölçüde artmaktadır. Hem emziren annenin enfeksiyon geçirdiği durumlarda (Hassiotou, Hepworth, ve ark., 2013) hem de bebeğin enfeksiyon geçirdiği durumlarda (Riskin ve ark., 2012) anne sütü lökositlerinde artış olmaktadır.

#### **4.3.1.2 Hematopoetik kök hücreler**

Kan kökenli lökositlere ek olarak, anne sütünde maternal dolaşımdan köken alan hematopoetik kök hücrelerin varlığı gösterilmektedir (Indumathi ve ark., 2013). İnsan kolostrumunda CD33, CD45 ve CD117 yüzey işaretleyicilerini içeren hematopoetik kök hücreler bulunmaktadır (Goudarzi ve ark., 2020). Bu hücrelerin özellikleri, rolü, maternal kandan anne sütüne transfer mekanizması, bebeğin immün sisteminin gelişimine katkıda bulunup bulunmadığı ve hangi koşullarda etkili oldukları bilinmemektedir.

### 4.3.2 Meme bezi kaynaklı hücreler

İnsan anne sütü meme bezi kaynaklı, laktositler (süt salgılayan hücreler), miyoepitelyal hücreler (memenin kanalları ve alveollerinden) ve progenitör/kök hücrelerin hiyerarşisini içeren heterojen hücre popülasyonlarını içermektedir (Hassiotou ve ark., 2014).

#### 4.3.2.1 Epitelyal hücreler

Epitelyal kökenli olan lüminal hücreler, miyoepitelyal hücreler ve laktositler sağlıklı koşullarda insan anne sütünde bulunan immün olmayan hücre tiplerinin yaklaşık %98'ini oluştururlar (Hassiotou ve ark., 2013). Bu hücreler meme epitelyal hücrelerinin farklılaşma belirteçleri olan sitokeratin 5, 14 ve 18 membran yüzey antijenini ifade ederler. Miyoepitelyal hücreler, alveollerin etrafını saran düz kas liflerini oluşturur ve kasılması ile alveollerden sütün süt kanallarına atılmasını sağlar. Lüminal hücreler epitelyal hücre adezyon molekülü (EPCAM) ifade ederken, miyoepitelyal hücreler düz kas aktin (SMA) ve sitokeratin 14 (CK14) ifade eder. Laktositler, insan meme bezinin alveollerini döşerler ve sütün sentezinden ve alveolar lümene salgılanmasından sorumludurlar. Laktositler sitokeratin 18 (CK18) eksprese eder. Aynı zamanda sentezledikleri  $\alpha$ -laktalbumin ve  $\beta$ -kazein gibi süt proteinleri laktositlere özgü işaretleyici olarak tanımlanır (Twigger ve ark., 2015). Hem lüminal hem de miyoepitelyal hücre tipleri  $\alpha 6$  integrin (CD49f) ve sitokeratin 5 (CK5) eksprese etmektedirler (Patki ve ark., 2010).

#### 4.3.2.2 Kök hücreler

Anne sütünde kök hücrelerin varlığı ispat edilmiştir ve bu hücre popülasyonu genel olarak insan anne sütü kök hücreleri (hBmSC) olarak adlandırılmaktadır (Cregan ve ark., 2007). Anne sütünden elde edilen kök hücrelerin nöral hücre hatlarına farklılaşma yeteneğine sahiptirler ve embriyonik ve mezenkimal kök hücrelere benzerlik göstermektedirler. Anne sütünden elde edilen hücre popülasyonunun *in vitro* olarak nörojenik ortamda farklılaştırılması ile nöron belirteci olan  $\beta$ -tubulin ifade eden nöronlara, O4 belirteci ifade eden oligodendrositler ve GFAP belirteci ifade eden astrositlere farklılaşmaktadırlar (Hosseini ve ark., 2014).

İnsan anne sütünde mezenkimal kök hücreler bulunmaktadır ve CD44, CD73, CD90, CD105, CD146 ve CD271 gibi tipik MKH belirteçlerini ifade eden hücreler süttten izole edilmiştir (Kaingade ve ark., 2016; Patki ve ark., 2010; Sani ve ark., 2015). İnsan anne sütünde küçük bir popülasyonun embriyonik kök hücre işaretleyicileri olan Oct4, Sox2, TRA 60-1 ve Nanog eksprese etmektedirler ama SSEA1 ve SSEA4 işaretleyicileri bulundurmamaktadırlar (Hosseini ve ark., 2014; Sani ve ark., 2015).

İnsan anne sütünde kendini yenileme kapasitesine sahip ve ektoderm, mezoderm ve endoderm olmak üzere üç germ tabakasına farklılaşabilen pluripotent kök hücreler içermektedir. Mezodermal yolak üzerinden osteoblast benzeri hücrelere, kondrositlere, adipositlere ve kardiyomiyositlere farklılaşabilmektedirler. Ayrıca insülin üreten pankreatik beta benzeri hücreler ve albümin üreten hepatosit benzeri hücreler gibi endodermal kökenli hücrelere farklılaşırlar. Nöronal özgül işaretleyicileri ifade eden gliya benzeri ve nöron benzeri hücreler de dahil olmak üzere çeşitli ektodermal kökenli hücrelere farklılaşabildiği gösterilmiştir (Hassiotou ve ark., 2012; Patki ve ark., 2010; Twigger ve ark., 2013).

#### 4.3.3 Probiyotik Bakteriler

Anne sütü tamamen steril değildir ve günlük 800 ml anne sütü tüketen bir bebek, günde yaklaşık  $10^7$ - $10^8$  bakteri hücresi alabilmektedir. Erken dönem konak-mikrop etkileşimlerinin değerlendirilmesinde süt bakterileri tarafından gerçekleştirilen bebeğin bağırsaklarının erken dönem kolonizasyonunun çocuklarda hastalık önleme ve ileriki sağlık üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir (Boix-Amorós ve ark., 2016). İnsan sütünde en sık bulunan bakteriler, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Lactococcus*, *Enterococcus* ve *Lactobacillus* türlerine aittir. *L. gasseri*, *L. salivarius*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* ve *L. fermentum* gibi diğer türler, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından probiyotik türler olarak kabul edilmektedirler (Martín ve ark., 2003).

Maternal gastrointestinal mikrobiyotanın seçilmiş bakterilerinin entero-meme bezi yoluyla meme bezinin içine ulaşabilmektedir. Bu mekanizma, dendritik hücreler ve CD18<sup>+</sup> hücrelerini içerir, bu hücreler bağırsak içeriğinden nonpatojenik bakterileri alarak emziren memeye taşımaktadırlar (Langa ve ark., 2012; Rescigno ve ark., 2001). Hamile ve emziren farelerde bakteriyel translokasyonun bağırsaktan mezenterik lenf düğümlerine ve meme bezlerine olduğu gözlemlenmektedir. Sağlıklı bir konakta bakteriyel translokasyonun ekstraintestinal dokulara olumlu bir fizyolojik olay olduğu ve neonatal bağışıklık sisteminin olgunlaşmasıyla ilişkili olabileceği öne sürülmektedir (Perez ve ark., 2007).

#### 4.4 Mikrokimerizm

Mikrokimerizm, genetik olarak farklı bir bireyin küçük bir hücre popülasyonunun veya DNA'sının başka bir bireyde bulunması durumudur (Müller ve ark., 2015). Gebelik, anne ve fetus arasında plasentadan iki yönlü hücre trafiğiyle doğal mikrokimerizmin başlıca nedenidir. Çeşitli hücre dışı maddelerin yanı sıra bazı hücrelerin de gebelik sırasında değiş tokuş edildiği ve mikrokimerizmin annede ve onun soyundaki bireylerde onlarca yıl sonra bile devam ettiği

bilinmektedir. Gebelik sırasında transfer edilen mikrokimerik hücrelerin varlığı ve işlevleri tam olarak belirlenememiştir. Bu hücrelerin insan sağlığına faydalı mı yoksa zararlı mı olduğu konusu hala tartışmalı olmasına rağmen otoimmün hastalıklar, kanser, yara iyileşmesi vb. gibi birçok nedenden dolayı günümüzde ilgi gören bir konudur (Shrivastava ve ark., 2019).

Mikrokimerik hücrelerin doğal ve yapay olmak üzere iki olası kökeni vardır. Doğal mikrokimerizm başlıca kaynağı gebelik olmakla beraber düşük yapma ve ikiz doğurma durumlarını da içermektedir. Yapay mikrokimerizm ise organ/doku nakli ve kan transfüzyonu yoluyla gerçekleşmektedir (Boyon ve ark., 2011; Galofré, 2012).

Normal gebelik sürecinde, anne, fetus ve plasentadan hücrelerin geri dönüşümlü olarak transferi olur. Doğal mikrokimerizm genel olarak iki kategoriye ayrılır. Gebelikte fetuse ait hücre yada DNA'nın anneye geçişi fetal mikrokimerizm, anneye ait hücrelerin veya DNA'nın fetüse geçmesi ise maternal mikrokimerizm olarak adlandırılır. İkizlerde ya da çoğul gebeliklerde de rahim içinde fetuslar arasında hücre alışverişi olmasıyla mikrokimerizm gerçekleşir (Cómitre-Mariano ve ark., 2022).

#### **4.4.1 Fetal mikrokimerizm**

Fetal mikrokimerizm, hücre ya da DNA materyalinin fetüsten gebelik sırasında anneye geçmesidir. Doğal mikrokimerizmin en yaygın şeklidir ve bu aktarım tüm gebeliklerde meydana gelir ve gebelik yaşı ilerledikçe artar.

Fetal hücrelerin anneye geçişi, insanlarda gebeliğin dördüncü ve altıncı haftaları arasında (Ariga ve ark., 2001), farelerde 11. gününde (Yutaka ve ark., 2009) ve rhesus maymunlarında dördüncü haftada başladığı bildirilmiştir ve gebelik süresince artarak doğumdan önceki günlerde maksimum düzeye ulaşmaktadır. Fetal hücrelerin çoğu, doğumdan sonraki ilk haftalarda kademeli olarak maternal dolaşımdan kaybolur ve maternal bağışıklık sistemi tarafından ortadan kaldırılır. Ancak birkaç fetal hücre, insanlarda doğumdan sonra 30 yıl boyunca (Chan ve Nelson, 2013) ve farelerde 8 ay boyunca (Dawe ve ark., 2007) maternal dokulara entegre olduğu bulunmuştur.

Fetal hücreler plasental bariyeri geçerek maternal dolaşıma girer ve burada hayatta kalabilir, göç edebilir ve farklı maternal dokulara entegre yerleşebilmektedirler. Hayvan modellerinde, fetal mikrokimerik hücreler kemik iliği, deri, hipofiz bezi, karaciğer, beyin, omurilik, akciğer, kalp, tiroid, böbrek, böbrek üstü bezi, timus, pankreas gibi çeşitli organlarda tespit edilmiştir (Fujiki ve ark., 2009; Jimenez ve ark., 2005; Pritchard ve ark., 2012; Vojdani ve ark., 2018;

Zeng ve ark., 2010; Zhang ve ark., 2014). İnsanda ise fetal mikrokimerik hücreler deri, dalak, karaciğer, beyin, akciğer, böbrek, memetiroid, lenf nodları, tükürük bezleri bağırsak, mesane ve uterus gibi organlarda gözlemlenmiştir (Broestl ve ark., 2018; Fett, 2011; Fugazzola ve ark., 2011; Huerta Sil ve Medrano Ramírez, 2006; Khosrotehrani ve Bianchi, 2005; Khosrotehrani ve ark., 2004; Koopmans ve ark., 2005).

Maternal ve plasental patolojilerde yüksek oranda fetal mikrokimerik hücre olduğu açıklanmıştır (Lambert, 2007). Ayrıca melenoma, kolorektal, meme, serviks, mesane ve akciğer kanseri gibi kanserlerde de bulunmaktadır (Fugazzola ve ark., 2011; Kamper-Jørgensen ve ark., 2012; Korkmaz ve ark., 2015). Bir yandan bu hücrelerin meme kanseri (Broestl ve ark., 2018) ve mesane kanseri (Nguyen Huu ve ark., 2009) riskini azaltma ile ilişkilidir. Aynı zamanda maternal sağlıkta faydalı (koruyucu ve rejeneratif) bir rol oynayabilir, doku onarımı ve rejenerasyonuna, hücre değişimine ve maternal homeostatik düzenin sürdürülmesine katkıda bulunabilmektedirler (Boddy ve ark., 2015). Örneğin iltihaplı maternal dokularda bulunarak anjiyogenik ve iyileştirme süreçlerinde rol aldıklarını düşündürmektedir (Nguyen Huu ve ark., 2009).

#### **4.4.2 Maternal mikrokimerizm**

Mikrokimerizm süreci çift yönlüdür ve anneden fetal dolaşıma az sayıda hücre veya DNA geçişine maternal mikrokimerizm denir. Bu geçiş embriyogenez sırasında (örneğin farelerde yaklaşık E12.5'te) plasenta aracılığıyla ve doğumdan sonra anne sütü yoluyla gerçekleşmektedir (Aydın ve ark., 2018; Vernochet ve ark., 2007). Maternal mikrokimerizm, tüm hücresel alt gruplarda fetal mikrokimerizmden daha az yaygındır. Maternal mikrokimerik hücrelerin yaşam boyunca kalıcı olduğu düşünülse de, doğumdan sonra herhangi bir potansiyel rolü olup olmadığı henüz netleştirilmemiştir.

Çeşitli organlarda farklı maternal hücre tipleri tanımlamış ve olası rollerini belirlemişlerdir. Fetal yaşam ve erken neonatal dönemde, maternal mikrokimerik hücreler cilt, timus, dalak, karaciğer ve tiroid gibi çeşitli organlarda bulunmuştur (Galofré, 2012). Maternal mikrokimerik hücrelerin büyük çoğunluğunu miyeloid hücreler ve granülositler oluşturmaktadır. Ayrıca, maternal mikrokimerik hücrelerin mikrogial hücreler, fibroblastlar, astrositler ve epitelyal hücreler gibi çeşitli farklılaşma durumları da bildirilmiştir (Fujimoto ve ark., 2022).

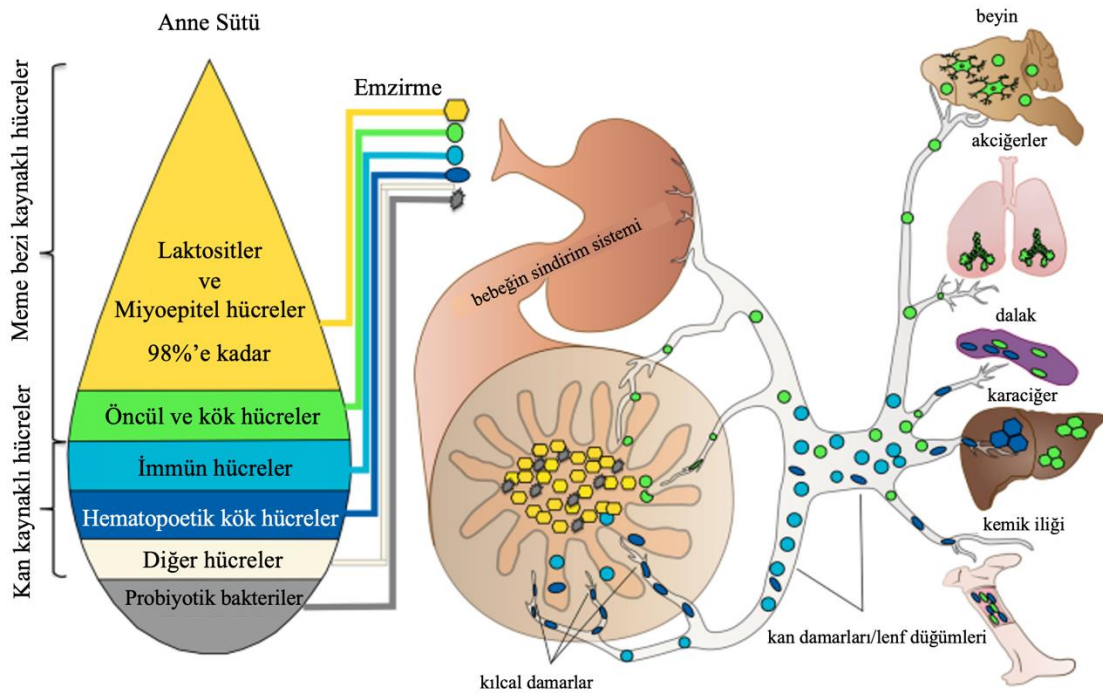
Maternal hücreler belirli patolojik durumlarla da ilişkilendirilmiştir. Örneğin, tip I diyabet hastalarında insülin salgılayan beta hücrelerinin tanımlanması (Nelson ve ark., 2007), hasarlı dokuların yenilenmesine katkıda bulunma olasılığını göstermiştir. Öte yandan, biliyer atrezi ve

Graves hastalığı gibi iltihabi hastalıklara sahip hastalarda CD8<sup>+</sup> T hücreleri gibi maternal sitotoksik bağışıklık hücrelerinin artması, maternal mikrokimerik hücrelerin bu tür hastalıkların oluşumuna veya kötüleşmesine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir (Muraji ve ark., 2008).

Farklılaşmış maternal hücrelerin soyundan gelen mikrokimerik hücrelerin muhtemelen biyolojik ev sahibinin bir nişinde depolanan bir kök hücre hattından kaynaklandığı ve bu yüzden maternal hücrelerin uzun ömürlü olduğu düşünülmektedir (Karlmark ve ark., 2021). Bu kadar fazla farklılaşmış maternal hücrenin gözlemlenmesi, farklılaşmış hücrelerin kök hücre potansiyeline sahip maternal mikrokimerik hücrelerden kaynaklanmış olabileceği gibi zaten göçten önce farklılaştığını düşündürmektedir.

#### 4.4.3 Anne sütündeki maternal mikrokimerik hücrelerin göçü

Maternal hücrelerin, plasentadan fetüse geçişinin dışında doğum sonrası emzirilen yavrulara süt aracılığıyla geçişi de gerçekleşmektedir. Bu geçiş anne sütü kaynaklı maternal mikrokimerizm olarak isimlendirilir ve anne sütü kaynaklı mikrokimerik hücreler yavruya geçerek farklı organlara yerleşebilmektedir. Bu geçiş tam olarak açıklanmamış olsada anne sütü kaynaklı hücrelerin gastrointestinal sistemin duvarını aşarak yavru dolaşım sistemine girdiği ve farklı organlara bu şekilde ulaştıktan sonra tamamen işlevsel hale gelebildiği gösterilmiştir (Şekil 6), (Hassiotou ve ark., 2014).



**Şekil 6.** Anne sütü kaynaklı hücrelerinin emzirilen yavru vücuduna yayılması (Hassiotou ve ark., 2014).

Yaşamın ilk haftalarında, anne sütündeki maternal hücrelerin, yeni doğan bağırsağındaki bariyeri etkilemeden geçebilecekleri benzersiz bir uygun ortam bulunmaktadır. Bu durum, düşük sindirim enzim aktivitesi, bebek midesindeki hipoklorhidri (hidroklorik asit eksikliği) ve bağırsak hücreleri arasındaki gevşek bağlantılar sonucunda parasellüler boşlukların oluşmasından kaynaklanır. Bu durum, maternal süt hücrelerinin transferini ve hayatta kalmasını mümkün kılar. Süt-tükürük etkileşimleri sırasında oluşan hücresel kompleksler, mide transitindeki asitlikten anne sütü hücrelerini korumada önemli bir rol oynamaktadır. Örnek olarak, süt makrofajları, oral uygulama sonrasında bebek farelerin sindirim sisteminde birkaç saat hayatta kalabilmektedirler (Southern, 1998). Hücre transferinin en olası mekanizması, zayıflamış interepitelyal bağlantılar aracılığıyla anne sütü hücrelerinin parasellüler geçişiyle gerçekleşir. Bağırsak epitelinden submukoza tabakasına geçen hücreler buradan hem lenf hem de kan dolaşımına katılmaktadırlar. Canlı lenfositlerin neonatal mide mukozası tarafından aktif bir şekilde alındığı gösterilmiştir (Seelig ve Head, 1987).

Anne sütü kaynaklı immün hücrelerin ve öncül/kök hücrelerin fetal dolaşıma katılması ile farklı organlara göçü birçok çalışma ile desteklenmektedir. Anne sütü kaynaklı lökositler, doğumdan sonraki ilk hafta yavrunun karaciğerinde tespit edilmiştir (Zhou ve ark., 2000). Ayrıca, immün yetmezliği olan farelerde IgG salgılayan B lenfositlerinin varlığı anne sütüyle beslenme sonrasında gösterilmiştir (Arvola ve ark., 2000).

Süt ile beslenen tavşanlar üzerinde yapılan çalışmalar, PKH26 kırmızı floresan hücre bağlayıcısı ile işaretlenmiş süt kaynaklı kök hücrelerin yavru organlarına tutunduğunu ve karaciğer, kıkırdak, kemik ve on iki parmak bağırsağında tespit edildiği gösterilmiştir (Abd Allah ve ark., 2016). Bir başka çalışmada yeşil floresan protein (GFP+) ifade eden transgenik dişi farelerin normal yavruları emzirmesi sonucunda GFP+ hücreleri yavrunun kanında ve beyin dokusunda tespit edilmiştir. Ayrıca, mikrokimerik hücrelerin beyinde hem sinirsel hem de gliyal hücre tiplerine farklılaştıkları belirtilmiştir. Bu veriler, GFP+ hücrelerin süt aracılığıyla yavrulara ulaştığını ve farklı hücre tiplerine farklılaşabildiğini güçlü bir şekilde göstermektedir (Aydın ve ark., 2018).

#### **4.5. Testis ve Gelişimi**

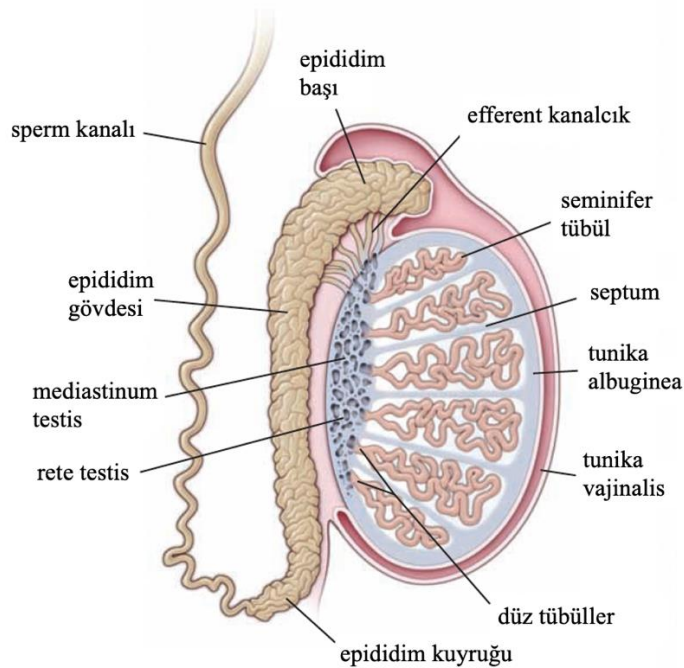
Erkek üreme sistemi, testisler, genital atım kanalları, yardımcı seks bezleri ve penisi ve skrotumu içeren dış genital organlardan oluşur. Yardımcı seks bezleri arasında seminal veziküller, prostat ve bulbouretral bezler bulunur. Testisin iki temel fonksiyonu spermatogenez ve steroidogenez (androjenlerin sentezi)dir. Androjenler, özellikle testosteron, spermatogenez

için önemlidir, erkek embriyonun fenotipik erkek fetüse dönüşmesinde embriyonik gelişimde önemli bir rol oynar ve cinsiyet dimorfizminin (erkek cinsiyetine ait fiziksel ve davranışsal özelliklerin) sorumlusudur (Ross, 2016).

#### 4.5.1 Testis morfolojisi

Yetişkin testisler, vücut boşluğunun dışında yer alan skrotum içinde bulunan çift elips şeklindeki organlardır. Her bir testis, uzunlamasına bir kasılı-fasiyal kese içinde asılı durur ve bu kese, ön karın duvarının tabakalarıyla sürekli bir halde olup skrotuma doğru uzanır. Testisler, sperm kanalları aracılığıyla karın duvarına bağlanır ve skrotuma skrotal ligamentler aracılığıyla bağlanır; bu ligamentler, gubernaculumun kalıntılarıdır (Ross, 2016).

Her bir testisin üzerini kalın, yoğun bağ dokusu kapsülü olan tunika albuginea örter. Bu kapsülün iç kısmı olan tunika vasküloza, kan damarlarını içeren gevşek bağ dokusu tabakasıdır. Her bir testis, kapsülden uzanan, kesikli bağ doku septaları tarafından yaklaşık olarak 250 lobüle bölünmüştür. Testisin arka yüzeyi boyunca, tunika albuginea kalınlaşır ve mediastinum testis olarak içeri doğru uzanır. Kan damarları, lenfatik damarlar ve genital atım kanalları, testise girerken veya ayrılırken mediastinum içinden geçer (Şekil 7) (Ross, 2016).

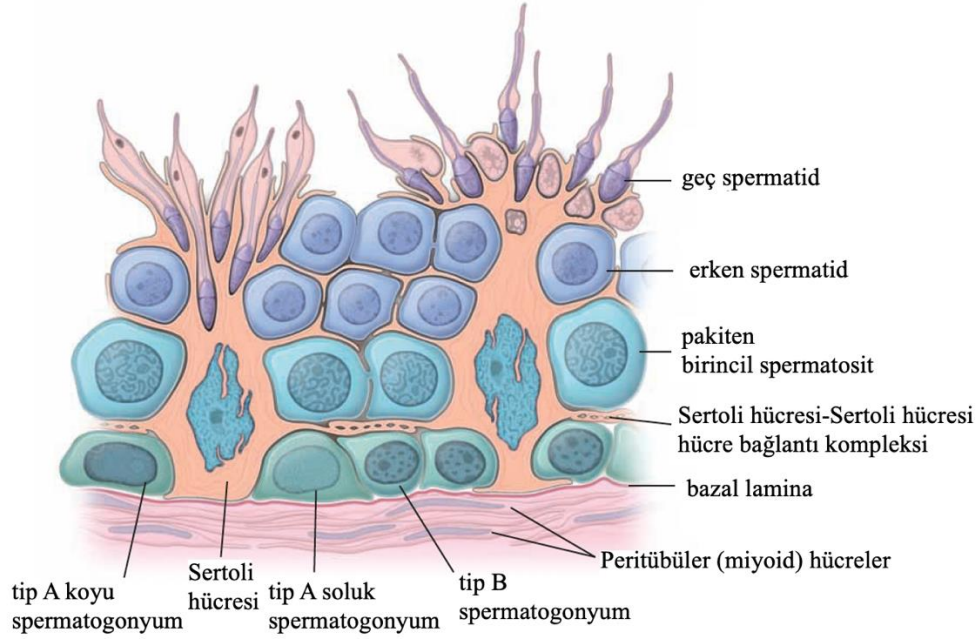


Şekil 7. İnsan testisinin midsagittal şematik çizimi (Ross, 2016).

Her bir testis lobülü, sperm üretildiği seminifer tübülleri ve testosteron üreten Leydig (interstisyel) hücrelerinin bulunduğu bağ dokusu stromasından oluşur. Lobül içindeki her tübül, bir döngü oluşturur ve uzunluğu nedeniyle oldukça kıvrımlıdır ve aslında lobül içinde kendi

üzerinde kıvrılır. Döngünün uçları, testisin mediastinumuna yakın bir konumdadır ve burada kısa ve düz bir yol izlerler. Bu seminifer tübülün bir kısmına düz tübül (tubulus rectus) denir. Bu tübül, testisin mediastinumunda bulunan anastomoz kanal sistemi olan rete testise bağlanır. Seminifer epiteli, iki temel hücre popülasyonundan oluşan, olağandışı ve karmaşık bir tabakalı epitelidir. Sertoli hücreleri, destekleyici veya sürdürme hücreleri olarak da bilinir. Bu hücreler ergenlik döneminden sonra çoğalmazlar. Sertoli hücreleri, yan yana yer alan spermatojenik hücreleri çevreleyen ve aralarında bulunan geniş apikal ve lateral uzantılara sahip sütun şeklindeki hücrelerdir. Sertoli hücreleri, seminifer tübüllerin tam kalınlığı boyunca uzanırlar ve tübüllerin yapısal düzenini sağlarlar (Şekil 8) (Ross, 2016).

Spermatojenik hücreler, olgun sperm hücrelerine düzenli olarak çoğalan ve farklılaşan hücrelerdir. Bu hücreler, testisin erken gelişimi sırasında gonadal sırtlara yerleşen yolk kesesinden kaynaklanan primordial germ hücrelerinden türetilirler. Spermatojenik hücreler, bitişik Sertoli hücreleri arasında ilerleyici gelişimin belirsiz tabakalarında düzenlenmiştir. En olgunlaşmamış spermatojenik hücreler, spermatogon adı verilenler, bazal lamina üzerinde dinlenir. En olgun hücreler olan spermatidler, Sertoli hücresinin apikal kısmına bağlıdır ve tübülün lümeni ile sınır oluştururlar. Tunika (lamina) propria, peritübüler doku olarak da adlandırılan, tipik fibroblastları içermeyen çok katmanlı bir bağ dokusudur. İnsanda, seminifer epitelin bazal laminasının dışında, üç ila beş katmanlı miyoid hücrelerden (peritübüler kasılabilen hücreler) ve kollajen fibrillerden oluşur. Miyoid hücreler, düz kas hücreleriyle ilişkili özellikler gösterir; bunlar arasında bir bazal lamina ve aktin filamentlerinin büyük miktarda bulunması bulunur. Ayrıca tipik fibroblastların olmadığı durumlarda kollajen sentezinde rol oynadıklarını gösteren önemli miktarda pürüzlü endoplazmik retikulum sergilerler. Miyoid hücrelerin ritmik kasılmaları, peristaltik dalgalar oluşturur ve spermilerin ve testiküler sıvının seminifer tübüllerden atım kanal sistemine kadar hareket etmesine yardımcı olur. Bu kasılmalar, spermatozoaların ve testiküler sıvının seminifer tübüllerden atım kanal sistemine doğru ilerlemesine yardımcı olan peristaltik dalgalar oluşturur (Şekil 8) (Ross, 2016).



**Şekil 8.** İnsan seminifer epitelinin şematik çizimi (Ross, 2016).

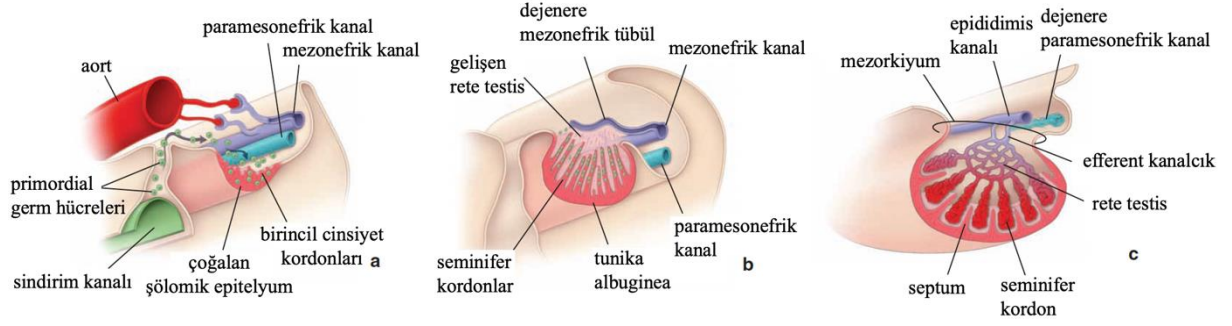
Leydig hücreleri (interstisyel hücreler), tipik olarak lipid damlacıkları içeren büyük, çokgen, eosinofilik hücrelerdir. Diğer steroid salgılayan hücreler gibi, Leydig hücreleri karmaşık bir düz endoplazmik retikuluma sahiptir ve bu özellik eosinofiliye neden olur. Kolesterolün testosteron sentezi için gerekli olan enzimler düz endoplazmik retikulum ile ilişkilidir. Steroid salgılayan hücrelerin diğer bir özelliği olan tübüloveziküler kristallerle mitokondriler de Leydig hücrelerinde bulunur. Leydig hücreleri, erken fetal yaşamda farklılaşırlar ve testosteron salgırlar. Testosteron salgısı, embriyonik gelişim, cinsel olgunlaşma ve üreme fonksiyonu sırasında gereklidir (Ross, 2016).

Sperm üretiminin gerçekleştiği spermatogenez, karmaşık ve benzersiz bir dizi olayı içeren bir süreçtir. Bu süreç, ergenlik döneminden kısa bir süre önce, hipofiz gonadotropinlerinin artan seviyelerinin etkisiyle başlar ve yaşam boyunca devam eder. Spermatogenez üç ayrı evreye ayrılır; spermatogonyal evre, spermatosit evresi, spermatid evresi. Spermatogonyal evre, spermatogonilerin mitoz bölünme geçirerek bir popülasyon oluşturduğu ve sonunda birincil spermatositlere dönüştüğü evredir. Spermatosit evre (mayoz), burada birincil spermatositler, spermatid adı verilen haploid hücreler üretmek üzere hem kromozom sayısını hem de DNA miktarını azaltmak için iki mayotik bölünmeye maruz kalır. Spermatid evresi (spermiyogenez), spermatidlerin olgun sperm hücrelerine farklılaştığı evredir. Spermatogenezin sonunda, spermatidler son olgunlaşmalarını geçirir ve spermiyasyon adı verilen bir süreçte destekleyici Sertoli hücrelerinden seminifer tübülün lümenine salınır (Ross, 2016).

#### 4.5.2 Cinsiyet belirlenmesi ve testis gelişimi

Genetik cinsiyet, döllenme sırasında Y kromozomunun varlığı veya yokluğuyla belirlenir. Bununla birlikte, testisler embriyonik gelişimin yedinci haftasına kadar oluşmaz. Gonadal cinsiyet, Y kromozomunun kısa kolundaki cinsiyet belirleyici bölgede bulunan SRY geninin varlığıyla belirlenir. SRY geninin erken embriyonik gelişimdeki ifadesi, gonadların cinsel farklılaşmasını tetikler ve dolayısıyla cinsiyet belirlemeden sorumludur. Y kromozomunda kodlanan olan genetik bilgi, erkek gonadlarının karmaşık gelişimini yönlendirmek için yeterli değildir. Bunun yerine, SRY geni, otozom 9, 11, 17 ve 19 ve X kromozomunda bir dizi gen aktivasyonunu kontrol eden bir ana anahtar olarak işlev görür. SRY geni tarafından kodlanan bir transkripsiyon faktörü olan testis belirleyici faktör (TDF), DNA'nın belirli bir bölgesine bağlanan bir moleküler domaine sahiptir ve yapısını değiştirir. Etkilenen DNA, diğer transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasına izin veren bir döngü oluşturur. Bunlar da sadece testislerin değil, diğer erkek üreme organlarının da oluşumunu başlatan diğer genlerin ifadesine neden olur. SRY geniyle aynı zamanda birkaç başka gen ifade edilir (Ross, 2016).

Testisler, karın boşluğunun arka duvarında, üriner sistemle yakın ilişki içinde retroperitoneal olarak gelişir. Testisler (ovaryumlar gibi) üç kaynaktan türetilir; orta mezoderm, mezodermal epitelyum, primordial germ hücreleri. Orta mezoderm, karın arka duvarında ürogenital çıkıntıları oluşturarak Leydig hücreleri (interstisyel hücreler) ve miyoid hücreleri (peritübüler kasılabilen hücreler) meydana getirir. Mezodermal epitelyum (şöломik mezotelyum), ürogenital çıkıntıları belirler ve birincil cinsiyet kordonları denilen parmak benzeri epitelyal kordonlar oluşturur. Bu kordonlar altta yatan orta mezoderme doğru büyür ve primordial germ hücreleri tarafından kolonize edilir. Birincil cinsiyet kordonları ayrıca Sertoli hücrelerini de meydana getirir. Primordial germ hücreleri, gelişim esnasında yolk kesesinden gelişen gonadlara geçerek birincil cinsiyet kordonlarına dahil edilir. Burada bölünür ve spermatogonya şeklinde farklılaşır. Daha önce belirtildiği gibi, primordial germ hücrelerinin genital çıkıntılara göçü, ürogenital çıkıntılardaki mezodermal hücreleri ve şöломik mezotelyum hücrelerini çoğalmaya ve birincil cinsiyet kordonlarını oluşturmaya teşvik eder. Bu aşamada, bu kordonlar, primordial germ hücreleri, öncül Sertoli hücreleri ve çevresindeki bir miyoid hücre tabakasından oluşur. Daha sonra, birincil cinsiyet kordonları seminifer tüplere farklılaşır, bunlar da seminifer tüpleri, düz tüpler ve testis ağını meydana getirir (Şekil 9) (Ross, 2016).



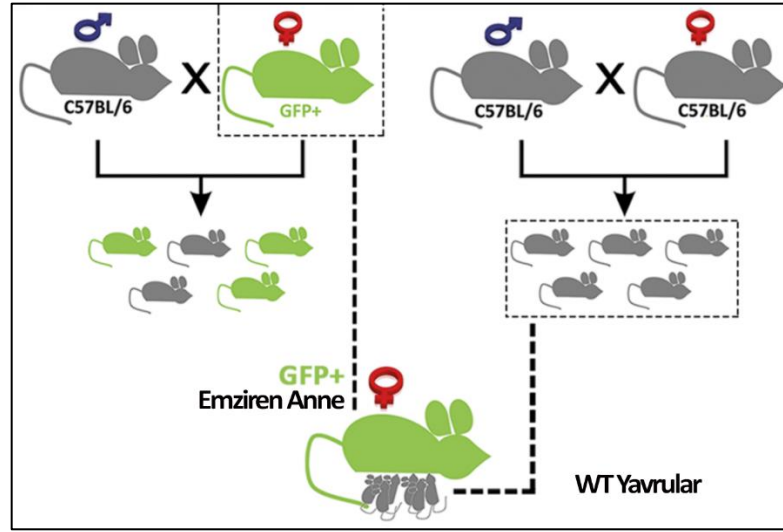
**Şekil 9.** Testis gelişim aşamalarının şematik diyagramı (Ross, 2016).

Gelişimin ilk aşamasında, testisler her iki cinsiyette de benzer olan ürogenital çıkıntıların belirsiz öncülünden, karın arka duvarında gelişir. Bu belirsiz aşamada, embriyo hem erkek hem de dişi olarak gelişme potansiyeline sahiptir. Bununla birlikte, SRY geninin ifadesi, yalnızca ön-Sertoli hücrelerinde, embriyonun erkek gelişimini düzenler. Erkek gelişiminin erken aşamalarında, seminifer tüpleri ayıran mezankim, testis gelişimine uyarıcı olan testosteron üreten Leydig (interstisyel) hücrelerini meydana getirir. Testosteron aynı zamanda erkek genital ekcurrent kanallarına dönüşen mezonefrik (Wolffian) kanalların büyümesi ve farklılaşmasından da sorumludur. Ayrıca bu erken aşamada, seminifer tüpler içinde gelişen Sertoli (destekleyici) hücreleri, Müllerian-inhibisyon faktörü (MIF) adı verilen başka bir önemli hormonal madde üretir. MIF'nin moleküler yapısı, dönüştürücü büyüme faktörü- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ile benzerdir. Bu, paramesonefrik (Müllerian) kanallarının hücre bölünmesini inhibe ederek, dişi üreme organlarının gelişimini engeller. Testisler, gebeliğin yaklaşık 26. haftasında karından skrotuma inerler (Ross, 2016).

## 5. GEREÇ ve YÖNTEM

### 5.1 Deney Hayvanları ve Deney Modeli

Çalışmamızda eritrositler ve kıllar hariç vücudundaki tüm hücrelerinde yeşil floresan protein (GFP) üretebilme yeteneğine sahip C57BL/6-Tg(ACTB-EGFP)1Os/J tür transgenik fareler ve C57BL/6J türü normal fareler kullanıldı. C57BL/6-Tg (CAG-EGFP)1Os/J tür fareler The Jackson Laboratory firmasından (The Jackson Laboratory, ME, USA, #003291) temin edildi. İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezinde (MEDİTAM) deney grupları için ihtiyaç olan farelerin üretimi yapıldı. Aynı anda normal erkek fareler ile GFP+ ve normal dişi fareler çiftleştirildi. Doğum sonrası GFP+ anne yavrularından ayrılarak normal anneden doğan yavruları emzirdi. Böylece GFP+ anneden geçen GFP+ kimerik hücreler normal yavrularda gözlemlendi (Şekil 10). Çalışmamızın etik kurul onayı İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 25.09.2019 tarihli 65 karar numarası ile alındı.



Şekil 10. Deney grupları için gerekli farelerin elde edilmesi (Aydın ve ark., 2016).

### 5.2 GFP+ Farelerin Mikroskop Altında Doğrulanması ve Genotipleme

C57BL/6-Tg (CAG-EGFP)1Os/J tür transgenik fareler C57BL/6 tür normal fareler ile çaprazlanarak yeni fareler üretildi. Doğan yavrular floresans ataçmanlı ZEISS Axio Zoom.V16 stereo mikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Almanya) altında 488 nm dalga boyunu geçirecek uygun filtre ile incelenerek GFP ışıma yapan yavrular seçildi.

Seçilen yavruların GFP+ olduğunu doğrulamak için anestezi altında kulağından “punch biopsisi” ile doku örnekleri alınıp genotipleme yapmak için hazırlandı. Dokulardan alınan

örnekler, 0.2 ml'lik PCR tüplerine 75 µl, 25mM NaOH/EDTA içeren bir çözelti ile aktarıldı. PCR tüpleri, Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific) cihazında 98 °C'de 1 saat boyunca bekletildi. 1 saat sonunda 75 µl, 40mM Tris/HCl eklenerek 3 dakika 4000 rpm'de santrifüj edilen dokulardan 100 µl alınarak yeni PCR tüplerine aktarıldı. DNA içeren örnekler elde edildikten sonra PCR karışımı hazırlandı ve analiz yapıldı (Tablo 3, 4, 5).

**Tablo 3.** Tek bir örnek için PCR karışımı.

| Bileşenler                                 | Konsantrasyon | Miktar µl |
|--------------------------------------------|---------------|-----------|
| ddH <sub>2</sub> O                         |               | 3         |
| OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer |               | 6         |
| 10 uM Transgen Primer ileri                | 0.4 uM        | 0.5       |
| 10 uM Transgen Primer geri                 | 0.4 uM        | 0.5       |
| 10 uM Kontrol Primer ileri                 | 0.4 uM        | 0.5       |
| 10 uM Kontrol Primer geri                  | 0.4 uM        | 0.5       |
| DNA                                        |               | 1         |
| Toplam miktar                              |               | 12        |

**Tablo 4.** Kullanılan primer dizileri.

| Primer   | Dizi 5' → 3'                      | Primer Tipi                |
|----------|-----------------------------------|----------------------------|
| oIMR0872 | AAG TTC ATC TGC ACC ACC G         | Transgen                   |
| oIMR1416 | TCC TTG AAG AAG ATG GTG CG        | Transgen                   |
| oIMR7338 | CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT   | İç Pozitif Kontrol Forward |
| oIMR7339 | GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C | İç Pozitif Kontrol Reverse |

**Tablo 5.** Thermal Cyclers PCR protokolü.

| Aşama | Sıcaklık °C | Zaman | Not                                       |
|-------|-------------|-------|-------------------------------------------|
| 1     | 95          | 1 dk  |                                           |
| 2     | 95          | 30 sn |                                           |
| 3     | 60          | 30 sn |                                           |
| 4     | 68          | 1 dk  |                                           |
| 5     |             |       | 2-4 no'lu aşamaları 38 kere tekrarlanması |
| 6     | 72          | 5 dk  |                                           |
| 7     | 4           |       | Durdurma                                  |

PCR sonrası örneklerin jele yüklenip görüntülenmesi için 3 gr agaroz tartıldı ve üzerine 100 µl 1X TAE tampon çözeltisi eklenerek karıştırıldı. Bu karışım mikrodalga fırında 3 dakika boyunca 200 °C'de kaynatıldı. Kaynadıktan sonra içerisine 5 µl SafeView™ (Applied Biological Materials Inc., Richmond, BC, Kanada) eklendi. Hazırlanan karışım kasete dökülerek 30 dakika boyunca donması beklendi. Jel donduktan sonra, jel tankına yerleştirildi ve tankın içerisine 1X TAE tampon çözeltisi dolduruldu. PCR ürünlerinden 10 µl alınarak içerisine 2 µl yükleme boyası eklenerek karıştırıldı. İlk kuyuya 5 µl işaretleyici (marker) konuldu ve ardından hazırlanan kontroller ve örnekler sırayla diğer kuyulara yerleştirildi. Daha sonra 30 dakika boyunca 80 Volt'ta elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Yürütülen jel ChemiDoc™ MP System (Bio Rad, CA, A.B.D.) cihazı ile görüntülendi. Görüntüleme sonunda çift bant görülen örnekler transgenik (GFP+) olarak değerlendirildi. Genotipleme yapılan GFP+ fareler yetişkin hale geldikten sonra normal yavruları emzirecek anne adayları olarak kullanıldı.

### 5.3 Deney Grupları

Deney gruplarında belirlenen süreler farelerin gelişim evreleri göz önünde bulundurularak belirlendi. 7. gün, anneden yavruya emzirmeye bağlı hücre geçişinin erken evrede, emzirme dönemi içerisinde, tespit edilebilmesi açısından belirlendi. Aynı zamanda farelerde testis dokusunda seminifer tübülü oluşturan hücrelerin organizasyonu yaklaşık 13.-14. günde tamamlandığı ve bu süre zarfında kan-testis bariyeri oluşmaya başladığından dolayı fonksiyonel testis oluşmadan da hücre geçişinin gözlenmesi planlandı. 30. gün, farelerin yaşam döngüsüne bağlı olarak genç birey oldukları dönemde hücrelerin tespit edilebilmesi açısından belirlendi. Sperm üretimi için gerekli olan spermatogenez olayı ise farelerde 21. günde başlar.

Böylece 30 günlük farelerde spermatogenezin erken evrelerindeki hücre geçişinin de gözlenmesi planlandı. 60. gün, farelerin yetişkin birey oldukları dönemdeki hücrelerin tespiti açısından belirlendi. Çalışmamızda sadece 60 günlük farelere hasar modelleri uygulanarak yetişkin fare testisinde hasar sonrası hücre geçişinde artış olup olmadığı incelendi. Hasar gruplarında hasardan sonra 21 gün beklenmesinin sebebi de spermatogenezin sıçanlarda 21 günlük periyotlarda tamamlanmasıdır.

Kimyasal hasar modeli için hem kemoteröpatik bir ajan olan hem de üreme organları için toksik etkilere sahip olduğu bilinen Busulfan (1, 4-butanediol dimethanesulfonate) kullanıldı. Busulfan uygulaması ile testis dokusunda seminifer tübüllerde spermatogenezin gerilemesi ile oligospermi ve azospermi meydana gelmesinden dolayı testis için uygun kimyasal hasar modelidir. Bu model de hedef hücre olarak seminifer tübül içerisinde bulunan Sertoli hücresi ve sperm üretiminde progenitor hücre olan spermatogonya etkilenecek spermatogenez gerilemektedir. Çalışmamızda her deney hayvanına (n:10) 30 mg/kg olacak şekilde dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek tek doz Busulfan ip yoldan verildi (Xie ve ark., 2020). Enjeksiyon sonrası 21 gün bekledikten sonra fareler dekapite edildi.

Fiziksel hasar modeli için iskemi/reperfüzyon (IR) modeli kullanıldı. Testiküler arter klemplenerek kan akışı engellendi. 6 saat iskemi uygulandıktan sonra klempl sökülerek reperfüzyon gerçekleştirildi ve 21 gün sonra fareler dekapite edildi (Hirai ve ark., 2017). Bu metodla kan akışı kesilerek öncelikle interstisyel dokuda bulunan Leydig hücreleri etkilenip testosteron seviyesinde düşüşe sebep olup spermatogenez gerileyip reaktif oksijen türlerinin (ROS) artması ile de spermatogenik seri hücreleri hasar görerek spermatogenezin gerilemesi planlandı.

Bütün bu uygulamalar için deney grupları aşağıdaki şekilde belirlendi (Şekil 11);

**7 Günlük Kontrol Grubu (n=6) :** Bu gruptaki yavru fareler GFP+ transgenik anneler tarafından doğumdan itibaren emzirildi. Postnatal 7. günde sakrifiye edilip testis dokusu alındı.

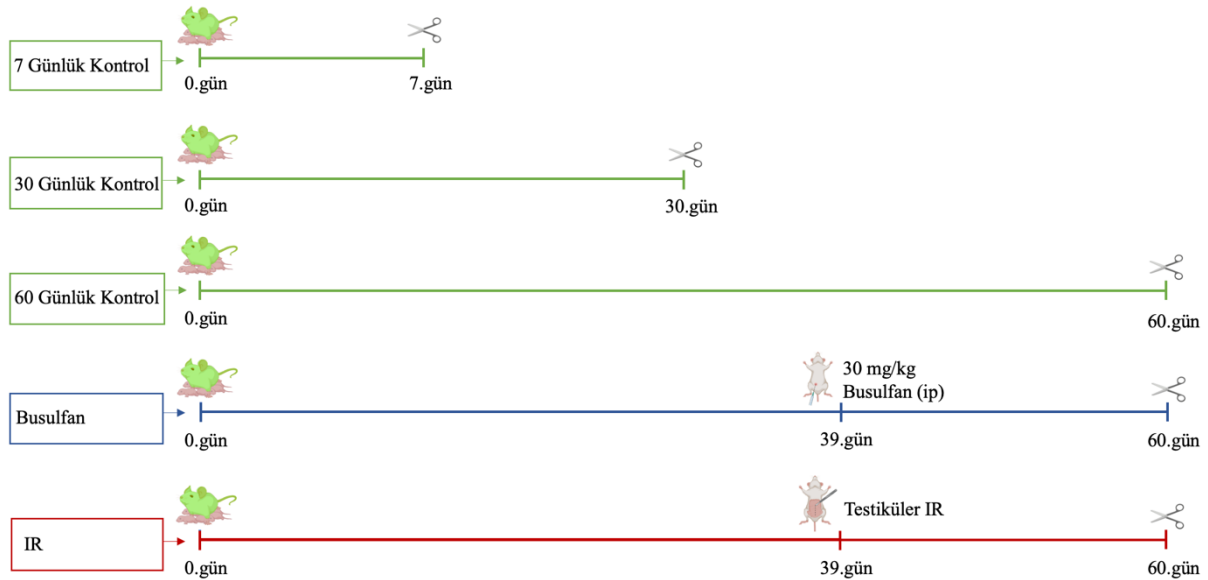
**30 Günlük Kontrol Grubu (n=6) :** Bu gruptaki yavru fareler GFP+ transgenik anneler tarafından doğumdan itibaren emzirildi. Postnatal 30. günde sakrifiye edilip testis dokusu alındı.

**60 Günlük Kontrol Grubu (n=6) :** Bu gruptaki yavru fareler GFP+ transgenik anneler tarafından doğumdan itibaren emzirildi. Postnatal 60. günde sakrifiye edilip testis dokusu alındı.

**Busulfan Grubu (n=8) :** Bu gruptaki yavru fareler GFP+ transgenik anneler tarafından doğumdan itibaren emzirildi. Postnatal 39. günde tüm yavrulara 30 mg/kg olacak şekilde tek doz busulfan ip olarak verildi. Postnatal 60. günde sakrifiye edilip testis dokusu alındı.

**IR Grubu (n=8) :** Bu gruptaki yavru fareler GFP+ transgenik anneler tarafından doğumdan itibaren emzirildi. Postnatal 39. günde tüm yavrulara 6 saat boyunca testiküler arter klemplenerek iskemi uygulandıktan sonra reperfüzyon yapıldı. Postnatal 60. günde sakrifiye edilip testis dokusu alındı.

Her bir deney grubundaki GFP+ transgenik anneleri emen yavruların pozitif ve negatif kontrolü yapıldı. Pozitif kontrol için GFP+ anneyi emen GFP+ yavrular, negatif kontrol için ise normal anneyi emen normal yavrular kullanıldı. Bu yavrulara da aynı deney modelleri uygulandı.



**Şekil 11.** Deney gruplarının ve uygulamalarının şematik gösterimi.

#### 5.4 DNA İzolasyonu ve Kantitatif PCR (qPCR) Yöntemi

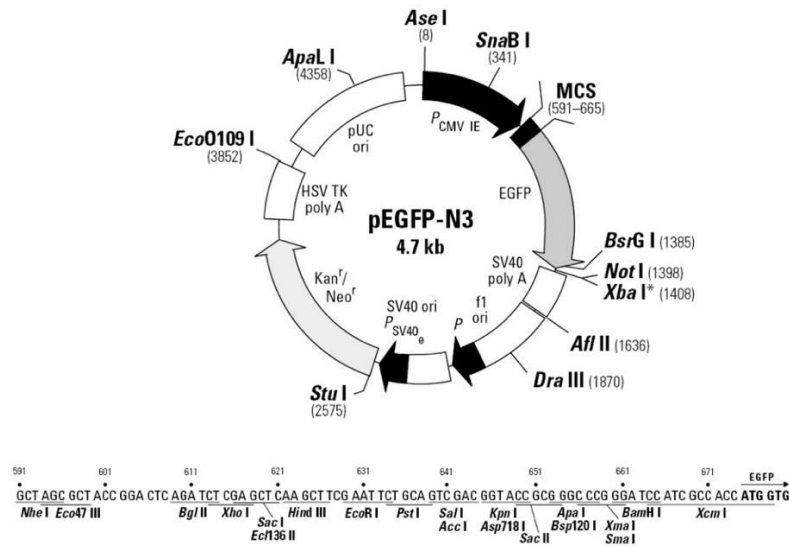
Bütün gruplardan alınan testis dokusu örnekleri çıkarıldıktan hemen sonra kuru buz üzerine alınarak donduruldu. Dondurulan dokular PCR tüplerine alınarak -80°C'de deney protokolü uygulanana kadar saklandı. Her gruptaki testis dokularında GFP+ hücre varlığının ve göreceli miktarının tespiti için hazır ticari kitlerle DNA izolasyonu yapıldı. Qiagen DNeasy kiti (Qiagen, Valencia, CA, USA) kullanılarak testis dokusu örneklerinin DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Testis dokusu örnekleri küçük parçalara bölünüp üretici firmanın önerdiği protokole uygun olacak şekilde 1,5 ml mikrosantrifüj tüpü içerisine koyuldu. Üzerine 180 µl ATL tampon

solusyonu ve 20 µl proteinaz K eklenip karıştırıldıktan sonra üzerine 200 µl ATL tampon solusyonu eklendi. Karışım 56 °C’de 10 dk bekletilip üzerine 200 µl saf etanol eklendi. DNeasy Mini spin kolonlarına koyulan süspansiyon 6.000g’de 1 dk santrifüj edildi. Kolon altında toplanan solüsyon atılarak 500 µl AW1 tampon solusyonu üzerine eklendi ve 6.000g’de 1 dk santrifüj edildi. Kolon altında toplanan solüsyon atıldıktan sonra üzerine 500 µl AW2 tampon solusyonu eklendi. Daha sonra 17.000g’de 5 dk santrifüj edildi. Kolon altında toplanan solüsyon atılıp spin kolon yeni 1,5 mikrosantrifüj tüpü içerisine alındı. Üzerine 200 µl AE tampon solusyonu eklenerek 6.000g’de 1 dk santrifüj edildi. Elde edilen saf DNA tüp içerisinde toplanıp saklandı.

qPCR analizleri Bio-Rad CFX Connect™ (Bio Rad, CA, A.B.D.) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Eşik döngü (C<sub>T</sub>) değerleri her amplifikasyonda hesaplanarak, hedeflenen gen bölgelerinin miktarı CFX Manager™ Software programı ile otomatik olarak analiz edildi. Pozitif kontrol olarak konsantrasyonu bilinen deneye özgü plazmid standartları kullanılırken, negatif kontrol olarak da moleküler çalışmalara uygun su kullanıldı. Standart eğrinin oluşturulabilmesi için GFP geni içeren plazmidler (pEGFP-N3) kullanıldı (Şekil 12). Plazmid konsantrasyonu Qubit® 2.0 Fluorometer kullanılarak ölçüldü. Elde edilen ortalama değerler aşağıdaki formül kullanılarak ng/µL’den kopya/µL değerine çevrildi (Joshi ve ark., 2008).

$$m = [n] \left[ \frac{1 \text{ mol}}{6,02 * 10^{23}} \right] \left[ \frac{660 \text{ g}}{\text{mol}} \right] = [n] \left[ 1,096 * 10^{-21} \frac{\text{g}}{\text{bç}} \right]$$

n = DNA boyu, bç= baz çifti, m = kütle, 1 mol çift sarmal DNA molekülünün ortalama moleküler ağırlığı = 660 g/mol



Şekil 12. pEGFP-N3 plazmidine ait restriksiyon haritası ve klonlama bölgeleri.

Standart eğri oluşturmak için plazmidler su ile 2, 20, 200, 2.000, 20.000 ve 200.000 kopya/μl aralığında seyreltilti. Daha sonra qPCR analizi yapılarak örneklerle ait elde edilen C<sub>T</sub> değerleri ve oluşturulan standart eğri denklemi kullanılarak örneklerdeki GFP kopya sayısı belirlendi (Joshi ve ark., 2008). qPCR analizi için Tablo 6'daki karışım ve Tablo 7'deki reaksiyon koşulları kullanıldı.

**Tablo 6.** GFP gen amplifikasyonu için qPCR bileşenleri.

| Bileşenler                                                                     | Miktar  |
|--------------------------------------------------------------------------------|---------|
| SsoAdvanced Universal Probes Supermix (2x)                                     | 5 μl    |
| GFP ileri (F) primer (10μM stok)<br>5' AGT GCT TCA GCC GCT ACC 3'              | 0.5 μl  |
| GFP geri (R) primer (10μM stok)<br>5' GAA GAT GGT GCG CTC CTG 3'               | 0.5 μl  |
| GFP Probe<br>5' FAM TTC AAG TCC GCC ATG CCC GAA<br>NON-FLUORESCENT QUENCHER 3' | 0.25 μl |
| DNA                                                                            | 1 ul    |
| Su                                                                             | 2.75 μl |
| Toplam miktar                                                                  | 10 μl   |

**Tablo 7.** qPCR döngü koşulları.

| Program                                   | Döngü Sayısı | Sıcaklık (°C) | Süre  |
|-------------------------------------------|--------------|---------------|-------|
| Polimeraz aktivasyonu / DNA Denatürasyonu | 1            | 95            | 10 dk |
| Denatürasyon                              | 50           | 95            | 10 sn |
| Bağlanma / Uzama                          |              | 60            | 1 dk  |

Bütün gruplara ait testis doku örneklerinden elde edilen DNA qPCR yöntemi kullanılarak kimerik hücrelerin varlığı gen ekspresyonu seviyesinde incelendi.

### 5.5 Akım Sitometrisi Analizi

Testis dokusu farklı tipte hücre popülasyonları içerdiğinden ve yoğun bağ dokusu içeriğinden dolayı akım sitometrisi yöntemi için zor bir dokudur. Deney sonucunda çok az popülasyona sahip hücre grubu (GFP+ kimerik hücre) arandığından minimum hücre kaybına sahip protokol

denemeler sonucunda belirlendi. Aşağıdaki basamakları içeren protokol uygun metod olarak belirlenerek bütün deney gruplarına uygulandı.

Protokol:

1. Çıkarılan testis dokusu 15ml konik tüp içerisine alınarak DMEM solüsyonunda buz üstünde bekletildi.
2. 3ml DMEM/kollejenaz I + 10 ul DNase I solüsyonu içerisinde 120 rpm, 33 °C’de 15 dk boyunca seminifer tübüller ayrışana kadar inkübatörlü karıştırıcı içerisinde inkübe edildi.
3. 15ml konik tüp dikey olarak oda ısında 2 dk bekletilip süpernatant kısmı ayrılıp saklandı (Bu kısım somatik hücre bakımından zengin).
4. Kalan kısım 2 ml DMEM/kollejenaz I + 10 ul DNase I + 50 ul Tripsin solüsyonu içerisinde 1000 ul’lik mikropipet ile 10 defa tritüre edildikten sonra 120 rpm, 33°C’de 15 dk boyunca inkübatörlü karıştırıcı içerisinde inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrası 1000 µl’lik mikropipet ile 10 defa tritürasyon yapıldı.
6. Tritürasyon sonrası üzerine 10 µl DNase I + 30 µl Tripsin solüsyonu eklenerek 33 °C’de 15 dk inkübe edildi.
7. İnkübasyon sonrası 200 µl’lik mikropipet ile 10 defa tritürasyon yapıldı.
8. Tritürasyon sonrası elde edilen hücre süspansiyonu 100 µm’lik hücre ayrıştırıcısından (cell strainer) geçirildi. Böylece hücre süspansiyonu hücre dışı birikinti ve kümeleşmiş hücrelerden ayrıştırılmış oldu.
9. Hücre süspansiyonunun üstüne 400 µl FBS eklenerek 200 µl’lik mikropipet ile 10 defa tritürasyon yapıldı.
10. Son olarak hücre süspansiyonu 40 µm’lik hücre ayrıştırıcısından geçirilerek buz üstünde 30-60 dk arasında bekletilerek FACS analizi için hazır hale getirildi.
11. Hücreler canlılığını koruduğu için Hoechst ile nükleuslar işaretlenerek analize başlandı.

Akım sitometrisi cihazının (BD Biosciences, BD Influx™ Cell Sorter with Bioprotect IV Safety Cabinet) lazer kalibrasyonu için 8 boyalı parlak floresan ışımaya veren boncuklar (BD Biosciences, BD Rainbow Calibration Particles 8 peaks, 559123), hücre ayrıştırma (sort) kalibrasyonu için parlak floresan ışımaya veren boncuklar (BD Biosciences, BD FACS AccuDrop

Beads, 345249) kullanıldı. Polipropilen tüpler (Corning Inc., 352002) içerisindeki hücre süspansiyonları akım sitometrisi cihazına yüklendi. Örneklerdeki GFP sinyalinin otofloresan ışımalardan ayırt edilebilmesi için negatif kontrol (C57BL/6) ve pozitif kontrol (C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)) hayvanlara ait hücre örnekleri kullanıldı.

Örneklerdeki hücre çiftleri ve hücre kümelerinin analiz dışı bırakılması (doublet and multiplet discrimination) için sırasıyla Side Scattered-W (SSC-W)/SSC-H değerlendirmesi ve Forward Scattered-W (FSC-W)/FSC-H değerlendirmesi yapılarak yalnızca tekli hücreler elde edildi. Hücre süspansiyonlarının hazırlık aşamaları sırasında fiziksel ve kimyasal etkilere bağlı olarak parçalanmış hücrelerden açığa çıkan hücre artıklarının tespit edilmesi amacıyla büyüklükleri hücrelerden küçük olan partiküller FSC/SSC değerlendirmesi yapılarak analiz dışı bırakıldı. Akım sitometrisi analizi sırasında örnekler içerisindeki hücre dışı partiküllerin analiz dışında bırakılması için yalnızca nükleusları Hoechst ile işaretlenmiş olan hücreler alt grup olarak seçilerek daha sonraki incelemeler bu hücreler içerisinde yapıldı. Analiz sırasında aynı anda Hoechst ve GFP sinyali veren GFP+ hücreler 460/40[355]/FSC ve 530/40[488]/FSC değerlendirmeleriyle alt kapılara (gate) alınarak gruplandırıldı. Gruplanan hücreler, anne sütü yoluyla yavruya geçen GFP+ hücreler olarak belirlendi. Grafikte orta hatta yoğunlaşmış hücreler otofloresans hücre grubu olarak belirlenip üstünde kalan alt kapıdaki bütün hücreler GFP+ hücre olarak kabul edildi. Belirlenen hücrelerin (20.000 hücre) tüm hücre popülasyonu içerisindeki oranları istatistiksel olarak belirlendi. Hücrelerin mikroskopik olarak incelenmesi için belirlenen hücreler tüm hücre süspansiyonu içerisinde ayrı bir tüpe sort edilerek alındı.

## **5.6 Mikroskopik İnceleme**

FACS sonrası elde edilen hücreler, testis dokusuna ait kalın kesitler ve total testis dokusu farklı metodlar ile hazırlanarak GFP+ kimerik hücrelerin varlığı lazer taramalı konfokal mikroskop ve lightsheet mikroskobu ile incelendi.

### **5.6.1 Akım sitometrisi sonrası elde edilen hücrelerin konfokal mikroskopik incelenmesi**

Akım sitometrisi yönteminde FACS cihazı ile ayrılan GFP+ hücreler lazer taramalı konfokal mikroskobu ile görüntülendi. FACS sonrası ayrılan hücreler %2 PFA (paraformaldehit) ile 3 saat fikse edildi. Fikse edilen hücre popülasyonu 5 mM kakodilat tamponu içerisinde 2 x10 dakika olacak şekilde yıkandıktan sonra aynı tampon içerisinde +4 °C’de saklandı. Bütün gruplara ait hücre popülasyonlarından alınan örnekler cam tabanlı hücre kültürü kapları içerisine konularak Zeiss LSM 800 lazer taramalı konfokal mikroskobu (Carl Zeiss, Oberkochen, Almanya) ile incelendi.

### **5.6.2 Testis dokusundan alınan kalın kesitlerin konfokal mikroskopik incelenmesi**

Testis içerisinde farklılaşmış hücreleri ve hücrelerin bulundukları bölgedeki fenotiplerinin belirlenmesi amacıyla deney sonunda farelerden çıkarılan testis örneklerine doku şeffaflaştırma işlemi uygulandı. Böylece testis dokusu mikrotom ile ince kesitler almaya gerek olmadan vibratom ile 400 µm kalınlığında alınan kesitler üzerinden mikroskopik olarak incelendi. Farklı doku şeffaflaştırma teknikleri içerisinde uygulama kolaylığı, süresi ve immünohistokimyasal olarak boyanma kapasitesi için en uygun yöntem olan iDisco metodu kullanıldı (Azaripour ve ark., 2016).

Şeffaflaştırma işlemi için fareden çıkarılan testis dokusu uygun parçalara bölünerek %4'lük paraformaldehit içerisinde +4°C'de gece boyunca bekletildi. Fikse edilen doku oda sıcaklığında 3 kere 30 dk PBS ile yıkandı. Yıkama sonrası vibratom ile 400 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler sırası ile 1'er saat metanol serisinden (%20, %40, %60, %80, %100) geçirildikten sonra gece boyu %66 diklorometan/%33 metanol karışımında oda ısısında bekletildi. 2 kere %100 metanol ile yıkandıktan sonra %5'lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içerisinde gece boyu +4°C'de bekletilecektir. Sırası ile 1'er saat azalan metanol serisinden (%80, %60, %40, %20) geçirildikten sonra PBS içerisine alındı. İmmünohistokimyasal olarak boyama için örnekler permeabilizasyon solüsyonunda (0,1% Triton X-100 içeren 1 M sodyum borat tamponu) 37°C'de 1 gün tutuldu. Ardından bloklama solüsyonu içerisinde 37°C'de bir gün tutulduktan sonra primer antikor içerisinde uygun dilüsyonda 37°C'de 3 gün süreyle inkübe edildi. Ardından 1 gün boyunca PBS ile yıkandı. Bu işlemler floresan bağlı sekonder antikorlarla tekrar edildi. İmmünohistokimyasal olarak boyanan doku 1'er saat metanol serisinden (%20, %40, %60, %80, %100) geçirilerek gece boyu %100 metanol içerisinde tutuldu ve %66 diklorometan/%33 metanol karışımı içerisinde 3 saat bekletildi. Ardından %100'lük diklorometan içerisinde yıkandı. Dibenzil eter içerisine alınarak şeffaflaştırma işlemi tamamlanıp, mikroskopta incelenene kadar ağzı kapalı şişede hava ile temas etmeden saklandı. Testis dokusuna ait şeffaflaştırılmış kalın kesitler cam tabanlı kaplar içerisine konularak Zeiss LSM 880 lazer taramalı konfokal mikroskobu (Carl Zeiss, Oberkochen, Almanya) ile incelendi.

### **5.6.3 Testis dokusunun lightsheet mikroskobu ile incelenmesi**

Hem kalın doku kesitleri hem de total organ görüntülemeleri için uygun olan uDISCO protokolü, lightsheet mikroskobu ile total organ görüntülenmesi için uygun şeffaflaştırma metodu olarak seçildi (Pan ve ark., 2016). Çalışmamızda lightsheet mikroskobu ile görüntüleme yapacağımız bütün testis dokuları bu yöntem ile şeffaflaştırıldı.

Fareler, intrakardiyak perfüzyondan önce midazolam/medetomidin/fentanil üçlü kombinasyonu ile intraperitoneal enjeksiyonla derin anestezi altına alındı. Daha sonra fareler, oda sıcaklığında heparinize 0.1 M PBS (10 U/ml heparin, Ratiopharm) ile 5-10 dakika boyunca kan yıkanana kadar 100-125 mm Hg basınçta intrakardiyak olarak perfüze edildi ve 0.1 M PBS içinde %4 paraformaldehit (pH 7.4) ile 20 dakika boyunca perfüze edildi. Disekte edilen testis doku örnekleri 2 gün boyunca %4 paraformaldehit içinde +4°C'de postfiksasyon yapıldı. Daha sonra, dokular bir kez 5 dakika boyunca PBS ile yıkandı. Bütün testis içerisine solüsyonların daha iyi penetre olması için testis yüzeyindeki kalın tunika albuginea tabakası çıkarıldı. Tüm inkübasyon adımları, hafif dönüşlü veya sallama ile birlikte inkübatörlü çalkalayıcı içinde gerçekleştirildi. Tüm fare testisleri 15 ml tüpler (Eppendorf, 0030 119.401) içerisine alınıp metoda ait bütün basamaklar uygulandı. Örnekler karanlıkta bekletilmek için alüminyum folyo ile kaplandı.

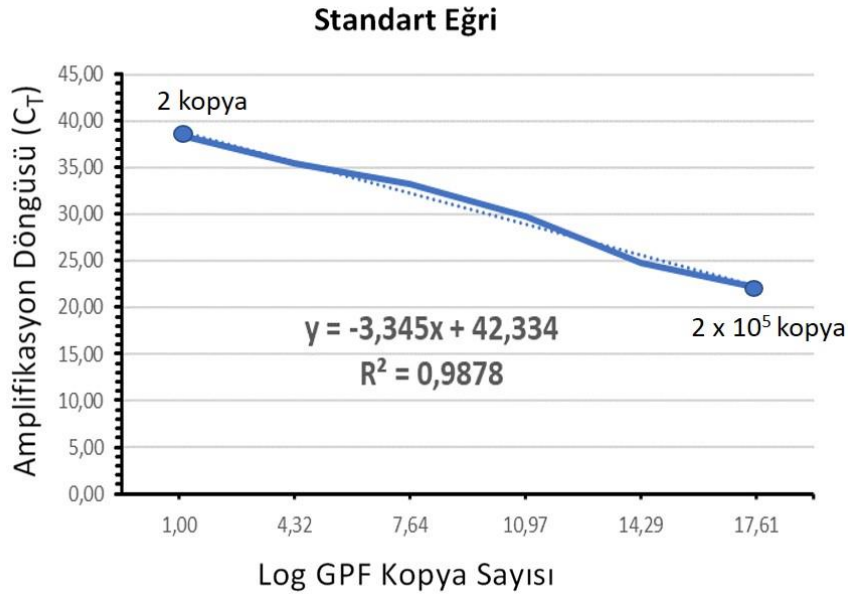
Şeffaflaştırma öncesi GFP+ kimerik hücreleri doğrulamak için anti-GFP antikoru ile immünohistokimyasal boyama yapıldı. Bu protokolda bir önceki kalın kesitler için uygulanan immünohistokimyasal boyama metodunun aynısı kullanıldı.

Şeffaflaştırma işlemi, 15 ml hacimde tert-bütanol (%30, %50, %70, %80, %90, %96 ve %100) içinde 34-35 °C'de yapılan ardışık inkübasyonlardan oluşur. Bu adımlar, dokuyu dehidre etmek için yapıldıktan sonra, lipidleri çıkarmak için oda sıcaklığında 45-60 dakika boyunca diklorometane içinde bekletildi. Son olarak, örnekler en az 2 saat boyunca oda sıcaklığında (benzil alkol+benzil benzoat 1 :2 ve difenil eter) BABB-D içinde inkübe edilerek şeffaf hale gelene kadar bekletildi. Örnekler, görüntülemeye kadar oda sıcaklığında karanlıkta BABB-D içinde saklandı.

## 6. BULGULAR

### 6.1 qPCR Sonuçları

Ardaşık konsantrasyonlu plazmidlerin (2 -200.000 kopya/ $\mu$ l) seyreltilip qPCR analizi sonucu elde edilen  $C_T$  değerleri ile standart eğri grafiği ve standart eğri denklemi oluşturuldu (şekil 13).



**şekil 13.** pEGFP-N3 plazmidi ile elde edilen standart eğri grafiği. Standart eğri denklemi :  $y = -3,345 \times + 42,334$ ; amplifikasyon etkinliği :  $R^2=0,9878$ .

Bütün deney gruplarına ait testis dokularından elde edilen DNA örneklerinin analiz sonrası belirlenen GFP  $C_T$  (y) verileri ile «  $y=-3,345 \times + 42,334$  » denkleminin kullanılmasıyla Log GFP kopya sayısı (x) hesaplandı. Her bir gruptaki örneklerin (n=6) ortalama  $C_T$  değerleri 3 tekrarlı analiz yapılarak belirlendi. Her gruba ait bir örnekteki 100 ng DNA içerisindeki kopya sayıları ve hücre sayıları belirlendi.

Negatif kontrol olarak kullanılan su ve normal fare DNA'sına ait örneklerde GFP  $C_T$  değeri, kopya sayısı ve GFP+ kimerik hücre sayısı 0 olarak ölçüldü. Bunun sonucunda negatif kontrol örneklerinde GFP+ kimerik hücre bulunmadı (Tablo 8).

Pozitif kontrol olarak kullanılan GFP+ fare DNA'sına ait örneklerde GFP  $C_T$  değeri  $25,23 \pm 1,7$  ; kopya sayısı  $5,11 \pm 0,5$  ve GFP+ kimerik hücre sayısı  $1,2 \times 10^6 \pm 1,4 \times 10^6$  olarak bulundu (Tablo 8).

7 Günlük Kontrol grubunda GFP C<sub>T</sub> değeri 38,11±0,3 ; kopya sayısı 1,26±0,1 ve GFP+ kimerik hücre sayısı 93±21 ; 30 Günlük Kontrol grubunda GFP C<sub>T</sub> değeri 37,13±0,5 ; kopya sayısı 1,55±0,1 ve GFP+ kimerik hücre sayısı 188±64 ; 60 Günlük Kontrol grubunda GFP C<sub>T</sub> değeri 38,71±0,6; kopya sayısı 1,08±0,2 ve GFP+ kimerik hücre sayısı 66±32 olarak bulundu. Busulfan grubunda GFP C<sub>T</sub> değeri 35,6±0,4 ; kopya sayısı 2,01±0,1 ve GFP+ kimerik hücre sayısı 533±147 ; IR grubunda GFP C<sub>T</sub> değeri 39,09±0,6 ; kopya sayısı 0,96±0,2 ve GFP+ kimerik hücre sayısı 49±17 olarak bulundu (Tablo 8).

**Tablo 8.** qPCR analizi sonuçları

| Örnek                                      | Ortalama C <sub>T</sub><br>GFP | Log Kopya<br>Sayısı<br>/100 ng | GFP+ kimerik<br>hücre sayısı<br>/100 ng  |
|--------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------------------|
| <b>Negatif kontrol: su</b>                 | -                              | -                              | -                                        |
| <b>Negatif kontrol: normal fare DNA'sı</b> | -                              | -                              | -                                        |
| <b>Pozitif kontrol: GFP+ fare DNA'sı</b>   | 25,23±1,7                      | 5,11±0,5                       | 1,2x10 <sup>6</sup> ±1,4x10 <sup>6</sup> |
| <b>7 Günlük Kontrol Grubu</b>              | 38,11±0,3                      | 1,26±0,1                       | 93±21                                    |
| <b>30 Günlük Kontrol Grubu</b>             | 37,13±0,5                      | 1,55±0,1                       | 188±64                                   |
| <b>60 Günlük Kontrol Grubu</b>             | 38,71±0,6                      | 1,08±0,2                       | 66±32                                    |
| <b>Busulfan Grubu</b>                      | 35,6±0,4                       | 2,01±0,1                       | 533±147                                  |
| <b>IR Grubu</b>                            | 39,09±0,6                      | 0,96±0,2                       | 49±17                                    |

Sonuçlar değerlendirildiğinde bütün gruplara ait farelerde GFP+ annenin sütünden geçen GFP+ kimerik hücre popülasyonları gözlemlendi. Testis dokusuna anne sütü kaynaklı hücre geçişi qPCR yöntemi ile bütün deney gruplarımızda değişik oranlarda gösterilmiş oldu. GFP+ kimerik hücre popülasyonları özellikle 30 Günlük Kontrol ve Busulfan gruplarında daha yoğun olarak gözlemlendi. Diğer deney gruplarımızda geçen hücre popülasyonunun oranı düşük olmasına rağmen tek bir hücrenin bile geçişi hipotezimizi doğrulamaktadır.

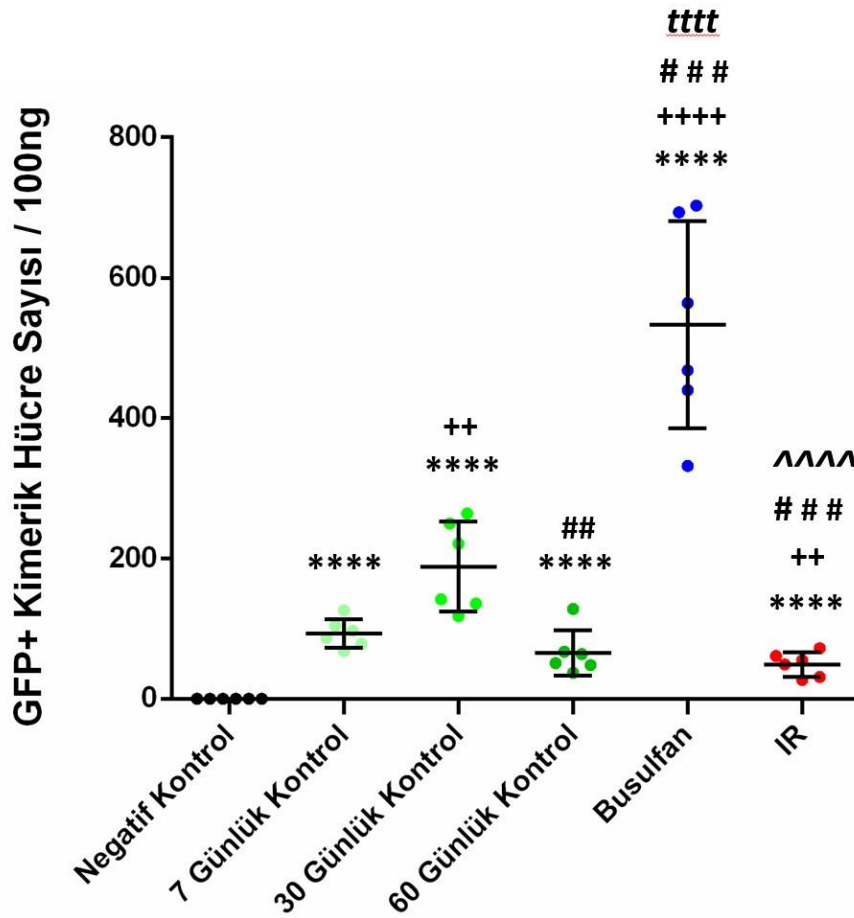
qPCR analizi sonucu elde ettiğimiz veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde GFP+ annenin sütünden geçen GFP+ kimerik hücre sayısı negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bütün deney gruplarında anlamlı şekilde arttı ( $p<0.0001$ ).

7 Günlük Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 30 Günlük Kontrol ( $p=0.006$ ) ve Busulfan gruplarında ( $p<0.0001$ ) anlamlı şekilde artarken IR grubunda ( $p=0.0025$ ) anlamlı şekilde

azaldı. 60 Günlük Kontrol grubunda ise anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi ( $p=0.11$ ), (Şekil 14).

30 Günlük Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 60 Günlük Kontrol ( $p=0.0018$ ) ve IR gruplarında ( $p=0.0004$ ) anlamlı şekilde azalırken Busulfan grubunda ( $p=0.0004$ ) anlamlı şekilde arttı (Şekil 14).

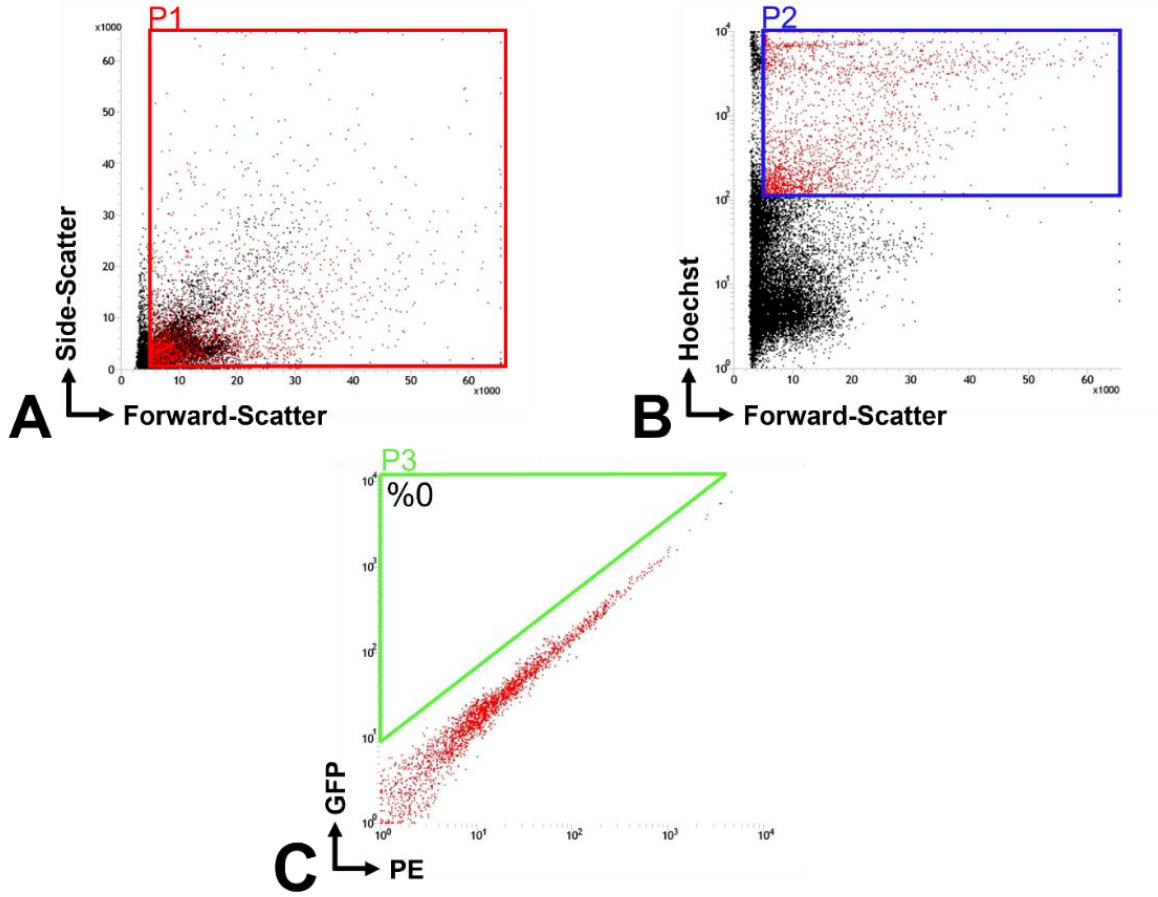
60 Günlük Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Busulfan grubu ( $p<0.0001$ ) anlamlı şekilde artarken IR grubunda anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi ( $p=0.295$ ). Busulfan grubu ile karşılaştırıldığında ise IR grubunda anlamlı bir azalma gözlemlendi ( $p<0.0001$ ), (Şekil 14).



**Şekil 14:** qPCR analizine göre deney gruplarındaki GFP+ kimerik hücrelerin sayısı. Negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında \*\*\*\*  $p<0.0001$ ; 7 Günlük Kontrol Grubu ile karşılaştırıldığında ++  $p<0.01$ , ++++  $p<0.0001$ ; 30 Günlük Kontrol Grubu ile karşılaştırıldığında ##  $p<0.01$ , ###  $p<0.001$ ; 60 Günlük Kontrol Grubu ile karşılaştırıldığında tttt  $p<0.0001$ ; Busulfan grubu ile karşılaştırıldığında ^^  $p<0.0001$

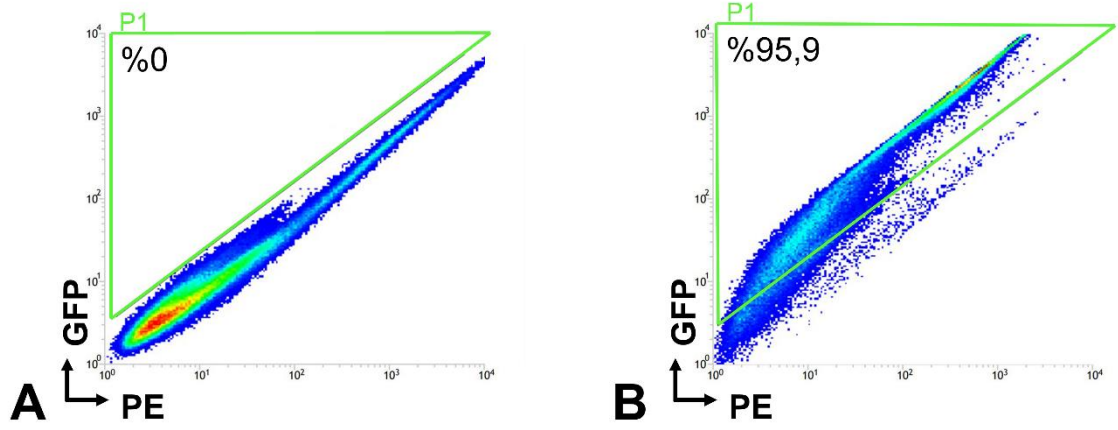
## 6.2 Akım Sitometrisi Analizi

Testis dokusu örneklerinde GFP+ kimerik hücrelerin tespiti için uygun kapılar belirlendi. Hatasız analiz yapılabilmesi için normal fare testis dokusu kullanılarak GFP+ hücre varlığının olmadığı kapı seçildi. Böylece deney gruplarında yapılan analizlerde bu kapı içerisinde bulunan GFP+ hücre popülasyonunun varlığının ispatlanması amaçlandı. Normal fare testis dokusu örneğinde bulunan hücre kümeleri ve hazırlık aşamasında hasar görmüş hücre artıkları Side Scattered/Forward Scattered değerlendirilerek analiz dışı bırakıldı (Şekil 15A). Örnek içerisindeki hücre dışı partiküllerin akım sitometrisi analizi sırasında analiz dışı tutmak için Hoechst ile çekirdekleri işaretli hücreler alt grup olarak seçildi (Şekil 15B). Daha sonra yapılan incelemeler Hoechst ile işaretlenmiş alt gruptaki hücre popülasyonu içerisinde yapıldı. En son seçilen kapıdaki hücre grubu hem GFP+ hücrelerin ayırt edilebilmesi için 488 nm dalga boyunda hem de başka dalga boyunda ışımaya veren hücrelerin tayini için phycoerythrin (PE) kanalından (561 nm) analiz yapıldı. Aynı anda iki farklı dalga boyu ile ışımaya yapan hücre popülasyonu, analiz sonucunda grafikte orta hatta yoğunlaşmış hücre grubu olarak belirlenip otofloresans ışımaya yapan hücreler olarak tanımlandı. Bu otofloresans ışımaya yapan hücre grubunun üstünde kalan alt kapıdaki bütün hücreler GFP+ hücre olarak kabul edildi. Uygun kapıyı belirlemek için kullanılan örnek normal fare testis dokusuna ait olduğu için seçilen kapıda GFP+ hücre popülasyonu (%0) gözlenmedi (Şekil 15C).



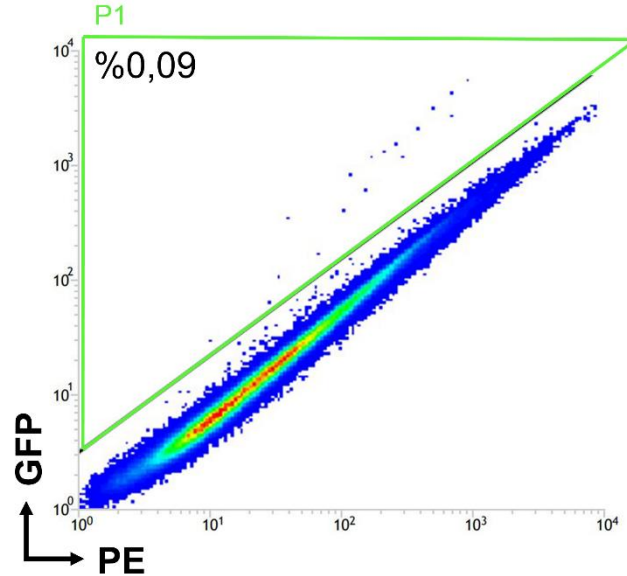
**Şekil 15.** GFP+ hücre analizi için gerekli olan kapıların seçilmesi. Normal farelerden alınan testis doku örnekleri içerisindeki tüm yapılar SSC-FSC grafiğinde görülmektedir. P1 bölgesi çok büyük hücre kümelenmeleri ve çok küçük partiküller dışındaki yapıları içermektedir (A). Grafikte görülen P2 bölgesi nükleusları Hoechst ile boyanan hücreleri göstermektedir (B). Grafiğin orta hattında yer alan yoğun alan otofloresan hücre topluluğunu, üstünde yer alan P3 bölgesi ise GFP+ hücrelerin bulunduğu alanı göstermektedir (C).

Negatif kontrol için normal ve pozitif kontrol için GFP+ fareye ait testis hücre süspansiyonlarının analizi yapıldı. Normal fareye ait testis hücre süspansiyonunun analizinde %0 oranında GFP+ hücre popülasyonu (Şekil 16A), GFP+ fareye ait testis hücre süspansiyonunun analizinde ise %95,9 oranında GFP+ hücre popülasyonu (Şekil 16B) elde edildi. Elde edilen bu oranlar seçilen kapıların ve analizin doğruluğunu ispatlamaktadır.

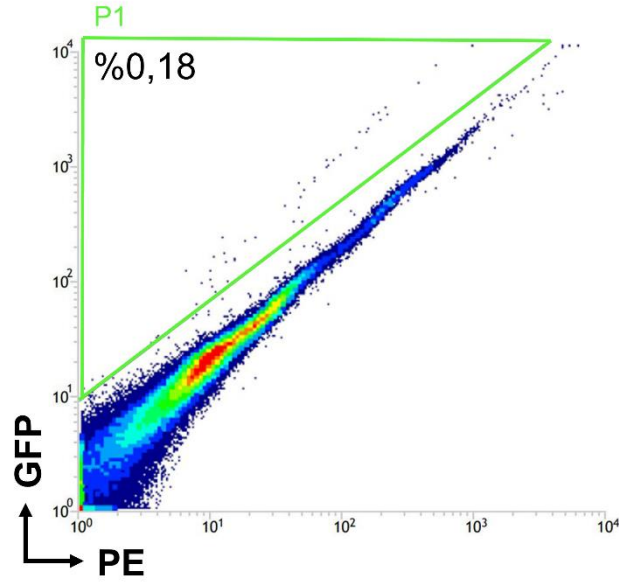


**Şekil 16.** Negatif ve pozitif kontrol testis dokularının akım sitometrisi analizi. Normal farelerden alınan testis doku örneği analizinde P1 bölgesi GFP+ hücre içermemektedir (A). GFP+ farelerden alınan testis doku örneği analizinde P1 bölgesi GFP+ hücreleri içermektedir (B).

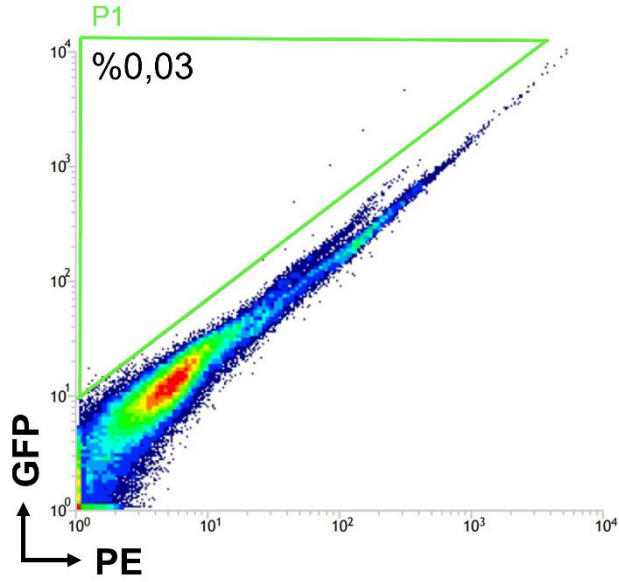
GFP+ anneden süt emmiş 7 Günlük Kontrol grubuna ait testis hücre süspansiyonunun analizinde %0,09 oranında GFP+ hücre popülasyonu (Şekil 17), 30 Günlük Kontrol grubuna ait testis hücre süspansiyonunun analizinde %0,18 oranında GFP+ hücre popülasyonu (Şekil 18) ve 60 Günlük Kontrol grubuna ait testis hücre süspansiyonunun analizinde %0,03 oranında GFP+ hücre popülasyonu (Şekil 19) elde edildi.



**Şekil 17.** 7 Günlük Kontrol grubuna ait testis dokusunun akım sitometrisi analizi. P1 bölgesi GFP+ hücreleri içermektedir.

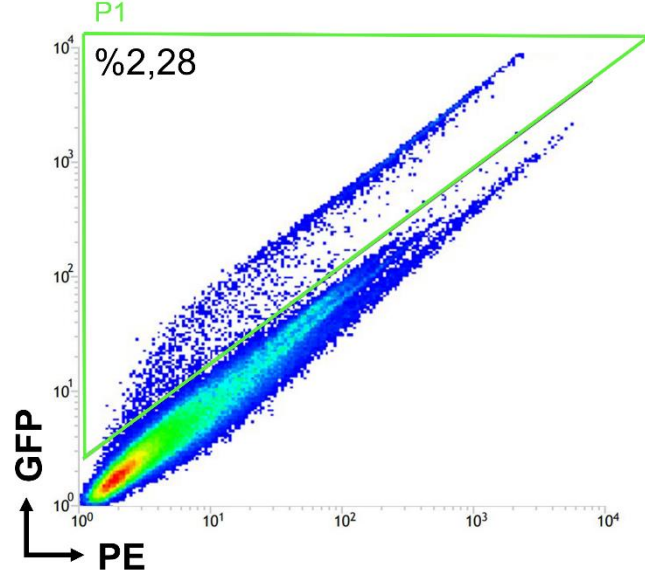


**Şekil 18.** 30 Günlük Kontrol grubuna ait testis dokusunun akım sitometrisi analizi. P1 bölgesi GFP+ hücreleri içermektedir.

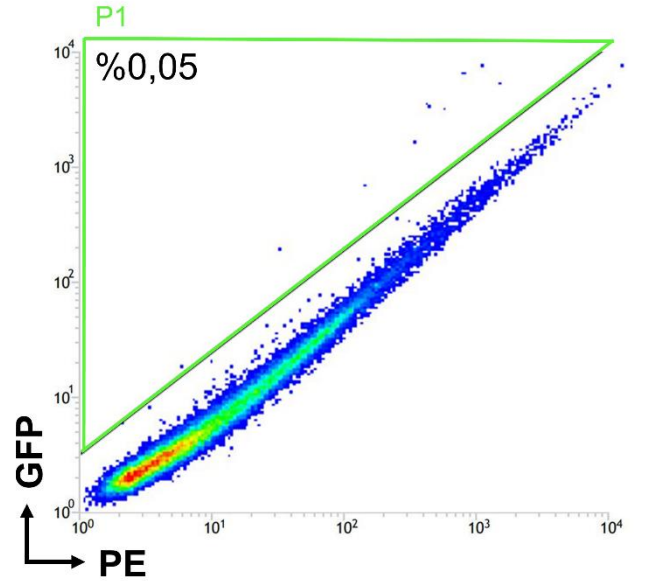


**Şekil 19.** 60 Günlük Kontrol grubuna ait testis dokusunun akım sitometrisi analizi. P1 bölgesi GFP+ hücreleri içermektedir.

GFP+ anneden süt emmiş farelere kimyasal ve fiziksel hasar modelleri uygulandı. Busulfan grubuna ait testis hücre süspansiyonunun analizinde %2,28 oranında GFP+ hücre popülasyonu (Şekil 20), İskemi grubuna ait testis hücre süspansiyonunun analizinde %0,05 oranında GFP+ hücre popülasyonu (Şekil 21) elde edildi.



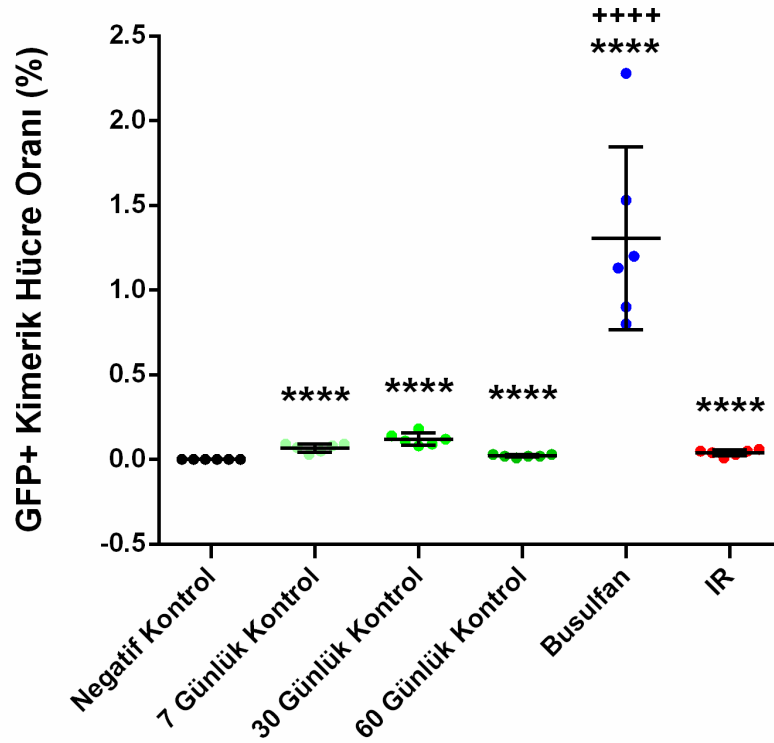
**Şekil 20.** Busulfan grubuna ait testis dokusunun akım sitometrisi analizi. P1 bölgesi GFP+ hücreleri içermektedir.



**Şekil 21.** IR grubuna ait testis dokusunun akım sitometrisi analizi. P1 bölgesi GFP+ hücreleri içermektedir.

Sonuçlar değerlendirildiğinde bütün deney gruplarında GFP+ annenin sütünden testis dokusuna geçen GFP+ kimerik hücreler gözlemlendi. 7, 30 ve 60 Günlük Kontrol gruplarında düşük popülasyonda GFP+ kimerik hücreler gözlemlendi. Kontrol grupları içerisinde 30 Günlük Kontrol grubunda daha fazla GFP+ kimerik hücre popülasyonunun varlığında artış gözlemlendi. Busulfan hasar grubunda ise GFP+ kimerik hücre sayısında belirgin bir artış gözlemlendi. IR grubunda ise çok düşük GFP+ kimerik hücre popülasyonunun varlığı tespit edildi. Sonuç olarak testis dokusuna anne sütü kaynaklı hücre geçişi akım sitometrisi yöntemi ile farklı gruplarda değişik oranlarda gösterilmiş oldu. Geçen hücre popülasyonunun oranı düşük olmasına rağmen tek bir hücrenin bile geçişi hipotezimizi doğrulamaktadır.

Akım sitometrisi analizi sonucu elde ettiğimiz veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde GFP+ annenin sütünden geçen GFP+ kimerik hücre sayısı negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bütün deney gruplarında anlamlı şekilde arttı ( $p<0.0001$ ). Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında ise Busulfan grubunda anlamlı bir artış gözlemlendi ( $p<0.0001$ ). Diğer deney grupları ise kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi (Şekil 22).



**Şekil 22.** Akım sitometrisi analizine göre deney gruplarındaki GFP+ kimerik hücrelerin oranı. Negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında \*\*\*\*  $p<0.0001$  ; Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında ++++  $p<0.0001$ .

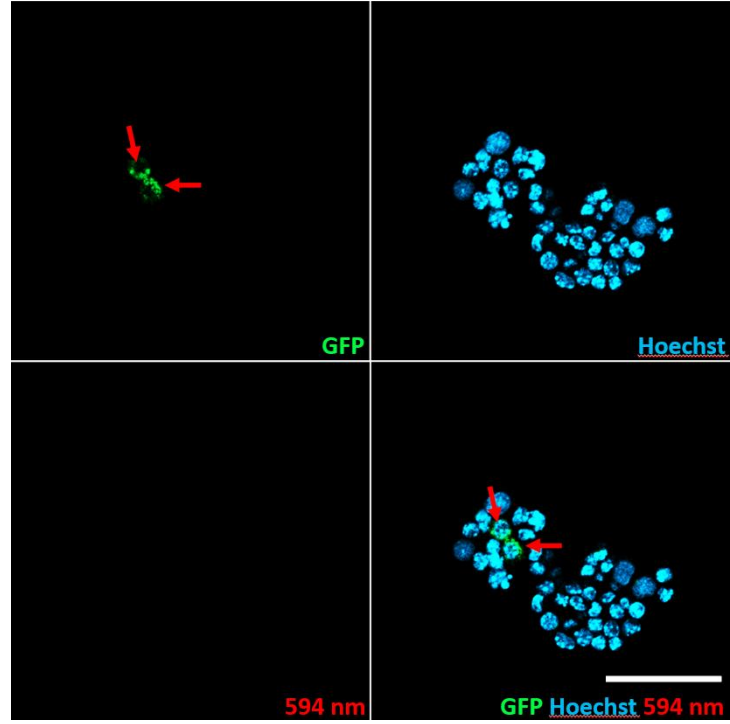
Akım sitometrisi analizine göre deney gruplarındaki GFP+ kimerik hücrelerin oranı 7 Günlük Kontrol grubunda  $0,0711 \pm 0,02$  ; 30 Günlük Kontrol grubunda  $0,12 \pm 0,04$  ; 60 Günlük Kontrol grubunda  $0,02 \pm 0,01$ ; Busulfan grubunda  $1,3 \pm 0,5$  ve IR grubunda  $0,04 \pm 0,02$  olarak bulundu.

### **6.3 Mikroskopik Bulgular**

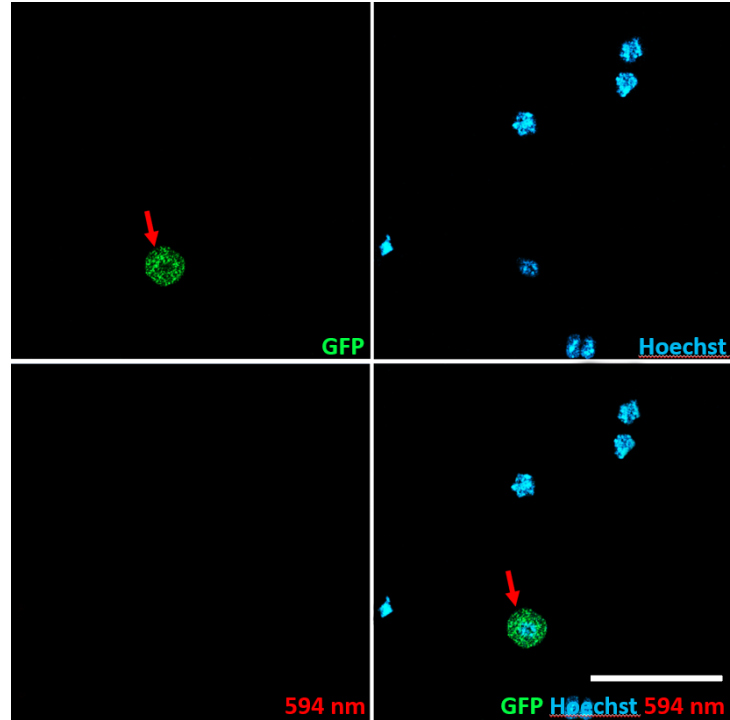
#### **6.3.1 Akım sitometrisi ile elde edilen hücrelerin konfokal mikroskopi bulguları**

Testis dokusu örneklerinde akım sitometrisi analizi sonrası belirlenen GFP+ kimerik hücreler FACS cihazı ile ayrıldı. Konfokal mikroskop ile yapılan incelemelerde ayrılan hücre popülasyonunun çekirdek boyası Hoechst ile işaretli olduğu ve az sayıda GFP+ kimerik hücreler içerdiği gözlemlendi. GFP+ kimerik hücreler konfokal mikroskopunda farklı bir dalga boyu (594 nm) ile uyarılarak otofloresan ışımaya yapıp yapmadığı kontrol edildi. Bütün gruplara ait örneklerdeki GFP+ kimerik hücrelerde otofloresan ışımaya gözlenmedi. Böylece GFP+ hücrelerin sadece GFP eksprese eden kimerik hücreler olduğu doğrulandı.

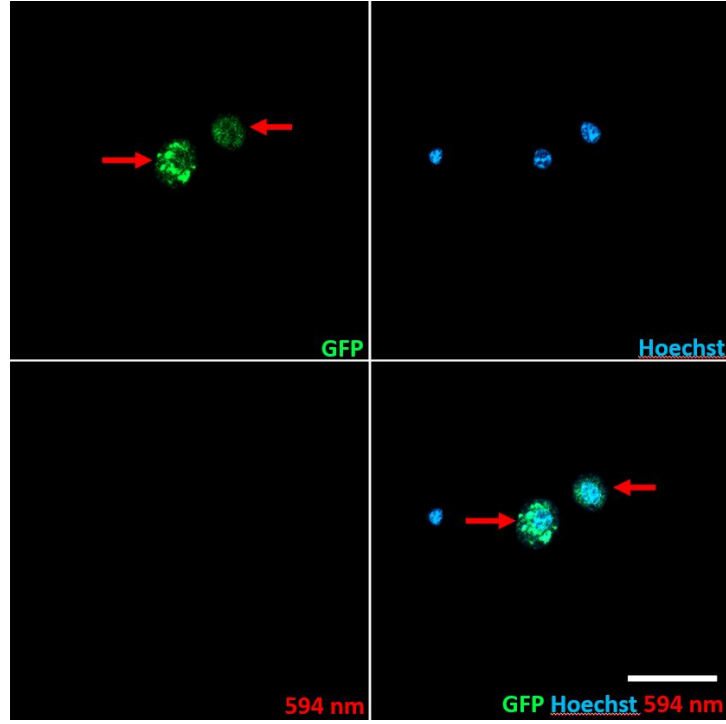
7 Gün, 30 Gün, 60 Gün Kontrol ve IR grubunda GFP+ kimerik hücre oranı düşük olduğundan dolayı konfokal mikroskopik incelemelerde her bir grupta daha az sayıda GFP+ kimerik hücre varlığına rastlandı (Şekil 23,24,25,27). Akım sitometrisi analizi sonuçlarında GFP+ kimerik hücre oranı fazla bulunan Busulfan grubunda ayrılan hücrelerin konfokal mikroskopik incelemesinde de daha fazla GFP+ kimerik hücreler gözlemlendi (Şekil 26). Akım sitometrisi analizi sonrası elde edilen konfokal mikroskopik görüntüler ile GFP+ kimerik hücrelerin varlığı doğrulandı.



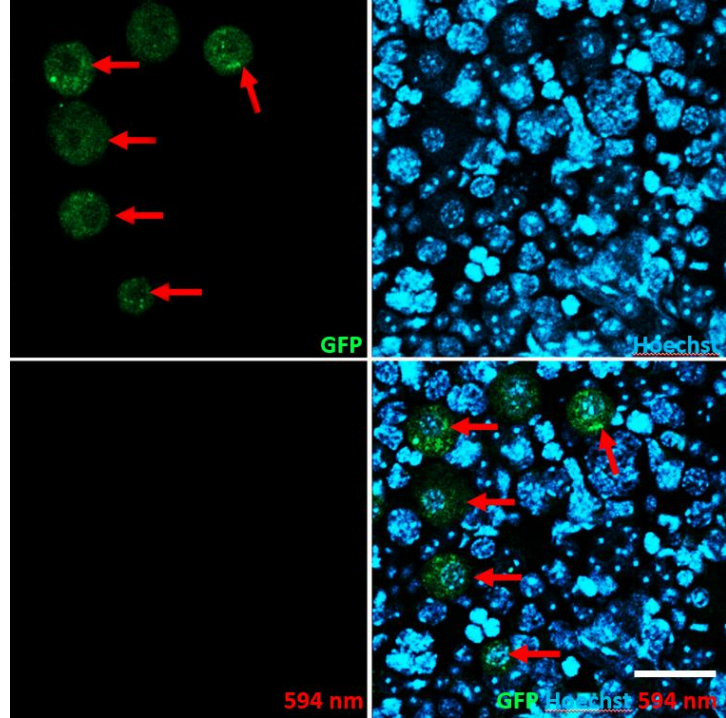
**Şekil 23.** 7 Günlük Kontrol grubunda akım sitometrisi analizi sonrası elde edilen hücrelerin konfokal mikroskopik görüntüsü. Hem çekirdeği boyalı (mavi) hem de GFP (yeşil) ışıması yapan GFP+ kimerik hücreler (ok) görülmektedir. 594 nm dalga boyunda otofloresan ışıma görülmemektedir. Bar : 50µm



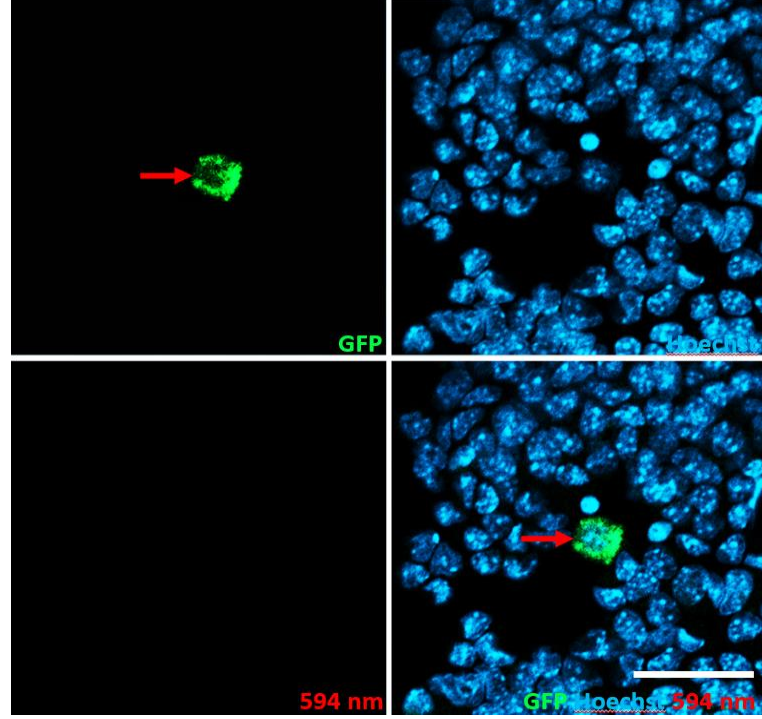
**Şekil 24.** 30 Günlük Kontrol grubunda akım sitometrisi analizi sonrası elde edilen hücrelerin konfokal mikroskopik görüntüsü. Hem çekirdeği boyalı (mavi) hem de GFP (yeşil) ışıması yapan GFP+ kimerik hücre (ok) görülmektedir. 594 nm dalga boyunda otofloresan ışıma görülmemektedir. Bar : 50µm



**Şekil 25.** 60 Günlük Kontrol grubunda akım sitometrisi analizi sonrası elde edilen hücrelerin konfokal mikroskopik görüntüsü. Hem çekirdeği boyalı (mavi) hem de GFP (yeşil) ışınması yapan GFP+ kimerik hücreler (ok) görülmektedir. 594 nm dalga boyunda otofloresan ışınma görülmemektedir. Bar: 20µm



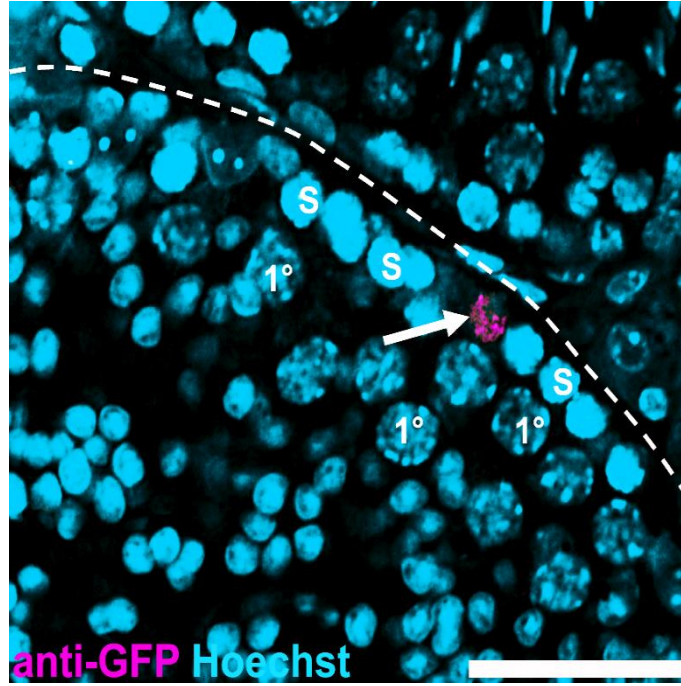
**Şekil 26.** Busulfan grubunda akım sitometrisi analizi sonrası elde edilen hücrelerin konfokal mikroskopik görüntüsü. Hem çekirdeği boyalı (mavi) hem de GFP (yeşil) ışınması yapan GFP+ kimerik hücreler (ok) görülmektedir. 594 nm dalga boyunda otofloresan ışınma görülmemektedir. Bar : 20µm



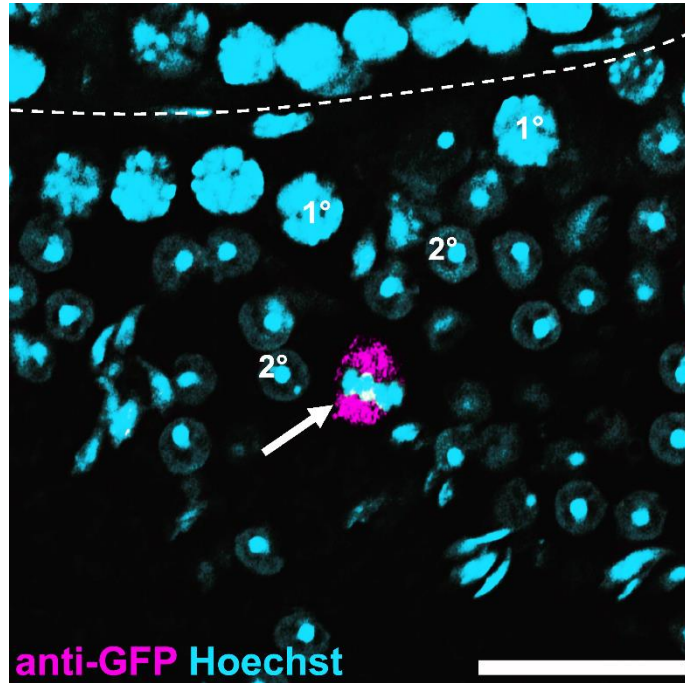
**Şekil 27.** IR grubunda akım sitometrisi analizi sonrası elde edilen hücrelerin konfokal mikroskopik görüntüsü. Hem çekirdeği boyalı (mavi) hem de GFP (yeşil) ışınması yapan GFP+ kimerik hücre (ok) görülmektedir. 594 nm dalga boyunda otofloresan ışınma görülmemektedir. Bar : 50µm

### 6.3.2 Testis doku örneklerinin konfokal mikroskopi bulguları

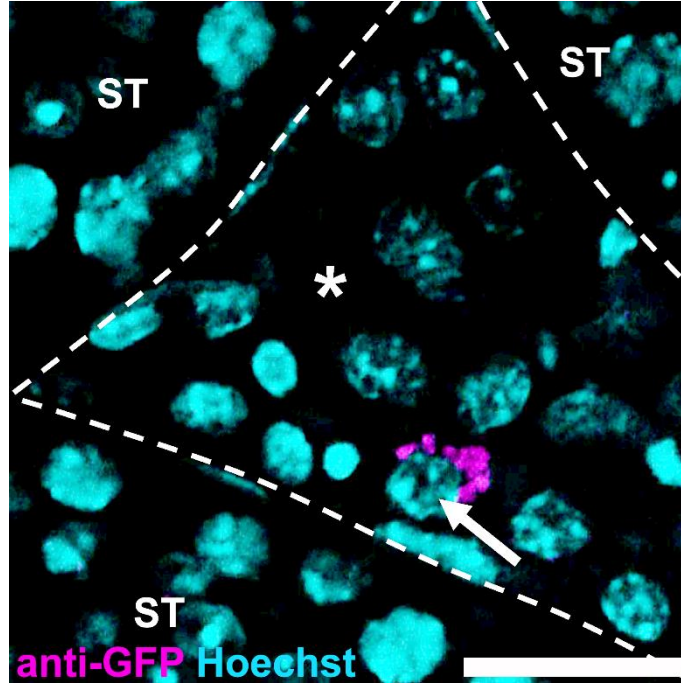
400 µm' lik kalın testis dokusu örneklerinin şeffaflaştırılması sonucunda konfokal mikroskobu ile görüntülendi. GFP+ anneler tarafından emzirilen yavrulara ait testis dokularında anti-GFP işaretlemesi ile doğrulanan GFP+ kimerik hücrelerin farklı hücre tiplerine testis dokusunun farklı bölgelerine yerleştikleri gözlemlendi. Hoechst ile boyanan çekirdeklerin yardımıyla genel testis morfolojisi belirlenip seminifer tübüllerin sınırları belirlendi. Yapılan incelemelerde 30 Günlük Kontrol grubunda GFP+ kimerik hücrelerin seminifer tübülün bazal kompartmanında spermatogonyumların arasına yerleştiği gözlemlendi (Şekil 28). Busulfan grubunda ise GFP+ kimerik hücre seminifer tübül içerisinde germinal epitelin lümenal kompartmanında gözlemlendi. Kimerik hücre bu pozisyonunda bölünme aşamasında yakalanarak bölünebilen aktif hücre özelliğinde olduğu belirlendi (Şekil 29). Busulfan grubuna ait başka bir örnekte ise GFP+ kimerik hücre seminifer tübüller arasında lokalize olan intersitisyel bağ doku içerisinde gözlemlendi (Şekil 30).



**Şekil 28.** 30 Günlük Kontrol grubuna ait testis dokusundan alınan konfokal mikroskobu görüntüsü. Seminifer tübüllerin bazal kısmı beyaz kesikli çizgiler ile belirlenmiştir. Hoechst işaretli bütün çekirdekler (mavi) genel morfolojinin anlaşılmasını sağlamaktadır. Seminifer tübül içerisinde bazal kompartmanda GFP+ kimerik hücre (ok) görülmektedir. S: spermatogonya, 1°: primer spermatosit. Bar : 50µm



**Şekil 29.** Busulfan grubuna ait testis dokusundan alınan konfokal mikroskobu görüntüsü. Seminifer tübüllerin bazal kısmı beyaz kesikli çizgiler ile belirlenmiştir. Hoechst işaretli bütün çekirdekler (mavi) genel morfolojinin anlaşılmasını sağlamaktadır. Seminifer tübül içerisinde lüminal kompartmanda bölünen GFP+ kimerik hücre (ok) görülmektedir. 1°: primer spermatosit, 2°: sekonder spermatosit. Bar : 50µm

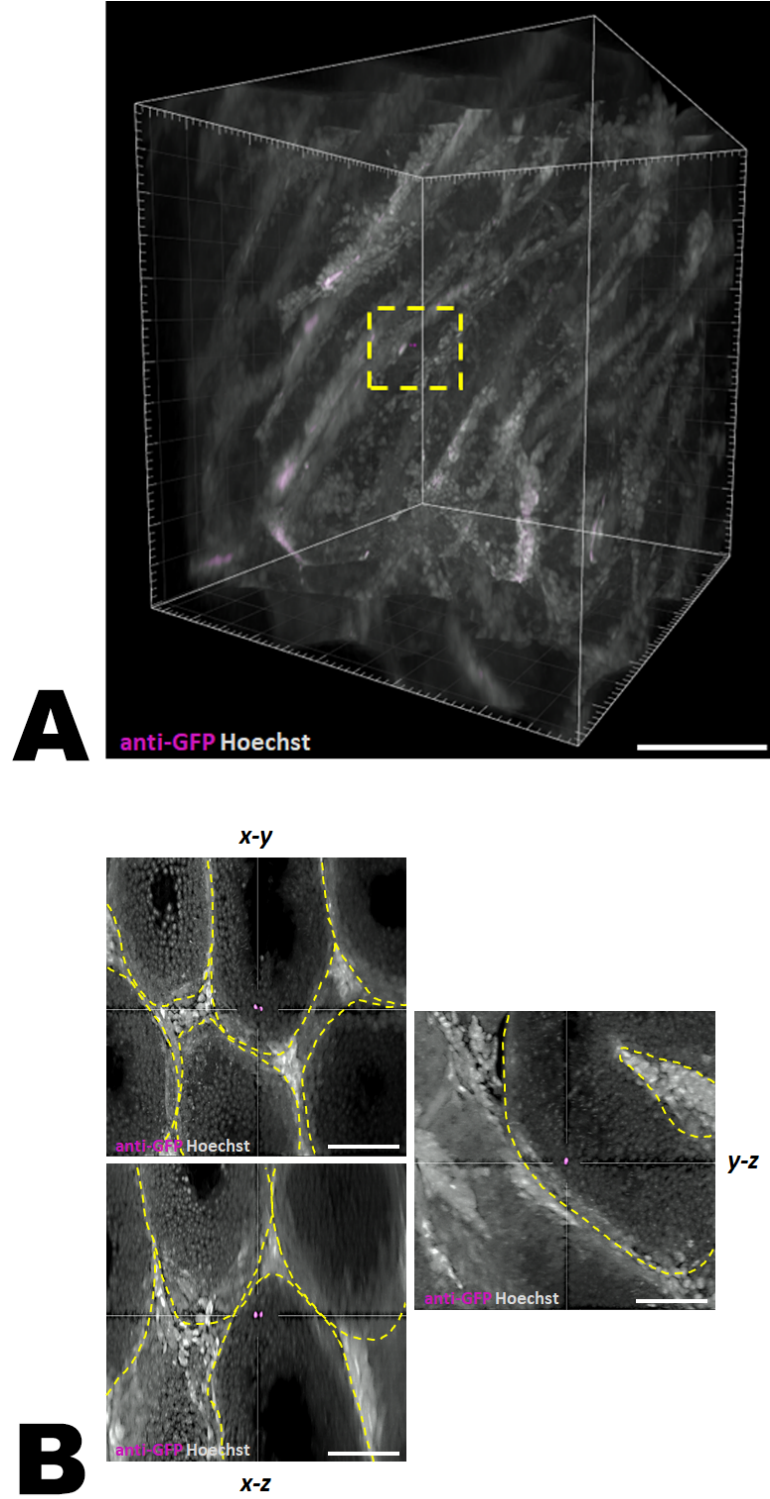


**Şekil 30.** Busulfan grubuna ait testis dokusundan alınan konfokal mikroskobu görüntüsü. Seminifer tübüllerin bazal kısmı beyaz kesikli çizgiler ile belirlenmiştir. Hoechst işaretli bütün çekirdekler (mavi) genel morfolojinin anlaşılmasını sağlamaktadır İntersitisyel bağ dokusu içerisinde GFP+ kimerik hücre (ok) görülmektedir. \*: interstisyel bağ dokusu, ST : seminifer tübül. Bar : 50µm

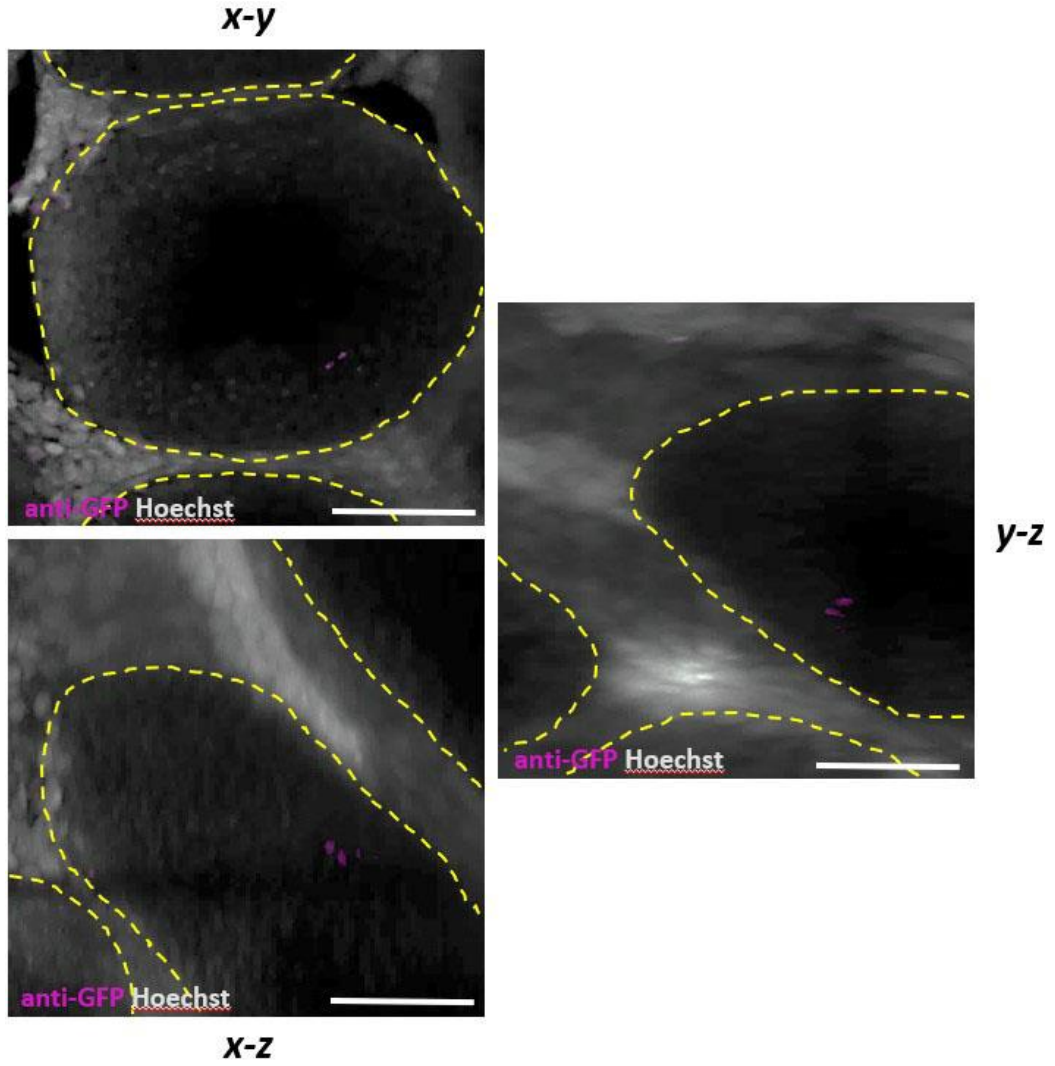
### 6.3.3 Testis doku örneklerinin lightsheet mikroskobu bulguları

qPCR ve akım sitometrisi bulgularının desteklediği gibi GFP+ kimerik hücre varlığı en çok 30 Günlük Kontrol ve Busulfan gruplarında gösterildi. Tüm mikroskobik analizlerde bu gruplarda GFP+ kimerik hücre varlığı daha kolay tespit edildi.

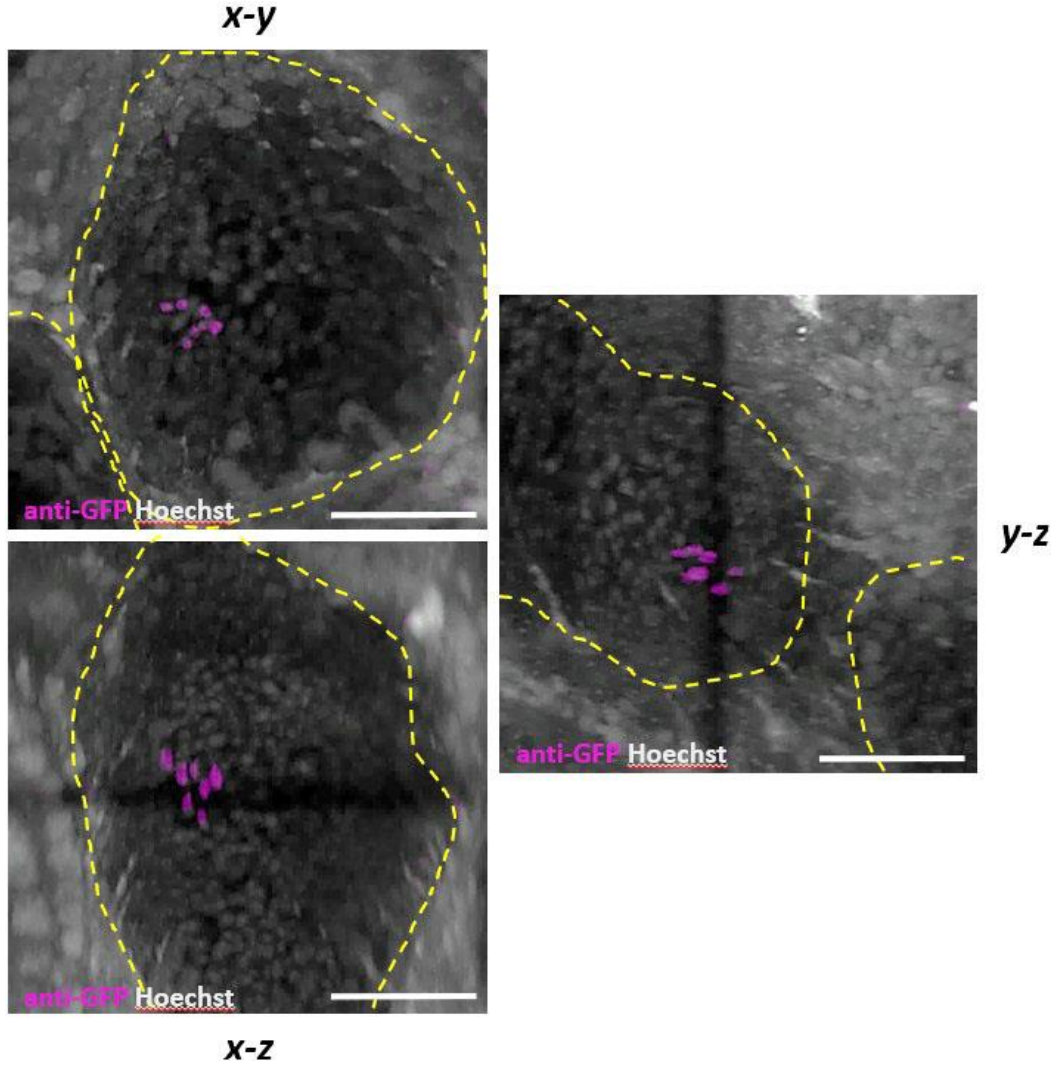
30 Günlük Kontrol grubunda lightsheet mikroskobu ile bütün testis dokusunun görüntüsü alınarak 3 boyutlu görüntü analizi yapıldı. Yapılan analiz sonucunda farklı lokasyonlarda GFP+ kimerik hücre popülasyonu gözlemlendi (Şekil 31A). Alınan görüntü daha büyük büyütmede incelenmesinde seminifer tübül içerisinde germinal epitelin orta sırasında konumlu 2 adet GFP+ kimerik hücre gözlenip x, y, z ekseninde görüntüleri alındı. (Şekil 31B). Başka lokasyonlarda seminifer tübül içerisinde germinal epitelin farklı seviyelerine yerleşmiş 7 adet (Şekil 32) ve 2 adet (Şekil 33) annesütü kaynaklı GFP+ kimerik hücreler görüldü.



**Şekil 31.** 30 Günlük Kontrol grubuna ait testis dokusundan alınan lightsheet mikroskobu görüntüsü. Lightsheet mikroskobu ile alınan 3 boyutlu görüntüde sarı ile işaretli alan içerisinde annesütü kaynaklı testis dokusuna yerleşen anti-GFP işaretli (pembe) GFP+ mikrokimerik hücreler görülmektedir. Bar : 200µm (A). 3 boyutlu görüntü üzerinden seçilen alana ait görüntüde seminifer tübüllerin bazal kısmı sarı kesikli çizgiler ile belirlenmiştir. Orta alanda bulunan seminifer tübül içerisinde germinal epitelin orta seviyesine yerleşik iki adet anti-GFP işaretli (pembe) GFP+ kimerik hücrelerin x, y ve z eksenindeki görüntüsü görülmektedir. Hoechst işaretli bütün çekirdekler gri renkte görülmektedir. Bar : 50µm (B).

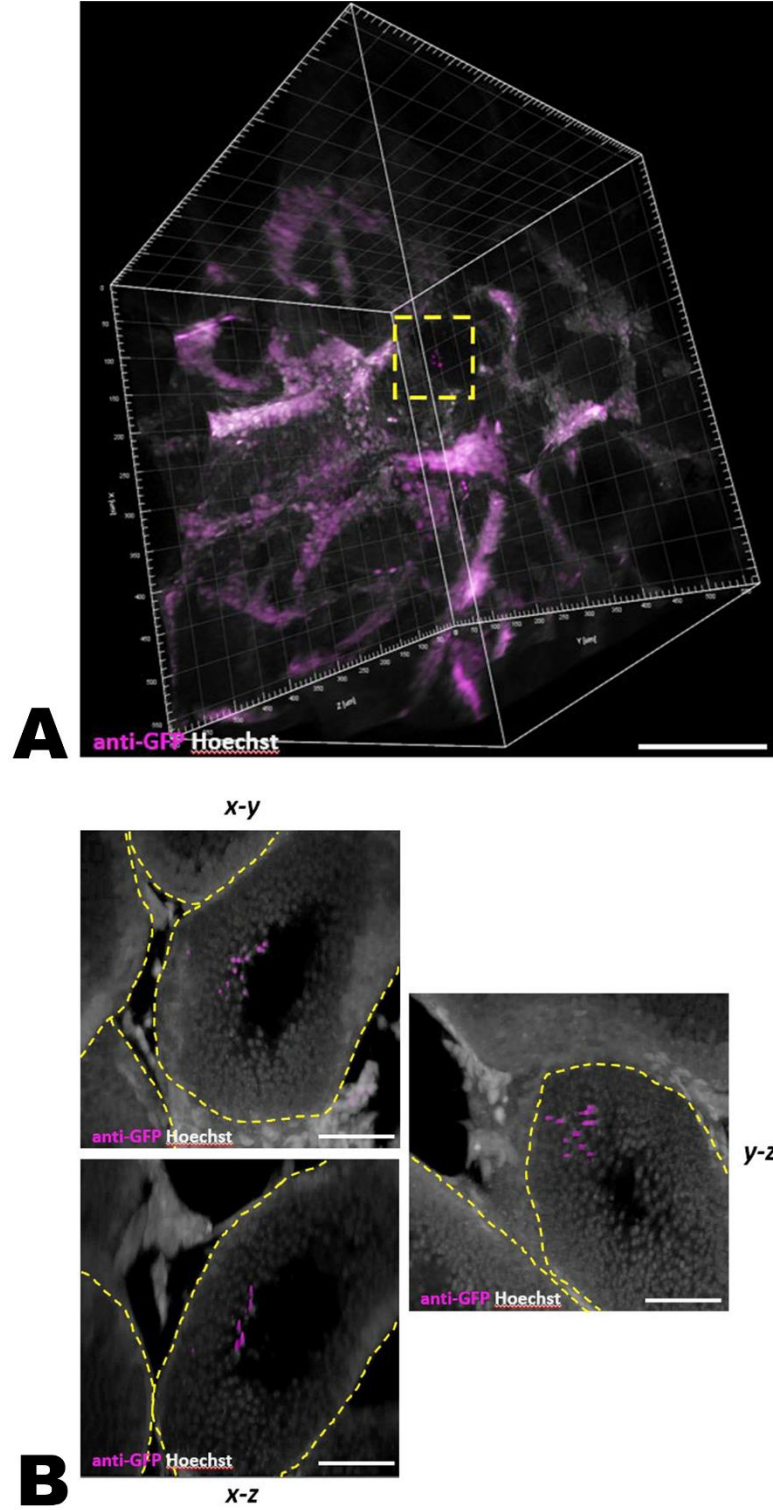


**Şekil 32.** 30 Günlük Kontrol grubuna ait testis dokusundan alınan lightsheet mikroskobu görüntüsü. Lightsheet mikroskobu ile alınan 3 boyutlu görüntü üzerinden seçilen alana ait görüntüde seminifer tübüllerin bazal kısmı sarı kesikli çizgiler ile belirlenmiştir. Hoechst işaretli bütün çekirdekler (gri) genel morfolojinin anlaşılmasını sağlamaktadır. Seminifer tübül içerisinde germinal epitelin lümene yakın bölgesine yerleşik iki adet anti-GFP işaretli (pembe) GFP+ kimerik hücrelerin x, y ve z eksenindeki görüntüsü görülmektedir. Bar : 100µm.

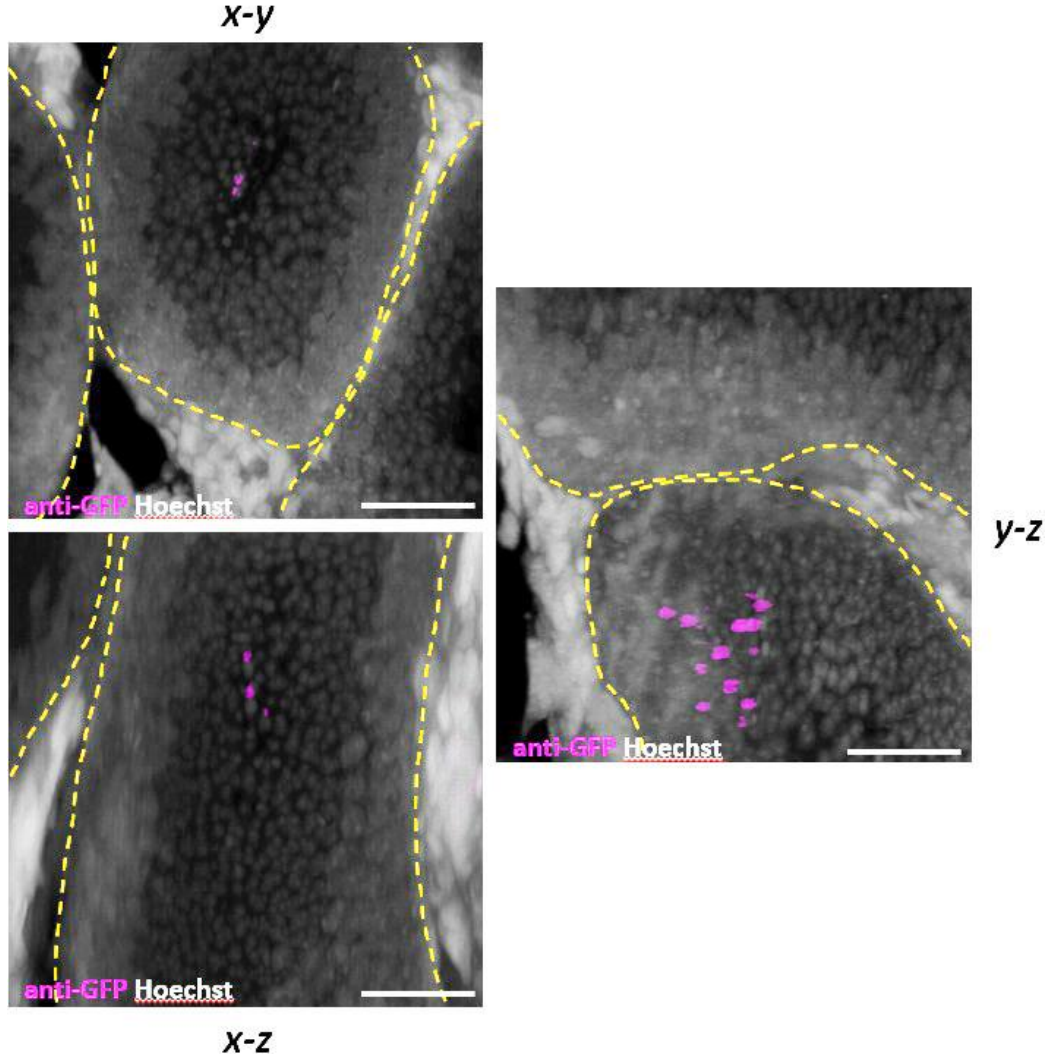


**Şekil 33.** 30 Günlük Kontrol grubuna ait testis dokusundan alınan lightsheet mikroskobu görüntüsü. Lightsheet mikroskobu ile alınan 3 boyutlu görüntü üzerinden seçilen alana ait görüntüde seminifer tübüllerin bazal kısmı sarı kesikli çizgiler ile belirlenmiştir. Hoechst işaretli bütün çekirdekler (gri) genel morfolojinin anlaşılmasını sağlamaktadır. Seminifer tübül içerisinde germinal epitelin farklı seviyelerine yerleşik yedi adet anti-GFP işaretli (pembe) GFP+ kimerik hücrelerin x, y ve z eksenindeki görüntüsü görülmektedir. Bar : 100µm.

Busulfan grubunda, qPCR ve akım sitometrisi analizlerine ait sonuçlara benzer şekilde lightsheet mikroskopik incelemede de GFP+ kimerik hücrelerin sayısında artış gözlemlendi. Annesütü kaynaklı hücrelerin yavruya geçerek hasarlı testis dokusuna yerleştiği ve hasar sonrası sayıca arttığı görülmektedir. Yapılan analiz sonucunda farklı lokasyonlarda GFP+ kimerik hücre popülasyonu gözlemlendi. Alınan görüntünün daha büyük büyütmede incelenmesinde seminifer tübül içerisinde germinal epitelin bazalinden başlayıp lümene kadar uzanan farklı seviyelerde yerleşik çok sayıda GFP+ kimerik hücreler gözlenip x, y, z ekseninde görüntüleri alındı (Şekil 34). Başka lokasyonda da seminifer tübül içerisinde germinal epitelin farklı seviyelerine yerleşmiş 11 adet annesütü kaynaklı GFP+ kimerik hücreler görüntülendi (Şekil 35).



**Şekil 34.** Busulfan grubuna ait testis dokusundan alınan lightsheet mikroskobu görüntüsü. Lightsheet mikroskobu ile alınan 3 boyutlu görüntüde sarı ile işaretli alan içerisinde annesütü kaynaklı testis dokusuna yerleşen anti-GFP işaretli (pembe) GFP+ mikrokimerik hücreler görülmektedir. Bar : 200μm (A). 3 boyutlu görüntü üzerinden seçilen alana ait görüntüde seminifer tübüllerin bazal kısmı sarı kesikli çizgiler ile belirlenmiştir. Orta alanda bulunan seminifer tübül içerisinde germinal epitelin farklı seviyelerine yerleşik onbir adet anti-GFP işaretli (pembe) GFP+ kimerik hücrelerin x, y ve z eksenindeki görüntüsü görülmektedir. Hoechst işaretli bütün çekirdekler gri renkte görülmektedir. Bar : 50μm (B).



**Şekil 35.** Busulfan grubuna ait testis dokusundan alınan lightsheet mikroskobu görüntüsü. Lightsheet mikroskobu ile alınan 3 boyutlu görüntü üzerinden seçilen alana ait görüntüde seminifer tübüllerin bazal kısmı sarı kesikli çizgiler ile belirlenmiştir. Hoechst işaretli bütün çekirdekler (gri) genel morfolojinin anlaşılmasını sağlamaktadır. Seminifer tübül içerisinde germinal epitelin farklı seviyelerine yerleşik 11 adet anti-GFP işaretli (pembe) GFP+ kimerik hücrelerin x, y ve z eksenindeki görüntüsü görülmektedir. Bar : 100µm.

## 7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda, anne sütü yoluyla yavruya geçen hücrelerin testis dokusuna geçerek hangi bölgelere lokalize olduğu ve testiste oluşan hasar durumunda rejenerasyonda görev alıp miktarlarında farklılaşma olmasına yönelik araştırmalar yapılmıştır. Literatürde, anne sütünden yavruya hücre geçişiyle ilgili birkaç çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan birinde, hücrelerin yavrunun karaciğer dokusuna geçtiği gösterilmiştir, ancak bu hücrelerin farklılaşma özellikleri açıklanmamıştır. (Zhou ve ark., 2000). Cabinian ve ark. (2016), anne sütü kaynaklı lenfosit tiplerinin emzirme ile yavru bağırsağındaki Peyer plaklarına yerleştiğini göstermişlerdir. Ayrıca, anne sütü içinde kök hücre özellikleri gösteren hücrelerin var olduğu ve bu hücrelerin *in vitro* olarak çeşitli dokuların hücrelerine dönüşebildiği gösterilmiştir (Hassiotou ve ark., 2012). Çalışmamızda, anne sütündeki hücrelerin yavruya geçişi belirlenmiştir ve testis dokusu içinde farklı hücre tiplerine dönüşebildiği ilk kez gösterilmiştir.

Mikrokimerizm, gebelikte doğal olarak gözlenebildiği gibi kan transferi, kök hücre ve doku transplantasyon gibi sonradan kazanılan durumlarda da meydana gelebilir (Gammill ve Nelson, 2010; Konuma ve ark., 2016; Stikvoort ve ark., 2016). Mikrokimerizm üzerine yapılan çalışmaların çoğu, sonradan kazanılan mikrokimerizmle ilişkili olduğu düşünülen hastalıklar ve çeşitli hematolojik hastalıklar üzerinde yoğunlaşmaktadır. Gebelik sürecinde doğal olarak gerçekleşen mikrokimerizm hakkında ise sınırlı sayıda literatür bilgisi mevcuttur. Mikrokimerizm meme kanseri ile ilişkili olabileceği gibi (Nemescu ve ark., 2016), tiroid kanseri (Cirello ve Fugazzola, 2014) ve yara iyileşmesi gibi durumlarda koruyucu ve pozitif etkilere sahip olabileceğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Mahmood ve O'Donoghue, 2014). Çalışmamızda, anne sütünden yavrunun testis dokusuna geçen kimerik hücrelerin hem seminifer tübül içerisinde germinal epitel hücrelerine dönüştüğü hem interstisyel bağ dokusunda bulunabildiği belirlenmiştir. Bu hücrelerin spesifik farklılaşma işaretleyicileri işaretlenip fizyolojik veya patolojik olaylarla ilişkisi ve rejenerasyondaki görevleri tam bilinmese de, bu hücrelerin mevcut hücre popülasyonunu destekleyebileceği düşünülmektedir. Bu bilgiler, mikrokimerizmin bireyler üzerinde olası olumlu veya olumsuz etkileri konusundaki belirsizlikleri devam ettirmektedir.

Zhou ve ark. (2000) tarafından yapılan bir çalışmada, anne sütündeki lökositlerin yavru karaciğerinde en yüksek seviyeye 5. ve 6. günlerde ulaştığı ve 9. günden sonra tespit edilemediği belirtilmiştir. Cabinian ve ark. (2016) ise anne sütündeki CD4+ ve CD8+ lökositlerin yavrunun bağırsaklarında Peyer plaklarında emzirme başlangıcından 18 gün sonra

bile tespit edilebildiğini göstermiştir. Yapılan bir diğer çalışmada ise anne sütü yoluyla yavrunun bağırsak, dalak ve timus dokularına geçen hücrelerin emzirmenin 1. ve 2. haftalarında bu dokularda bulunduğu belirtilmiştir (Ma ve ark., 2008). Hassiotou ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada ise anne sütü içerisinde bulunan Oct4+, Nanog+ ve CD49f+ kök hücrelerin emzirme yoluyla yavruya aktarıldığı ve doğumdan 3 hafta sonrasında mide duvarında ve timus dokusunda yerleştiği gösterilmiştir. Aydın ve ark. (2016) ise anne sütü kaynaklı kimerik hücrelerin beyin dokusunda 7. ve 30 günlerde tespit etmiş ve hem nöron hem de glial hücrelere farklılaştığını ispatlamıştır. Çalışmamızda anne sütü kaynaklı hücrelerin ilk defa emzirmeden sonra 7 günlük sürede testis dokusuna göçü gerçekleşebildiği gibi 30 ve 60 gün sonunda da tespit edilmiştir. Literatürdeki diğer çalışmalara göre emzirme sonrası 60 gün gibi geç dönemde de anne sütü kaynaklı GFP+ kimerik hücrelerin varlığını koruyabildiği hatta busulfan hasarından sonra sayılarında artışın olduğu gözlenmektedir.

İlk çalışmalarda, süt yoluyla anne sütündeki hücre geçişini tespit etmek için geleneksel boyama yöntemleri kullanılmıştır. Fare yavrularına rodamin ve floresan isotiyosiyanat (FITC) ile işaretli hücreler içeren süt verilerek işaretli lenfositler yavru farelerde tespit edilmiştir (Weiler ve ark., 1983). Günümüzde ise anne ve yavru arasındaki hücre transferinin deneysel hayvanlarda araştırılması için transgenik hayvanlar tercih edilmektedir, çünkü bu hayvanlarda çeşitli işaretleyicilere sahip hücreler bulunmaktadır. Transgenik hayvanlar, mikroskopik inceleme ve dokudaki hücre yerleşimi hakkında bilgi sağlama açısından özellikle etkili bir yöntemdir. En yaygın kullanılan floresan protein olan GFP hücrelere toksik etkisi olmaması, mavi dalga boyunda spesifik bir ışımaya yayması, mikroskop ve akım sitometrisi ile analiz edilebilmesi gibi avantajlara sahiptir (Chalfie ve ark., 1994). GFP pozitif transgenik hayvanlar kullanılarak yapılan çalışmalarda, gebelik sürecinde anne ve yavru arasında iki yönlü hücre geçişinin gerçekleştiği gösterilmiştir (Vernochet ve ark., 2007). Başka bir çalışmada ise gebelik ve emzirme döneminde anne sütü aracılığıyla GFP+ lenfositlerin yavruya geçtiği belirtilmiştir (Zhou ve ark., 2000). Çalışmamızda, dişi farelerde  $\beta$ -aktin'e bağlı olarak GFP üretebilen hücrelerin kullanıldığı bir transgenik fare modeli kullanılmıştır. Transgenik farelerde, GFP molekülü hücrelerin temel iskelet elemanı olan  $\beta$ -aktin'e bağlı olarak üretilir. Bu nedenle, GFP+ hücreler mitoz bölünme geçirir veya farklı bir hücre tipine farklılaştığında dahi GFP üretme yeteneklerini korur ve bulundukları dokuda tespit edilebilirler. Emzirme yoluyla yavrulara geçen GFP+ hücreler, çeşitli yöntemlerle araştırılmış ve bu hücrelerin anneden geçtiği kesin olarak belirlenmiştir.

Mikrokimerizm ile ilgili yapılan araştırmalarda genellikle mikroskopik inceleme, PCR ve akım sitometrisi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Akım sitometrisi ve PCR, yaygın kullanılan metodlardır. Mikroskopik inceleme yöntemleri ise az miktarda kimerik hücrenin dokularda tespit edilmesi zorluğu nedeniyle daha az kullanılmaktadır. Transgenik hayvanlar kullanılarak yapılan çalışmalarda, LacZ veya luciferaz gibi floresan veya enzimatik işaretleyicilere sahip hücreler kullanılmıştır. Bu çalışmalarda, gebelik sırasında anneden yavrunun timus, dalak, karaciğer ve kemik iliği gibi organlarına LacZ+ veya luciferaz+ hücrelerin geçtiği gösterilmiştir (Marleau ve ark., 2003; Piotrowski ve Croy, 1996). Bu analizler genellikle qPCR yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda, anne sütünden yavruya geçen hücrelerin tespiti için mikroskopik inceleme, qPCR ve akım sitometrisi yöntemlerini bir arada kullanıldı. Mikroskopik inceleme yöntemiyle yavrunun dokularında bulunan nadir kimerik hücrelerin tespiti oldukça zorlu bir süreç olmakla birlikte, doku şeffaşlaştırma metodlarıyla birlikte konfokal ve lightsheet mikroskobu görüntülemeleri sayesinde bu hücrelerin morfolojileri ve yerleşimleri gibi diğer tekniklerle elde edilemeyen bilgiler çalışmamızda elde edildi. Literatürde bu teknikler farklı organlar üzerinde kullanılmış olsada annesütü kaynaklı mikrokimerizmde testis dokusu içerisinde kimerik hücre varlığını ilk defa tanımlamaktayız.

Geleneksel histolojik kesit teknikleri, doku örnekleri içindeki anatomik yapılar ve hücresel bileşenler hakkında iki boyutlu bilgi sağlamaktadır (Seo ve ark., 2016). Bu nedenle, üç boyutlu (3D) görüntüleme, bütün vücut ve bütün organ hücre profillemesi için önemli bir tekniktir (Matsumoto ve ark., 2019). Son zamanlarda ortaya çıkan doku şeffaşlaştırma teknikleri, bütün organları veya hatta bütün vücutları hızlı bir şekilde 3D olarak görüntülemeyi mümkün kılmaktadır. Doku şeffaşlaştırma tekniği, dokuyu optik olarak şeffaf hale getirir ve şeffaf hale getirilen dokulara ışığın derinlemesine nüfuz etmesine izin verir, bu da bütün vücut görüntüleme çalışmalarının ilerlemesini hızlandırmaktadır (Tian ve ark., 2021). Bir diğer doku şeffaşlaştırma metodu olan iDISCO kullanarak Alzheimer hastalığı fare modelinde plak oluşumu incelendi. Beta-amiloid plakların 3D mekansal dağılımını, mikrogliya ve damar yapılarıyla birlikte grntlendiler (Liebmann ve ark., 2016). Doku şeffaşlaştırma yöntemi, damar yapıları, böbrek, pankreas ve organoidler gibi yumuşak dokularda da yaygın olarak uygulanmaktadır. Genç farelerin şeffaf pankreasını optik şeffaşlaştırma ajanı (RapiClear) kullanarak hazırladılar ve pankreas mikroyapısının, adacık dağılımının, nörovasküler ağın ve hastalıktaki sinir ağının 3D panoramik olarak görüntülenmiştir (Tang ve ark., 2018). Bütün fare akciğerlerinde yüksek çözünürlükle 3 boyutlu lifsi kollajen ağını ortaya çıkararak bütün akciğerler boyunca hava yolunun düzeyinde kollajen birikimi gösterilmiştir (Ochoa ve ark.,

2018). Hücresel ve detaylı analiz yapılan bir başka çalışmada ise CUBIC tabanlı kanser analizi kullanılıp 13 farklı fare modelinde kanser metastazını detaylı bir şekilde incelenmiştir (Kubota ve ark., 2017). Aydın ve arkadaşları da doku şeffaflaştırma yöntemini kullanarak beyin dokusunda GFP+ kimerik hücrelerin varlığını göstermiştir. Doku şeffaflaştırma metodları bütün dokuda tek hücre analizini ve hücresel lokalizasyonun daha kolay anlaşılabilir olmasını kolaylaştırmaktadır. Çalışmamızda miktarı oldukça az olan ve mikroskopik olarak standard metodlarla tespiti oldukça güç olan anne sütü kaynaklı kimerik hücrelerin tespiti için doku şeffaflaştırma metodu kullanılmıştır. Bu sayede kimerik hücrelerin varlığı hem kalın doku kesitlerinde hem de bütün testis dokusunda kolaylıkla gösterilmiştir. Testis dokusunda bu metod kullanılarak ilk defa kimerik hücrelerin varlığı ispatlanmıştır.

Kemoterapötik ajan olarak busulfan, guanin alkile edip DNA çapraz bağını ve tek zincir kırılmalarını indükleyerek hücre proliferasyonunu inhibe eder. Busulfan tedavisi, germ hücrelerini hasara uğratar, sperm hareketliliğini ve testis ağırlığını azaltır, sperm anomalisi oranını artırır ve sonunda infertileye neden olmaktadır (Panahi ve ark., 2015). Busulfan, redoks dengesini bozarak ve oksidatif hasara yol açarak spermatogonya apoptozuna neden olduğu gösterilmiştir (Ganjlikhan Hakemi ve ark., 2019). Ayrıca, spermatogonyal kök hücrelerin farklılaşmasını engelleyen BMP4/Smads yolları aracılığıyla busulfanın spermatogonya farklılaşmasını engellemektedir (Carlomagno ve ark., 2010). Yetişkin sıçanlarda busulfan ile tedavi, Sertoli hücrelerinin bazal bölgesinde bulunan vimentin filamentlerin yıkılmasına neden olarak Sertoli hücreleri ile spermatogonya arasındaki bağlantıyı ayırmaktadır (ElGhamrawy ve ark., 2014). Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), kan-testis bariyeri fonksiyonunu düzenleyen Sertoli ve germ hücre adhezyon proteinidir ve farede intraperitoneal busulfan enjeksiyonuyla miktarı belirgin bir şekilde azalmaktadır (Cai ve ark., 2016). Ayrıca, busulfan tedavisi Sertoli hücrelerinde toll-benzeri reseptörlerin aktivasyonunu ve inflamatuvar faktörlerin (makrofaj kemotaktik protein 1 ve tümör nekroz faktör- $\alpha$  gibi) ifadesini artırarak fare testislerinde endojen inflamasyona neden olmaktadır (Zhang ve ark., 2013). Busulfan kaynaklı oluşan testis inflamasyonunun kan-testis bariyeri ile ilişkili proteinlerin ekspresyonunu ve lokalizasyonunu etkilediği, kan-testis bariyerinin yapısını ve işlevini bozduğu ve seminifer tübül içindeki mikroçevreye zarar verdiği ve sonuç olarak spermatogenez bozukluğuna neden olmaktadır (Zhao ve ark., 2023).

Busulfan tedavisi tamamlandığında, testis dokusunda inflamasyon ve doku onarımı gerçekleşerek testiste rejenerasyon süreci tamamlanarak spermatogenez normale dönmektedir. Hasar sonrası testis dokusuna veya seminifer tübüllerin içine nakledilen kök

hücreler, seminifer tübüllerde yerleşerek kendilerini çoğaltarak spermatogenez sürecini başlatabilmektedir (Qian ve ark., 2020). Seminifer tübüllere dışarıdan kök hücre geçişi, spermatogonyal kök hücre nakli gibi yapay bir yöntemle sağlanabileceği gibi, bazı durumlarda endojen kök hücrelerin de seminifer tübüllere doğal olarak geçebildiği gözlemlenmiştir. Farelerdeki hasarlı seminifer tübüllerde endojen spermatogonyal kök hücrelerin aktif hale geldiği ve hasarlı bölgeye yerleşerek sperm üretimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Kanatsu-Shinohara ve ark., 2013). Busulfan tedavisini takiben NGN3+ farklılaşma eğilimli progenitör hücrelerin tekrar kök hücre durumuna dönebildiği ve bu popülasyonun rejeneratif yanıtta önemli katkılarda bulunduğu gösterilmiştir (Nakagawa ve ark., 2007). Farelerdeki seminifer tübül hasarı sonrasında, spermatogonyal kök hücrelerin hasarlı bölgelere migrasyon gösterdiği ve bu kök hücrelerin hasarlı tübüllerde yeniden spermatogenez başlatabildiği gösterilmiştir (Hermann ve ark., 2010). Anne sütü kaynaklı kimerik hücrelerin hedef organa nasıl göç ettikleri ve farklılaşma mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Pluripotent kök hücre özelliği göstermelerinden dolayı hasarlı bölgeye diğer kök hücrelerin göç edişi şeklinde gerçekleştiği düşünülmektedir. Çalışmamızda busulfan enjeksiyonu ile oluşan testis hasarı sonrasında tüm tekniklerde anne sütü kaynaklı GFP+ kimerik hücrelerin sayısının arttığı gösterilmiştir. Bu sonuç hasar sonrası testis rejenerasyonunda GFP+ hücrelerin etkin rol aldığını desteklemekle beraber kimerik hücrelerin rejenerasyondaki aktif rolünü ispatlamak için detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Testiküler iskemi-reperfüzyon, endotelial hücrelerde hücre içi sinyalleme kaskadını tetikleyerek nötrofil rekrütasyonuna, hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) artmasına ve sonunda germ hücrelerine özgü apoptoza yol açmaktadır (Lysiak ve ark., 2003). Dolayısıyla testis dokusunda IR ile yapılan çalışmalar anti-oksidan ajanların kullanımıyla daha çok koruyucu mekanizmalar üzerinedir (Şener ve ark., 2015). IR sonrası endojen kök hücre göçü ve farklılaşması ile ilgili çalışma bulunamamıştır. Ancak IR sonrası tedavi amaçlı izole edilen mezenkimal kök hücrelerin seminifer tübül içine enjeksiyonu ile bu hücrelerin spermatogonyal kök hücrelere farklılaşıp spermatogenezde aktif rol aldıkları gösterilmiştir (Sharifian ve ark., 2022). Çalışmamızda IR sonrası testis dokusunda GFP+ kimerik hücre popülasyonunun varlığı gösterilmiştir. Ancak diğer kontrol gruplarına benzer oranda GFP+ kimerik hücre bulunup hasar sonrası artış gözlenmemiştir. Bunun sebebi reperfüzyon sonrası sürenin uzun olup erken dönemde rejenerasyonun tamamlanmış olması olabilir. Busulfan grubundaki GFP+ kimerik hücre sayısının IR grubuna göre fazla olmasının sebebi busulfanın direk olarak spermatogonya üzerine etkili olmasından kaynaklanabilir.

İnfertilite son yıllarda artan ciddi bir sağlık sorunudur ve çiftlerin yaklaşık %20'sinde gözlenir. Erkek kısırlığı, tüm infertilite vakalarının yaklaşık yarısını oluşturur ve obstrüktif olmayan azospermi en şiddetli şekilde görülen vakadır. Azospermi genetik faktörlerin yanı sıra, yaralanmalar, toksik maddelere maruz kalma, immünsüpresyon ilaç kullanımı ve kanser tedavisi nedeniyle de ortaya çıkabilmektedir. Bununla birlikte, infertil erkeklerin büyük bir kısmı, insanlarda spermatogenezi ve sperm fonksiyonunu düzenleyen mekanizmaların hala tam olarak açıklanamayan yönlerini gösteren, açıklanamayan infertilite olarak tanımlanmaktadır (Fang ve ark., 2019). Günümüz yardımcı üreme teknikleri kullanılarak erkek infertilitesi birçok yönüyle tedavi edilebilmekte ve çiftler çocuk sahibi olabilmektedir. Ancak Klinefelter sendromu ve Y kromozom delesyonu gibi genetik faktörler, aşırı derecede toksik ajanlara maruz kalma ve kanser tedavisi spermatogenezde geri dönüşü olmayan hasarlara neden olmaktadır ve bu durumlarda yardımcı üreme teknikleri yetersiz kalmaktadır (Tüttelmann ve Gromoll, 2010). Bu nedenlerden dolayı son yıllarda üreme biyolojisi alanında çalışan araştırmacılar kök hücre tedavisi üzerine yoğunlaşmışlardır. Anne sütü kaynaklı olup testis dokusuna ait hücrelere farklılaşabilen kök hücrelerin izole edilip saklanması önerilebilir. Yüksek farklılaşma potansiyeli olan bu hücreler, infertilite tedavi yöntemlerinde kök hücreden farklılaştırma metodlarıyla kullanılabilir.

Embriyonik kök hücrelerinin (EKH) *in vitro* ortamda erkek germ hücreleri oluşturabildiği gösterilmiştir. Kemik morfogenezik protein 4 ile indüklenen germ hücrelerinin testiste seminifer tübüllere nakledildiğinde spermatogenezde rol oynayabileceği gösterilmiştir (Toyooka ve ark., 2003). Busulfan ile oluşturulan infertil fare modelinde kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin testise verilmesi ile bu hücrelerin germ, Sertoli ve Leydig hücrelerine farklılaştığı bildirilmiştir (Lue ve ark., 2007). Kök hücre araştırmalarının güncel konularından biri embriyonik bir kök hücre gibi davranması için yeniden programlanan farklılaşmış yetişkin hücreler olan uyarılmış pluripotent kök hücreler (iPSC)'dir (Kumar ve ark., 2015). Farelerin indüklenmiş pluripotent kök hücreleri, geç dönem germ hücrelerine (spermatozoa) farklılaşma yeteneğine ve potansiyeline sahip olduğu gösterilerek bu kök hücrelerin infertil testislere nakli ile erkek infertilitesinin tedavisinde potansiyel uygulamaya sahip olabilmektedir (Zhu ve ark., 2012).

Kök hücre teknolojisinin hızla gelişmesiyle ve bu alanda yapılan çalışmalar ışığında gametlerin insan pluripotent kök hücrelerinden türetilmesi olasılığı, kısır çiftler için yeni terapötik stratejiler sağlayabilir. Ancak hem insan embriyonik kök hücre kullanımının önündeki yasal ve etik sınırlamalar hem de kök hücre elde etmesi ve uygulanmasındaki zorluklar ve bazı bilinmeyenler bu alanda çalışmayı sınırlandırmaktadır. İnsan embriyonik kök hücrelerinin etik

nedenlerle araştırmalarda kullanılamaması, anne sütünden elde edilebilecek embriyonik kök hücre benzeri özellikteki kök hücre tedavi yöntemleri kapsamında kullanılabilmesi açısından son derece önemlidir. Buna bağlı olarak bu alanda hücresel tedavi yöntemleri bir umut ışığı olmaktadır. Günümüzde kök hücre ile ilgili çalışmaların yoğunlaştığı iPSC ve insan mezenkimal kök hücreleriyle ilgili olarak karşılaşılan önemli bir problem, bu tipteki hücrelerin transplantasyon sonrası kontrolsüz bir şekilde tümör oluşumuna sebebiyet vermeleridir (Hentze ve ark., 2009). Buna karşın süttten izole edilen kök hücrelerin immün-yetersiz farelere enjeksiyonu sonucunda herhangi bir tümör oluşumuna rastlanmadığı bildirilmiştir (Hassiotou ve ark., 2012). Bu önemli verilerin yanında bu hücrelerin hücresel tedavi yöntemleri gibi amaçlarla kullanılması için henüz yeterince bilgi mevcut değildir. Bu kök hücrelerin her ne kadar *in-vitro* ortamdaki farklılaşma yetenekleri gösterilmiş olsa da *in vivo* olarak taşınabilme potansiyelleri ve dokularla olan ilişkileri belirsizliğini korumaktadır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz anne sütü kaynaklı kimerik hücrenin testis dokusuna yerleşip seminifer tübül içerisinde gözlenmesi dikkat çekici bir sonuçtur. Somatik bir hücrenin göç ederek seminifer tübül içerisine yerleşmesi de çalışmamızın ilgi çekici sonuçlarındandır. Sonuçlarımızda seminifer tübül içerisinde germinal epitelin orta seviyesinde bölünme aşamasında olan bir kimerik hücrenin varlığı göç eden bu hücrelerin bulundukları yerde aktif olduğunu düşündürmektedir. Spermatogonyal kök hücreleri olmayan infertil erkeklerde sperm elde etmek için tek seğenek, hastaya özğü somatik hücrelerin pluripotent kök hücrelere dönüştürülmesi ve ardından genetik olarak ilişkili haploid gametlere diferansiyasyonudur. Fare pluripotent kök hücrelerinden erkek gametlere diferansiyasyonla canlı yavrular elde edilmiştir. Activin A ve kemik morfogenetik proteinler (BMP) 4 ve 8b'nin yanı sıra yaygın olarak kullanılan büyüme faktörleri olan bazal fibroblast büyüme faktörü (bFGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), lösemi inhibe edici faktör (LIF) ve kök hücre faktörü (SCF) ile elde edilen hücreler fare testisine nakledilerek tam spermatogenez geręekleřmiř ve yavrular elde edilmiştir (Hayashi ve ark., 2011). Bir diğer çalışmada ise *in vitro* olarak petri kabında somatik kökenli farklılaşmış gametlerden tam spermatogenez elde edilmiş ve üretilen fare spermatid benzeri hücrelerden ICSI sonrasında canlı yavrular elde edilmiştir (Zhou ve ark., 2016). Bu sonuçlar çalışmamızda gözlemlediğimiz somatik kaynaklı anne sütü kimerik hücrelerin seminifer tübül içerisine yerleşip farklılaşmasını destekleyebilmektedir.

Gelişim esnasında XX kromozomlu primordial germ hücreleri testiküler kordlara yerleşip pro-spermatogonyaya farklılaşmaktadır. Ancak tüm XX pro-spermatogonya doğumdan sonraki birkaç gün içinde dejenere olmaktadır (Bronson ve ark., 1995). 46 XX erkek (Chapelle)

sendromunda normal fenotipte erkek bireyler gözlenmekte olup bu bireylerde spermatogenez oldukça sınırlıdır. Düşük spermatogenez kapasitesinden dolayı infertil bireyler genellikle oligoastenoteratozoospermi (OAT) özelliktedir. Bu gibi sendromlu durumlarda da XX kromozomlu spermatogonyya seminifer tübül bazal kompartmanında görülmektedir (Adrião ve ark., 2020). Bir başka çalışmada ise, 46,XX/46,XY tetragametik kimerizm durumunda oligospermik erkeklerden alınan testis ve deri örneklerinde kısa tandem tekrar dizileri (STR) analizi sonucunda XX kromozomlu hücrelere rastlanmıştır (Magharehabed ve ark., 2019). XX kromozomlu gametlerin seminifer tübül içerisine yerleşimi sendrom ya da kimerizm durumlarında da olsa mümkün gözükmemektedir. Bu durum çalışmamızdaki anne sütü kaynaklı GFP+ kimerik hücrelerin testise yerleşme potansiyelini desteklemekle beraber GFP+ hücrelerin detaylı kromozomal incelemelerinin yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Anne sütü kaynaklı kök hücrelerin, cerrahi bir müdahaleye gerek duyulmadan sadece emzirme yoluyla ulaşılabilmesi, hem insanlar hem de hayvanlar üzerinde çalışma yapma açısından önemli bir avantajdır. Bu bilgiler, sütte bulunan kök hücrelerin rejeneratif tedavilerde kullanılabilmesi için yeni fırsatlar sunmaktadır. Kök hücrelerin sütteki farklılaşma yeteneklerinin ve herhangi bir hasar durumunda nasıl işlev görebileceklerinin ayrıntılı olarak araştırılması özellikle testis hücreleri üzerinde önemlidir.

Çalışmamızda annesütü kaynaklı kimerik hücrelerin testis dokusunda görülme olasılığı çok düşüktür. Bu durum yaptığımız qPCR ve akım sitometrisi analizleri sonuçları ile desteklenmektedir. Her iki analiz sonucunda da annesütü kaynaklı kimerik hücrelerin varlığına düşük oranda rastlanılmış olsa da bu hücrelerin testis dokusundaki varlığı mikroskopik incelemeler ile ispatlanmıştır. Bütün bir testis dokusunda birkaç adet bulunan annesütü kaynaklı GFP+ kimerik hücrelerin varlığını konfokal mikroskop altında 20 µm'lik seri kesitler ile incelemek oldukça zor ve uzun zamanlara ihtiyaç olan bir metoddur. Bu yüzden hem şeffaflaştırılmış kalın testis doku kesitlerinin konfokal mikroskobu hem de şeffaflaştırılmış total testis dokusunun lightsheet mikroskobu ile incelenmesi bu süreci hızlandırmaktadır. Böylece çalışmamızda önemli bir yere sahip olan mikroskopik analiz kısmında yaşadığımız problem ileri görüntüleme teknikleri ve mikroskopları kullanılarak aşıldı.

Çalışmamızda yer alan limitasyondan biri hem seminifer tübül içerisinde hem de interstisyel bağ doku içerisinde bulunan hücrelere ait özgün işaretleyiciler kullanılarak testis dokusuna yerleşen annesütü kaynaklı GFP+ kimerik hücrelerin hücre tiplerinin yapılamamış olmasıdır. Diğer bir limitasyon ise kimerik hücrelerin göç ediş mekanizmasının erken dönemde araştırılmamış olmasıdır. Annesütü kaynaklı kimerik hücreler doğum sonrası erken dönemde

(ilk 5 gün) doğumdan itibaren gün aşırı takip edilerek testis dokusuna yerleşim mekanizmasının açıklığa kavuşturulmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Testis dokusunda bulunan GFP+ kimerik hücrenin önce mikroskop altında tespit edilip daha sonra aynı hücrenin özgün işaretleyiciler ile boyanarak kimerik hücrenin testise özgü bir hücre tipine dönüşüp dönüşmediğini ispatlamak önem arz etmektedir. Böylece testis dokusuna yerleşen kimerik hücrenin farklılaşma potansiyelleri araştırılmalıdır. Busulfan hasarı sonrası gözlemlediğimiz kimerik hücre sayısındaki artışa neden olan mekanizma hasar sonrası erken dönemde detaylı olarak incelenmelidir. Hasar sonrası gözlemlenen kimerik hücrelerin kaynağının testis dokusuna ait bir kimerik hücre mi yoksa dışarıdan göç ederek testis dokusuna yerleşen başka bir kimerik hücre mi olduğunun gösterilmesi araştırılmalıdır. Çalışmamızda testis dokusuna yerleşen kimerik hücrelerin annesütü kaynaklı olduğu birçok yöntem ile ispat edilmiştir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler ışığında, kimerik hücrelerin hem göç hem de farklılaşma mekanizmasını aydınlatmak için ileri görüntüleme ve moleküler teknikler kullanılarak gösterilebilir. Bu hücrelerin anneye ait olduğu genetik olarak yapılan analizler ile de desteklenmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada annesütü kaynaklı kimerik hücrelerin testis dokusuna göç ettiği moleküler ve ileri mikroskopi teknikleri ile ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir. Emzirme sonrası kontrol gruplarında hem erken dönemde hem de yetişkin dönemde fare testis dokularında GFP+ kimerik hücrelerin varlığı ispatlanmıştır. Aynı zamanda Busulfan hasarı sonrası daha çok olmakla beraber IR grubunda da kimerik hücrelerin varlığı gözlenmiştir. Anne sütü kaynaklı kök hücrelerin migrasyon ve farklılaşma kapasiteleri ile hasar modellerinde testis dokusunun rejenerasyonuna katkı sağladığı düşünülmektedir. Bu yüzden ileriki çalışmalarda testis rejenerasyonuna katkısı, mekanizması ve hangi hücre tiplerine farklılaştığı detaylı olarak araştırılmalıdır.

## 8. KAYNAKLAR

- Abd Allah, S. H., Shalaby, S. M., El-Shal, A. S., El Nabtety, S. M., Khamis, T., Abd El Rhman, S. A., Ghareb, M. A., & Kelani, H. M. (2016). Breast milk MSCs: An explanation of tissue growth and maturation of offspring. *IUBMB Life*, 68(12), 935-942. <https://doi.org/10.1002/iub.1573>
- Adrião, M., Ferreira, S., Silva, R. S., Garcia, M., Dória, S., Costa, C., Castro-Correia, C., & Fontoura, M. (2020). 46,XX male disorder of sexual development. *Clin Pediatr Endocrinol*, 29(1), 43-45. <https://doi.org/10.1297/cpe.29.43>
- Agostoni, C., Braegger, C., Decsi, T., Kolacek, S., Koletzko, B., Michaelsen, K. F., Mihatsch, W., Moreno, L. A., Puntis, J., & Shamir, R. (2009). Breast-feeding: A commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 49(1), 112-125. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31819f1e05>
- Allen, J. C., Keller, R. P., Archer, P., & Neville, M. C. (1991). Studies in human lactation: milk composition and daily secretion rates of macronutrients in the first year of lactation. *The American journal of clinical nutrition*, 54(1), 69-80. <https://doi.org/10.1093/ajcn/54.1.69>
- Arthur, P. G., Kent, J. C., Potter, J. M., & Hartmann, P. E. (1991). Lactose in blood in nonpregnant, pregnant, and lactating women. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 13(3), 254-259. <https://doi.org/10.1097/00005176-199110000-00003>
- Arvola, M., Gustafsson, E., Svensson, L., Jansson, L., Holmdahl, R., Heyman, B., Okabe, M., & Mattsson, R. (2000). Immunoglobulin-secreting cells of maternal origin can be detected in B cell-deficient mice. *Biol Reprod*, 63(6), 1817-1824. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.6.1817>
- Aydın, M., Yiğit, E. N., Vatandaşlar, E., Erdoğan, E., & Öztürk, G. (2018). Transfer and Integration of Breast Milk Stem Cells to the Brain of Suckling Pups. *Sci Rep*, 8(1), 14289. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32715-5>
- Azaripour, A., Lagerweij, T., Scharfbillig, C., Jadcak, A. E., Willershausen, B., & Van Noorden, C. J. (2016). A survey of clearing techniques for 3D imaging of tissues with special reference to connective tissue. *Prog Histochem Cytochem*, 51(2), 9-23. <https://doi.org/10.1016/j.proghi.2016.04.001>
- Ballard, O., & Morrow, A. L. (2013). Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am*, 60(1), 49-74. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>
- Blum, J. W., & Baumrucker, C. R. (2002). Colostral and milk insulin-like growth factors and related substances: mammary gland and neonatal (intestinal and systemic) targets. *Domest Anim Endocrinol*, 23(1-2), 101-110. [https://doi.org/10.1016/s0739-7240\(02\)00149-2](https://doi.org/10.1016/s0739-7240(02)00149-2)
- Boddy, A. M., Fortunato, A., Wilson Sayres, M., & Aktipis, A. (2015). Fetal microchimerism and maternal health: a review and evolutionary analysis of cooperation and conflict beyond the womb. *Bioessays*, 37(10), 1106-1118. <https://doi.org/10.1002/bies.201500059>
- Boesmans, W., Gomes, P., Janssens, J., Tack, J., & Vanden Berghe, P. (2008). Brain-derived neurotrophic factor amplifies neurotransmitter responses and promotes synaptic communication in the enteric nervous system. *Gut*, 57(3), 314-322. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.131839>
- Boix-Amorós, A., Collado, M. C., & Mira, A. (2016). Relationship between Milk Microbiota, Bacterial Load, Macronutrients, and Human Cells during Lactation. *Front Microbiol*, 7, 492. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00492>
- Boyon, C., Collinet, P., Boulanger, L., Rubod, C., Lucot, J. P., & Vinatier, D. (2011). Fetal microchimerism: benevolence or malevolence for the mother? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 158(2), 148-152. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2011.05.008>
- Broestl, L., Rubin, J. B., & Dahiya, S. (2018). Fetal microchimerism in human brain tumors. *Brain Pathol*, 28(4), 484-494. <https://doi.org/10.1111/bpa.12557>
- Bronson, S. K., Smithies, O., & Mascarello, J. T. (1995). High incidence of XXY and XYY males among the offspring of female chimeras from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(8), 3120-3123. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.8.3120>
- Cabinian, A., Sinsimer, D., Tang, M., Zumba, O., Mehta, H., Toma, A., Sant'Angelo, D., Laouar, Y., & Laouar, A. (2016). Transfer of Maternal Immune Cells by Breastfeeding: Maternal Cytotoxic T Lymphocytes Present in Breast Milk Localize in the Peyer's Patches of the Nursed Infant. *PLoS One*, 11(6), e0156762. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156762>

- Cacho, N. T., & Lawrence, R. M. (2017). Innate Immunity and Breast Milk. *Front Immunol*, 8, 584. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00584>
- Cai, Y., Liu, T., Fang, F., Shen, S., & Xiong, C. (2016). Involvement of ICAM-1 in impaired spermatogenesis after busulfan treatment in mice. *Andrologia*, 48(1), 37-44. <https://doi.org/10.1111/and.12414>
- Carlomagno, G., van Bragt, M. P., Korver, C. M., Repping, S., de Rooij, D. G., & van Pelt, A. M. (2010). BMP4-induced differentiation of a rat spermatogonial stem cell line causes changes in its cell adhesion properties. *Biol Reprod*, 83(5), 742-749. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.085456>
- Castellote, C., Casillas, R., Ramírez-Santana, C., Pérez-Cano, F. J., Castell, M., Moretones, M. G., López-Sabater, M. C., & Franch, A. (2011). Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. *J Nutr*, 141(6), 1181-1187. <https://doi.org/10.3945/jn.110.133652>
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148), 802-805. <https://doi.org/10.1126/science.8303295>
- Chen, D. C., Nommsen-Rivers, L., Dewey, K. G., & Lönnerdal, B. (1998). Stress during labor and delivery and early lactation performance. *The American journal of clinical nutrition*, 68(2), 335-344. <https://doi.org/10.1093/ajcn/68.2.335>
- Cheng, L., Akkerman, R., Kong, C., Walvoort, M. T., & de Vos, P. (2021). More than sugar in the milk: human milk oligosaccharides as essential bioactive molecules in breast milk and current insight in beneficial effects. *Critical reviews in food science and nutrition*, 61(7), 1184-1200. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1754756>
- Cirello, V., & Fugazzola, L. (2014). Positive effect of fetal cell microchimerism on tumor presentation and outcome in papillary thyroid cancer. *Chimerism*, 5(3-4), 106-108. <https://doi.org/10.1080/19381956.2015.1107254>
- Cómitre-Mariano, B., Martínez-García, M., García-Gálvez, B., Paternina-Die, M., Desco, M., Carmona, S., & Gómez-Gaviro, M. V. (2022). Feto-maternal microchimerism: Memories from pregnancy. *iScience*, 25(1), 103664. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103664>
- Cregan, M. D., Fan, Y., Appelbee, A., Brown, M. L., Klopčič, B., Koppen, J., Mitoulas, L. R., Piper, K. M., Choolani, M. A., Chong, Y. S., & Hartmann, P. E. (2007). Identification of nestin-positive putative mammary stem cells in human breastmilk. *Cell Tissue Res*, 329(1), 129-136. <https://doi.org/10.1007/s00441-007-0390-x>
- De Luca, A., Hankard, R., Alexandre-Gouabau, M. C., Ferchaud-Roucher, V., Darmaun, D., & Boquien, C. Y. (2016). Higher concentrations of branched-chain amino acids in breast milk of obese mothers. *Nutrition*, 32(11-12), 1295-1298. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.05.013>
- Delgado-Noguera, M. F., Calvache, J. A., Bonfill Cosp, X., Kotanidou, E. P., & Galli-Tsinopoulou, A. (2015). Supplementation with long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) to breastfeeding mothers for improving child growth and development. *Cochrane Database Syst Rev*, 2015(7), Cd007901. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007901.pub3>
- Delplanque, B., Gibson, R., Koletzko, B., Lapillonne, A., & Strandvik, B. (2015). Lipid Quality in Infant Nutrition: Current Knowledge and Future Opportunities. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 61(1), 8-17. <https://doi.org/10.1097/mpg.0000000000000818>
- Dvorak, B. (2010). Milk epidermal growth factor and gut protection. *J Pediatr*, 156(2 Suppl), S31-35. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.11.018>
- Dvorak, B., Fituch, C. C., Williams, C. S., Hurst, N. M., & Schanler, R. J. (2003). Increased epidermal growth factor levels in human milk of mothers with extremely premature infants. *Pediatr Res*, 54(1), 15-19. <https://doi.org/10.1203/01.Pdr.0000065729.74325.71>
- Eidelman, A. I. (2012). Breastfeeding and the use of human milk: an analysis of the American Academy of Pediatrics 2012 Breastfeeding Policy Statement. *Breastfeed Med*, 7(5), 323-324. <https://doi.org/10.1089/bfm.2012.0067>
- ElGhamrawy, T. A., Helmy, D., & Elall, H. F. (2014). Cadherin and vimentin immunoexpression in the testis of normal and induced infertility models of albino rats. *Folia Morphol (Warsz)*, 73(3), 339-346. <https://doi.org/10.5603/fm.2014.0050>

- Eriksen, K. G., Christensen, S. H., Lind, M. V., & Michaelsen, K. F. (2018). Human milk composition and infant growth. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 21(3), 200-206. <https://doi.org/10.1097/mco.0000000000000466>
- Fang, N., Cao, C., Wen, Y., Wang, X., Yuan, S., & Huang, X. (2019). MicroRNA profile comparison of testicular tissues derived from successful and unsuccessful microdissection testicular sperm extraction retrieval in non-obstructive azoospermia patients. *Reprod Fertil Dev*, 31(4), 671-682. <https://doi.org/10.1071/rd17423>
- Fett, J. D. (2011). Fetal and maternal microchimerism: a boost for mom and baby? *Int J Cardiol*, 147(3), 347-348. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2010.12.017>
- Fichter, M., Klotz, M., Hirschberg, D. L., Waldura, B., Schofer, O., Ehnert, S., Schwarz, L. K., Ginneken, C. V., & Schäfer, K. H. (2011). Breast milk contains relevant neurotrophic factors and cytokines for enteric nervous system development. *Mol Nutr Food Res*, 55(10), 1592-1596. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100124>
- Fields, D. A., & Demerath, E. W. (2012). Relationship of insulin, glucose, leptin, IL-6 and TNF- $\alpha$  in human breast milk with infant growth and body composition. *Pediatr Obes*, 7(4), 304-312. <https://doi.org/10.1111/j.2047-6310.2012.00059.x>
- Fu, N. Y., Nolan, E., Lindeman, G. J., & Visvader, J. E. (2020). Stem cells and the differentiation hierarchy in mammary gland development. *Physiological reviews*, 100(2), 489-523. <https://doi.org/10.1152/physrev.00040.2018>
- Fugazzola, L., Cirello, V., & Beck-Peccoz, P. (2011). Fetal microchimerism as an explanation of disease. *Nat Rev Endocrinol*, 7(2), 89-97. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2010.216>
- Fujiki, Y., Johnson, K. L., Peter, I., Tighiouart, H., & Bianchi, D. W. (2009). Fetal cells in the pregnant mouse are diverse and express a variety of progenitor and differentiated cell markers. *Biol Reprod*, 81(1), 26-32. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.074468>
- Fujimoto, K., Nakajima, A., Hori, S., Tanaka, Y., Shirasaki, Y., Uemura, S., & Irie, N. (2022). Whole-embryonic identification of maternal microchimeric cell types in mouse using single-cell RNA sequencing. *Sci Rep*, 12(1), 18313. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20781-9>
- Galofré, J. C. (2012). Microchimerism in graves' disease. *J Thyroid Res*, 2012, 724382. <https://doi.org/10.1155/2012/724382>
- Gammill, H. S., & Nelson, J. L. (2010). Naturally acquired microchimerism. *Int J Dev Biol*, 54(2-3), 531-543. <https://doi.org/10.1387/ijdb.082767hg>
- Ganjalikhan Hakemi, S., Sharififar, F., Haghpahan, T., Babae, A., & Eftekhari-Vaghefi, S. H. (2019). The Effects of Olive Leaf Extract on The Testis, Sperm Quality and Testicular Germ Cell Apoptosis in Male Rats Exposed to Busulfan. *Int J Fertil Steril*, 13(1), 57-65. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2019.5520>
- Geddes, D. T., Gridneva, Z., Perrella, S. L., Mitoulas, L. R., Kent, J. C., Stinson, L. F., Lai, C. T., Sakalidis, V., Twigger, A. J., & Hartmann, P. E. (2021). 25 Years of Research in Human Lactation: From Discovery to Translation. *Nutrients*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/nu13093071>
- Goudarzi, N., Shabani, R., Ebrahimi, M., Baghestani, A., Dehdashtian, E., Vahabzadeh, G., Soleimani, M., Moradi, F., & Katebi, M. (2020). Comparative phenotypic characterization of human colostrum and breast milk-derived stem cells. *Hum Cell*, 33(2), 308-317. <https://doi.org/10.1007/s13577-019-00320-x>
- Greer, F. R. (2001). Do breastfed infants need supplemental vitamins? *Pediatr Clin North Am*, 48(2), 415-423. [https://doi.org/10.1016/s0031-3955\(08\)70034-8](https://doi.org/10.1016/s0031-3955(08)70034-8)
- Guo, M. (2014). Chemical composition of human milk. In *Human milk biochemistry and infant formula manufacturing technology* (pp. 19-32). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857099150.1.19>
- Hannan, F. M., Elajna, T., Vandenberg, L. N., Kennedy, S. H., & Thakker, R. V. (2023). Hormonal regulation of mammary gland development and lactation. *Nature Reviews Endocrinology*, 19(1), 46-61. <https://doi.org/10.1038/s41574-022-00742-y>
- Hanson, L. A. (2000). The mother-offspring dyad and the immune system. *Acta Paediatr*, 89(3), 252-258. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2000.tb01325.x>
- Hassiotou, F., Beltran, A., Chetwynd, E., Stuebe, A. M., Twigger, A. J., Metzger, P., Trengove, N., Lai, C. T., Filgueira, L., Blancafort, P., & Hartmann, P. E. (2012). Breastmilk is a novel source of stem cells with multilineage differentiation potential. *Stem Cells*, 30(10), 2164-2174. <https://doi.org/10.1002/stem.1188>

- Hassiotou, F., & Geddes, D. T. (2015). Immune cell-mediated protection of the mammary gland and the infant during breastfeeding. *Advances in Nutrition*, 6(3), 267-275. <https://doi.org/10.3945/an.114.007377>
- Hassiotou, F., Geddes, D. T., & Hartmann, P. E. (2013). Cells in human milk: state of the science. *J Hum Lact*, 29(2), 171-182. <https://doi.org/10.1177/0890334413477242>
- Hassiotou, F., Heath, B., Ocal, O., Filgueira, L., Geddes, D., Hartmann, P., & Wilkie, T. (2014). Breastmilk stem cell transfer from mother to neonatal organs (216.4). *The FASEB Journal*, 28, 216.214.
- Hassiotou, F., Hepworth, A. R., Metzger, P., Tat Lai, C., Trengove, N., Hartmann, P. E., & Filgueira, L. (2013). Maternal and infant infections stimulate a rapid leukocyte response in breastmilk. *Clin Transl Immunology*, 2(4), e3. <https://doi.org/10.1038/cti.2013.1>
- Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S., & Saitou, M. (2011). Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*, 146(4), 519-532. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.052>
- Hentze, H., Soong, P. L., Wang, S. T., Phillips, B. W., Putti, T. C., & Dunn, N. R. (2009). Teratoma formation by human embryonic stem cells: evaluation of essential parameters for future safety studies. *Stem Cell Res*, 2(3), 198-210. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2009.02.002>
- Hermann, B. P., Sukhwani, M., Hansel, M. C., & Orwig, K. E. (2010). Spermatogonial stem cells in higher primates: are there differences from those in rodents? *Reproduction*, 139(3), 479-493. <https://doi.org/10.1530/rep-09-0255>
- Hester, S. N., Hustead, D. S., Mackey, A. D., Singhal, A., & Marriage, B. J. (2012). Is the macronutrient intake of formula-fed infants greater than breast-fed infants in early infancy? *J Nutr Metab*, 2012, 891201. <https://doi.org/10.1155/2012/891201>
- Hirai, S., Hatayama, N., Naito, M., Nagahori, K., Kawata, S., Hayashi, S., Qu, N., Terayama, H., Shoji, S., & Itoh, M. (2017). Pathological effect of arterial ischaemia and venous congestion on rat testes. *Sci Rep*, 7(1), 5422. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05880-2>
- Hoeflich, A., & Meyer, Z. (2017). Functional analysis of the IGF-system in milk. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 31(4), 409-418. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2017.10.002>
- Hosseini, S. M., Talaei-Khozani, T., Sani, M., & Owringi, B. (2014). Differentiation of human breast-milk stem cells to neural stem cells and neurons. *Neurol Res Int*, 2014, 807896. <https://doi.org/10.1155/2014/807896>
- Huerta Sil, G., & Medrano Ramírez, G. (2006). [Fetal microchimerism in rheumatic diseases]. *Reumatol Clin*, 2(4), 202-209. [https://doi.org/10.1016/s1699-258x\(06\)73046-7](https://doi.org/10.1016/s1699-258x(06)73046-7) (Microquimerismo fetal en enfermedades reumáticas.)
- Indumathi, S., Dhanasekaran, M., Rajkumar, J. S., & Sudarsanam, D. (2013). Exploring the stem cell and non-stem cell constituents of human breast milk. *Cytotechnology*, 65(3), 385-393. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9492-8>
- Jantscher-Krenn, E., Zhrebtsov, M., Nissan, C., Goth, K., Guner, Y. S., Naidu, N., Choudhury, B., Grishin, A. V., Ford, H. R., & Bode, L. (2012). The human milk oligosaccharide disialyllacto-N-tetraose prevents necrotising enterocolitis in neonatal rats. *Gut*, 61(10), 1417-1425. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301404>
- Jimenez, D. F., Leapley, A. C., Lee, C. I., Ultsch, M. N., & Tarantal, A. F. (2005). Fetal CD34+ cells in the maternal circulation and long-term microchimerism in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Transplantation*, 79(2), 142-146. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000144468.71962.aa>
- Joshi, M., Keith Pittman, H., Haisch, C., & Verbanac, K. (2008). Real-time PCR to determine transgene copy number and to quantitate the biolocalization of adoptively transferred cells from EGFP-transgenic mice. *Biotechniques*, 45(3), 247-258. <https://doi.org/10.2144/000112913>
- Kaingade, P. M., Somasundaram, I., Nikam, A. B., Sarang, S. A., & Patel, J. S. (2016). Assessment of Growth Factors Secreted by Human Breastmilk Mesenchymal Stem Cells. *Breastfeed Med*, 11(1), 26-31. <https://doi.org/10.1089/bfm.2015.0124>
- Kamper-Jørgensen, M., Biggar, R. J., Tjønneland, A., Hjalgrim, H., Kroman, N., Rostgaard, K., Stamper, C. L., Olsen, A., Andersen, A. M., & Gadi, V. K. (2012). Opposite effects of microchimerism on breast and colon cancer. *Eur J Cancer*, 48(14), 2227-2235. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.02.006>

- Kanatsu-Shinohara, M., Mori, Y., & Shinohara, T. (2013). Enrichment of mouse spermatogonial stem cells based on aldehyde dehydrogenase activity. *Biol Reprod*, 89(6), 140. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.114629>
- Karlmark, K. R., Haddad, M. E., Donato, X. C., Martin, G. V., Bretelle, F., Lesavre, N., Cocallemen, J. F., Martin, M., Picard, C., Albentosa, T., Roudier, J., Desbriere, R., & Lambert, N. C. (2021). Grandmaternal cells in cord blood. *EBioMedicine*, 74, 103721. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103721>
- Khosrotehrani, K., & Bianchi, D. W. (2005). Multi-lineage potential of fetal cells in maternal tissue: a legacy in reverse. *J Cell Sci*, 118(Pt 8), 1559-1563. <https://doi.org/10.1242/jcs.02332>
- Khosrotehrani, K., Johnson, K. L., Cha, D. H., Salomon, R. N., & Bianchi, D. W. (2004). Transfer of fetal cells with multilineage potential to maternal tissue. *Jama*, 292(1), 75-80. <https://doi.org/10.1001/jama.292.1.75>
- Kim, M. H., Shim, K. S., Yi, D. Y., Lim, I. S., Chae, S. A., Yun, S. W., Lee, N. M., Kim, S. Y., & Kim, S. (2019). Macronutrient Analysis of Human Milk according to Storage and Processing in Korean Mother. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*, 22(3), 262-269. <https://doi.org/10.5223/pghn.2019.22.3.262>
- Kim, S. Y., & Yi, D. Y. (2020). Components of human breast milk: from macronutrient to microbiome and microRNA. *Clin Exp Pediatr*, 63(8), 301-309. <https://doi.org/10.3345/cep.2020.00059>
- Kling, P. J., Sullivan, T. M., Roberts, R. A., Philipps, A. F., & Koldovský, O. (1998). Human milk as a potential enteral source of erythropoietin. *Pediatr Res*, 43(2), 216-221. <https://doi.org/10.1203/00006450-199802000-00010>
- Konuma, T., Kato, S., Oiwa-Monna, M., Ishii, H., Tojo, A., & Takahashi, S. (2016). Early phase mixed chimerism in bone marrow does not affect long-term outcomes of myeloablative single-unit cord blood transplantation for adult patients with hematological malignancies. *Leuk Lymphoma*, 57(12), 2848-2854. <https://doi.org/10.3109/10428194.2016.1171860>
- Koopmans, M., Kremer Hovinga, I. C., Baelde, H. J., Fernandes, R. J., de Heer, E., Bruijn, J. A., & Bajema, I. M. (2005). Chimerism in kidneys, livers and hearts of normal women: implications for transplantation studies. *Am J Transplant*, 5(6), 1495-1502. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.00858.x>
- Korkmaz, D. T., Demirhan, O., Abat, D., Demirberk, B., Tunç, E., & Kuleci, S. (2015). Microchimeric Cells, Sex Chromosome Aneuploidies and Cancer. *Pathol Oncol Res*, 21(4), 1157-1165. <https://doi.org/10.1007/s12253-015-9934-7>
- Krachler, M., Li, F. S., Rossipal, E., & Irgolic, K. (1998). Changes in the concentrations of trace elements in human milk during lactation. *Journal of trace elements in medicine and biology*, 12(3), 159-176. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0946-672X\(98\)80005-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0946-672X(98)80005-9)
- Kubota, S. I., Takahashi, K., Nishida, J., Morishita, Y., Ehata, S., Tainaka, K., Miyazono, K., & Ueda, H. R. (2017). Whole-Body Profiling of Cancer Metastasis with Single-Cell Resolution. *Cell Rep*, 20(1), 236-250. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.010>
- Kuhn, N. (1977). Lactogenesis: the search for trigger mechanisms in different species. *UK, Zoological Society of London: Comparative aspects of lactation.*, 165-192.
- Kulski, J., & Hartmann, P. (1981). Changes in human milk composition during the initiation of lactation. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 59(1), 101-114. <https://doi.org/10.1038/icb.1981.6>
- Kumar, D., Talluri, T. R., Anand, T., & Kues, W. A. (2015). Induced pluripotent stem cells: Mechanisms, achievements and perspectives in farm animals. *World J Stem Cells*, 7(2), 315-328. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i2.315>
- Lambert, N. C. (2007). Microchimeric cells: guardians or actors of immunity in scleroderma? *Rheumatology (Oxford)*, 46(3), 382-383. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kel370>
- Langa, S., Maldonado-Barragán, A., Delgado, S., Martín, R., Martín, V., Jiménez, E., Ruíz-Barba, J. L., Mayo, B., Connor, R. I., Suárez, J. E., & Rodríguez, J. M. (2012). Characterization of Lactobacillus salivarius CECT 5713, a strain isolated from human milk: from genotype to phenotype. *Appl Microbiol Biotechnol*, 94(5), 1279-1287. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4032-1>
- Lessen, R., & Kavanagh, K. (2015). Position of the academy of nutrition and dietetics: promoting and supporting breastfeeding. *J Acad Nutr Diet*, 115(3), 444-449. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2014.12.014>

- Li, R., Xia, W., Zhang, Z., & Wu, K. (2011). S100B protein, brain-derived neurotrophic factor, and glial cell line-derived neurotrophic factor in human milk. *PLoS One*, 6(6), e21663. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021663>
- Liebmann, T., Renier, N., Bettayeb, K., Greengard, P., Tessier-Lavigne, M., & Flajolet, M. (2016). Three-Dimensional Study of Alzheimer's Disease Hallmarks Using the iDISCO Clearing Method. *Cell Rep*, 16(4), 1138-1152. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.060>
- Lue, Y., Erkkila, K., Liu, P. Y., Ma, K., Wang, C., Hikim, A. S., & Swerdloff, R. S. (2007). Fate of bone marrow stem cells transplanted into the testis: potential implication for men with testicular failure. *Am J Pathol*, 170(3), 899-908. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060543>
- Lysiak, J. J., Nguyen, Q. A., Kirby, J. L., & Turner, T. T. (2003). Ischemia-reperfusion of the murine testis stimulates the expression of proinflammatory cytokines and activation of c-jun N-terminal kinase in a pathway to E-selectin expression. *Biol Reprod*, 69(1), 202-210. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.013318>
- Ma, L. J., Walter, B., Deguzman, A., Muller, H. K., & Walker, A. M. (2008). Trans-epithelial immune cell transfer during suckling modulates delayed-type hypersensitivity in recipients as a function of gender. *PLoS One*, 3(10), e3562. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003562>
- Magharehabed, M., Almadani, N., Askari, M., Naji, M., Akbari, A., Gourabi, H., Sedighi Gilani, M. A., Reyhani Sabet, F., Masoudi, N. S., & Totonchi, M. (2019). Rare case of an oligospermic male with 46,XX/46,XY tetragametic chimerism. *Andrologia*, 51(7), e13290. <https://doi.org/10.1111/and.13290>
- Mahmood, U., & O'Donoghue, K. (2014). Microchimeric fetal cells play a role in maternal wound healing after pregnancy. *Chimerism*, 5(2), 40-52. <https://doi.org/10.4161/chim.28746>
- Marleau, A. M., Greenwood, J. D., Wei, Q., Singh, B., & Croy, B. A. (2003). Chimerism of murine fetal bone marrow by maternal cells occurs in late gestation and persists into adulthood. *Lab Invest*, 83(5), 673-681. <https://doi.org/10.1097/01.lab.0000067500.85003.32>
- Martin, C. R., Ling, P.-R., & Blackburn, G. L. (2016). Review of infant feeding: key features of breast milk and infant formula. *Nutrients*, 8(5), 279. <https://doi.org/10.3390/nu8050279>
- Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M. L., Xaus, J., Fernández, L., & Rodríguez, J. M. (2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr*, 143(6), 754-758. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2003.09.028>
- Matsumoto, K., Mitani, T. T., Horiguchi, S. A., Kaneshiro, J., Murakami, T. C., Mano, T., Fujishima, H., Konno, A., Watanabe, T. M., Hirai, H., & Ueda, H. R. (2019). Advanced CUBIC tissue clearing for whole-organ cell profiling. *Nat Protoc*, 14(12), 3506-3537. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0240-9>
- Molès, J. P., Tuailon, E., Kankasa, C., Bedin, A. S., Nagot, N., Marchant, A., McDermid, J. M., & Van de Perre, P. (2018). Breastmilk cell trafficking induces microchimerism-mediated immune system maturation in the infant. *Pediatr Allergy Immunol*, 29(2), 133-143. <https://doi.org/10.1111/pai.12841>
- Monaco, M., Kim, J., & Donovan, S. (2015). Human milk: composition and nutritional value. In *Encyclopedia of food and health* (pp. 357-362). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00413-X>
- Mosca, F., & Gianni, M. L. (2017). Human milk: composition and health benefits. *Pediatr Med Chir*, 39(2), 155. <https://doi.org/10.4081/pmc.2017.155>
- Muraji, T., Hosaka, N., Irie, N., Yoshida, M., Imai, Y., Tanaka, K., Takada, Y., Sakamoto, S., Haga, H., & Ikehara, S. (2008). Maternal microchimerism in underlying pathogenesis of biliary atresia: quantification and phenotypes of maternal cells in the liver. *Pediatrics*, 121(3), 517-521. <https://doi.org/10.1542/peds.2007-0568>
- Müller, A. C., Jakobsen, M. A., Barington, T., Vaag, A. A., Grunnet, L. G., Olsen, S. F., & Kamper-Jørgensen, M. (2015). Microchimerism of male origin in a cohort of Danish girls. *Chimerism*, 6(4), 65-71. <https://doi.org/10.1080/19381956.2016.1218583>
- Nakagawa, T., Nabeshima, Y., & Yoshida, S. (2007). Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Dev Cell*, 12(2), 195-206. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.01.002>
- Nelson, J. L., Gillespie, K. M., Lambert, N. C., Stevens, A. M., Loubiere, L. S., Rutledge, J. C., Leisenring, W. M., Erickson, T. D., Yan, Z., Mullarkey, M. E., Boespflug, N. D., Bingley, P. J., & Gale, E. A. (2007).

- Maternal microchimerism in peripheral blood in type 1 diabetes and pancreatic islet beta cell microchimerism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(5), 1637-1642. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606169104>
- Nemescu, D., Ursu, R. G., Nemescu, E. R., & Negura, L. (2016). Heterogeneous Distribution of Fetal Microchimerism in Local Breast Cancer Environment. *PLoS One*, 11(1), e0147675. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147675>
- Neville, M. C., Allen, J. C., Archer, P. C., Casey, C. E., Seacat, J., Keller, R. P., Lutes, V., Rasbach, J., & Neifert, M. (1991). Studies in human lactation: milk volume and nutrient composition during weaning and lactogenesis. *The American journal of clinical nutrition*, 54(1), 81-92.
- Neville, M. C., Keller, R., Seacat, J., Lutes, V., Neifert, M., Casey, C., Allen, J., & Archer, P. (1988). Studies in human lactation: milk volumes in lactating women during the onset of lactation and full lactation. *The American journal of clinical nutrition*, 48(6), 1375-1386. <https://doi.org/10.1093/ajcn/48.6.1375>
- Neville, M. C., Morton, J., & Umemura, S. (2001). Lactogenesis: the transition from pregnancy to lactation. *Pediatric Clinics of North America*, 48(1), 35-52. [https://doi.org/10.1016/s0031-3955\(05\)70284-4](https://doi.org/10.1016/s0031-3955(05)70284-4)
- Newburg, D. S., Woo, J. G., & Morrow, A. L. (2010). Characteristics and potential functions of human milk adiponectin. *J Pediatr*, 156(2 Suppl), S41-46. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.11.020>
- Nguyen Huu, S., Oster, M., Avril, M. F., Boitier, F., Mortier, L., Richard, M. A., Kerob, D., Maubec, E., Souteyrand, P., Moguelet, P., Khosrotehrani, K., & Aractingi, S. (2009). Fetal microchimeric cells participate in tumour angiogenesis in melanomas occurring during pregnancy. *Am J Pathol*, 174(2), 630-637. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080566>
- Ochoa, L. F., Kholodnykh, A., Villarreal, P., Tian, B., Pal, R., Freiberg, A. N., Brasier, A. R., Motamedi, M., & Vargas, G. (2018). Imaging of Murine Whole Lung Fibrosis by Large Scale 3D Microscopy aided by Tissue Optical Clearing. *Sci Rep*, 8(1), 13348. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31182-2>
- Organization, W. H. (2013). *Essential nutrition actions: improving maternal, newborn, infant and young child health and nutrition*.
- Pan, C., Cai, R., Quacquarelli, F. P., Ghasemigharagoz, A., Loubopoulos, A., Matryba, P., Plesnila, N., Dichgans, M., Hellal, F., & Ertürk, A. (2016). Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO. *Nat Methods*, 13(10), 859-867. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3964>
- Panahi, M., Keshavarz, S., Rahmanifar, F., Tamadon, A., Mehrabani, D., Karimaghahi, N., Sepehrmanesh, M., & Aqababa, H. (2015). Busulfan induced azoospermia: Stereological evaluation of testes in rat. *Vet Res Forum*, 6(4), 273-278.
- Pang, W. W., & Hartmann, P. E. (2007). Initiation of human lactation: secretory differentiation and secretory activation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 12(4), 211-221. <https://doi.org/10.1007/s10911-007-9054-4>
- Patki, S., Kadam, S., Chandra, V., & Bhonde, R. (2010). Human breast milk is a rich source of multipotent mesenchymal stem cells. *Hum Cell*, 23(2), 35-40. <https://doi.org/10.1111/j.1749-0774.2010.00083.x>
- Patton, S., Huston, G. E., Montgomery, P. A., & Josephson, R. V. (1986). Approaches to the study of colostrum—the onset of lactation. *Human lactation 2: Maternal and environmental factors*, 231-239.
- Peng, L., Li, Z. R., Green, R. S., Holzman, I. R., & Lin, J. (2009). Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *J Nutr*, 139(9), 1619-1625. <https://doi.org/10.3945/jn.109.104638>
- Perez, P. F., Doré, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., Segura-Roggero, I., Schiffrin, E. J., & Donnet-Hughes, A. (2007). Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics*, 119(3), e724-732. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-1649>
- Pillay, J., & Davis, T. J. (2021). Physiology, lactation. *StatPearls [Internet]*.
- Piotrowski, P., & Croy, B. A. (1996). Maternal cells are widely distributed in murine fetuses in utero. *Biol Reprod*, 54(5), 1103-1110. <https://doi.org/10.1095/biolreprod54.5.1103>
- Plaza-Díaz, J., Fontana, L., & Gil, A. (2018). Human Milk Oligosaccharides and Immune System Development. *Nutrients*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/nu10081038>
- Pritchard, S., Peter, I., Johnson, K. L., & Bianchi, D. W. (2012). The natural history of fetal cells in postpartum murine maternal lung and bone marrow: a two-stage phenomenon. *Chimerism*, 3(3), 59-64. <https://doi.org/10.4161/chim.22769>

- Qian, C., Meng, Q., Lu, J., Zhang, L., Li, H., & Huang, B. (2020). Human amnion mesenchymal stem cells restore spermatogenesis in mice with busulfan-induced testis toxicity by inhibiting apoptosis and oxidative stress. *Stem Cell Res Ther*, 11(1), 290. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01803-7>
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J. P., & Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol*, 2(4), 361-367. <https://doi.org/10.1038/86373>
- Riskin, A., Almog, M., Peri, R., Halasz, K., Srugo, I., & Kessel, A. (2012). Changes in immunomodulatory constituents of human milk in response to active infection in the nursing infant. *Pediatr Res*, 71(2), 220-225. <https://doi.org/10.1038/pr.2011.34>
- Rodrigues, D. M., Li, A. Y., Nair, D. G., & Blennerhassett, M. G. (2011). Glial cell line-derived neurotrophic factor is a key neurotrophin in the postnatal enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil*, 23(2), e44-56. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2010.01626.x>
- Ross, M. H. (2016). *Histology A Text and Atlas* (7 ed.).
- Saarela, T., Kokkonen, J., & Koivisto, M. (2005). Macronutrient and energy contents of human milk fractions during the first six months of lactation. *Acta Paediatr*, 94(9), 1176-1181. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2005.tb02070.x>
- Sani, M., Hosseini, S. M., Salmannejad, M., Aleahmad, F., Ebrahimi, S., Jahanshahi, S., & Talei-Khozani, T. (2015). Origins of the breast milk-derived cells; an endeavor to find the cell sources. *Cell Biol Int*, 39(5), 611-618. <https://doi.org/10.1002/cbin.10432>
- Savino, F., Benetti, S., Liguori, S. A., Sorrenti, M., & Cordero Di Montezemolo, L. (2013). Advances on human milk hormones and protection against obesity. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 59(1), 89-98. <https://doi.org/10.1170/T950>
- Savino, F., & Liguori, S. A. (2008). Update on breast milk hormones: leptin, ghrelin and adiponectin. *Clin Nutr*, 27(1), 42-47. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2007.06.006>
- Schrezenmeir, J., Korhonen, H., Williams, C. M., Gill, H. S., & Shah, N. (2000). Beneficial natural bioactive substances in milk and colostrum: occurrence, biochemical and technological characteristics of bioactive substances physiological effects and potential health benefits. *British Journal of Nutrition*, 84(Supplement 1).
- Secker, G. A., & Harvey, N. L. (2015). VEGFR signaling during lymphatic vascular development: From progenitor cells to functional vessels. *Dev Dyn*, 244(3), 323-331. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24227>
- Seelig, L. L., Jr., & Head, J. R. (1987). Uptake of lymphocytes fed to suckling rats. An autoradiographic study of the transit of labeled cells through the neonatal gastric mucosa. *J Reprod Immunol*, 10(4), 285-297. [https://doi.org/10.1016/0165-0378\(87\)90031-3](https://doi.org/10.1016/0165-0378(87)90031-3)
- Semba, R. D., & Juul, S. E. (2002). Erythropoietin in human milk: physiology and role in infant health. *J Hum Lact*, 18(3), 252-261. <https://doi.org/10.1177/089033440201800307>
- Seo, J., Choe, M., & Kim, S. Y. (2016). Clearing and Labeling Techniques for Large-Scale Biological Tissues. *Mol Cells*, 39(6), 439-446. <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.0088>
- Sharifian, P., Yari, S., Hasanein, P., & Manteghi Nezhad, Y. (2022). Conditioned medium of bone marrow mesenchymal stem cells improves sperm parameters and reduces histological alteration in rat testicular ischaemia/reperfusion model. *Andrologia*, 54(11), e14624. <https://doi.org/10.1111/and.14624>
- Shiou, S. R., Yu, Y., Chen, S., Ciano, M. J., Petrof, E. O., Sun, J., & Claud, E. C. (2011). Erythropoietin protects intestinal epithelial barrier function and lowers the incidence of experimental neonatal necrotizing enterocolitis. *J Biol Chem*, 286(14), 12123-12132. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.154625>
- Shrivastava, S., Naik, R., Suryawanshi, H., & Gupta, N. (2019). Microchimerism: A new concept. *J Oral Maxillofac Pathol*, 23(2), 311. [https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP\\_85\\_17](https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_85_17)
- Southern, S. O. (1998). Milk-borne transmission of HIV. Characterization of productively infected cells in breast milk and interactions between milk and saliva. *J Hum Virol*, 1(5), 328-337.
- Stikvoort, A., Sundin, M., Uzunel, M., Gertow, J., Sundberg, B., Schaffer, M., Mattsson, J., & Uhlin, M. (2016). Long-Term Stable Mixed Chimerism after Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Patients with Non-Malignant Disease, Shall We Be Tolerant? *PLoS One*, 11(5), e0154737. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154737>

- Struck, J., de Almeida, P., Bergmann, A., & Morgenthaler, N. G. (2002). High concentrations of prolactin but not mature calcitonin in normal human milk. *Horm Metab Res*, 34(8), 460-465. <https://doi.org/10.1055/s-2002-33596>
- Şener, T. E., Yüksel, M., Özyılmaz-Yay, N., Ercan, F., Akbal, C., Şimşek, F., & Şener, G. (2015). Apocynin attenuates testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg*, 50(8), 1382-1387. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2014.11.033>
- Tang, S. C., Shen, C. N., Lin, P. Y., Peng, S. J., Chien, H. J., Chou, Y. H., Chamberlain, C. E., & Pasricha, P. J. (2018). Pancreatic neuro-insular network in young mice revealed by 3D panoramic histology. *Diabetologia*, 61(1), 158-167. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4408-y>
- Thurl, S., Munzert, M., Boehm, G., Matthews, C., & Stahl, B. (2017). Systematic review of the concentrations of oligosaccharides in human milk. *Nutr Rev*, 75(11), 920-933. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nux044>
- Tian, T., Yang, Z., & Li, X. (2021). Tissue clearing technique: Recent progress and biomedical applications. *J Anat*, 238(2), 489-507. <https://doi.org/10.1111/joa.13309>
- Toyooka, Y., Tsunekawa, N., Akasu, R., & Noce, T. (2003). Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(20), 11457-11462. <https://doi.org/10.1073/pnas.1932826100>
- Trend, S., de Jong, E., Lloyd, M. L., Kok, C. H., Richmond, P., Doherty, D. A., Simmer, K., Kakulas, F., Strunk, T., & Currie, A. (2015). Leukocyte Populations in Human Preterm and Term Breast Milk Identified by Multicolour Flow Cytometry. *PLoS One*, 10(8), e0135580. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135580>
- Tüttelmann, F., & Gromoll, J. (2010). Novel genetic aspects of Klinefelter's syndrome. *Mol Hum Reprod*, 16(6), 386-395. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq019>
- Twigger, A. J., Hepworth, A. R., Lai, C. T., Chetwynd, E., Stuebe, A. M., Blancafort, P., Hartmann, P. E., Geddes, D. T., & Kakulas, F. (2015). Gene expression in breastmilk cells is associated with maternal and infant characteristics. *Sci Rep*, 5, 12933. <https://doi.org/10.1038/srep12933>
- Twigger, A. J., Hodgetts, S., Filgueira, L., Hartmann, P. E., & Hassiotou, F. (2013). From breast milk to brains: the potential of stem cells in human milk. *J Hum Lact*, 29(2), 136-139. <https://doi.org/10.1177/0890334413475528>
- Vass, R. A., Kemeny, A., Dergez, T., Ertl, T., Reglodi, D., Jungling, A., & Tamas, A. (2019). Distribution of bioactive factors in human milk samples. *International breastfeeding journal*, 14(1), 1-10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s13006-019-0203-3>
- Vernochet, C., Caucheteux, S. M., & Kanellopoulos-Langevin, C. (2007). Bi-directional cell trafficking between mother and fetus in mouse placenta. *Placenta*, 28(7), 639-649. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2006.10.006>
- Vieira Borba, V., Sharif, K., & Shoenfeld, Y. (2018). Breastfeeding and autoimmunity: Programming health from the beginning. *Am J Reprod Immunol*, 79(1). <https://doi.org/10.1111/aji.12778>
- Vojdani, Z., Bagheri, J., Talaei-Khozani, T., Azarpira, N., Salmannjad, M., & Farrokhi, A. (2018). Fetal microchimerism in mouse caerulein-induced pancreatitis model. *Iran J Basic Med Sci*, 21(9), 889-895. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2018.26976.6595>
- Wagner, C. L., Taylor, S. N., & Johnson, D. (2008). Host factors in amniotic fluid and breast milk that contribute to gut maturation. *Clin Rev Allergy Immunol*, 34(2), 191-204. <https://doi.org/10.1007/s12016-007-8032-3>
- Weiler, I. J., Hickler, W., & Sprenger, R. (1983). Demonstration that milk cells invade the suckling neonatal mouse. *Am J Reprod Immunol* (1980), 4(2), 95-98. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1983.tb00261.x>
- Witkowska-Zimny, M., & Kaminska-El-Hassan, E. (2017). Cells of human breast milk. *Cell Mol Biol Lett*, 22, 11. <https://doi.org/10.1186/s11658-017-0042-4>
- Wookey, P. J., Turner, K., & Furness, J. B. (2012). Transient expression of the calcitonin receptor by enteric neurons of the embryonic and early post-natal mouse. *Cell Tissue Res*, 347(2), 311-317. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1303-6>
- Xie, Y., Chen, H., Luo, D., Yang, X., Yao, J., Zhang, C., Lv, L., Guo, Z., Deng, C., Li, Y., Liang, X., Deng, C., Sun, X., & Liu, G. (2020). Inhibiting Necroptosis of Spermatogonial Stem Cell as a Novel Strategy for Male Fertility Preservation. *Stem Cells Dev*, 29(8), 475-487. <https://doi.org/10.1089/scd.2019.0220>
- Zeng, X. X., Tan, K. H., Yeo, A., Sasajala, P., Tan, X., Xiao, Z. C., Dawe, G., & Udolph, G. (2010). Pregnancy-associated progenitor cells differentiate and mature into neurons in the maternal brain. *Stem Cells Dev*, 19(12), 1819-1830. <https://doi.org/10.1089/scd.2010.0046>

- Zhang, G., Zhao, Y., Li, X. M., & Kong, J. (2014). Fetal cell microchimerism in the maternal mouse spinal cord. *Neurosci Bull*, 30(1), 81-89. <https://doi.org/10.1007/s12264-013-1392-1>
- Zhang, X., Wang, T., Deng, T., Xiong, W., Lui, P., Li, N., Chen, Y., & Han, D. (2013). Damaged spermatogenic cells induce inflammatory gene expression in mouse Sertoli cells through the activation of Toll-like receptors 2 and 4. *Mol Cell Endocrinol*, 365(2), 162-173. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.10.016>
- Zhao, L., Zhao, J., Dong, Z., Xu, S., & Wang, D. (2023). Mechanisms underlying impaired spermatogenic function in orchitis induced by busulfan. *Reprod Toxicol*, 115, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2022.11.002>
- Zhou, L., Yoshimura, Y., Huang, Y., Suzuki, R., Yokoyama, M., Okabe, M., & Shimamura, M. (2000). Two independent pathways of maternal cell transmission to offspring: through placenta during pregnancy and by breast-feeding after birth. *Immunology*, 101(4), 570-580. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2000.00144.x>
- Zhou, Q., Wang, M., Yuan, Y., Wang, X., Fu, R., Wan, H., Xie, M., Liu, M., Guo, X., & Zheng, Y. (2016). Complete meiosis from embryonic stem cell-derived germ cells in vitro. *Cell stem cell*, 18(3), 330-340.
- Zhu, Y., Hu, H. L., Li, P., Yang, S., Zhang, W., Ding, H., Tian, R. H., Ning, Y., Zhang, L. L., Guo, X. Z., Shi, Z. P., Li, Z., & He, Z. (2012). Generation of male germ cells from induced pluripotent stem cells (iPS cells): an in vitro and in vivo study. *Asian J Androl*, 14(4), 574-579. <https://doi.org/10.1038/aja.2012.3>

## 9. ÖZGEÇMİŞ

|            |  |              |  |
|------------|--|--------------|--|
| Adı        |  | Soyadı       |  |
| Doğum Yeri |  | Doğum Tarihi |  |
| Uyruğu     |  | Tel          |  |
| E-mail     |  |              |  |

### Eğitim Düzeyi

|  |                          |                |
|--|--------------------------|----------------|
|  | Mezun Olduğu Kurumun Adı | Mezuniyet Yılı |
|  |                          |                |

### İş Deneyimi

|        |       |                  |
|--------|-------|------------------|
| Görevi | Kurum | Süre (Yıl - Yıl) |
|        |       |                  |
|        |       |                  |

|                 |                   |          |        |
|-----------------|-------------------|----------|--------|
| Yabancı Dilleri | Okuduğunu Anlama* | Konuşma* | Yazma* |
|                 |                   |          |        |
|                 |                   |          |        |

| Yabancı Dil Sınav Notu # |     |       |           |           |           |     |     |     |
|--------------------------|-----|-------|-----------|-----------|-----------|-----|-----|-----|
| YÖKDİL                   | ÜDS | IELTS | TOEFL IBT | TOEFL PBT | TOEFL CBT | FCE | CAE | CPE |
|                          |     |       |           |           |           |     |     |     |

|               |         |              |       |
|---------------|---------|--------------|-------|
|               | Sayısal | Eşit Ağırlık | Sözel |
| ALES Puanı    |         |              |       |
| (Diğer) Puanı |         |              |       |

### Bilgisayar Bilgisi

|         |                   |
|---------|-------------------|
| Program | Kullanma Becerisi |
|         |                   |
|         |                   |
|         |                   |
|         |                   |
|         |                   |

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.

## 10. BİLİMSEL FAALİYETLER

### Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

- Okten, S. B., Cetin, C., **Tok, O. E.**, Guler, E. M., Taha, S. H., Ozcan, P., & Ficicioglu, C. (2023). Cannabidiol as a potential novel treatment for endometriosis by its anti-inflammatory, antioxidative and antiangiogenic effects in an experimental rat model. *Reproductive BioMedicine Online*, 46(5), 865-875. [10.1016/j.rbmo.2023.01.018](https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2023.01.018)
- Deveci, E., Akbaş, F., Ergun, A. Ş., Kurtulmuş, A., Koçak, A. B., Boyraz, R. K., **Tok, O. E.**, Aydın, M. Ş., Kılıç, Ö., & Bozkurt, A. (2023). The effects of transcranial focused ultrasound stimulation of nucleus accumbens on neuronal gene expression and brain tissue in high alcohol-preferring rats. *Molecular Neurobiology*, 60(2), 1099-1116. [10.1007/s12035-022-03130-9](https://doi.org/10.1007/s12035-022-03130-9)
- Taslidere, E., Esrefoglu, M., **Tok, O.**, Taslidere, B., & Bulut, H. (2023). Effects of melatonin on both testicular regeneration and recovery of spermatogenesis in busulfan-treated rats. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902022e20945>
- Tok, O. E.**, Demirel, G., Saatci, Y., Akbulut, Z., Kayalar, O., & Aktas, R. G. (2022). Culturing, Freezing, Processing, and Imaging of Entire Organoids and Spheroids While Still in a Hydrogel. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*(190), e64563. [10.3791/64563](https://doi.org/10.3791/64563)
- Kayalar, E., Goger, F., Tas Deynek, G., **Tok, O. E.**, & Kucuk, S. (2022). New bone-generative effect of *Salvia officinalis* L. in the expanded midpalatal suture: An in vivo and in vitro study. *Journal of Orofacial Orthopedics/Fortschritte der Kieferorthopädie*, 83(Suppl 1), 85-95. [10.1007/s00056-021-00366-3](https://doi.org/10.1007/s00056-021-00366-3)
- Irem Demir, A., Pulatkan, A., Ucan, V., Yilmaz, B., Tahmasebifar, A., **Tok, O. E.**, Tuncay, I., Elmali, N., Ozturk, B. Y., & Uzer, G. (2022). Comparison of 3 cell-free matrix scaffolds used to treat osteochondral lesions in a rabbit model. *The American Journal of Sports Medicine*, 50(5), 1399-1408. [10.1177/03635465221074292](https://doi.org/10.1177/03635465221074292)
- Soylemez, E., Ozcagli, E., Korkmaz, S., **Tok, O. E.**, Aydin, M. S., & Omurtag, G. Z. (2022). The association of oxidative stress and DNA damage with XRCC1 and XRCC3 polymorphisms in radiology technicians. *Toxicology and Industrial Health*, 38(2), 70-79. [10.1177/07482337211062680](https://doi.org/10.1177/07482337211062680)
- Yozgat, Y., Karakoc, E., Sahin, O., Cimen, S., Rabeh, W. M., Aydin, M. S., Mardinoglu, A., Gursel, I., Cakir, A., & Sensoy, O. (2022). Hexokinase 1b is a novel target for non-small-cell lung cancer. *bioRxiv*, 2022.2006. [10.1101/2022.06.27.497447](https://doi.org/10.1101/2022.06.27.497447)
- Kayalar, E., Deynek, G. T., **Tok, O. E.**, & Kucuk, S. (2021). Effect of salvianolic acid B on new bone formation in the orthopedically expanded suture: A histological and immunohistochemical study. *The Angle Orthodontist*, 91(2), 248-254. [10.2319/042620-360.1](https://doi.org/10.2319/042620-360.1)
- Akakin, D., **Tok, O. E.**, Anil, D., Akakin, A., Sirvanci, S., Sener, G., & Ercan, F. (2021). Electromagnetic waves from mobile phones may affect rat brain during development. *Turk. Neurosurg*, 31, 412-421. [10.5137/1019-5149.JTN.31665-20.2](https://doi.org/10.5137/1019-5149.JTN.31665-20.2)

- Mirapoglu, S. L., Guler, E. M., **Tok, O. E.**, Aydogdu, I., Cay, A., Camli, M. F., Kocyigit, A., Canter, H. I., & Yildiz, K. (2021). Effects of platelet rich plasma and amniotic cell culture medium on wound healing following experimental animal tracheal injury model: a comparative study. *Journal of Craniofacial Surgery*, 32(5), 1937-1941. [10.1097/SCS.00000000000007396](https://doi.org/10.1097/SCS.00000000000007396)
- Sozen, E., Yazgan, B., **Tok, O. E.**, Demirel, T., Ercan, F., Proto, J. D., & Ozer, N. K. (2020). Cholesterol induced autophagy via IRE1/JNK pathway promotes autophagic cell death in heart tissue. *Metabolism*, 106, 154205. [10.1016/j.metabol.2020.154205](https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154205)
- Ozcan, P., Takmaz, T., **Tok, O. E.**, Islek, S., Yigit, E. N., & Ficicioglu, C. (2020). The protective effect of platelet-rich plasma administrated on ovarian function in female rats with Cy-induced ovarian damage. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37, 865-873. [10.1007/s10815-020-01689-7](https://doi.org/10.1007/s10815-020-01689-7)
- Yuca, Y., Yucesoy, T., **Tok, O. E.**, & Alkan, A. (2020). The efficiency of ozone therapy and low-level laser therapy in rat facial nerve injury. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 48(3), 308-314. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2020.01.017>
- Saygin, B., Esrefoglu, M., Bayindir, N., **Tok, O. E.**, Selek, S., Bulut, H., Ozer, O., Ozturk, A., Yilmaz, O., & Meydan, S. (2018). Protection with thymoquinone against formaldehyde-induced neurotoxicity in the rats. *Bratislavske Lekarske Listy*, 119(11), 726-730. [10.4149/BLL.2018.129](https://doi.org/10.4149/BLL.2018.129)
- Yaman, O. M., Erman, H., Guner, I., **Tok, O. E.**, Pala, M., Esrefoglu, M., Gelisgen, R., Uzun, H., Aksu, U., & Yelmen, N. (2018). Remote myocardial injury: the protective role of fluoxetine. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 96(4), 319-327. [10.1139/cjpp-2017-0383](https://doi.org/10.1139/cjpp-2017-0383)
- Çalışkan, S., Keleş, M. O., Öztürk, M. İ., Kutluhan, M. A., **Tok, O. E.**, Ercan, F., & Karaman, M. İ. (2017). Effect of sildenafil citrate in testosterone induced benign prostate hyperplasia rat model. *Turkish Journal of Urology*, 43(4), 434. [10.5152/tud.2017.23356](https://doi.org/10.5152/tud.2017.23356)
- Sozen, E., Yazgan, B., **Tok, O. E.**, Ercan, F., Karademir, B., & Ozer, N. K. (2017). High cholesterol diet-mediated unfolded protein response activation enhances autophagic cell death in heart tissue. *Free Radical Biology and Medicine*, 108, S56. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.199>
- Özdemir-Kumral, Z. N., Özbeyli, D., Özdemir, A. F., Karaaslan, B. M., Kaytaç, K., Kara, M. F., **Tok, O. E.**, Ercan, F., & Yeğen, B. Ç. (2017). Protective effect of nicotine on sepsis-induced oxidative multiorgan damage: role of neutrophils. *Nicotine & Tobacco Research*, 19(7), 859-864. [10.1093/ntr/ntw198](https://doi.org/10.1093/ntr/ntw198)
- Esrefoglu, M., Çetin, A., Taslidere, E., Elbe, H., Ateş, B., **Tok, O. E.**, & Aydin, M. (2017). Therapeutic effects of melatonin and quercetin in improvement of hepatic steatosis in rats through suppression of oxidative damage. *Bratislava Medical Journal-Bratislavske Lekarske Listy*, 118(6). [10.4149/BLL.2017.066](https://doi.org/10.4149/BLL.2017.066)
- Uzer, G., Elmadağ, N. M., Yıldız, F., Güzel, Y., & **Tok, O. E.** (2017). Increasing number of small hole diameter microfracture compared with traditional microfracture in same size cartilage defects and effect of HA based aselluler scaffold. An animal study. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*, 5(2\_suppl2), Published online. [10.1177/2325967117S00081](https://doi.org/10.1177/2325967117S00081)

- Esrefoglu, M., **Tok, O. E.**, Aydin, M., Iraz, M., Ozer, O., & Selek, S. (2016). Effects of beta-glucan on protection of young and aged rats from renal ischemia and reperfusion injury. *Bratislavske Lekarske Listy*, 117(9), 530-538. [10.4149/bll.2016.105](https://doi.org/10.4149/bll.2016.105)
- Özcan, P., Fıçıcıoğlu, C., Kizilkale, O., Yesiladali, M., **Tok, O. E.**, Ozkan, F., & Esrefoglu, M. (2016). Can Coenzyme Q10 supplementation protect the ovarian reserve against oxidative damage? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33, 1223-1230. [10.1007/s10815-016-0751-z](https://doi.org/10.1007/s10815-016-0751-z)
- Yarpuzlu, B., Ayyildiz, M., **Tok, O. E.**, Aktas, R. G., & Basdogan, C. (2014). Correlation between the mechanical and histological properties of liver tissue. *journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 29, 403-416. [10.1016/j.jmbbm.2013.09.016](https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2013.09.016)
- Şehirli, A. Ö., Koyun, D., Tetik, Ş., Özşavcı, D., Yiğiner, Ö., Çetinel, Ş., **Tok, O. E.**, Kaya, Z., Akkiprik, M., & Kılıç, E. (2013). Melatonin protects against ischemic heart failure in rats. *Journal of pineal research*, 55(2), 138-148. [10.1111/jpi.12054](https://doi.org/10.1111/jpi.12054)
- Ozturk, M. I., Koca, O., Keles, M. O., Haklar, G., Baykan, O., Ercan, F., **Tok, O. E.**, & Karaman, M. I. (2013). The impact of unilateral experimental rat varicocele model on testicular histopathology, Leydig cell counts, and intratesticular testosterone levels of both testes. *Urology Journal*, 10(3), 973-980.
- Savcun, G. Y., Özkan, E., Dulundu, E., Topaloğlu, Ü., Şehirli, A. Ö., **Tok, O. E.**, Ercan, F., & Şener, G. (2013). Antioxidant and anti-inflammatory effects of curcumin against hepatorenal oxidative injury in the experimental sepsis model created in rats. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, 19(6), 507-515. [10.5505/tjtes.2013.76390](https://doi.org/10.5505/tjtes.2013.76390)

#### Uluslararası Diğer Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

- Guneren, E., Akman, O., Bilgen, R., & **Tok, O. E.** (2018). Fascicular Turnover Flap Repair in Peripheral Nerve Defects; An Experimental Study. *Plastic and Reconstructive Surgery Global Open*, 6(9 Suppl), 217. [10.1097/01.GOX.0000547117.60395.a1](https://doi.org/10.1097/01.GOX.0000547117.60395.a1)
- Sozen, E., Yazgan, B., **Tok, O. E.**, Ercan, F., Karademir, B., & Ozer, N. K. (2017). IRE1-JNK branch of ER stress response promotes inflammation and autophagy in heart tissue. *FEBS Journal*, 284, 306.
- Akyuz, E., Ercan, C., Akbas, F., **Tok, O. E.**, & Esrefoglu, M. (2017). Examination of ECG recording and cardiac potassium channels-genes in a mice model of demyelination. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 46, 263.
- Erkeç, O. E., Meral, İ., Kara, M., Esrefoglu, M., & **Tok, O. E.** (2015). Effects of Cichorium intybus on seizure development in pentylenetetrazole kindling model of epilepsy. *Int J Exp Clin Anat*, 9(1), 45.

## **Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler**

- Tok OE**, Özcan P, Eşrefoğlu M. Negative effects on endometrium of clomiphene citrate treatment can be prevented with resveratrol? pp. 272-4. 14<sup>th</sup> Multinational Congress on Microscopy (MCM 2019), Belgrade, Serbia, 15-20 September 2019.
- Aydin MS, **Tok OE**, Kilic A, Kayasandik CB, Tanriverdi C, Tabakci BN, Ozturk G. Comparison of collagen distribution between keratoconus and normal human corneal stroma using second harmonic generation microscopy. pp. 50-51. 14<sup>th</sup> Multinational Congress on Microscopy (MCM 2019), Belgrade, Serbia, 15-20 September 2019.
- Sozen E, Yazgan B, Sahin A, **Tok OE**, Ercan F, Ozer NK. Use of mass spectrometry in determining fatty acid and oxysterol alterations in heart tissue; effect of high cholesterol diet. Advances in the Study of Lipid and Protein Oxidation: From Methods to Targets. Ghent, Belgium, 13-15 March 2019.
- Mirapoğlu SL, Yildiz K, Güler EM, **Tok OE**, Aydoğdu İ, Çay A. Healing following Experimental Tracheal Injury and Repair: A Comparative Study in the Rat Model. 27th congress of The Association of Paediatric Surgeons of Pakistan (APSP) and 8th congress of Federation of Associations of Pediatric Surgeons of SAARC Countries (FAPSS) 2019, Lahore, Pakistan, 22 February - 18 March 2019.
- Tok OE** and Aktas RG. Serial passaging effects the carcinogenicity, stemness and speroid formation of HEPG2 cells, a hepatocellular carcinoma cell line. pp. 401. 13<sup>th</sup> Multinational Congress on Microscopy (MCM 2017), Rovinj, Croatia, 24-29 September 2017.
- Ozturk M, Dağıstanlı FK, Kurum GA, Eşrefoğlu M, **Tok OE**, Tanrıverdi G. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition causes liver regeneration in neonatal STZ-diabetic rats. pp. 240. 15<sup>th</sup> International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (ICHC 2017), Antalya, Turkey, 18 - 21 May 2017.
- Ozkan N, Şehirli AO, Yuksel M, Cilingir OT, **Tok OE**, Aydemir S, Koc M, Cetinel Ş. The Effect of Apelin on Podocytes in Doxorubicin Induced Nephrotic Syndrome. pp.445. 15<sup>th</sup> International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (ICHC 2017), Antalya, Turkey, 18 - 21 May 2017.
- Sahin G, Yaman OM, Guner I, **Tok OE**, Pala M, Esrefoglu M, Yelmen N. Fluoxetine prevents ischemia perfusion induced acute cardiac inflammation and injury. 33. World Congress of Internal Medicine (WCIM), Bali, Indonesia, 22-25 August 2016.
- Tok OE**, Akakin D, Dagbası N, Anıl D, Akakin A, Sırvancı S, Ercan F. Effects of electromagnetic waves emitted by cell phones on rat optic and trigeminal nerve. 693.15/O10. Neuroscience 2016, San Diego, CA, USA, 12-16 November 2016.

- Aktas RG, Isan H, Caliskan EB, **Tok OE**, Aydin MS, O. T. Kaya. Dose Dependent Effects of Dimethyl Sulfoxide on the Mitochondria of Hepatocellular Carcinoma Cells. 3-7.12.2016, Cell Biology 2016, San Francisco, CA, USA.
- Erkec OE, Meral I, Kara M, **Tok OE**, Esrefoglu M. Antiepileptic and antioxidant effects of cichorium intybus on pentylenetetrazol-induced kindling in rats. pp. 343-345. 12th Multinational Congress on Microscopy, Eger, Hungary, 23-28 August 2015.
- Bayindir N, Esrefoglu M, **Tok OE**, Aydin MS, Iraz M, Kesgin S, Kocyigit A. Protective effects of  $\beta$  glucan on hepatic injury induced by renal ischemia and reperfusion in rats. pp. 367-369. 12th Multinational Congress on Microscopy, Eger, Hungary, 23-28 August 2015.
- Esrefoglu M, Aydin MS, **Tok OE**, Iraz M, Kesgin S, Kocyigit A. The effects of melatonin on hepatic regeneration after partial hepatectomy in young and aged Sprague–dawley rats. pp. 373-374. 12th Multinational Congress on Microscopy, Eger, Hungary, 23-28 August 2015
- Aktas RG, **Tok OE**. Localization of embryonic stem cell markers (Oct4, Nanog, Sox2, SSEA-4, TRA-1) in tumour spheroids of hepatocellular carcinoma cell line after confluency in long-term cell cultures. 2nd International Congress on Stem Cell and Cellular Therapies, Antalya, Turkey, 15 - 18 October 2015.
- Esrefoglu M., **Tok OE.**, Aydin M.S, Iraz M., Selek S., Ozer O.F., Kocyigit A.; Protective effect of beta-glucan on renal ischemia and reperfusion injury in young and aged rats. 18th International Microscopy Congress, Prague, Czech Republic, 07-12 September 2014.
- Tok OE**, Kıran D, Şehirli AÖ, Ercan F; The effects of electromagnetic waves on urinary bladder morphology and urothelial barrier function in developing rats. 18th International Microscopy Congress, Prague, Czech Republic, 07-12 September 2014.
- Tok OE**, Şehirli AÖ, Ercan F; Electromagnetic Waves Emitted By Mobile Phones Effect On The Testis Morphology Of Rat, Cell Death and Blood-Testis Barrier: Evaluation for Infertility. 18th International Microscopy Congress, Prague, Czech Republic, 07-12 September 2014.
- Çalışkan S., Keleş M.O., Öztürk M.I., Kutluhan M.A., **Tok OE**, Ercan F., Karaman M.I. Efficacy Of Sildenafil Citrate In Testosterone Induced Bening Prostate Hyperplasia In Rats. EAU 9th South Eastern European Meeting, Thessaloniki, Greece, 1-3 November 2013.
- Aktas RG, Karahuseyinoglu S, Karabork M, **Tok OE**, Yucel D; Mito Tracker labeling in HepG2 Cell Cultures: Influence of different staining techniques on the morphology of

mitochondria. 2012 ASCB Annual Meeting, San Francisco, USA, December 15-19 2012

Aktas RG, Karahuseyinoglu S, **Tok OE**, Karabork M, Yucel D; Actin distribution in HepG2 cell-spheroids: A fluorescence microscopic study. 2012 ASCB Annual Meeting, San Francisco, USA, December 15-19 2012.

Aktas RG, Guven A, Ozacmak HS, Ozacmak VH, Ickin M, **Tok OE**, Oktayer G.; Mechanisms of the effects of Erythropoietin in wound healing: A morphologic study. 2012 ASCB Annual Meeting, San Francisco, USA, December 15-19 2012.

Karabork M, Kavgaci U, **Tok OE**, Lack N, Aktas RG; Relationship between the expression of F-Actin and Nanog, an embryonic stem cell gene, in prostate cancer cells. 2012 ASCB Annual Meeting, San Francisco, USA, December 15-19 2012.

Aktas RG, Ozdemir AA, **Tok OE**, Karahisarli B. Success rate of surgical sperm retrieval in 47;XXY Klinefelter syndrome: a study of 38 azoospermic turkish patients. Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology, Istanbul, Turkey, July 1-4, 2012.

Ozdemir AA, Aktas RG, **Tok OE**.: Success rate of different surgical methods for sperm retrieval: a study of 211 azoospermic Turkish patients with normal karyotype. Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology, Istanbul, Turkey, July 1-4, 2012.

#### **Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler**

Ucan, V., Yildiz, F., Elmadağ, N. M., Uzer, G., Güzel, Y., **Tok, O. E.**, & Mukaddes, E. (2021). Comparison of Small-diameter-hole and Traditional Microfracture in Cartilage Repair and the Effect of Adding a Hyaluronic Acid-based Acellular Matrix Scaffold: An Animal Study. *Bezmialem Science*, 9(1):84-90, 2021. [10.14235/bas.galenos.2020.3751](https://doi.org/10.14235/bas.galenos.2020.3751)

Günay, Ö., Doğanay, Ö., **Tok, O. E.**, & Alkan, A. (2020). Radyoterapiyi takiben kritik boyutta oluşturulan kemik defektlerinde antibiyotiklerin etkinliğinin deneysel olarak incelenmesi. *Selcuk Dental Journal*, 7(2), 294-303. <https://doi.org/10.15311/selcukdentj.695767>

Kelahmetoğlu, O., Yağmur, Ç., Yeniocak, A., Özer, Ö. F., **Tok, O. E.**, Güneren, E., Yıldız, K., Koçyiğit, A., & Eşrefoğlu, M. (2020). The Effect of Vitamin D3 on Skeletal Muscle in Rat after Ischemia Reperfusion Injury: Preliminary Report. [10.14235/bas.galenos.2019.3433](https://doi.org/10.14235/bas.galenos.2019.3433)

Kiran, D., **Tok, O. E.**, Şehirli, A. Ö., Gökçe, A. M., & Ercan, F. (2017). The morphological and biochemical investigation of prenatal electromagnetic wave effects on urinary bladder in rats. *Marmara Medical Journal*, 30(3), 146-154. <https://doi.org/10.5472/marumj.370642>

**Tok, O. E., & Ercan, F.** (2013). The effect of the electromagnetic waves emitted by mobile phones on the testis morphology of rats. *Clinical and Experimental Health Sciences*, 3(3), 138.

#### **Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler**

Akakın D, **Tok OE**, Dağbaşı N, Anıl D, Akakın A, Şirvancı S, Ercan F. Cep Telefonları Kaynaklı Elektromanyetik Dalgaların Sıçan Trigeminal Siniri Üzerine Etkileri. *Cell and Tissue Biology Research*, 2015 (6):225-226. Uluslararası Katılımlı XIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 30 Nisan – 3 Mayıs 2016, İzmir, Türkiye.

**Tok OE**, Aydın MŞ, Eşrefoğlu M, Iraz M, Ayhan S, Koçyiğit A. Genç Ve Yaşlı Sprague-Dawley Sıçanlarda Parsiyel Hepatektomi Sonrası Melatoninin Karaciğer Rejenerasyonuna Etkisi. *Cell and Tissue Biology Research*, 2015 (6):595-596. Uluslararası Katılımlı XIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 30 Nisan – 3 Mayıs 2016, İzmir, Türkiye.

Bayındır N, **Tok OE**, Eşrefoğlu M, Kılıç E, Bulut H. Shea Yağının Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi. *Cell and Tissue Biology Research*, 2015 (6):720-21. Uluslararası Katılımlı XIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 30 Nisan – 3 Mayıs 2016, İzmir, Türkiye.

Erkeç OE, Meral İ, Kara M, Eşrefoğlu M, **Tok OE**, Effects of Cichorium intybus on seizure development in pentyleneterazole kindling model of epilepsy, 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi, Konya, Türkiye, 30 Nisan-3 Mayıs 2015.

Garip A, Uzak E, **Tok OE**, Eşrefoğlu M, Aktaş RG, Uzun Süreli ve Düşük Doz Siklosporin Kullanımının Böbrek Dokusu Üzerine Apoptotik Etkileri, syf.52, 3. Cerrahpaşa Bilim Günleri, İstanbul, 8-9 Mart 2014.

**Tok OE**, Ercan F, Cep Telefonlarının Yaydığı Elektromanyetik Dalgaların Sıçan Testisinde Hücre Ölümü ve Kan-Testis Bariyeri Üzerine Etkileri: İnfertilite Açısından Değerlendirme, 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, Mersin, 28-31 Mayıs 2013.

**Tok OE**, Akakın D, Dağbaşı N, Şirvancı S, Şener G, Ercan F, Cep Telefonlarının Yaydığı Elektromanyetik Dalga Maruziyetine Bırakılan Sıçanların Beyin Dokusunda GFAP İmmünreaktivitesi ve Western Blot Analizi, 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, Mersin, 28-31 Mayıs 2013.

Büyüktopçu E, **Tok OE**, Aktaş RG, Yarpuzlu B, Ayyıldız M, Başdoğan Ç, Organ Nakilleri Öncesi Dokuların Taşınma Sürecinde “UW” Ve “Custodiol” Solüsyonlarında Bekleyen Karaciğer Dokularında Zamana Bağlı Ortaya Çıkan Değişikliklerin İnce Yapısal Düzeyde İncelenmesi, 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, Mersin, 28-31 Mayıs 2013.

Güney G, **Tok OE**, Ercan F, Aktaş RG, Karbondioksitsiz Ortamda ve Düşük Isıda Canlı Kalabilen HepG2 Hücrelerinin Morfolojik Özellikleri, 21. Uluslararası katılımlı Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, Mersin, 28-31 Mayıs 2013.

Yüksel M, Şehirli AÖ, **Tok OE**, Ercan F, Haklar G. Protective Effects of Alpha Lipoic-Acid and N-Acetyl Cystein Against Acrylamide-Induced Peripheric Neuropathy. 4th Conference of the Mediterranean Neuroscience Society, September 30 – October 3, 2012.

**Tok OE**, Ercan F, Aktaş RG, Embriyonik Kök Hücre Belirleyicisi Nanog'un Karaciğer Kanseri Hücre Sferoidleri İçerisindeki Lokalizasyonunun Konfokal Mikroskop Ve Taramalı Elektron Mikroskop Düzeyinde Görüntülenmesi, 3. Kök Hücre Sempozyumu, İstanbul, 30 Kasım – 1 Aralık 2012.

**Aktas RG, Tok OE**, Oktayer AG, Oztekin A, Bayar U, Kosif R. Regional Expression of Basic Fibroblast Growth Factor and Its Receptor on Placenta. XI. National Histology and Embryology Congress with International Contribution, Cell&Tissue Biology Research, Special Issue, 163-164, Denizli, 16-19 May 2012.

Akakın D, Dağbaşı N, **Tok OE**, Şırvancı S, Ercan F. Effects of Electromagnetic Waves Emitted by Cell Phones on Rat optic Nerve. XI. National Histology and Embryology Congress with International Contribution, Cell&Tissue Biology Research, Special Issue, 106, Denizli, 16-19 May 2012.

Savcun GY, Özkan E, Dulundu E, Topaloğlu Ü, Şehirli AÖ, **Tok OE**, Ercan F, Şener G, Ratlarda Deneysel Sepsis Modelinde Oluşan Hepatorenal Oksidatif Hasara Karşı Curcuminin Antioksidan Ve Antiinflamatuvar Etkisi, 18. Ulusal Cerrahi Kongresi, İzmir, 23-27 Mayıs 2012.

Yüksel M, Şehirli AÖ, Çavuşoğlu-Dalgıçdır E, **Tok OE**, Erzik C, Ercan F, Haklar G. Antioxidant effects of alpha-lipoic acid and n-acetyl cysteine on acrylamide-induced gonotoxicity in male rats. 4th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. 26-29 June 2012.

**Tok OE**, Gökçe AM, Şener G, Ercan F, Cep Telefonlarının Yayıdığı Elektromanyetik Dalgaların Sıçan Testis Morfolojisi Üzerine Etkileri: Ön Çalışma, 20. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, Kemer - Antalya, 25 – 28 Ekim 2011.

Akakın D, Dağbaşı N, **Tok OE**, Şırvancı S, Şener G, Ercan F, Cep Telefonlarının Yayıdığı Elektromanyetik Dalgaların Sıçan Beyin Morfolojisi Üzerine Etkileri: Ön Çalışma, 20. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, Kemer - Antalya, 25 – 28 Ekim 2011.

Contuk G, **Tok OE**, Şener G, Ercan F, Cep Telefonlarının Yayıdığı Elektromanyetik Dalgaların Sıçan Mide, İleum ve Kolon Morfolojisi Üzerine Etkileri: Ön Çalışma, 20. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, Kemer - Antalya, 25 – 28 Ekim 2011.

Kıran D, Contuk G, **Tok OE**, Gökçe A, Şener G, Ercan F, Cep Telefonlarının Yayıdığı Elektromanyetik Dalgaların Sıçan Mesane Morfolojisi Üzerine Etkileri: Ön Çalışma, 20. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, Kemer - Antalya, 25 – 28 Ekim 2011.

Kumral ZNÖ, Özdemir AF, Karaaslan B, Kaytaç K, Kara MF, **Tok OE**, Ercan F, Özbeyli D, Koc M, Yeğen BÇ, Sıçanlarda Sepsisle İndüklenen Kardiyopulmoner ve Renal Hasara Nikotin Tedavisinin veya Nikotin Yoksunluğunun Etkileri, Ankara, 6. Cerrahi Araştırma Kongresi, 08-10 Aralık 2011.

Yıldız SD, Aydın MŞ, **Tok OE**, Özlem Tuğçe Çilingir, Kıran D. In vivo görüntülemeye Quantum Dot kullanımı: Ön çalışma. 10. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Çeşme, İzmir, 05/2010.

Özdemir ZN, Özbeyli D, Özdemir AF, Karaaslan MB, Kaytaç K, Kara MF, **Tok OE**, Ercan F, Berrak C. Yeğen. The Effect of Nicotine Consumption & Deprivation on Damage of Multi-organ Failure Caused by Sepsis: Role of Neutrophils, 3rd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels, 22-27 Haziran 2010.

## Projeler

Kornea hastalıklarında mikroskopik görüntüleme ve makine öğrenme ile yeni tanı yöntemlerinin geliştirilmesi. Destekleyen kurum: TÜSEB (4362), Nisan 2020

Fluoxetine Prevents Ischemia Reperfusion Induced Acute Cardiac Inflammation and Injury. Bağımsız Proje, Destekleyen kurum: İstanbul Üniversitesi, BAP (BEK-2016-22531), 03.08.2016 -03.02.2017

Salvia officinalis'in Sıçanlarda Hızlı Premaksilla Genişletmesinde Yeni Kemik Oluşumuna Etkisinin Histomorfometrik Olarak İncelenmesi, Bağımsız Proje, Destekleyen kurum: Anadolu Üniversitesi BAP, (1701S029), 2017

Serulein ile oluşturulan akut pankreatit modelinde Shea yağı ve  $\beta$ -glukan'ın sıçanlarda tedavi edici etkisi. Bağımsız Proje, Destekleyen kurum: Bezmialem Vakıf Üniversitesi, BAP, 2017

Farelerde zenograft ile oluşturulmuş hepatosellüler karsinomda *Olea europaea* yapraklarının Bağımsız Proje, Destekleyen kurum: Bezmialem Vakıf Üniversitesi, BAP (3.2016/6), 2016

Rat siyatik sinirinde fasiküler turnover flap ile iyileşmenin ve motor fonksiyonların değerlendirilmesi. Bağımsız Proje, Destekleyen kurum: Bezmialem Vakıf Üniversitesi, BAP (6.2016/10), 2016

Busulfan uygulanan sıçanlarda oluşan testis hasarı ve sperm parametreleri üzerine melatoninin etkileri. Bağımsız Proje, Destekleyen kurum: Bezmialem Vakıf Üniversitesi, BAP (6.2016/24), 2016

Nucleus Accumbense Odaklanmış Ultrason Uyarımının Alkol Bağımlılığı Oluşturulmuş Ratlarda Alkol Tüketimi ve Beyin Dokusu Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması. Destekleyen kurum: TÜBİTAK-1001 (214S249), Mayıs 2015

İskemi Reperfüzyon Hasarında Vitamin D3'ün İskelet Kası Üzerine Etkisi. Bağımsız Proje, Destekleyen kurum: Bezmialem Vakıf Üniversitesi, BAP (6.2015/14), 2015

Nucleus accumbense odaklanmış ultrason uyarımının opioid bağımlılığı oluşturulmuş ratlarda opioid tercih ve opioid yoksunluğu ile beyin dokusu üzerindeki etkilerinin araştırılması. Bağımsız Proje, Destekleyen kurum: Bezmialem Vakıf Üniversitesi, BAP (9.2015/20), 2015

Genç ve yaşlı sıçanlarda oluşturulan renal iskemi-reperfüzyon hasarında  $\beta$ -Glukan'ın etkileri. Bağımsız Proje, Destekleyen kurum: Bezmialem Vakıf Üniversitesi, BAP (3.2014/46), 2014

Cuprizon modeli multipl sklerozda kalpte bulunan K<sup>+</sup> kanal ekspresyonunun incelenmesi. Bağımsız Proje, Destekleyen kurum: Bezmialem Vakıf Üniversitesi, BAP (3.2014/37), 2014

Melatoninin Genç Ve Yaşlı Sıçanlarda Karaciğer Rejenerasyonuna Etkisi: Mikroskopik Ve Biyokimyasal Bir Çalışma. Destekleyen kurum: TÜBİTAK-3001 (213S106), Mayıs 2014

Anne-yavru mikrokimerizminde kimerik hücrelerin tespiti ve tanımlanması. Bağımsız Proje, Destekleyen kurum: Bezmialem Vakıf Üniversitesi, BAP (6.2014/8), 2014

Clomipene citrate tedavisinin endometriyum üzerindeki olumsuz etkisi rezveratrol ile engellenebilir mi? Bağımsız Proje, Destekleyen kurum: Bezmialem Vakıf Üniversitesi, BAP (12.2014/33), 2014

High Cholesterol Diet Mediated Unfolded Protein Response Activation Enhances Autophagic Cell Death In Heart Tissue. Bağımsız Proje, Destekleyen kurum: Marmara Üniversitesi, BAPKO, (SAG-C-DRP-130515-0164), 2013

Shea yağının yara iyileşmesi üzerine etkisi. Bağımsız Proje, Destekleyen kurum: Bezmialem Vakıf Üniversitesi, BAP (9.2013/1), 2013

Ratlarda pentilentetrazol ile oluşturulan deneysel epilepsy modelinde *Cichorium intybus*'un kan ve beyin oksidatif stress, apoptosis, genotoksiste ve DNA hasarı üzerine etkisinin incelenmesi. Bağımsız Proje, Destekleyen kurum: Yüzüncü Yıl Üniversitesi, BAPKO, 2013

Cep telefonlarının yaydığı elektromanyetik dalgaların sıçan Sıçan Mesane Morfolojisi Üzerine Etkileri. Bağımsız Proje, Destekleyen kurum: Marmara Üniversitesi, BAPKO, 2012

Cep telefonlarının yaydığı elektromanyetik dalgaların sıçan beyin morfolojisi, hücre ölümü ve GFAP immünohistokimyası üzerine etkileri. Bağımsız Proje, Destekleyen kurum: Marmara Üniversitesi, BAPKO, (SAG-A-130511-0130), 2011

Cep Telefonlarının Yaydığı Elektromanyetik Dalgaların Sıçan Testis Gelişimi, Hücre Ölümü ve Kan-Testis Bariyeri Üzerine Etkileri: İnfertilite Açısından Değerlendirme. Yüksek Lisans Projesi, Destekleyen kurum: Marmara Üniversitesi, BAPKO, (SAG-C-YLP-031210-0270), 2010

## **11. EKLER**