

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALLOJENİK MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER VE MİKROAKIŞKAN SİSTEMLE VÜCUT
DIŞINDA TESTİSTEKİ SPERMATOGONYAL KÖK HÜCRE MİKROÇEVRESİNİN
DEVAMLILIĞININ SAĞLANMASI**

SELİN ÖNEN

Kök Hücre Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2023

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALLOJENİK MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER VE MİKROAKIŞKAN SİSTEMLE VÜCUT
DIŞINDA TESTİSTEKİ SPERMATOGONYAL KÖK HÜCRE MİKROÇEVRESİNİN
DEVAMLILIĞININ SAĞLANMASI

SELİN ÖNEN

Kök Hücre Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Petek KORKUSUZ

İKİNCİ DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Sevil KÖSE

ANKARA

2023

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

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

..... / /

Selin ÖNEN

i

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

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

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

ETİK BEYAN

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

Selin ÖNEN

TEŞEKKÜR

Tanıştığımız günden bugüne bilgisi ve tecrübesi ile hayatımın her alanında beni destekleyen, doktora tezimde bana multidisipliner bakış açısıyla araştırma yapma olanağı sağlayan, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyduğum sayın danışmanım Prof. Dr. Petek Korkusuz'a; bilimsel kimliği ve insanlığını örnek aldığım, değerli yardımcı danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Sevil Köse'ye; tez kapsamında geliştirilen cihazın tasarım ve üretimi için bana ODTÜ MEMS Merkezi'nin kapılarını açan ve ekibiyle birlikte mühendislik altyapısını sunan sayın hocam Prof. Dr. Haluk Külâh'a; mikroakışkan cihazın tasarımı ve üretimi aşamalarında bana kıymetli katkılarını sunan sevgili arkadaşım Ali Can Atik'e; doktora tezi çalışmalarımın yanı sıra hayatımın her alanında yanımda varlığını hissettiğim ve kendisinden güç aldığım canım arkadaşım Merve Gizer'e; yüksek lisans ve doktora serüvenimde birlikte yürüdüğüm kıymetli ekip arkadaşım, iş arkadaşım Özge Boyacıoğlu'na teşekkürü borç bilirim.

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

Sonsuz sevgi, güvenleriyle hayatımın her alanında beni destekleyen, hayallerimi öngörüp sonuna kadar arkasında duran biricik ailemin üyeleri annem Ayten Önen, babam Mehmet Önen, kardeşlerim Aylin Önen ve Berkin Önen'e sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, TÜBİTAK tarafından 1001-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı kapsamında 218S421 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Selin Önen

ÖZET

Önen, S. Allojenik Mezenkimal Kök Hücreler ve Mikroakışkan Sistemle Vücut Dışında Testisteki Spermatogonyal Kök Hücre Mikroçevresinin Devamlılığının Sağlanması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Programı Doktora Tezi, Ankara 2023. Prepubertal kanser vakalarında kemo ve radyoterapi uygulamaları nedeniyle erkek hastaların yarısında infertilite görülmektedir. Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (KİMKH) Sertoli hücreleriyle proliferatif faktörler salgılama karakterleri ve embriyonik kökenleri ortaktır. Mikroakışkan sistemleri (MaS), vücutta mikrovasküler akışı modelleyen yüksek teknolojik tıbbi cihazlardır. Tez çalışmasıyla geliştirilen MaS'ta KİMKH salgıları kullanılarak spermatogonyal kök hücrelerin (SKH) proliferasyonu ve farklılaştırılması hedeflenmiştir. Çalışma; disiplinler arası, rastgele seçilmiş, kontrol grubu içeren, ileriye yönelik *in vitro* deneysel araştırma şeklinde yürütülmüştür. Bağımlı değişkenler ölçüm parametreleri, bağımsız değişkenler MaS, asılı damla (AD) sistemleri; KİMKH salgılarının kullanılıp kullanılmadığı gruplar ve zamandır (7, 28 ve 42 gün). Histokimyasal boyamalara göre tübül epiteli kalınlığı, lümen çapı, spermatogonyum, spermatosit ve spermatid sayısı KİMKH salgısı kullanılan gruplarda kullanılmayan gruplara göre; MaS gruplarında AD gruplarına göre daha yüksektir ($p<0.05$). SALL4 immün işaretli SKH sayısının KİMKH ve MaS gruplarında kontrol gruplarına göre yüksek olduğu ortaya konmuştur ($p<0.05$). PLZF, c-Kit ve VASA işaretlemeleri ile sırasıyla SKH, spermatojenik seri hücreleri ve germ hücreleri akım sitometrisi ile değerlendirilerek histokimyasal ve immünhistokimyasal işaretlemelerin sonuçları doğrulanmıştır ($p<0.005$). KİMKH-KB ve MaS kullanımında 7, 42. günlerde testosteron seviyesinde kontrol gruplarına göre artış görülmüştür ($p<0.005$). Çalışmadan elde edilen verilerle KİMKH salgılarıyla desteklenen MaS'ta testis kültürünün, yenidoğan farede *in vitro* spermatogeneze olumlu etkisi ortaya konmuştur. Gerçekleştirilen özgün tasarım ve cihaz üretimi, ülkemizin önemli bir sağlık sorununda yurt dışına bağımlılığı azaltarak sağlık ekonomisine yeni bir çözüm sunacak bir model oluşturmuştur.

Anahtar sözcükler: Erkek infertilitesi, testis, mezenkimal kök hücre, mikroakışkan sistemi, spermatogenez

ABSTRACT

Önen, S. Providing the Maintenance of Spermatogonial Stem Cell Niche in Testis by Allogeneic Mesenchymal Stem Cells And Microfluidic System. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, PhD Thesis in Stem Cell Programme, Ankara, 2023. Chemoradiotherapeutics used in childhood cancers result in permanent infertility in half of male patients. Bone marrow derived mesenchymal stem cells (BMMSC) share some of their secretomes and their embryonic origin with Sertoli cells which are main modulators of spermatogenesis. Microfluidic devices (MFD) are technologic platforms that simulate microvascular flow in the body. The study has been conducted as a randomized, prospective, experimental, interdisciplinary research. Dependent variables are the measurement parameters; the independent variables are the groups (MFD and hanging drop (HD); usage and not usage of MSC secretions) and the time (7, 28 and 42 days). Tubular epithelial thickness, luminal diameter, number of spermatogonium, spermatocyte and spermatid were higher in BMMSC-CM and MFD groups when compared to control ($p<0.05$). SALL4 immune labeled SSCs increased with use of BMMSC-CM and MFD ($p<0.05$). These results are confirmed by flow cytometric analyses of PLZF (SSCs), c-Kit (spermatogenic cell series) and VASA (germ cells) labeled cells ($p<0.005$). Testosterone level is increased with use of BMMSC-CM and MFD on days 7 and 42 by mass spectrometry comparing to control ($p<0.005$). As a result, through the BMMSC-CM supported, novel, technological MFD, seminiferous tubular epithelial thickness, luminal diameter, testosterone level, SSC and spermatogenic cell pool have been increased during 42-day long *in vitro* culture period. With the data obtained from this study, the supportive effect of BMMSC-CM contributed MFD in *in vitro* spermatogenesis is demonstrated. This new technology has the potential of being a new therapeutic device for ensuring the continuity of fertility in male prepubertal cancer patients. This model may be a solution for decreasing the economic dependency of our nation to the foreign countries by solving an important health problem like male infertility.

Keywords: Male infertility, testis, mesenchymal stem cell, microfluidic system, spermatogenesis

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xx
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Prepubertal Kanser Hastalarında Erkek İnfertilitesi	4
2.2. Spermatogenez ve SKPH mikroçevresi	5
2.3. Hücresel ve kimyasal faktörler	7
2.3.1. Sertoli hücreleri	7
2.3.2. Leydig hücreleri	7
2.2.3. Peritübüler miyoid hücreler	8
2.4. Fiziksel çevre	8
2.5. Mikroakışkan cihazlar ile doku/organ kültürü ve testis kültürü	9
2.6. MKH'ler ve Testis	10
3. GEREÇ ve YÖNTEM	14
3.1. Testis için KİMKH destekli yeni MaS'ın üç boyutlu tasarımı, üretimi ve validasyonu	15
3.1.1. MaS'ın tasarımı	16
3.1.2. MaS'ın üretilmesi, sıvı akış hızının test edilmesi	21
3.2. C57BL/6 yeni doğan farelerden KİMKH'lerin izolasyonu, karakterizasyonu; testislerin izole edilerek yeni MaS ve AD	23

platformlarına yüklenmesi ve KİMKH destekli organ kültürünün optimizasyonu	
3.2.1. MKH'lerin izolasyonu ve karakterizasyonu	23
3.2.2. Testislerin izole edilerek yeni MaS ve AD platformlarına yüklenmesi ve MKH destekli organ kültürünün optimizasyonu	26
3.3. SKH'lerin devamlılığı ve farklılaşmasında MKH'lerin salgısal potansiyelini kullanan MaS ve AD platformlarının karşılaştırılması	30
3.3.1. Histokimyasal yöntemlerle spermatojenik seri hücreleri ve testis matürasyonunun değerlendirilmesi	30
3.3.2. SALL4 ile SKPH'lerin immün işaretlenmesi	30
3.3.3. Akım sitometrisi ile SKPH ve spermatojenik seri hücre miktarlarının belirlenmesi	31
3.3.4. MaS ve AD'den alınan besiyeri örneklerinde testosteron seviyesinin ölçülmesi	33
3.4. Verilerin değerlendirilmesi ve istatistiksel analiz	33
4. BULGULAR	35
4.1. MKH destekli pompasız MaS'ın tasarımı, üretimi ve validasyonu	35
4.1.1. Mikrokanallar optimum sıvı ve besin geçişini sağlamıştır	35
4.1.2. Yeni MaS testis için optimum sıvı akış hızını sağlamıştır	36
4.2. Yeni doğan C57BL/6 fare MKH'lerinin karakterizasyonu; MAS ve AD'de KİMKH destekli testis kültürünün optimizasyonu	37
4.2.1. İzole edilen hücreler morfolojik olarak KİMKH özelliklerini taşımaktadır	37
4.2.2. MKH'ler adipojenik yönde farklılaşma kapasitesi göstermiştir	37
4.2.3. MKH'ler osteojenik yönde farklılaşma kapasitesi göstermiştir	38
4.2.4. MKH'ler spesifik yüzey belirteçlerini taşımaktadır	38
4.2.5. Bir spermatojenik siklus boyunca MAS ve AD'de MKH destekli testis kültürünün devamlılığı sağlandı	40
4.3. MKH destekli AD ve MAS'ın SKPH havuzu, spermatogenez ve testis matürasyonuna etkisi	40

4.3.1. MAS ve MKH destekli MAS SALL4(+), PLZF(+) SKPH havuzunu 42. güne kadar genişletmiştir	40
4.3.2. MAS ve MKH destekli MAS <i>in vitro</i> spermatogenezi 42. güne kadar desteklemiştir	49
4.3.3. MKH destekli MAS seminifer tübül epiteli kalınlığı, lümen çapı ve testosteron seviyesini 42. güne kadar arttırmıştır	55
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇLAR	70
7. KAYNAKLAR	71
8. EKLER	82
EK-1: Hacettepe Üniversitesi Yerel Etik Kurulu Karar Yazısı	82
EK-2: Deney Hayvanı Kullanım Sertifikası	84
EK-3: Turnitin Orijinallik Raporu	85
EK-4: Dijital makbuz	86
EK-5: Hacettepe Üniversitesi Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu	87
EK-6: Tez kapsamında üretilen yayınlar – I (<i>Web of Science</i> bilgisi)	88
EK-7: Tez kapsamında üretilen yayınlar – I (Kabul yazısı)	89
EK-8: Tez kapsamında üretilen yayınlar – I (Yayın)	90
EK-9: Tez kapsamında üretilen yayınlar – II (Ulusal patent başvurusu belgesi)	106
EK-10: Tez kapsamında üretilen yayınlar – II (Uluslararası patent başvuru belgesi)	107
EK-11: Tez çıktılarının sunulduğu ASRM 2022 Kongresi bildiri özeti	108
9. ÖZGEÇMİŞ	109

SİMGELER VE KISALTMALAR

A_{al}	<i>A aligned spermatogonyum</i>
AD	Asılı damla
A_{pr}	<i>A paired spermatogonyum</i>
ARS	<i>Alizarin red s</i>
A_s	<i>A single spermatogonyum</i>
ASA	Anti sperm antikor
ATF-1	<i>Activating transcription factor 1</i>
BAX	<i>BCL2 associated X, apoptosis regulator</i>
BMP	<i>Bone morphogenic protein</i>
BMP4	<i>Bone morphogenic protein 4</i>
BMMSC	<i>Bone marrow-derived mesenchymal stem cell</i>
BMMSC-CM	<i>Bone marrow-derived mesenchymal stem cell conditioned medium</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
c-Fos	<i>Fos proto-oncogene</i>
c-Kit	<i>KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase</i>
CREB-1	<i>Cyclic AMP-responsive element-binding protein 1</i>
DAB	<i>3,3'-Diaminobenzidine</i>
Dazl	<i>Deleted in azoospermia like gene</i>
Ddx4/VASA	<i>DEAD-box helicase 4</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetra acetic acid</i>
EGF	<i>Epithelial growth factor</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FSH	Folikül uyarıcı hormon
GDNF	<i>Glial cell driven neurotrophic factor</i>
HCl	Hidroklorik asit
HD	<i>Hanging drop</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HKH	Hematopoetik kök hücre
IBMX	3- isobutyl-1-methylxantine

ICSI	<i>Intracytoplasmic sperm injection</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
ITGA6	<i>Integrin subunit alpha 6</i>
Kİ	Kemik iliği
KİMKH	Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre
KİMKH-KB	Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre koşullu besiyeri
KSR	<i>Knockout Serum Replacement</i>
LH	Lüteinleştirilen Hormon
MaS	Mikroakışkan sistemi
MCSF	<i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
MCSF-R	<i>Macrophage Colony Stimulating Factor Receptor</i>
MEMS	Mikro-Elektro-Mekanik Sistemler
MFD	<i>Microfluidic device</i>
MHCII	<i>Major histocompatibility complex-II</i>
MKH	Mezenkimal kök hücre
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
Oct4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
ORO	<i>Oil red O</i>
PAS	<i>Periodic Acid Schiff</i>
PDMS	Polidimetilsiloksan
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PGP9.5	<i>Protein gene product 9.5</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PLZF	<i>Promyelocytic leukaemia zinc finger protein</i>
RA	Retinoik asit
RAR	<i>Retinoic Acid Receptor</i>
Ras	<i>Resistance to audiogenic seizures</i>
RXR	<i>Retinoid X Receptor</i>
ROSI	<i>Round spermatid injection</i>
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SDF-1	<i>Stromal derived factor-1</i>
SKH	Spermatogonyal kök hücre
SRY	Sex determining region Y

SSC	<i>Spermatogonial stem cell</i>
Stra8	<i>Stimulated by retinoic acid 8 gene</i>
TGF-α	<i>Transforming growth factor-alpha</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TPO	<i>Thrombopoietin</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>



ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
1.1. Tez çalışmasının araştırma sorusu. Testiste SKH mikroçevresi ve KİMKH-KB'nin bu mikroçevre ile etkileşimi kapsamında tez çalışmasının temel araştırma sorusu şematize edilmiştir.	3
2.1. Prepubertal kanser nedenli erkek infertilitesi ve olası çözüm yolları şematize edilmektedir.	5
2.2. Farede spermatogenez ve germ hücresi alt popülasyonlarının spesifik belirteçleri şematize edilmektedir.	6
3.1. Tez çalışmasının iş akışı şematize edilmektedir.	15
3.2. Tasarlanan cihazdaki besiyeri haznesi ve direnç hattının çizimi, hesaplamada kullanılan sayısal parametreler gösterilmektedir.	17
3.3. PDMS yumuşak fotolitografi ve replika kalıplama ile mikroakışkan kanal üretim aşamaları gösterilmiştir.	22
3.4. İzole edilen MKH'lerin üçüncü pasajda (A) morfolojik özellikler, (B) adipojenik farklılaşma, (C) osteojenik farklılaşma ve (D) yüzey belirteci analizleri ile karakterize edilme yöntemi şematize edilmektedir.	26
3.5. Yeni doğan farelerden izole edilen testislerin (A) AD ve (B) MaS'a yüklenmek üzere hazırlanması ve kültür sistemlerinin oluşturulması yöntemi şematize edilmiştir.	27
3.6. Testis izolasyonu, organ kültürü hazırlığı, AD ve mikroakışkan kültür sistemlerinin oluşturulması. (A-D) C57BL/6 türü fareden testis izolasyonu, tunika albugineanın uzaklaştırılması ve seminifer tübüllerin kültüre uygun boyuta getirilmesi aşamaları gösterilmektedir. (E) Mikroakışkan sisteme ve (F) AD kültür sistemine yerleştirilen testis örnekleri gösterilmektedir. (G) MaS'ta organ haznesindeki testisin mikroskop görüntüsü sunulmaktadır.	29

- 3.7.** Mikroakışkan ve AD sistemlerinde 7, 28 ve 42 günlük kültür sürelerini tamamlayan testis örneklerinin histokimyasal ve immün işaretleme işlem basamakları şematize edilmiştir. 31
- 3.8.** Kültür sonrası akım sitometrisi yöntemiyle farklı germ hücresi popülasyonu yüzdelerinin belirlenmesi yöntemi şematize edilmiştir. 32
- 3.9.** LC/MS-MS ile besiyerinden testosteron ölçümüne ait yöntem şematize edilmektedir. 33
- 4.1.** MaS'ın üretimi ve validasyonu. Fotolitografiden sonra (A) organ haznesi, (B) difüzyon çeperleri ve (C) direnç kanallarının mikroyografi ve (D) MKH eklentili MaS'ın üretim sonrası fotoğrafı verilmektedir. (E) Grafik (MATLAB R2018a), besiyeri tankındaki farklı sıvı yüksekliklerinde direnç kanallarındaki sıvı akış hızını göstermektedir (COMSOL Multiphysics v5.6). 36
- 4.2.** Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonu. 39
 (A) KİMKH'ler içsi-poligonal şekil göstermektedir (x400). (B) Adipojenik ve (C) osteojenik farklılaşma analizinin kalitatif değerlendirme sonuçları verilmektedir (x200, ORO, ARS). (D) Adipojenik ve (E) osteojenik farklılaşma gruplarının spektrofotometrik analiz sonuçları görülmektedir (n=6, *p<0.05). Mezenkimal kök hücre yüzey belirteci analizi sonuçlarına göre (F) CD44 ile %100, (G) CD140a ile %99,63 ve (H) CD90 ile %99,85 oranında; HKH belirteçleri olan (I) CD34 ile %0,00 ve (J) CD45 ile %0.00 oranında işaretlenmiştir.

- 4.3.** Kültür sistemlerinin *in vitro* koşulda SKPH havuzuna etkilerinin değerlendirilmesi. (A) AD kontrol, AD KİMKH-KB, mikroakışkan kontrol ve mikroakışkan KİMKH-KB gruplarına ait 7, 28 ve 42. günlerde testis mikrografları görülmektedir (*= seminifer tübül, x1000, PAS, n=6, 50 tübül). (B) Spermatogonyum sayımı verilerine ait istatistik sonuçları ve (C) SALL4(+) SKPH sayımının spermatogonyum sayısı ($R^2=0.9994$, $p=0,001$) ve PLZF yüzdesi ($R^2=0.0319$, $p=0,054$) ile korelasyonu gösterilmektedir (AD-Kontrol: MKH koşullu besiyeri kullanılmayan asılı damla, AD - KİMKH-KB: MKH koşullu besiyeri kullanılan asılı damla, Mikroakışkan – Kontrol: MKH koşullu besiyeri kullanılmayan mikroakışkan, Mikroakışkan – KİMKH-KB: MKH koşullu besiyeri kullanılan mikroakışkan). 42
- 4.4.** Kültür sistemlerinin SKPH havuzuna etkisinin SALL4 immünohistokimyasal işaretleme yöntemiyle değerlendirilmesi. (A) AD kontrol, AD KİMKH-KB, mikroakışkan kontrol ve mikroakışkan KİMKH-KB gruplarına ait 7, 28 ve 42. günlerde testislerin SALL4 ile indirekt immün peroksidaz yöntemiyle işaretlenmelerini gösteren mikrograflar ve (B) immün işaretlemeyle ait istatistik sonuçları sunulmaktadır (*= $p<0.005$). Bazal membrana tutunmuş, DAB kromojeniyle sitoplazmaları kahverengi renkli SALL4 immün reaktivitesi gösteren SKH'ler okla işaretlenmiştir (x1000, n=6, 50 tübül, AD-Kontrol: MKH koşullu besiyeri kullanılmayan asılı damla, AD - KİMKH-KB: MKH koşullu besiyeri kullanılan asılı damla, Mikroakışkan – Kontrol: MKH koşullu besiyeri kullanılmayan mikroakışkan, Mikroakışkan – KİMKH-KB: MKH koşullu besiyeri kullanılan mikroakışkan). 45
- 4.5.** Kültür sistemlerinin PLZF immün işaretleli SKPH havuzuna etkisinin akım sitometrisi yöntemiyle değerlendirilmesi. (A) AD kontrol, AD KİMKH-KB, mikroakışkan kontrol ve mikroakışkan KİMKH-KB 48

gruplarına ait 7, 28 ve 42. günlerde testislerdeki PLZF işaretli SKPH yüzdelerini gösteren akım sitometrisi sonuçları ve (B) immün işaretlemeye ait istatistik sonuçları sunulmaktadır (*= $p<0.005$, $n=6$, AD-Kontrol: MKH koşullu besiyeri kullanılmayan asılı damla, AD - KİMKH-KB: MKH koşullu besiyeri kullanılan asılı damla, Mikroakışkan – Kontrol: MKH koşullu besiyeri kullanılmayan mikroakışkan, Mikroakışkan – KİMKH-KB: MKH koşullu besiyeri kullanılan mikroakışkan).

- 4.6.** Kültür sistemlerinin *in vitro* koşulda mayotik germ hücrelerine etkisinin değerlendirilmesi. (A) Spermatozit, (B) spermatid sayımlarına ait istatistik sonuçları verilmektedir. (*= $p<0.05$, HE, $\times 1000$, $n=6$, 50 tübül). (C) Spermatozit ve spermatogonyum ($R^2=0.2699$, $p=0.0834$; (D) spermatid ve spermatogonyum ($R^2=0.09664$, $p=0.3254$) ve (E) spermatid ve spermatozit ($R^2=0.7634$, $p=0.0002$) sayımlarının birbirleriyle korelasyonları sunulmaktadır (AD-Kontrol: MKH koşullu besiyeri kullanılmayan asılı damla, AD - KİMKH-KB: MKH koşullu besiyeri kullanılan asılı damla, Mikroakışkan – Kontrol: MKH koşullu besiyeri kullanılmayan mikroakışkan, Mikroakışkan – KİMKH-KB: MKH koşullu besiyeri kullanılan mikroakışkan). 50
- 4.7.** Kültür sistemlerinin c-Kit immün işaretli farklılaşmakta olan germ hücre havuzuna etkisinin akım sitometrisi yöntemiyle değerlendirilmesi. (A) AD kontrol, AD KİMKH-KB, mikroakışkan kontrol ve mikroakışkan KİMKH-KB gruplarına ait 7, 28 ve 42. günlerde testislerdeki c-Kit işaretli germ hücresi yüzdelerini gösteren akım sitometrisi sonuçları ve (B) immün işaretlemeye ait istatistik sonuçları sunulmaktadır (*= $p<0.005$, $n=6$, AD-Kontrol: MKH koşullu besiyeri kullanılmayan asılı damla, AD - KİMKH-KB: MKH koşullu besiyeri kullanılan asılı damla, Mikroakışkan – Kontrol: MKH koşullu besiyeri kullanılmayan mikroakışkan, 52

Mikroakışkan – KİMKH-KB: MKH koşullu besiyeri kullanılan mikroakışkan).

- 4.8.** Kültür sistemlerinin VASA immün işaretli total germ hücresi havuzuna etkisinin akım sitometrisi yöntemiyle değerlendirilmesi. (A) AD kontrol, AD KİMKH-KB, mikroakışkan kontrol ve mikroakışkan KİMKH-KB gruplarına ait 7, 28 ve 42. günlerde testislerdeki VASA işaretli germ hücresi yüzdelerini gösteren akım sitometrisi sonuçları ve (B) immün işaretlemeye ait istatistik sonuçları sunulmaktadır (*= $p < 0.005$, $n=6$). 54
- 4.9.** KİMKH destekli MaS'ın yapısal ve fonksiyonel testis matürasyonuna etkisi. (A) Tübül epiteli kalınlığı ve (B) lümen çapı, (D) total testosteron miktarı ölçümlerine ait istatistik sonuçları verilmektedir (PAS, x400, $n=6$). (C) Lümen çapı ve tübül epiteli kalınlığı ölçümlerinin korelasyonu verilmektedir ($R^2 = 0,9524$, $p=0,001$). (E) Kültür sonrası kültür sistemlerindeki seminifer tübüllerindeki germ hücresi popülasyonu sunulmaktadır. 58
- 5.1.** Tez kapsamında geliştirilmiş olan kişiselleştirilmiş hücresel tedavi temelli ileri tıbbi tedavi platformu in vitro koşulda SKPH havuzunu genişletmiş, testis matürasyonunu sağlayarak testosteron seviyesini arttırmış ve spermatogenezi sağlamıştır. Elde edilen germ hücresi havuzu ROSI, kriyoprezervasyon ve transplantasyon gibi yöntemlerle prepubertal kanser hastalarının karşılaştığı infertilite problemi için bir tedavi seçeneği olabilir. 69

TABLOLAR

Tablo		Sayfa
2.1.	Mezenkimal kök hücrelerin testis dokusu rejenerasyonuna katkılarını inceleyen makaleler listelenmiştir.	12
3.1.	Tez çalışmasının hayvan deneylerine ait örneklem büyüklüğü sunulmaktadır.	14
3.2.	Yapılan hesaplamalara göre MaS'ın üretiminde kullanılmış olan parametrelerin değerleri	19
3.3.	Toplam hidrolik direnç (R_{hid}) hesabı verilmektedir.	20
3.4.	Minimum ve maksimum akış hızını sağlayacak hidrostatik basıncın hesaplanması	20
3.5.	Hidrostatik basıncı sağlayacak minimum ve maksimum besiyeri yüksekliğinin hesaplanması	21
4.1.	Üretilen sistemde yapılan manuel ölçümlerde 76, 38 ve 19 mm besiyeri yüksekliğinde dakikada sistemi terk eden sıvı miktarı tablosu	37

1. GİRİŞ

Çocukluk çağı kanserlerinde kemo ve radyoterapi sonrası testislerde spermatogonyal kök hücre (SKH) mikroçevresinin bozulmasına bağlı olarak spermatogenezin devam etmemesi sonucu erkek hastaların yaklaşık yarısında **infertilite** ortaya çıkmaktadır (1). Prepubertal kanserler dünyada kanserlerin yaklaşık %0,5 - 4,6'sını oluşturmaktadır. Çocukluk çağı kanserlerinde yüksek gelirli ülkelerde %85 hayatta kalım görülür. Ancak kemoterapi ve radyoterapi gibi tedaviler fertilité sorunlarına neden olarak yüksek morbidite ile seyreder (2, 3). Klinikte hastaların fertilitelerinin korunması amacıyla **testislerinden** doku alınarak dondurulmakta, tedavi sonrası hastalığı atlaman erişkin bireylere geri transplantasyon ile fertilitenin sağlanması beklenmektedir (4). Kanser tedavisinde bireylerde testis matürasyonu duraksaması ve SKPH mikroçevre hasarı görüldüğünden bu uygulamalar başarılı olmamaktadır. Bu hastalarda fertilitenin sağlanması için, SKPH sayısının arttırılabileceği, testis matürasyonunun ve *in vitro* spermatogenezin sağlanabileceği etkili bir yöntem geliştirilememiştir. Prepubertal dönemde alınan testis biyopsilerinin *in vitro* matürasyonu hastaların fertilité problemine çözüm olabileceğinden önemlidir.

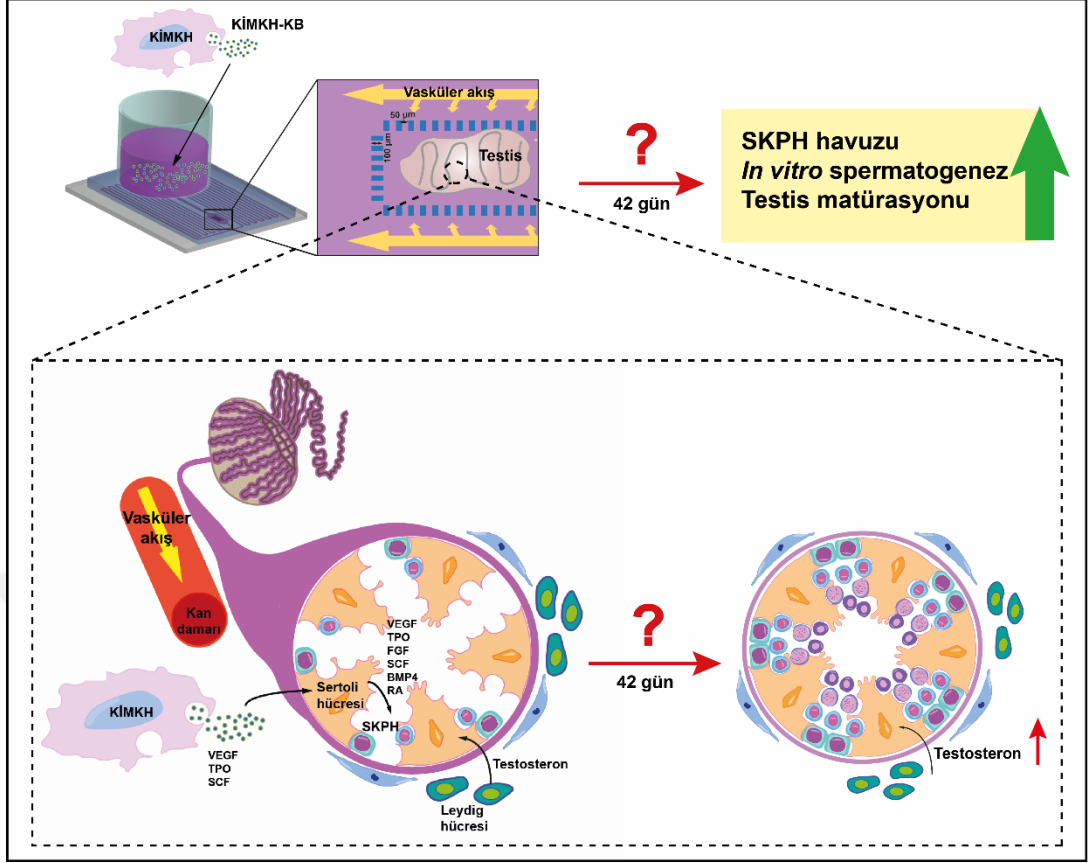
Çocukluk çağında kanser tedavisi öncesi sağlıklı SKH'lerin yaşamsallığı ve sayıca korunarak spermatogenetik farklılaşmasının sağlanabilmesi için testis kök hücre mikroçevresinin (niş) korunması şarttır. Bu amaçla tedavi öncesi elde edilen testis dokusunun, organizmadaki fizyolojik koşulların sağlandığı optimal ortamlarda vücut dışında yaşatılması ve devamlılığı gereklidir. Yakın zamanda Japon bir araştırma grubu tarafından geliştirilen bir dizi **mikroakışkan** sistemle farelerde ilk kez spermatogenezin devamlılığı dış ortam koşullarında sağlanmıştır (5-7). Ancak bu sistemler insanda SKH havuzunu genişletmeyi ve hastalık sonrası erişkin bireylerde fertilitenin kalıcı restorasyonunu hedeflememektedir. İleride vücuda verildiğinde fertilitenin devamlılığını sağlayacak olan kök hücrelerin dış ortamda üç boyutlu nişlerinde desteklenerek korunması ve sayıca arttırılmasını hedefleyen bir sistem geliştirilmemiştir. Testis mikroçevresinde SKH'lerin temel destek hücreleri olan

Sertoli hücrelerine pek çok yönleriyle benzeyen KİMKH'lerin seminifer tübüllerdeki rejeneratif etkileri sınırlı sayıda *in vivo* çalışmada bildirilmiştir (Tablo 2.1). Bu tez çalışmasında, allojenik KİMKH'lerin salgısal rejeneratif potansiyeli ile desteklenen, pompasız, tek polidimetilsiloksan (PDMS) tabakalı özgün bir MaS'ın tasarlanarak üretilebileceği, böylece SKPH havuzunun genişletilerek, *in vitro* spermatogenez ve testis matürasyonunun sağlanabileceği **varsayılmıştır**. Bu varsayımı test etmek üzere, tek PDMS tabakalı pompasız MaS tasarlanıp üretilmiş, yeni doğan fare testis örneklerinin bu sistemde 42 günlük bir spermatojenik siklus boyunca KİMKH koşullu besiyeri (KİMKH-KB) ile desteklenerek kültüre edilmesini, SKPH havuzu, spermatogenez ve testis matürasyonu ile ilgili başarısının AD kültür sistemi ile karşılaştırılarak valide edilmesini hedefleyen bir deney akışı tasarlanmıştır.

Bu varsayım ile **aşağıdaki araştırma hedefleri** belirlenmiştir.

1. Testis organ kültürü için allojenik KİMKH'lerin salgısal desteğini kullanan pompasız, tek PDMS tabakalı yeni **MaS'ın** tasarımı, üretimi ve fiziksel optimizasyonunun sağlanması,
2. KİMKH salgısı destekli pompasız, tek PDMS tabakalı MaS'ta en az bir spermatojenik siklus boyunca kültüre edilen testislerde **SKPH havuzunun** genişlemesine katkısının AD kültür sistemi ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi,
3. KİMKH destekli MaS'ın ***in vitro* spermatogenez** ve **testis matürasyonu** üzerindeki etkisinin AD kültür sistemi ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesidir.

Tez çalışmasının temel araştırma sorusu Şekil.1.1'de şematize edilmiştir.



Şekil 1.1. Tez çalışmasının araştırma sorusu. Testiste SKH mikroçevresi ve KİMKH-KB'nin bu mikroçevre ile etkileşimi kapsamında tez çalışmasının temel araştırma sorusu şematize edilmiştir.

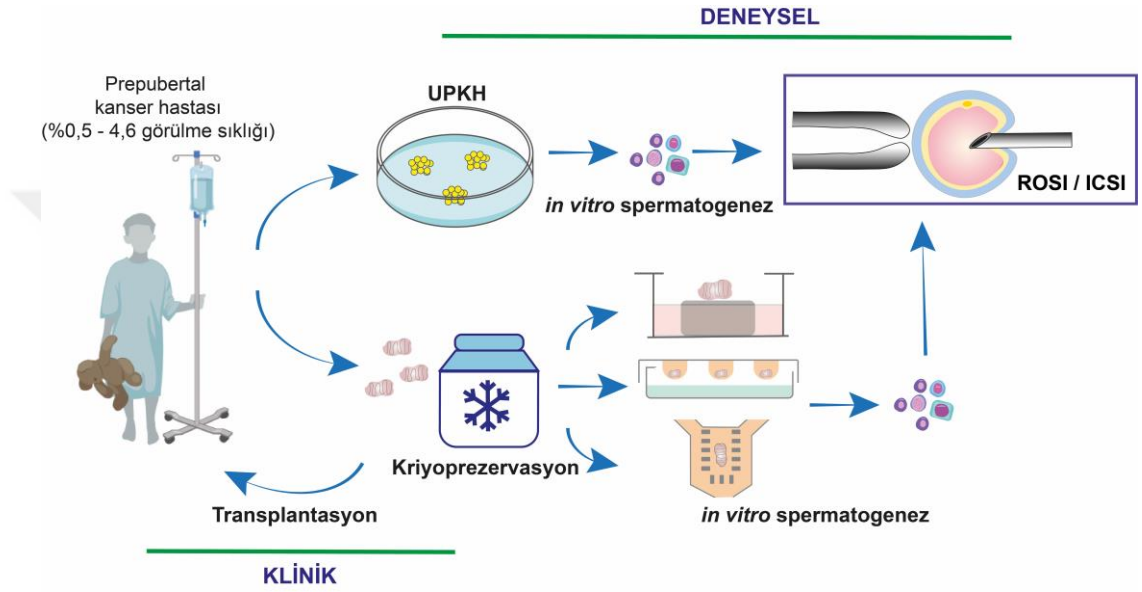
2. GENEL BİLGİLER

Tez çalışması, çocukluk kanseri nedeniyle ortaya çıkan erkek infertilitesinin tedavisi için pompasız tek PDMS tabakalı MaS'ın tasarlanması, *ex vivo* ortamda prepubertal erkek fare modelinde KIMKH destekli olarak geliştirilen MaS ile erkek infertilitesine bir çözüm getirmeyi kapsamaktadır. Buna göre; tez çalışmasının gerekçelerini oluşturan **anahtar sözcüklere ait literatür bilgileri** “Prepubertal Kanser Hastalarında Erkek İnfertilitesi”, “Spermatogenez ve SKPH mikroçevresi”, “Hücrel ve kimyasal faktörler”, “Fiziksel çevre”, “MKH’ler ve testis” ve “Mikroakışkan cihazlar ile doku/organ kültürü ve testis kültürü” başlıkları altında verilmektedir.

2.1. Prepubertal Kanser Hastalarında Erkek İnfertilitesi

Amerikan Kanser Derneği’nin 2022 verilerine göre, kanser teşhisi konulan 10.000 prepubertal hastanın %85’inde uzun süreli sağkalım görülürken (8), hastaların yarısı kemo ve radyoterapi nedeniyle infertilite problemi ile karşı karşıya kalmaktadır (Şekil 2.1.) (1, 9-11). Puberteye kadar spermatogenez başlamadığından bu hastalarda spermatogonial kök/progenitor hücreler (SKPH) fertilitenin korunması için tek kaynağı oluşturmaktadır. Klinikte güncel olarak prepubertal erkek kanser hastalarından testis biyopsilerinin alınıp saklanması yoluna gidilmektedir. Kemoterapi ve radyoterapi alan çocuklarda testiste spermatojenik mikroçevre bozulduğundan hastalardan alınan biyopsiler tedavi sonrasında testise transplante edildiğinde spermatogenezin başlatılması başarısız olmaktadır. Özellikle dolaşım sistemi kanserlerinde alınacak olan biyopside kanserli hücre bulunabileceğinden bu yöntem kanseri atlatmış bireylerin sağlıklarını tehdit edebilecek bir durum oluşturmaktadır. Bu nedenle alınan testis biyopsilerinin dış ortamda matürasyonu üzerinde deneysel çalışmalar yürütülmektedir. İmmatür testis örneklerinde bulunan SKPH’lerden *in vitro* spermatogenez (İVS), parakrin ve fiziksel sinyalleri düzenleyen vasküler akış, komşu hücreler ve stromal elementlerden oluşan karmaşık bir üç boyutlu niş içinde yer alan zorlu bir süreçtir. Selin Önen’in Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı’nda yüksek lisans tezi çalışması ile, prepubertal C57BL/6 fare SKPH’lerde

konvansiyonel ve statik hava sıvı interfaz kültür sisteminin KİMKH'lerin desteği ile SPKH havuzunu genişletme, spermatogenezi başlatma ve testis matürasyonu sağlama potansiyeli gösterilmiştir (12). Ancak statik kültür koşulunun spermatogenezi iki hafta süreyle sınırlı olarak desteklediği görülmüştür. Bu nedenle bu tez çalışmasında vasküler akışın simüle edildiği mikroakışkan sisteme KİMKH-KB eklentisi ile uzun süreli *in vitro* spermatogenezin sağlanması yoluna gidilmiştir.



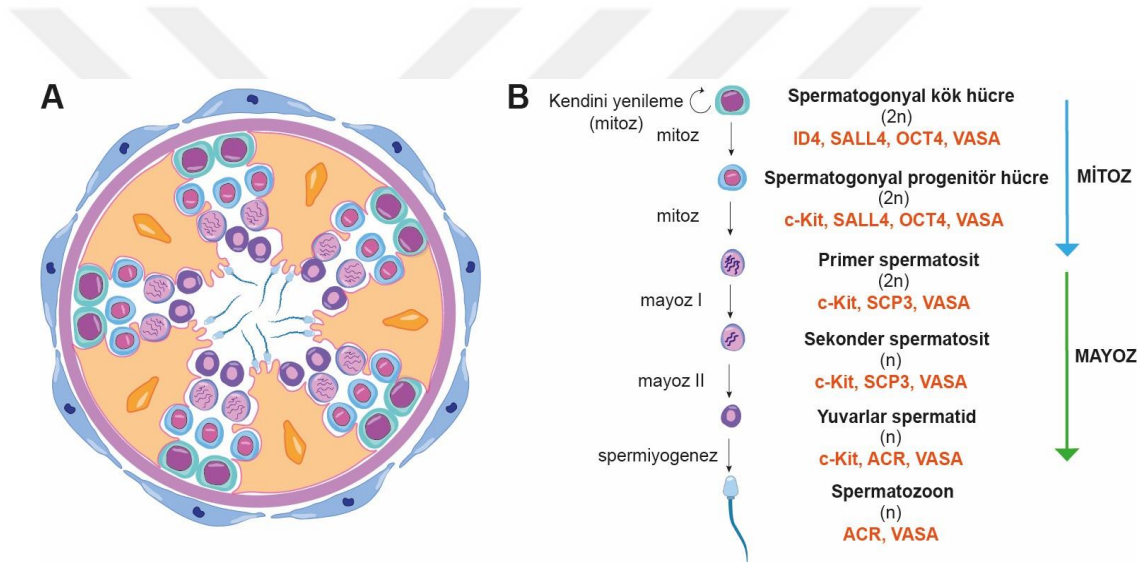
Şekil 2.1. Prepubertal kanser nedeniyle erkek infertilitesi ve olası çözüm yolları şematize edilmektedir.

2.2. Spermatogenez ve SKPH mikroçevresi

Testis mikroçevresi, yaş ve metabolik koşullara göre değişiklik gösteren dinamik bir sistemdir. Mikroçevrenin bileşenleri, hücreler, fiziksel ve kimyasal faktörler olarak sınıflandırılır (13).

Farede spermatogenez doğumdan sonraki yedinci günde başlamaktadır. Doğumdan sonra altıncı günde spermatogenez başlar (Şekil 2.2.). Spermatogonyal kök hücreler *Asingle* (A_s) spermatogonyum adı verilen hücre popülasyonundan oluşmaktadır. Bu hücreler daha sonra ileri mitoz bölünmeler ile *Apai red* (A_{pr}) ve *Aaligned* (A_{al}) spermatogonyumları yapar (14). A_s , A_{pr} ve A_{al} farklılaşmamış

spermatogonyumlardır ve germ hücresi popülasyonunun % 0,3'ünü oluşturmaktadır (15). Aal spermatogonyumlar A1 spermatogonyuma farklıdır, A1 spermatogonyumlar sonra, ardışık bölünmeler ile sırasıyla A₂, A₃, A₄, *Intermediate* ve B spermatogonyumları oluşturur. B spermatogonyumlar ise bölünerek primer spermatositleri meydana getirmektedir. Elde edilen diploid primer spermatositlerden (2n) birinci ve ikinci mayoz ile sırasıyla sekonder spermatositler ve spermatidler (n) oluşmaktadır. Spermatidler, spermiyogenezle olgun spermiumlara farklılaşır (15-17). Farede, ID4 SKH; PLZF ve SALL4 spermatogonyal kök/progenitör hücre, c-Kit farklılaşmakta olan spermatojenik seri hücreleri ve VASA (DDX/MVH4) genel germ hücresi belirteci olarak kullanılmaktadır (15).



Şekil 2.2. Farede (A) spermatogenez ve (B) germ hücresi alt popülasyonlarının spesifik belirteçleri şematize edilmektedir.

İnsanda spermatogenez, puberte ile etkinleşip yaşam boyu sürmektedir. İnsan testisinde, *A_{dark}* ve *A_{pale}* olmak üzere iki tür farklılaşmamış spermatogonyum bulunmaktadır (14). *A_{dark}* spermatogonyumlar testiste kök hücre rezervini, *A_{pale}* spermatogonyumlar proliferatif progenitör hücre rezervini oluşturmaktadır (18). Asimetrik bölünme ile *A_{pale}* spermatogonyumlar B spermatogonyumlara, B spermatogonyumlar primer spermatositlere farklılaşmaktadır. Primer spermatositlerin sekonder spermatosite farklılaşmasının ardından spermatidler spermiyogenez olgun spermier elde edilmektedir (18). Spermatogenez üç boyutlu bir mikroçevre/nişte gerçekleşmektedir. Bu niş, Sertoli, Leydig hücreleri, endotel

hücreleri, miyoid hücreler, peritübüler ve interstisiyel makrofajlar ile, fiziksel ve kimyasal faktörlerden oluşur. Şekil 2.2’de SKH mikroçevresi bileşenleri ve germ hücrelerinin alt popülasyonlarına spesifik belirteçler gösterilmiştir.

2.3. Hücresel ve kimyasal faktörler

2.3.1 Sertoli hücreleri

Testiste tübüllerin bazal membranının üzerinde yer alan, poligonal, büyük hücrelerdir. Bu hücreler sağladıkları yapısal destek ve salgıladıkları kimyasal faktörlerle spermatogenezin düzenlenmesinde SKH nişinin başlıca bileşenidir (19). Sertoli hücrelerinin birbirleriyle olan bağlantılarıyla oluşturulan kan-testis bariyeri spermatogenezin işleyişini yürütmektedir (20). GDNF, BMP, FGF ve SCF büyüme faktörleri Sertoli hücreleri tarafından üretilip testiste germ kök hücrelerinin kaderinde rol oynar. Sertoli Hücreleri, salgıladıkları proliferasyon indükleyici faktörler (VEGF, FGF, SCF vb.) ve embriyonik köken bakımından KİMKH’lerle benzerlik göstermektedir (21). Bu nedenle, tez çalışması kapsamında tasarlanarak validasyonu tamamlanan testis organ kültüründe KİMKH’lerin, testisteki Sertoli hücrelerini desteklemesi ve yukarıdaki büyüme faktörlerinin salgısını arttırarak SKH’ler üzerinde mitojenik bir etki oluşturması hedeflenmiştir.

2.3.2 Leydig hücreleri

Seminifer tübüllerin aralarındaki bağ dokusunda bulunan Leydig hücreleri testosteron hormonu salgılar. FSH ve LH, Sertoli ve Leydig hücrelerinin uyarımını sağlamakta; bu iki hücrenin etkileşimi, spermatogenezi düzenlemektedir. Luteinizan hormon (LH), Leydig hücrelerinin testosteron salgısını uyarır (22). Leydig hücrelerinden salgılanan EGF SKPH proliferasyonunu arttırmaktadır (23). Tez çalışması kapsamında Leydig hücrelerinin testis organ kültüründe yer alarak SKH’ler, spermatojenik seri hücreleri ve tüm testis mikroçevresinin *in vitro* devamlılığına hem salgıladığı faktörler hem de Sertoli hücreleriyle olan iş birliğiyle destek sunması beklenmiştir.

2.3.3. Peritübüler miyoid hücreler

Peritübüler miyoid hücreler tübüleri dışarıdan sarmakta ve kasılma ile sperm mobilizasyonunu sağlamaktadır (24). Bu hücreler CSF1 salgılayarak, SKH etkinliğini düzenlemektedir (25). Tez çalışması kapsamındaki testis organ kültüründeki varlıkları hem parakrin salgı hem de fiziksel destek ile SKH havuzunun korunması ve spermatojenik seri hücrelerinin oluşturulmasına katkı sağlaması içindir.

2.4. Fiziksel çevre

Nişte sıcaklık, pH, oksijen seviyesi kök hücrelerin farklılaşma potansiyeli ve fonksiyonlarını düzenleyerek kaderleri üzerinde belirleyici olur. Spermatogonyal kök hücreler, seminifer tübüllerde bazal membranın hemen üzerinde, kan damarlarına yakın bir bölgede oksijenden zengin ortamda yerleşim gösterir. Spermatogenez sürecinde, her farklılaşma aşamasında damarlardan uzaklaşarak lümene doğru ilerler.

Diğer yandan oksijen seviyesindeki anormal düşüş ve hipoksik koşullar spermatojenik seri hücrelerinde morfolojik hasara neden olur; apoptozu tetikler (26). Memelilerin birçoğunda, skrotum içindeki testislerin ısısı, vücut sıcaklığının 2-7 °C altındadır. Spermatogenez, sıcaklığa bağımlı bir mekanizma olduğu için ve skrotal ısıdaki artış, spermatogenezin işleyişini bozar; meydana gelen bir termal hasar, germ hücrelerinin apoptoz oranında artışa neden olur. Sıcaklık artışına bağlı ortaya çıkan ısı stresi, testiste ağırlıklı olarak pakiten evresindeki spermatositler, proliferatif spermatositler ve erken dönem spermatidlerin apoptozuna yol açmaktadır (27). İki boyutlu hücre kültürü ile, yukarıda özetlenen fiziksel koşulların hücrelerle üç boyutlu etkileşimi sağlanamadığından, SKH'lerin vücut dışında uzun süreli idamesi mümkün olmamaktadır. Bu nedenle, testis nişinin *in vivo* koşullardaki optimal fiziksel ve kimyasal alt yapısını sağlayabilmek için, üç boyutlu bir organ kültür sisteminin kurulması gerekmektedir. Bu kapsamda mikroakışkan sistemler, günümüzde mikroçevrenin modellenmesinde, ilaç çalışmalarında vücut koşulları ile ilgili doğru sonuç almada kullanılan başlıca kültür cihazlarıdır (28, 29).

2.5. Mikroakışkan cihazlar ile doku/organ kültürü ve testis kültürü

Mikroakışkan sistemler (MaS), boyutları 10 - 1000 μm arasında değişen boyutta kanallara küçük miktarda sıvının yüklenerek düzenli olarak akışının sağlandığı teknolojik sistemlerdir (30). Bu sistemler mikron boyutundaki geometrik hacimler içinde mikro-, nano- ve hatta piko litre ölçeğindeki sıvıların fiziksel, elektriksel özelliklerini kullanarak kontrol edilebildikleri çok duyarlı cihazlardır. Bu cihazlar laboratuvarı büyük alanlar gerektiren birçok işlemin, küçük bir çip üzerinde mobil olarak gerçekleştirilmesine olanak verdikleri için, *lab-on-a-chip* (LOC) yani çip-üstü-laboratuvar olarak da adlandırılmaktadır (31). Çip üstü laboratuvar kullanımı deney süresini kısaltma, atık miktarını azaltma, etken madde kullanımını kısıtlamayı sağlamasının yanında; kanallarında sıvıların akış hızının kontrolü sayesinde madde difüzyonu gibi fiziksel eylemlerin kontrollü olarak yapılabilmesine olanak verir (32). Biyouyumlu malzemeler ile üretildiklerinde, mikroakışkan sistemler doku örnekleri, fizyolojik sıvılar ve hücrelerin vücut dışında devamlılığı için uygun bir ortam sağlayabilmektedir (32). Bu nedenle, çalışma kapsamında testis nişindeki mikrovasküler akış ve interstisyumla etkileşim için uygun, biyouyumlu ve özgün bir MaS geliştirilmiştir.

Testis doku-organ kültürü agaroz jelde ve kültüre filtre eklentileriyle hava-sıvı interfaz, asılı damla (AD) gibi yöntemlerle C57BL/6, ICR veya ICRXC57BL/6F1 türü farelerde iki boyutlu olarak bir dizi araştırma grubu tarafından gerçekleştirilmiştir (33-35). Bu yöntemlerle spermatojenik seri hücrelerini ve dokuların canlılığının sınırlı sürede korunabildiği, kök hücre nişini oluşturan hücresel bileşenlerin zamanla dejenere olduğu ya da işlevselliğini kaybettiği, üç boyutlu kültüre oranla hormon sentezi ve spermatojenik farklılaşma açısından düşük verim alındığı saptanmıştır (6, 34). Nitekim sitotoksik tedavi alacağı için testisleri hasarlanacak çocuklardan elde edilen ve kriyoprezervasyon yöntemleriyle dondurularak saklanan testis doku örnekleri çözdürüldüklerinde elde edilen SKH sayısı ve buna bağlı fertilitite oranları çok düşük olarak bildirilmektedir (36).

Bu gerekçelerle yakın zamanda literatürde MaS'ta uzun süreli testis organ kültürünü uygulayan Japon araştırmacı grubunun 3 adet çalışması bulunmaktadır (5-7). Grup ilk çalışmasında pompalı ve iki PDMS tabakalı bir sistemle uzun süreli kültürü, ikinci çalışmasında iki PDMS tabakalı pompasız bir sistemle kültürü, üçüncüsünde ise pompalı ve tek PDMS tabakalı, kültür esnasında yüksek görüntü kalitesinin sağlandığı bir sistemi geliştirmeyi hedeflemiştir. Geliştirilen her üç sistemin de bazı sınırlılıkları bulunmaktadır. İlk çalışmada (6) ve pompasız sistemin geliştirildiği ikinci çalışmada (7) iki kat polimerik malzeme PDMS tabakası kullanılmış, böylelikle üç katlı bir sistem elde edilmiştir. Ancak bu sistem yüksek görüntü kalitesinin elde edilmesi açısından tek katlı PDMS kullanılan sisteme göre daha az etkili olarak saptanmıştır. Tek kat PDMS tabakasının kullanıldığı çalışmada ise yüksek görüntü kalitesi elde edilmiş, fakat yeniden pompalı bir sistem kullanılmıştır (37). Bu da sistemin kendi kendini pompasız şekilde yürütememesi ve organ haznesi boyutundan (800 μ m) ötürü organın merkezinin yeterli kültür koşulunun sağlanamadığından dejenere olması nedeniyle sınırlılık taşımaktadır.

Buradan yola çıkarak, tez çalışması kapsamında ekibimizce yukarıdaki sorunların giderildiği, 750 μ m organ haznesi genişliğine sahip, pompasız, hidrostatik basınç kullanılarak istenen sıvı akış hızının elde edilebildiği ve aynı zamanda yüksek görüntü kalitesi sunan, tek PDMS katlı özgün, yeni bir MaS tasarlanmış, üretilmiş, karakterizasyon ve validasyonu gerçekleştirilmiştir. Böylelikle, hem kültür esnasında testisin yüksek kalitede görüntüsünün alınması, hem de pompa kullanımının ortadan kaldırılması ile fizyolojik koşulların tam simülasyonu sağlanmıştır. Diğer yandan, tasarlanan yeni sistemde organ kültüründe kullanılacak olan besiyerine KİMKH salgıları eklenmiş, sistemin etkinliğinin KİMKH kaynaklı parakrin salgı desteğiyle artırılması sağlanmıştır. Geliştirilen özgün ürün ile patent başvurusu yapılmıştır.

2.6. MKH'ler ve testis

Mezenkimal kök hücreler (MKH), kemik iliği, yağ dokusu, plasenta gibi kaynaklardan kolayca elde edilebilen, multipotent, somatik, erişkin kök hücrelerdir. Bulundukları mikroçevrede, antiapoptotik, proliferatif ve immün düzenleyici etkilere

sahiptir (38, 39). MKH'lerin testis hasarının önlenmesi ve hasarlı testiste hücre rejenerasyonuna katkıları ile ilgili bazı çalışmalar yapılmıştır. Hasarlı testis dokusunun fiziksel ve fonksiyonel olarak onarımına olan etkilerini gösteren çalışmalar Tablo 2.1'de özetlenmiştir.

Literatürde bazı çalışmalarda MKH'lerin germ hücrelerine sınırlı farklılaşma kapasitesinin olduğuna ait veriler sunulmuşsa da (40, 41), genel olarak *in vitro* kültür koşulları ve *in vivo* ortamda bir kemoterapötik olan būsūlfan uygulaması ile gerçekleştirilen hasar modellerinde MKH'lerin, testis mikroçevresi ve SKH havuzunun onarımında Sertoli hücrelerine benzer biçimde parakrin sinyallerle destekleyici etki gösterdiği bildirilmektedir (42). Ayrıca, Sertoli hücrelerinin farklılaşma sürecine girmiş bir çeşit KİMKH benzeri hücre olabileceği öne sürülmüştür (21). Sertoli hücreleri ile benzerlikleri ve testiste bilinen koruyucu etkileri nedeniyle tez çalışması kapsamında geliştirilen MaS, *allojenik* KİMKH'lerle desteklenmiştir. Böylece erkek infertilitesi için, mikroakışkan cihazlardaki yeni doğan testis kültürlerinde KİMKH'lerle kişiye özel, insana aktarıldığında otojen bir tedavi modalitesi geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Tablo 2.1. Mezenkimal kök hücrelerin testis rejenerasyonuna etkilerini inceleyen makaleler listelenmiştir.

MKH kaynağı	Çalışma	Parametre	Etki	Kaynak
Kemik iliği	Testis hasarı sonrası <i>in vivo</i> MKH enjeksiyonu	Seminifer tübül alanı Seminifer tübül lümeni alanı Spermatogonium sayısı Spermatozoid sayısı Spermatogenez Antioksidan enzimler Anti apoptotik Bcl-2 geninin ifadesi Sperm sayısı Serum testostereone seviyesi Spermatogenez ile ilişkili miRNA'ların ve hedef genlerinin ifadesi Etradiol seviyesi ICAM-1 ve P-kaderin adhezyon moleküllerinin ifadesi	↑	(43-53)
		Apoptotik Bim, Bax, Caspase3 genlerinin ifadesi Antisperm antikor (ASA) ifadesi Apoptotic spermatojenik seri hücrelerinin sayısı	↓	
Göbek kordonu	<i>In vivo</i> / MKH enjeksiyonu	Germ hücresi spesifik genlerin ifadesi Normal morfolojide sperm üretimi Seminifer tübül onarımı	↑	(54-57)
		Enjekte edilen MKH'lerin bazal membrana yerleşimi		
Yağ dokusu	<i>In vivo</i> / MKH enjeksiyonu	Spermatogenez Testosteron salgısı Sertoli hücresi sayısı Sertoli hücresi migrasyonu Leydig hücrelerinin salgısal fonksiyonu	↑	(58-61)
		Oksidatif stress	↓	
		MKH'lerin transdiferasyasyon ile fonksiyonel sperme dönüşümü		
Amniyon zarı	<i>In vivo</i> / MKH enjeksiyonu	Spermatogenez Testosteron seviyesi Testis kütlesi Testis boyutu Semen parametreleri Germ hücresi spesifik genlerin (Dazl, Ddx4 ve Miwi) ifadesi Mayoz genlerinin (Scp3, Siklin A1, ve Stra8) ifadesi	↑	(62)

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında; allojenik KİMKH salgısı ile desteklenen pompasız tek PDMS tabakalı yeni MaS'ın tasarlanıp üretilmesi, valide edilmesi, MaS koşullarının 42 günlük bir spermatojenik siklus boyunca yeni doğan fare testis organ kültüründe SKH havuzunun idamesi, *in vitro* spermatogenezin başlatılması ve yürütülmesi ve yapısal/fonksiyonel testis matürasyonunun desteklenmesine olası katkılarının değerlendirilmesi **amaçlanmıştır.**



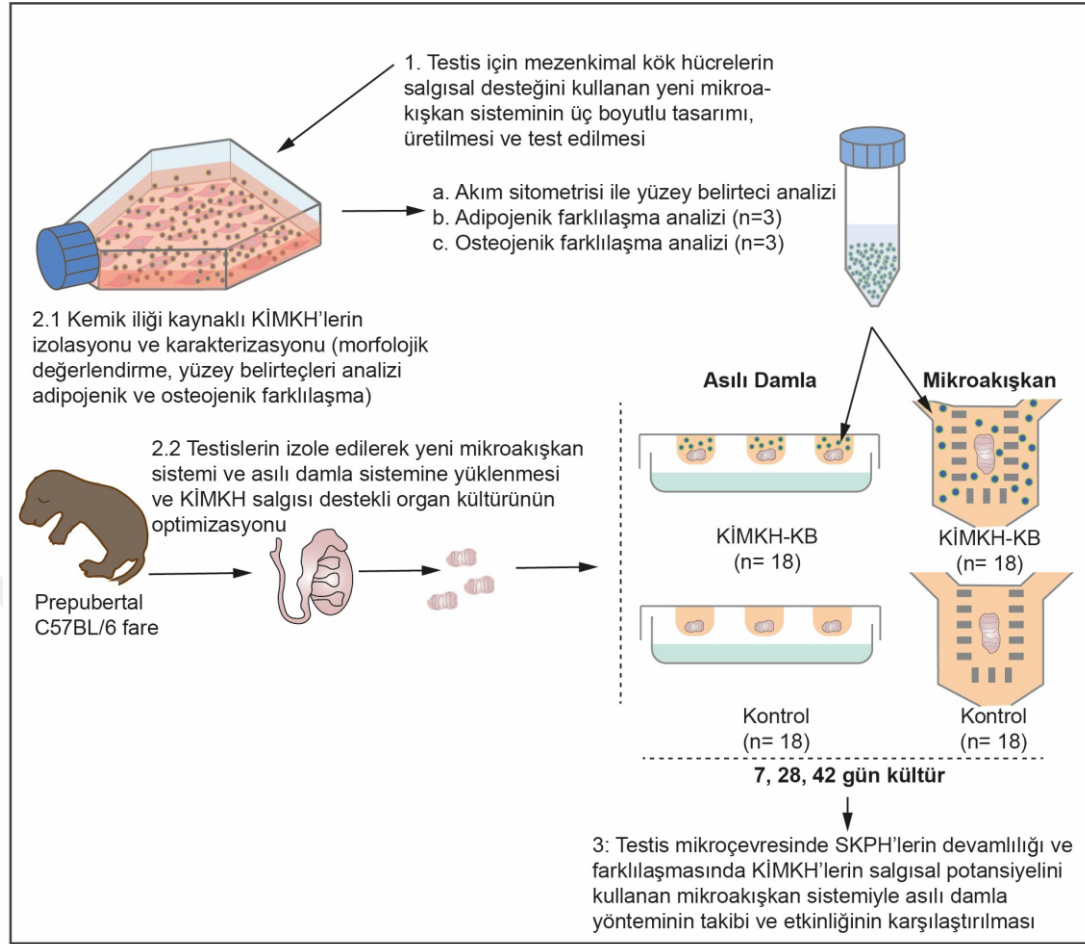
3. GEREÇ VE YÖNTEM

Deney tasarımı: Tez çalışması randomize, prospektif *in vitro* deneysel araştırma olarak planlanmıştır. G-power 3.0.10 programında 0,3 etki büyüklüğü, %80 güç, %5 hata payı ile yapılan istatistiksel güç analizine göre kullanılması gereken hayvan sayısı n=77 olarak belirlenmiştir (Tablo 3.1.). Kontrol grubu olarak MKH-KB içermeyen MaS, MKH-KB içermeyen AD ve MKH-KB içeren AD kültür ortamı kullanılırken; deney grubu olarak ise MKH-KB içeren MaS kültür ortamı kullanılmıştır. KİMKH izolasyonu için 5 adet yeni doğan fare kullanılmıştır.

Tablo 3.1. Tez çalışmasının hayvan deneylerine ait örneklem büyüklüğü sunulmaktadır.

	Hayvan sayısı: MKH salgısı ile kültürü yapılan testisler			Hayvan sayısı: MKH salgısı olmadan kültürü yapılan testisler		
MaS'ta kültürü yapılan testisler (2 set)	7. gün n= 6	28. gün n= 6	42. gün n= 6	7. gün n= 6	28. gün n= 6	42. gün n= 6
AD yöntemiyle kültürü yapılan testisler (2 set)	7. gün n= 6	28. gün n= 6	42. gün n= 6	7. gün n= 6	28. gün n= 6	42. gün n= 6
MKH izolasyonu	Kullanılan hayvan sayısı			n= 5		
	Kullanılan toplam testis ve hayvan sayısı			72 (144 testis, 72 hayvan) + 5 hayvan n=77 hayvan		

Bağımlı değişkenler araştırmanın ölçüm parametreleri (hücre proliferasyonu, testis dokusunda seminifer tübül ve lümenlerin histomorfometrik ölçümleri), bağımsız değişkenler zaman (1. hafta (7. gün), 4. hafta (28. gün), 6. hafta (42. gün)) ve deney koşullarıdır (MKH salgıları ile kültüre edilmiş ve edilmemiş, MaS ve AD yöntemi ile kültüre edilmiş immatür testis). Tez ile ilgili tüm çalışmalar, Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 18.09.2018 tarihli ve 52338575-109 sayılı izni (Ek 1-2) ile asıl olarak Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AbD'na ait altyapı, laboratuvar ve yanı sıra Orta Doğu Teknik Üniversitesi Mikro-Elektro-Mekanik Sistemler (MEMS) Merkezi'ne ait teknik donanım kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasına ait iş akışı Şekil 3.1.'de şematize edilmektedir.



Şekil 3.1. Tez çalışmasının iş akışı şematize edilmektedir.

3.1. Testis için MKH destekli yeni MaS'ın üç boyutlu tasarımı, üretimi ve validasyonu

Bu iş paketi kapsamında rezistans kanalı aracılığı ile pompasız ve tek PDMS katlı MaS'ın tasarımı ve üretimi; geliştirilen MaS'ta belirli besiyeri yüksekliğinde kanallardaki sıvı akış hızının değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir. İş paketi kapsamındaki çalışmalar, 6550 sayılı yasa ile ülkemizdeki dört mükemmeliyet merkezinden biri olarak tescil edilen Orta Doğu Teknik Üniversitesi Mikro-Elektro-Mekanik Sistemler (MEMS) Merkezi bünyesindeki altyapı, teçhizat ve sarf malzemesi desteğiyle tamamlanmıştır.

3.1.1 MaS'ın tasarımı

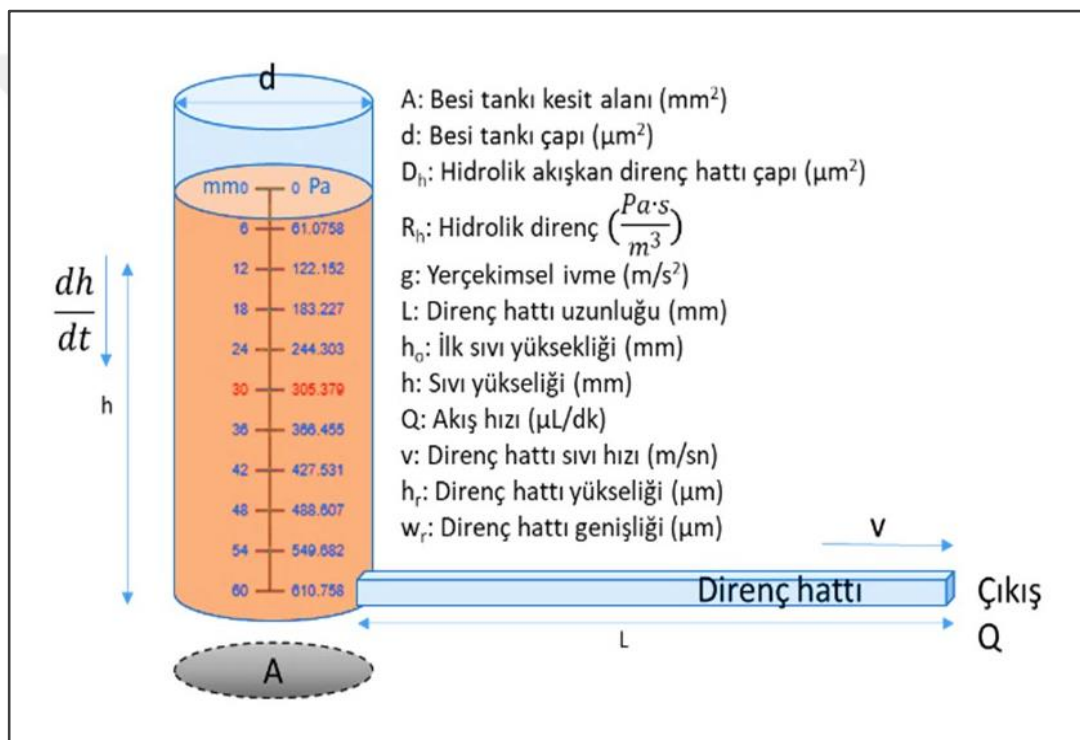
MaS'ta, testis dokusu tarafından kanallardan geçen besiyerinde bulunan moleküllerin difüzyonunu ve dokunun yaşamsal özelliklerinin sürdürülmesini sağlamak üzere biyouyumlu PDMS kullanımı tercih edilmiştir (63, 64). Her iki tarafından kılcal besiyeri kanalları tarafından beslenen organ haznesi, besiyerinin testis içinde difüzyon ile ilerleyebildiği maksimum mesafe bakımından literatürden yola çıkılarak belirlenen 300-400 μm 'lik uzunluk baz alınarak 750 μm olarak belirlenmiştir (6). Dokunun kültür ortamında canlı kalabilmesi için kanallardan geçen sıvının akış hızı aralığı literatürden faydalanılarak 0.05 $\mu\text{l}/\text{dk}$ ile 2 $\mu\text{l}/\text{dk}$ olarak belirlenmiş, yapılan tasarımda bu akış hızı aralığına uyum hedeflenmiştir(7). Bu amaçla, kullanılan MaS'ın hidrolik direnci; kanal uzunluğu, genişliği, yüksekliği ve besiyerinin viskozitesi gibi parametrelere bağlı olarak hesaplanmıştır (Tablo 3.2.). Tez çalışması kapsamında, hidrostatik basınç prensibi ile akışkanın giriş ve çıkış noktalarındaki basınç farkından faydalanılarak, pompaya ihtiyaç duyulmadan sıvı akış hızını kendiliğinden belirlenen aralıkta tutabilen bir MaS'ın tasarımı tamamlanmıştır.

MaS tasarımına uygun olarak, her iki tarafından difüzyon ile kılcal besiyeri kanalları tarafından beslenen organ haznesi 750 μm ve dokunun kültür ortamında canlı kalabilmesi için kanallardan geçen sıvının akış hızı aralığı 0.05 $\mu\text{l}/\text{dk}$ ile 2 $\mu\text{l}/\text{dk}$ olacak şekilde cihaz tasarımı tamamlanmıştır. Kullanılan direnç hattı uzunluğu kanal genişliği, yüksekliği, besiyerinin viskozitesi gibi parametreler göz önüne alınarak yapılan hesaplamalar neticesinde cihaz tasarımı oluşturulmuştur. Tasarlanan cihaz çalışma kapsamında uygulanacak deneyler için uygun sayıda üretilip test edilerek organ kültürü iş paketleri için hazırlanmıştır.

Analitik model

Mikroakışkan sistemlerinde sıvı akış hızının belirli bir seviyede tutulabilmesi için gerekli olan enerjiyi sağlayabilecek bir pompa sistemine ihtiyaç duyulmaktadır. Pompa sisteminin kullanılmadığı mikroakışkan sistemler kullanım açısından basittir ve pompanın oluşturduğu akış stresinin önlenmesi hücre/organ kültürü açısından

avantajlıdır (65, 66). Literatüre dayanarak bu cihazın tasarımında, organ haznesinin şeklinden kaynaklı boyut değişimi, kültür sıcaklığı, kullanılan besiyerinin dinamik viskozitesi sabit varsayılmış, atmosferik basınç giriş ve çıkışta da etkili olacağından etkisi sıfır olarak düşünülmüş, organ haznesinin sıvı akışına etkisi hesaba katılmadan sadece kanalların ele alınması ile hidrolik direnç ve sıvı akış hızı hesaplamaları yapılmıştır. Yapılan hesaplamalarda elde edilen değerler ile üretimi yapılan cihazlara yapılan sıvı akış testleri ile karşılaştırılmıştır. Tasarlanan cihazdaki besiyeri haznesi, rezistans direnç hattının çizimi ve hesaplanmada kullanılan sayısal parametreler Şekil 3.2.'de gösterilmektedir.



Şekil 3.2. Tasarlanan cihazdaki besiyeri haznesi ve direnç hattının çizimi, hesaplamada kullanılan sayısal parametreler gösterilmektedir.

Hidrolik direnç (R_{hid}) hesabı

Besiyeri kanallarının, doku haznesinin ve rezistans hattının dirençleri ayrı ayrı hesaplanarak toplam direnç hesaplanmıştır. Hagen–Poiseuille kanunu, basınçla çalışan, sonsuz uzunluktaki kanal ve denge durumundaki bir akış için kullanılmaktadır. Bu kanun aynı zamanda tasarımıma benzer şekilde *Reynolds* sayısı (*Re*) küçük olduğunda ve kanal uzunluğu hidrolik çapa (D_h) göre çok büyük olduğunda ($L \gg D_h$)

kullanılabilmektedir. Akış hızının 0,05 - 2 $\mu\text{L/dk}$ aralığında tutulabilmesi için 500 mm uzunluğundaki bir rezistans hattı ve $h=170\ \mu\text{m}$, $w=150\ \mu\text{m}$ kılcal kanal boyutlarının kullanıldığı sistemde D_h aşağıdaki gibi hesaplanmıştır:

$$D_h = \frac{4A}{P_{Wet}} \approx 160\ \mu\text{m}$$

A: kesit alanı (m^2). P_{Wet} : Sıvının temas ettiği çeper uzunluğu (m)

MaS tasarımında mikron boyutundaki akışkan fiziği esas alınmıştır ve bu prensibe göre viskozite, ataletsel kuvvetlerden daha baskın bir rol oynamaktadır. *Reynolds sayısı* mikroakışkan sistemlerde genel olarak laminar akım rejimine denk gelmektedir ($Re < 1000$) ve zamana bağlı olarak ve besiyeri tankında bulunan sıvının yüksekliğine göre değişim göstermesi beklenmiştir. Bu nedenlerle tasarlanmakta olan sistem için Hagen–Poiseuille kanununu uygulanmıştır:

$$Re = \frac{\rho v D_h}{\mu} = \frac{\rho Q t D_h}{\mu}$$

(ρ : sıvı yoğunluğu (kg/m^3), μ : dinamik viskozite ($\text{kg/m}\cdot\text{s}$), v : sıvı hızı (m/s), D_h =hidrolik akışkan kanal çapı (dairesel olmayan), t : zaman, Q ($\mu\text{L/dk}$): akış hızı.)

Mikroakışkan cihazında kullanılan direnç hattı ve doku haznesine ait parametrelerin, cihaz tasarımında kullanılmış olan hesaplamalara göre elde edilen sayısal değerleri Tablo 3.2’de sunulmaktadır.

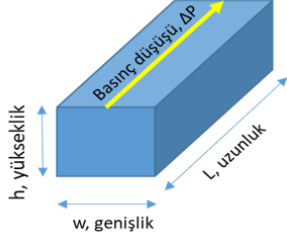
Tablo 3.2. Yapılan hesaplamalara göre MaS'ın üretiminde kullanılmış olan parametrelerin değerleri

PARAMETRE		SEMBOL	BİRİM	TASARIMDA KULLANILAN DEĞER
Sıvı ve ortam özellikleri	MEM- α L0475 sıvı yoğunluğu @ 20 °C	ρ	kg/m ³	1038
	MEM- α L0475 dinamik viskozite @ 20 °C	μ	cP	1,06
	Yerçekimsel ivme	g	m/s ²	9,81
Besiyeri kanalı (giriş)	Kanal yüksekliği	h_y	μm	170
	Kanal genişliği	w_y	μm	500
	Kanal uzunluğu	L_y	mm	14,5
Organ haznesi	Organ haznesi yüksekliği	h_{doku}	μm	170
	Organ haznesi genişliği	w_{doku}	μm	750
	(Hidrolik akışkan) doku haznesi çapı,	D_{doku}	μm	291
	Doku haznesi uzunluğu	L_{doku}	mm	2,5
Besiyeri kanalı (organ haznesi çevresi)	Sıvının temas ettiği çeper uzunluğu ($2 \times (h_r + w_r)$)	$P_{\text{Wet,d}}$	mm	234
	Besiyeri kanal yüksekliği	h_b	μm	170
	Besiyeri kanal genişliği toplamı	w_b	μm	500
	Besiyeri kanal uzunluğu	L_b	mm	$\approx 3,2$
Direnc hattı	Sıvının temas ettiği çeper uzunluğu ($2 \times (h_r + w_r)$)	P_{Wet}	μm	670
	(Hidrolik akışkan) direnc hattı kanal çapı,	D_h	μm	159,4
	Direnc hattı uzunluğu	L_r	m	0,5
	Direnc hattı yüksekliği	h_r	μm	170
	Direnc hattı genişliği	w_r	μm	150
Besiyeri haznesi	Besiyeri tankı çapı	d	mm	17,1
	Besiyeri tankı kesit alanı	A	m ²	72,3
	Akış hızı	Q	$\mu\text{L/dk}$	min: 0,05 ve max: 2

Kullanılan parametrelerle tasarlanan cihaz için yapılmış olan toplam hidrolik direnc hesabı Tablo 3.3.'te verilmiştir. Tabloda verilen hesaba göre, mikroakışkan cihazındaki sistemin direncini en çok etkileyen faktör kanal yüksekliğidir. Fakat, sistemin kanal yüksekliği, tam bir seminifer tübül gelişimine izin verecek şekilde 170 μm olarak belirlenmiştir (6). Bu nedenle, sistemin tek bir fotolitografi aşaması ile

üretmesini sağlayacak şekilde, istenen aralıkta bir sıvı akış hızının elde edilebilmesi için uzun bir direnç hattı (0,5 m) kullanılmıştır.

Tablo 3.3. Toplam hidrolik direnç (R_{hid}) hesabı verilmektedir.

	$R_{hid} = \frac{12\mu L}{wh^3 \left(1 - \left(\frac{192h}{\pi^5 w} \right) \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(2n-1)^5} \tanh \left(\frac{(2n-1)\pi w}{2h} \right) \right)}$
$R_{hid,b}$	$0,83 \times 10^{10}$
$R_{hid,y}$	$4,28 \times 10^{10}$
$R_{hid,d}$	$2,34 \times 10^{13}$
$R_{hid,toplam}$	$\approx 2,34 \times 10^{13}$

Hesaplama da kullanılan Hagen-Poiseuille kanununa göre, akış hızı (Q) ve direnci (R_{hid}) değerleri birbirleriyle lineer olarak ilişkilendirmektedir:

$$\Delta P = Q \times R_{hid,toplam}$$

Bu nedenle toplam dirence ve gerekli olan minimum (Q_{min}) ve maksimum (Q_{max}) akış hızları (0,05 - 2 $\mu\text{L/dk}$) dikkate alınarak göre sıvının kanallarda akması için gerekli olan basınç farkı (ΔP) hesabı Tablo 3.4.; gerekli olan minimum ve maksimum besiyeri yüksekliği Tablo 3.5.'te verilmektedir.

Tablo 3.4. Minimum ve maksimum akış hızını sağlayacak hidrostatik basıncın hesaplanması

$R_{hid,toplam}$	$Q_{min}=0.05 \mu\text{L/dk} (8,4 \times 10^{-13} \text{ m}^3/\text{s})$	$Q_{max}=2 \mu\text{L/dk} (3,3 \times 10^{-11} \text{ m}^3/\text{s})$
$\approx 2,34 \times 10^{13}$	20 (Pa)	772 (Pa)

Yapılan hesaplama ya göre, minimum ve maksimum sıvı akış hızının elde edilebilmesi için kullanılması gereken basınç farkı değerinin 20 Pa – 772 Pa aralığında

olması gerektiği hesaplanmıştır. Elde edilen bu basınç farkı değerleri, tasarlanan pompasız sistemde besiyeri tankında olması gereken minimum ve maksimum sıvı yüksekliği değerlerinin elde edilmesi için kullanılmıştır:

$$P_{hidrostatik} = \rho gh,$$

$$P_{hidrostatik} = 1038 \left(\frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \right) \times 9,81 \left(\frac{\text{m}}{\text{s}^2} \right) \times h \text{ (m)}$$

($P_{hidrostatik}$ = basınç (kg/ms^2), ρ = sıvının özgül ağırlığı (kg/m^3), g = yerçekimsel ivme ($9,81 \text{ m/s}^2$), h = sıvının yüksekliği (m))

Tablo 3.5. Hidrostatik basıncı sağlayacak minimum ve maksimum besiyeri yüksekliğinin hesaplanması.

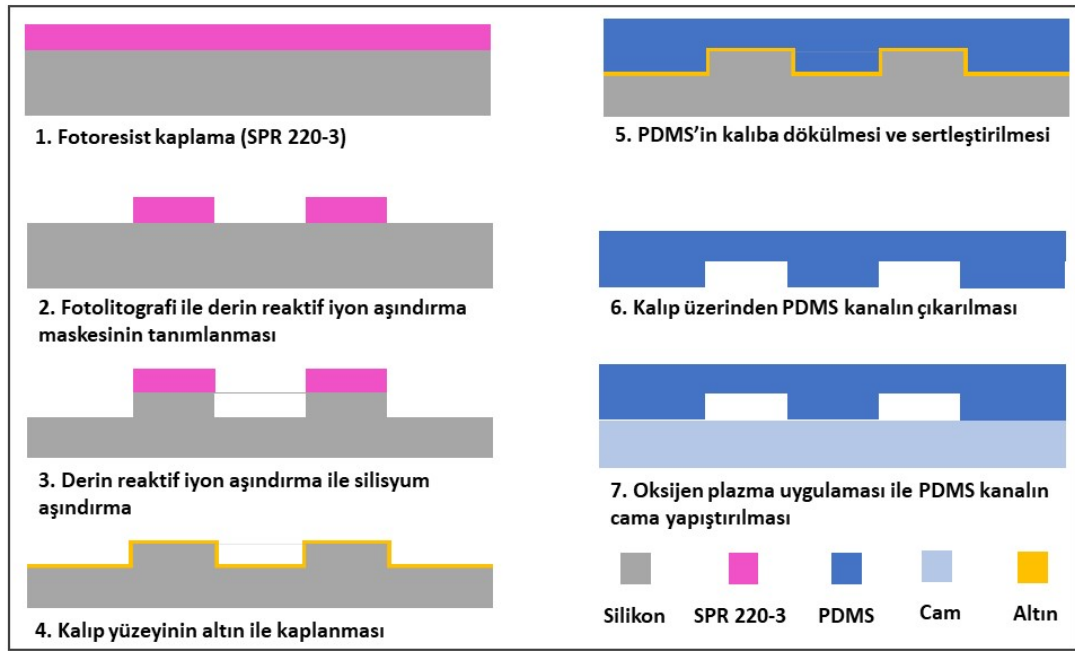
	$Q_{\min}=0,05 \text{ }\mu\text{L/dk}$	$Q_{\max}=2,00 \text{ }\mu\text{L/dk}$
	20 (Pa)	772 (Pa)
Sıvı yüksekliği, h_o (mm)	1,9	76

Mikrokanal içerisindeki akış hızının zamana bağlı değişimi ise aşağıda verilen üssel eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$Q(t) = \frac{h_o \rho g}{R_{hid}} e^{-\frac{\rho g}{R_{hid} A} t}$$

3.1.2. MaS'ın üretilmesi, sıvı akış hızının test edilmesi

Mikroakışkan sistemleri, tek bir 10 cm çapında pul üzerinde 8 adet cihazın bulunacağı şekilde ODTÜ MEMS Araştırma ve Uygulama Merkezinde tasarlanmış ve mikrofabrikasyon yöntemleri kullanılarak üretilmiştir. Şekil 3.3.'te kalıp üretim aşamaları şematize edilmiştir.



Şekil 3.3. PDMS yumuşak fotolitografi ve replika kalıplama ile mikroakışkan kanal üretim aşamaları gösterilmiştir.

PDMS yumuşak fotolitografi ve replika kalıplama yöntemi

Silikon pullar üzerine yapılan üretimde ilk olarak doku haznesi ve kanallar fotolitografi yöntemi ile cam maske kullanılarak 2B’de gösterildiği gibi tanımlanmıştır. Sonrasında fotoresist ile maskelenmeyen bölgelerde silisyum pul, derin reaktif iyon aşındırma (DRIE) yöntemi aşındırılmıştır. Fotoresist ve DRIE polimer katmanının plazma ile temizlenmesi sonrasında, kalıplama sırasında PDMS’in puldan ayrılmasını kolaylaştırmak amacıyla, ince bir Cr/Au katmanı (20nm/200nm) silikon pul üzerinde saçtırma ile kaplanmış ve kalıp üretimi tamamlanmıştır. Hazırlanan kalıplar üzerine 1:10 oranında kürleştirici ile PDMS monomer karışımı dökülmüş ve 90 dk boyunca 80 °C fırında bekletilerek kürleştirilmiştir. Daha sonra, kürleştirilen PDMS silisyum puldan ayrılmıştır. En son aşamada, üzerinde mikrokanallar yer alan PDMS çipler ile cam yüzeyler oksijen plazmaya maruz bırakılmıştır ve plazma altında aktifleşen yüzeyler birbirlerine yapıştırılmıştır. Bu yöntemle hazırlanan mikroakışkan cihazları sıvı akış hızı açısından test edilmiştir.

Üretilen sistemin test edilmesi

Mikroyapının sıvı geçişi ve besin geçişine uyumluluğu:

Mikroakışkan sistemde, kullanılan besiyerinin organ haznesi ile etkileşimi; ve besiyeri kanalı - doku haznesini birbirinden ayıran 25 µm aralıklı engellerden mikron düzeyinde parçacık ve sıvı geçişi kanallardan geçirilen sıvının fluoressan ataşmanlı ışık mikroskobu (Leica DMI8, Wetzlar Almanya) altında gözlemlenmesi ile değerlendirilmiştir.

Akış testi:

Sisteme yüklenen besiyeri tankındaki sıvının belirli yüksekliklerinde dakikada sistemi terk eden sıvı miktarının ölçümü yapılarak da sıvı akış hızı değerlendirmesi yapılmıştır.

3.2. C57BL/6 yeni doğan farelerden MKH'lerin izolasyonu, karakterizasyonu; testislerin izole edilerek yeni MaS ve AD platformlarına yüklenmesi ve MKH destekli organ kültürünün optimizasyonu

Bu iş paketi kapsamında, yenidoğan 5 adet C57BL/6 türü fareden MKH izolasyonu, elde edilen hücrelerin kültürü, üçüncü pasajda karakterizasyonu ve yine aynı pasajda depolanarak deneylere hazır hale getirilmesi; 6 günlük farelerden testis izolasyonu yapılarak mikroakışkan ve AD sistemlerindeki testis kültürünün optimizasyonunun yapılması ve elde edilen sistemlerde 7, 28 ve 42 günlük kültür süreleri boyunca testis organ kültürünün yürütülmesi sağlanmıştır.

3.2.1. KİMKH'lerin izolasyonu ve karakterizasyonu

KİMKH'lerin izolasyonu ve kültürü

Etik kurul izni kapsamında cerrahi işlem servikal dislokasyon uygulanan yeni doğan fareler, 100 mm petri kabında %70 etanolde 3 dakika bekletilmiştir. Arka bacaklar kesilip, tibia ve femur çıkarılmıştır. Elde edilen kemik örnekleri kas ve bağ dokularından arındırılıp, steril *α-minimum essential medium* (α-MEM) (Biological Industries, ABD) içine alınmıştır. Örnekler %1 penisilin streptomisin (PS) (Biological

Industries, ABD) içeren PBS ile iki kez yıkanıp, 10 ml α -MEM içeren 100 mm petri kabına alınmıştır. Kemikler mikrodiseksiyon makası yardımı ile Kİ kavitelerinin sonundan kesilip, kaviteler 5 ml'lik enjektör yardımı ile %15 *fetal bovine serum* (FBS) (Biological Industries, ABD) ve %1 PS içeren α -MEM besiyeri ile yıkanmıştır. Kavitelerin yıkanması ile elde edilen kemik iliği hücre popülasyonu T75 kültür kaplarına alınıp, 5 gün boyunca 37 °C'de %5 CO₂ kültür koşulunda kültüre edilmiştir. Her üç günde bir kültür kabındaki besiyeri uzaklaştırılıp, taze besiyeri eklenmiştir (67, 68). Yüzde 70 yoğunluğa gelen hücreler %0.25 tripsin-EDTA (Gibco, ABD) ile kaldırılıp Tripan mavisi ile sayım yapılarak pasajlanmıştır. Aynı pasajlama işlemi 4-6 günde bir hücreler üçüncü pasaja gelene kadar tekrarlanmıştır (68).

Morfolojik analiz ile karakterizasyon

Tüm karakterizasyon çalışmaları ve ileri deney paketleri üçüncü pasaj MKH'ler ile gerçekleştirilmiştir. MKH'ler adeziv yapı ve iğsi-poligonal şekle sahip olma özellikleri açısından değerlendirilmiştir (Şekil 3.4.A).

Adipojenik yönde farklılaşma analizi

Hücrelerin 20.000 hücre/cm² yoğunlukta ekilmesinin ardından %100 konfluensiye ulaşıncaya kadar MKH kültür besiyeri ile beslenmeye devam edilmiştir. Yüzde 100 yoğunluğa ulaşan hücrelerin besiyeri adipojenik farklılaşma besiyeri ile değiştirilmiştir (68). Yirmi bir gün sonra farklılaşmalarını tamamlayan hücreler *Oil Red O* boyası ile boyanarak ışık mikroskobu (Olympus, Japonya) altında değerlendirilmiştir. Hücrelerin adipojenik farklılaşma potansiyeli ORO boyasının %2 igepal/izopropanol (v/v) ile ekstraksiyonu sonrası 492 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri ile (Tecan, Avustralya) kantitatif olarak değerlendirilmiştir (68) (Şekil 3.4.B).

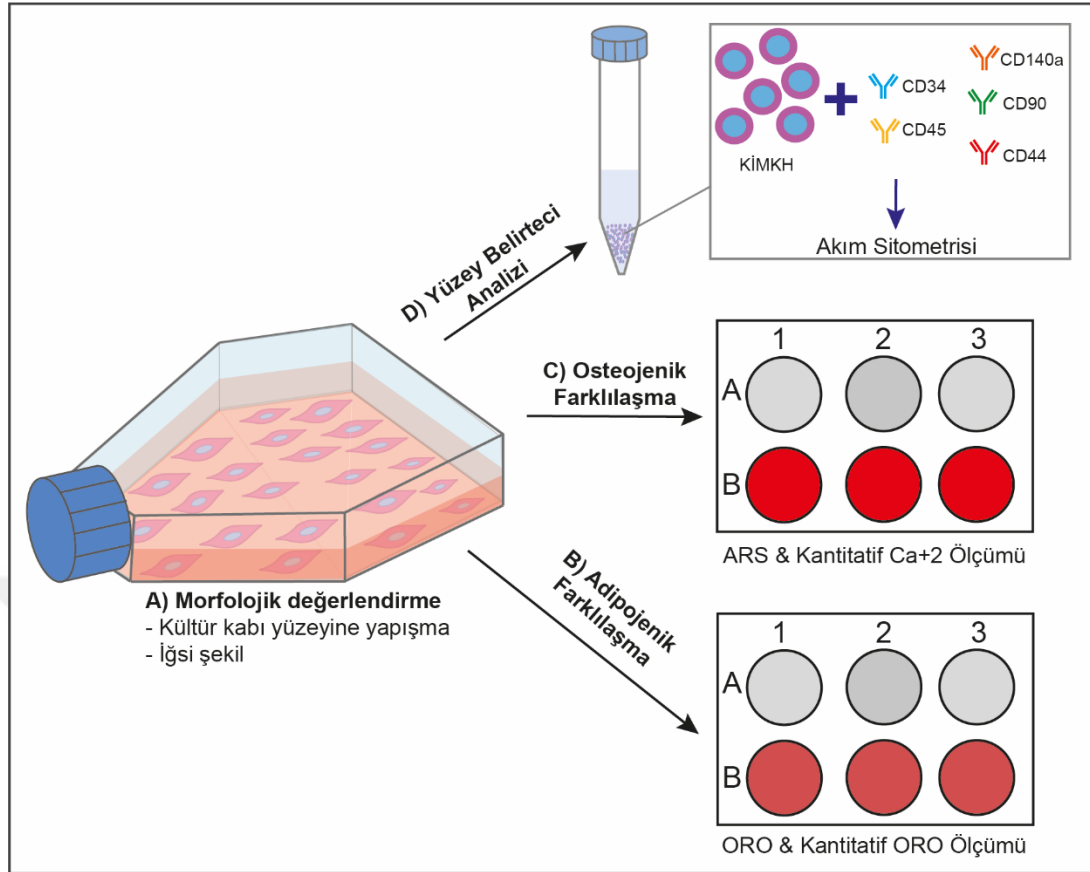
Osteojenik yönde farklılaşma analizi

Hücrelerin 5.000 hücre/cm² yoğunlukta ekilmesinin ardından %70 konfluensiye ulaşıncaya kadar MKH kültür besiyeri ile beslenmeye devam edilmiştir.

Yüzde 100 yoğunluğa ulaşan hücrelerin besiyeri osteojenik farklılaşma besiyeri ile değiştirilmiştir (69). Yirmi bir gün sonra farklılaşmalarını tamamlayan hücreler *Alizarin Red S* boyası (pH=4.2, Sigma, ABD) ile boyanarak ışık mikroskobu bağlantılı dijital görüntüleme sistemi (Olympus, Japonya) ile değerlendirilmiştir. Osteojenik farklılaşma *SigmaFast pNPP* (Sigma Aldrich, Almanya) kiti ile spektrofotometrik yöntemle 405 nm dalga boyunda okutularak kantitatif olarak değerlendirilmiştir (68) (Şekil 3.4.C).

Yüzey belirteçleri analizi

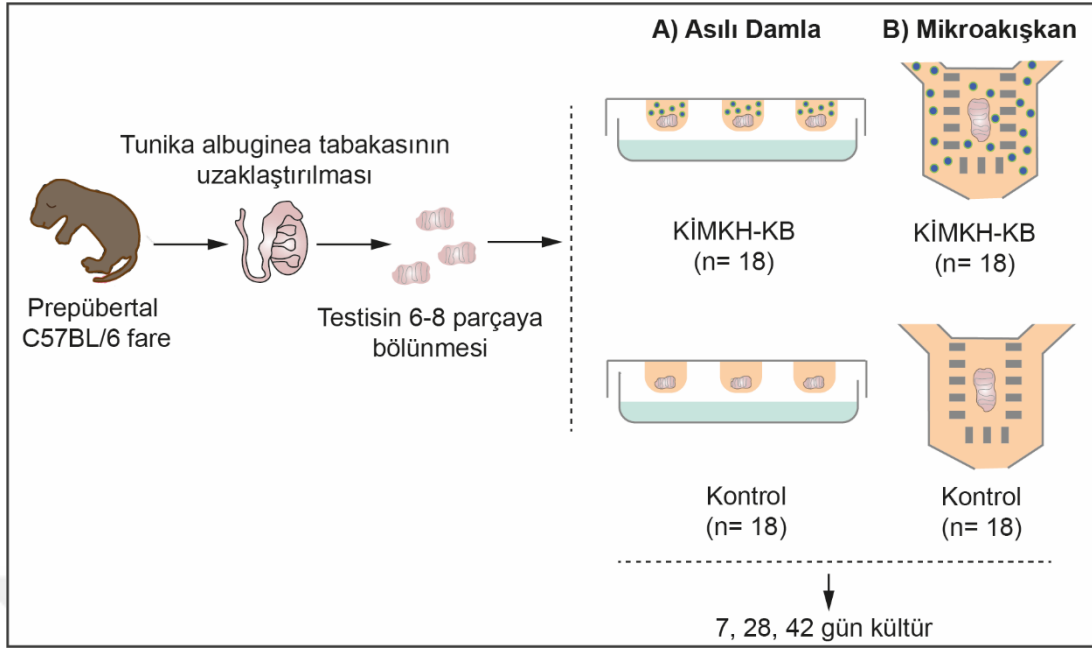
Hücreler mekanik olarak kaldırılmış, PBS ile yıkanarak $2 \times 10^5/100$ µl hücre yoğunluğunda tüplere bölünmüş, 5'er µl eklenerek +4 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir. Fare MKH belirteçleri olarak anti fare CD44 (BD Biosciences, ABD), CD140a (BD Biosciences, ABD) ve CD90 (BD Biosciences, ABD); fare hematopoetik hücre yüzey belirteçleri olarak anti fare CD34 (BD Biosciences, ABD) ve CD45 (BD Biosciences, ABD); izotipik kontrol olarak PE konjuge sıçan IgG2b (BD Biosciences, ABD), APC konjuge sıçan IgG2b (BD Biosciences, ABD), PE konjuge sıçan IgG2a (BD Biosciences, ABD), PE konjuge sıçan IgG2a (BD Biosciences, ABD), FITC konjuge sıçan IgG2b (BD Biosciences, ABD) antikorları kullanılmıştır (70). İnkübasyonunu tamamlayan hücrelere 2 ml PBS eklenerek 350xg'de santrifüj edilip 200 µl PBS ile dilüe edilmiş, toplam 10.000 olgu okutularak akım sitometrisi cihazında (Novocyte, Agilent) analiz gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4.D).



Şekil 3.4. İzole edilen MKH'lerin üçüncü pasajda (A) morfolojik özellikler, (B) adipojenik farklılaşma, (C) osteojenik farklılaşma ve (D) yüzey belirteci analizleri ile karakterize edilme yöntemi şematize edilmektedir.

3.2.2. Testislerin izole edilerek yeni MaS ve AD platformlarına yüklenmesi ve MKH destekli organ kültürünün optimizasyonu

Yeni doğan C57BL/6 farelerde cinsiyet ayrımı yapıp, erkek farelere servikal dislokasyon uygulanmasının ardından testisler izole edilmiştir. İzole edilen testisler %1 PS eklenmiş +4°C HBSS'ye alınmıştır. Testisler %10 (v/v) *knockout serum replacement* (KSR) (Gibco, ABD), %1 (v/v) pen-strep (Gibco, ABD) içeren α -MEM (Biological Industries, İsrail) içine alınarak stereomikroskop altında dekapsüle edilmiştir. Seminifer tübüller 6-8 parçaya bölünerek kültüre hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. Yeni doğan farelerden izole edilen testislerin (A) AD ve (B) MaS'a yüklenmek üzere hazırlanması ve kültür sistemlerinin oluşturulması yöntemi şematize edilmiştir (AD-Kontrol: MKH koşullu besiyeri kullanılmayan asılı damla, AD - KİMKH-KB: MKH koşullu besiyeri kullanılan asılı damla, Mikroakışkan – Kontrol: MKH koşullu besiyeri kullanılmayan mikroakışkan, Mikroakışkan – KİMKH-KB: MKH koşullu besiyeri kullanılan mikroakışkan).

Testislerin AD yöntemi ile kültürü

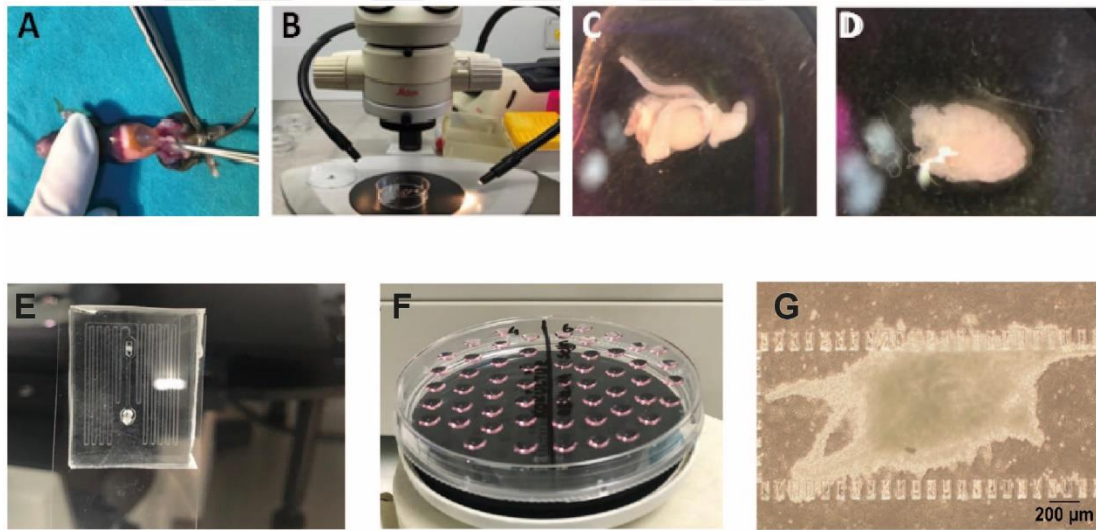
İzolasyon işleminin ardından, stereomikroskop altında testisleri dıştan saran kapsül yapısındaki tunika albuginea penset yardımıyla parankimden ayrılmış, seminifer tübüller açığa çıkarılarak MaS kullanılan deney grubuyla aynı şekilde 6-8 parçaya bölünmüştür. 100 mm çapında petri kaplarının kapaklarına 30 µl hacimli besiyeri damlacıkları oluşturulmuş ve bunun ardından hazırlanan seminifer tübül parçaları penset yardımıyla dikkatlice damlacıklar içine bırakılmıştır. Kontrol grubunda testis besiyeri olarak %10 KSR ve %1 PS ilave edilmiş α-MEM besiyeri (71); deney grubunda besiyerine ek olarak olarak %50 oranında üçüncü pasajdaki MKH süpernatanı içeren testis doku besiyeri kullanılmıştır. Oluşturulan damlacıklara testislerin yerleştirilmesinin ardından, petri kabının tabanı kaplanacak şekilde 10 ml distile PBS ile doldurulmuş ve kapak petri kabına dikkatlice kapatılarak, hazırlanan düzenek inkübatöre yerleştirilip, 34 °C'de, %5 CO₂ ortam koşullarında inkübe

edilmiştir. Mezenkimal kök hücrelerin salgılarının testis kültür ortamına entegre edilmesi için, ADların besiyeri değişimi yapılırken, 1:1 oranında MKH süpernatanı ve testis organ kültür besiyeri karışımı yapıp kullanılmıştır. Mezenkimal kök hücrelerin %70 yoğunlukta T75 kültür kabını kaplamalarının ardından taze besiyeri (yaklaşık 2,5 ml) 1 gün boyunca bekletilmiş ve ardından MKH kültüründe kullanılmış bu besiyeri testis organ kültürü için hazırlanmış besiyeri ile 1:1 oranında karıştırılıp damlalara eklenmiştir. ADlarda besiyeri değişimi yapılması için, eşit hacimde besiyeri (20 µl) damlalardan çekilip, yerine yeni hazırlanmış besiyeri MKH salgısı karışımı eklenmiştir. Besiyeri değişimi iki günde bir tekrarlanmıştır (72). Elde edilen sistemde 7, 28 ve 42 gün kültür süreleri boyunca testis organ kültürünün yürütülmesi sağlanmıştır.

Testislerin MaS düzeneğine yerleştirilmesi ve kültürü

Hazırlanan tübüller laminar akım kabini içinde buz üstünde testis kültür besiyerinde bekletilirken, mikroakışkan cihaz tasarımı ile hazırlanan PDMS ve cam tabakalarının yapıştırılabilmesi için oksijen plazma işlemi yapılmıştır. Bu işlem için, PDMS'in kanal yüzeyi yukarı gelecek şekilde hazırlanan tabakalar cihaz içine yerleştirilmiş ve 100 W güç ile 90 saniye boyunca oksijen plazma işlemi uygulanmıştır. Bu işlemin ardından seminifer tübül parçaları birer birer mikroakışkan cihazın PDMS tabakasında bulunan organ haznesine stereomikroskop altında izlenerek yerleştirilmiştir. Ardından üst tabaka olan PDMS tabakası, alt cam tabakaya oksijen plazmanın etkisi ile yapıştırılmıştır. Oksijen plazma ile aktive edilen PDMS yüzeyin cama sıkı bağlarla bağlanmasıyla iki yüzey arasındaki kopma engellenmiştir. Testisler mikroakışkan düzeneklere yerleştirildikten sonra, 15 ml santrifüj tüpleri ile hazırlanan besiyeri tankları cihaz üzerine yapıştırılmış ve tank testis organ kültür besiyeri ile doldurulmuştur. Mikroakışkan cihazı, sistemi terk edecek olan sıvıların birikmesi için 33 mm çapında petri kapları üzerine yerleştirilerek ihtiyaç olan düzenek tamamlanmıştır. Sonrasında, hazırlanan düzenek inkübatöre yerleştirilip, testis organ kültürü için uygun koşul olan 34 °C, %5 CO₂ ortam koşullarında inkübe edilmeye başlanmıştır. Mezenkimal kök hücrelerin salgılarının sisteme entegre edilmesi için, mikroakışkan sistemdeki besiyeri haznesine ekleme yapılırken (sıvı akış hızının

istenilen aralıkta kalması için yaklaşık 5 günde bir ekleme yapılmıştır) 1:1 oranında MKH süpernatanı (MKH kültürü için kullanılmış olan %15 FBS, %1 PS ve sodyum bikarbonat içeren α -MEM) ve testis organ kültür besiyeri karışımı ((%10 (v/v) KSR ve %1 Pen-strep (Lonza, İsviçre) ilave edilmiş α -MEM (Invitrogen, ABD)) yapıp haznelere konulmuştur. Salgıların elde edilmesi için üçüncü pasajdaki MKH'lerin kültür süpernatantları kullanılmıştır. Ekilen MKH'lerin %70 yoğunlukta T75 kültür kabını kaplamalarının ardından taze besiyeri (yaklaşık 2,5 ml) 1 gün boyunca bekletilmiş ve ardından MKH kültüründe kullanılmış bu besiyeri testis organ kültürü için hazırlanmış besiyeri ile 1:1 oranında karıştırılıp sisteme eklenmiştir. Böylece fizyolojik ortamı modelleyen testis mikroçevresine MKH'lerin endojen parakrin katkısı da eklenmiştir. Elde edilen sistemde 7, 28 ve 42 gün kültür süreleri boyunca testis organ kültürünün yürütülmesi sağlanmıştır (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. Testis izolasyonu, organ kültürü hazırlığı, AD ve mikroakışkan kültür sistemlerinin oluşturulması. (A-D) C57BL/6 türü fareden testis izolasyonu, tunika albugineanın uzaklaştırılması ve seminifer tübüllerin kültüre uygun boyuta getirilmesi aşamaları gösterilmektedir. (E) Mikroakışkan sisteme ve (F) AD kültür sistemine yerleştirilen testis örnekleri gösterilmektedir. (G) MaS'ta organ haznesindeki testisin mikroskop görüntüsü sunulmaktadır.

3.3. SKH'lerin devamlılığı ve farklılaşmasında MKH'lerin salgısal potansiyelini kullanan MaS ve AD platformlarının karşılaştırılması

Farelerde spermatogenez siklusu 35 gün olarak bildirilmiş (73, 74); vücut dışında 6 günlük fare testis organ kültürü modellerinde bu zamana denk gelen 28. günden itibaren farklılaşmaya ait veriler bulunmaktadır (6). Buradan yola çıkılarak çalışmanın 3.1 numaralı iş paketinde 7, 28 ve 42. günlerde SKH havuzunun performansı, spermatojenik seri hücrelerinin farklılaşma performansı değerlendirilmiştir.

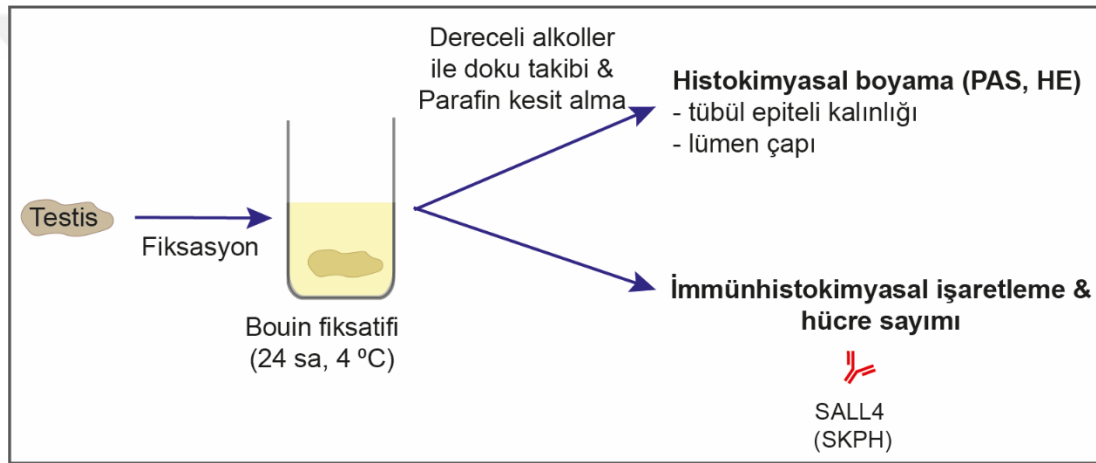
3.3.1. Histokimyasal yöntemlerle spermatojenik seri hücreleri ve testis matürasyonunun değerlendirilmesi

7, 28 ve 42 günün sonunda AD yöntemi ve MaS içinde MKH salgıları ile kültüre edilen ve MKH salgıları olmadan kültüre edilen gruplardan elde edilen testisler Bouin fiksatif ile fikse edilip, sabit vakumlu doku takip cihazında (Leica, Almanya) dereceli alkoller ve ksilollerden geçirilerek takip edildikten sonra parafine gömülmüştür. Kızaklı mikrotomda (Leica, Almanya) ile 3-5 µm'lik kesitler alınmıştır. Ardından deparafinizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında, dereceli alkoller ile rehidratasyon sağlanıp, kesitler hematoksilin eozin (HE) ve *Periodic Acid Schiff* (PAS) (Abcam, Birleşik Krallık) yöntemleriyle boyanmıştır. Kesitlerden ışık mikroskobu ataşmanlı dijital kamera ve ilişkili görüntü analiz sistemi (Leica DM 600, LAS, Almanya) ile görüntüler alınmış olup, histomorfometrik olarak seminifer tübül epiteli kalınlığı, tübül lümeni çapı ve spermatojenik seri hücrelerinin (spermatogonyumlar, primer ve sekonder spermatositler, spermatidler, spermatozoonlar) kantitatif olarak değerlendirilmiştir (75).

3.3.2. SALL4 ile SKPH'lerin immün işaretlenmesi

Yedi, yirmi sekiz ve kırk ikinci günler sonunda AD yöntemi ve MaS içinde MKH salgıları ile kültüre edilen ve MKH salgıları olmadan kültüre edilen gruplardaki testislerden elde edilen 3 µm kalınlığındaki parafin kesitler deparafinize ve rehidrate edilmiştir. Ardından kesitlere indirekt bir immün peroksidaz yöntemi uygulanmıştır.

Endojen peroksidaz aktivitesinin durdurulması için H_2O_2 ile inkübe edilmiş ve sitrat tamponu (pH=6.5) ile ısı kaynaklı antijen geri çağırma sağlanmıştır. Keçi serumu ile (Abcam, ABD) protein blokajı gerçekleştirilmiştir. Kesitler sırayla keçi anti fare SALL4 primer antikoru (1:200) ve HRP-keçi anti-tavşan IgG sekonder antikoru ile inkübe edilmiştir. Örnekler kromojen olarak DAB uygulanmıştır. Negatif kontrol olarak primer antikor uygulanmayan kesitler kullanılmıştır. Çekirdek boyaması için hematoksin kullanılmıştır. İmmün işaretli hücreler, analiz programı (LASv3 Leica, Almanya) ile ışık mikroskobu (Leica DM 6000 BM, Almanya) altında her gruptan seminifer tübülde değerlendirilmiştir (Şekil 3.7.).

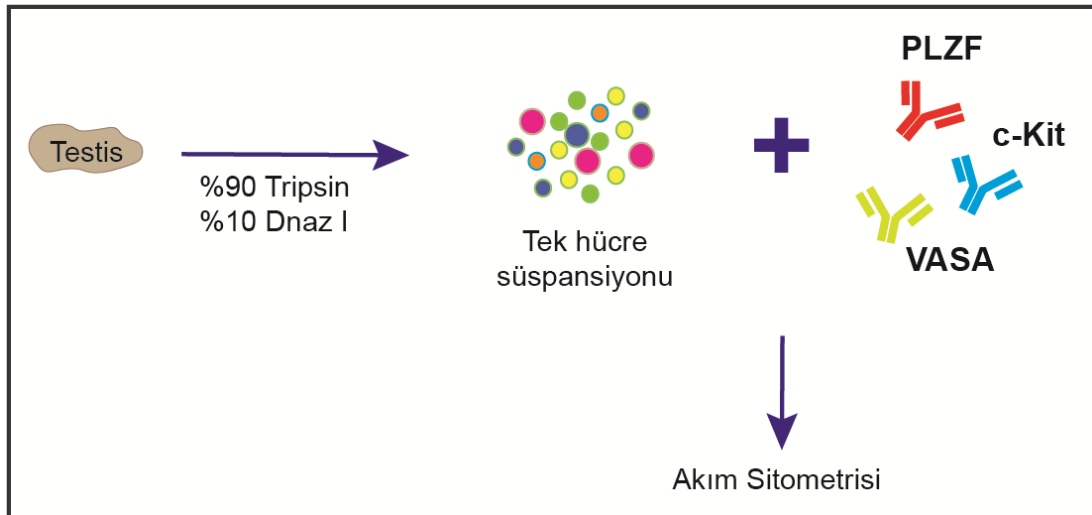


Şekil 3.7. Mikroakışkan ve AD sistemlerinde 7, 28 ve 42 günlük kültür sürelerini tamamlayan testis örneklerinin histokimyasal ve immün işaretleme işlem basamakları şematize edilmiştir.

3.3.3. Akım sitometrisi ile SKPH ve spermatojenik seri hücre miktarlarının belirlenmesi

Testisler, akım sitometrisinde ölçüm yapılabilmesi için tek hücre süspansiyonu haline getirilmiştir. Bu amaçla, MaS'ta ve ADlarda kültüre edilen testisler, 35 mm'lik petri kaplarına alınıp, HBSS solüsyonu içindeyken enjektör iğneleri yardımıyla parçalara ayrılmıştır. Parçalanan testisler, 0,5 ml 7 g/ml DNAz I ve 4,5 ml %25 Tripsin-EDTA solüsyonu içeren 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınmış, pipetaj işleminin ardından 37 °C'de 5 dk süreyle inkübe edilmiş, yeniden pipetaj yapıp aynı koşullarda 3 dakika daha inkübe edilmiştir. Ardından, enzimatik sindirimin durdurulması için 0,7 ml FBS

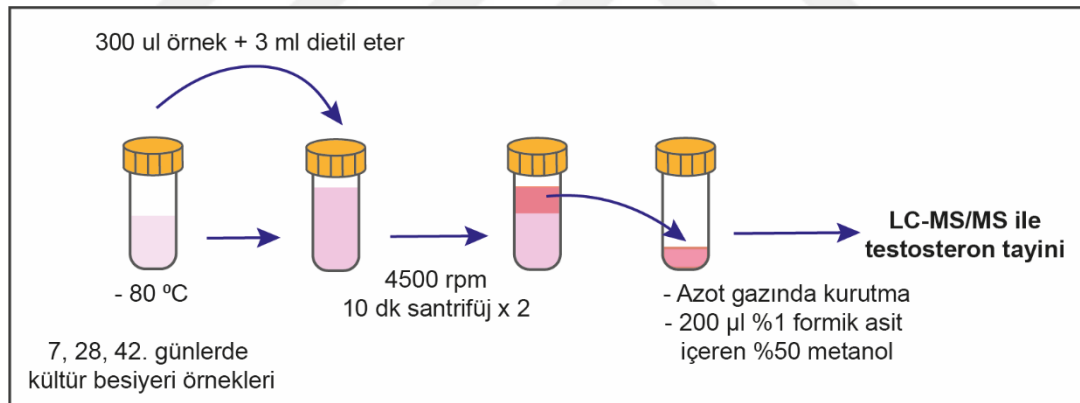
eklenmiş, 0,5 ml DNaz eklenip pipetaj yapılarak tek hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Hücreler 40 µm'lik filtreden geçirilip 15 ml'lik falkonlara alınıp 350xg'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılıp, hücre pelleti a-MEM besiyeri ile çözülmüş ve hücre sayımı yapılarak 2×10^5 hücre olarak tüplere bölünmüştür. PBN ile birlikte PE-anti fare PLZF (pozitif olması SKH belirteci) ve APC-anti fare CD117 (c-kit) antikorları (negatif olması SKH belirteci) (Biolegend, ABD) testiste SKH miktarının belirlenmesi amacıyla eklenmiştir (17). Diğer spermatojenik seri hücrelerinin miktarının belirlenmesi için aynı işlem, çeşitli düzeylerde farklılaşmış spermatojenik seri hücrelerine özgü antikorlarla sürdürülmüştür. Bunun için aynı örnekte tüm spermatojenik hücrelere özgü anti fare DDX (VASA) antikoruna ve PLZF ile işaretleme yapılarak PLZF işaretli SKH'lerin çıkarılması suretiyle diğer hücre popülasyonu hesaplanmaktadır. Ayrıca farklılaşmış spermatojenik hücrelere özgü APC-anti fare CD117 (c-Kit) ile işaretleme yapılmıştır (17, 76). Tüpler +4 °C'de ve karanlıkta 30 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında akım sitometrisi cihazında 10.000 olgu okutulmuş ve işaretlenmiş hücrelerin yüzey belirteçlerinin analizi yapılmıştır (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. Kùltür sonrası akım sitometrisi yöntemiyle farklı germ hücresi popülasyonu yüzdelерinin belirlenmesi yöntemi şematize edilmiştir.

3.3.4. MaS ve AD'den alınan besiyeri örneklerinde testosteron seviyesinin ölçülmesi

Testis mikro çevresinin fonksiyonel kapasitesinin değerlendirilmesi amacıyla, kültür süresi olan 7, 28 ve 42. günlerin sonunda, 24 saatte mikroakışkan sistemini terk eden besiyeri ve 24 saat AD kültürlerinde beklemiş olan besiyeri toplanmıştır. Literatüre uygun olarak cam tüplere 250 µL örnek (kullanılmış besiyeri) alınıp, üzerine 50 µL internal standart (11-deoksikortizol-D5) ve 3 ml dietil eter eklenmiştir (77). Karışım, 1900xg'de 10 dakika santrifüj edilip, üst faz temiz bir tüpe alınmış; üst fazı alınmış tüpe tekrar 3 ml dietil eter konularak, 2 dakika vortekslenip, 3600xg'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Bunun üst fazı da tekrar üst fazı alınan temiz tüpe ilave edilmiştir. Azot gazı altında uçurularak kurutulan tüplere %0,1' lik formik asit içeren %50'lik metanolden 200 µl ilave edilerek çözülmüş, 200 µl viallere enjekte edilmiş ve vialler örneklerdeki testosteron miktarının belirlenmesi için hizmet alımı yoluyla LC-MS cihazında analiz edilmiştir (Şekil 3.9.).



Şekil 3.9. LC/MS-MS ile besiyerinden testosteron ölçümüne ait yöntem şematize edilmektedir.

3.4. Verilerin değerlendirilmesi ve istatistiksel analiz

Karakterizasyon ve deney paketlerinden elde edilen veriler istatistiksel analiz için hazırlanmış ve analiz sonuçları raporlanmıştır. Buna bağlı olarak elde edilen sonuçlar değerlendirilmiş ve literatürle karşılaştırılarak tartışılmıştır. Verilerde istatistiksel olarak normal dağılımın varlığı Shapiro Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Bu teste göre, MKH karakterizasyonu için yapılan ORO ve kalsiyum ölçümlerinin

verileri normal dağılmadığından bağımlı ikili gruplarda parametrik olmayan test (Wilcoxon) ile değerlendirilmiştir. Seminifer tübül epiteli kalınlığı, lümen çapı ölçümleri; tübüllerde spermatogonyum, spermatosit, spermatid ve SALL4 immün işaretli hücre sayımları; PLZF, c-Kit ve VASA işaretli hücre yüzdelerinin değerlendirilmesi ve besiyerinden testosteron ölçümüne ait sonuçların Shapiro Wilk testi ile normal dağılım gösterdiği görülmüştür. Bu nedenle, ikili gruplar arasındaki farklılık bağımlı gruplarda t testi ile ve çoklu gruplar arasındaki farklılık tekrarlı ölçümlerde varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel analiz için %95 güven aralığında çalışılmıştır. Çalışmadan elde edilen tanımsal istatistikler parametrik ya da parametrik olmayan testlerin uygulanmasına göre sırasıyla ortalama değerleri $\pm$ SS ya da ortanca, minimum maksimum değer olarak sunulmuştur. Parametrik olmayan verilerin grafiği kutu grafiği ile gösterilirken, parametrik verilerin sonuçları veri dağılımını ve hata çubuklarını gösterecek biçimde bar grafikleri ile sunulmuştur. Analizler için SPSS 23.0 Bivariate Correlation A programı kullanılmıştır.

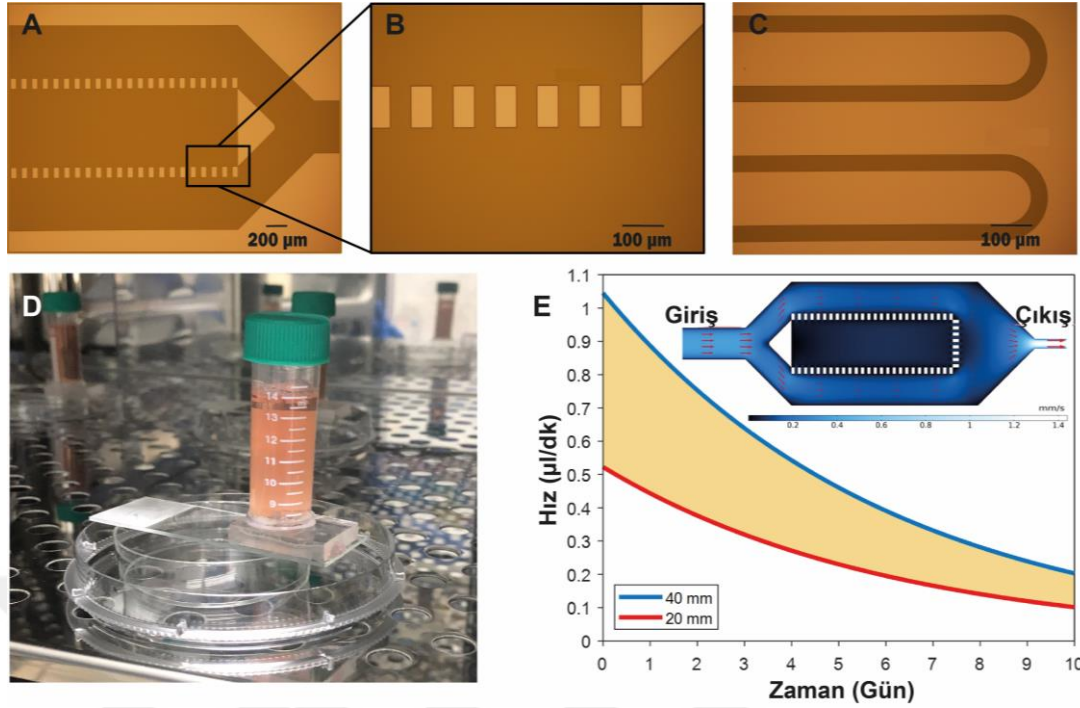
4. BULGULAR

4.1. MKH destekli pompasız MaS'ın tasarımı, üretimi ve validasyonu

Yapılan hesaplamalar ile tasarlanan cihazın kalıbı ve PDMS tabakasının üretimi sağlanmıştır (Şekil 4.1.A-D). Geliştirilen sistemin mikroskop altında yapılan ölçümlerinde organ haznesinin 170 μm yüksekliğe, 750 μm genişliğe, 291 μm çapa, 2,5 mm uzunluğa sahip olduğu tespit edilmiştir. Alınan bu ölçümler yapılan tasarım ile uyumludur. Besiyeri tankı 17,1 mm çapa, 72,3 m^2 kesit alanına sahiptir. Cihaz tasarıma uygun şekilde besiyeri tankındaki sıvı yüksekliğine bağlı olarak minimum 0,05 $\mu\text{L}/\text{dk}$, maksimum 2 $\mu\text{L}/\text{dk}$ pompasız akış hızı sağlamaktadır (Şekil 4.1.E). Bu akış hızını sağlayan direnç kanalı boyutlarının tasarıma uygunluğu valide edilmiştir. Direnç kanalı 670 μm çeper uzunluğuna, 159,4 μm çapa, 0,5 m uzunluğa, 170 μm yüksekliğe ve 150 μm genişliğe sahiptir.

4.1.1. Mikrokanallar optimum sıvı ve besin geçişini sağlamıştır

Mikroakışkan cihazının kanal boyutları tasarıma uygun olarak üretilmiştir (Şekil 4.1.D). Üretilen sistemin içinden besiyeri geçirildiğinde sıvının haznenin tamamına ulaştığı görülmüştür. Böylelikle, tasarlanıp üretimi yapılan mikroakışkan cihazının organ kültürü açısından uyumlu olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.1. MaS'ın üretimi ve validasyonu. Fotolitografiden sonra (A) organ haznesi, (B) difüzyon çeperleri ve (C) direnç kanallarının mikrografı ve (D) MKH eklentili MaS'ın üretim sonrası fotoğrafı verilmektedir. (E) Grafik (MATLAB R2018a), besiyeri tankındaki farklı sıvı yüksekliklerinde direnç kanallarındaki sıvı akış hızını göstermektedir (COMSOL Multiphysics v5.6).

4.1.2. Yeni MaS testis için optimum sıvı akış hızını sağlamıştır

Besiyeri ölçümleri ile yapılan değerlendirmede üretilen sistemin 76 mm besiyeri yüksekliğinde 1.8 $\mu\text{l}/\text{dk}$, 38 mm yüksekliğinde 0.8 $\mu\text{l}/\text{dk}$ ve 19 mm yüksekliğine 0.05 $\mu\text{l}/\text{dk}$ hızında sıvı akış hızı sağladığı görülmüştür. Bu akış hızı tasarım sırasında yapılan MATLAB ölçümleri ile uyum sağlamıştır. Mikroakışkan sistemi kanallarındaki sıvı akış hızında süreye bağlı dalgalanmaların çok olmaması adına gün aşırı besiyeri eklemesi yapılmıştır. Böylelikle yaklaşık olarak 0,9 $\mu\text{l}/\text{dk}$ pompasız sabit akış hızı elde edilmiştir (Tablo 4.1., Şekil 4.1.E).

Tablo 4.1. Yeni MaS'ta yapılan manuel ölçümlerde 76, 38 ve 19 mm besiyeri yüksekliğinde dakikada sistemi terk eden sıvı miktarı gösterilmektedir.

	<i>Belirlenen Zaman Aralığında Sistemi Terk Eden Sıvı Miktarı (μl)</i>			<i>Sistemi Terk Eden Toplam Sıvı Miktarı (μl)</i>		
<i>Zaman (dk)</i>	<i>76 mm</i>	<i>38 mm</i>	<i>19 mm</i>	<i>76 mm</i>	<i>38 mm</i>	<i>19 mm</i>
0-10	18,0	6,5	1,0	18,0	6,5	1,0
10-20	18,0	9,0		36,0	15,5	
20-30	18,0	8,0	1,1	54,0	23,5	2,1
30-40	18,0	8,0		72,0	31,5	
40-50	17,5	8,5	1,0	89,5	40,0	3,1
50-60	18,5	8,0		108,0	48,0	
60-70	18,0	8,0	1,1	126,0	56,0	4,2
70-80	18,5	9,0		144,5	65,0	
80-90	18,0	8,5	1,0	162,5	73,5	5,2
90-100	17,5	8,0		180,0	81,5	

4.2. Yeni doğan C57BL/6 fare MKH'lerinin karakterizasyonu; MAS ve AD'de MKH destekli testis kültürünün optimizasyonu

4.2.1. İzole edilen hücreler morfolojik olarak MKH özelliklerini taşımaktadır

Üçüncü pasajdaki hücreler MKH özelliklerine uygun olarak kültür kabına tutunma ve iğsi-poligonal şekle sahip olma özelliği göstermiştir (Şekil 4.2.A).

4.2.2. MKH'ler adipojenik yönde farklılaşma kapasitesi göstermiştir

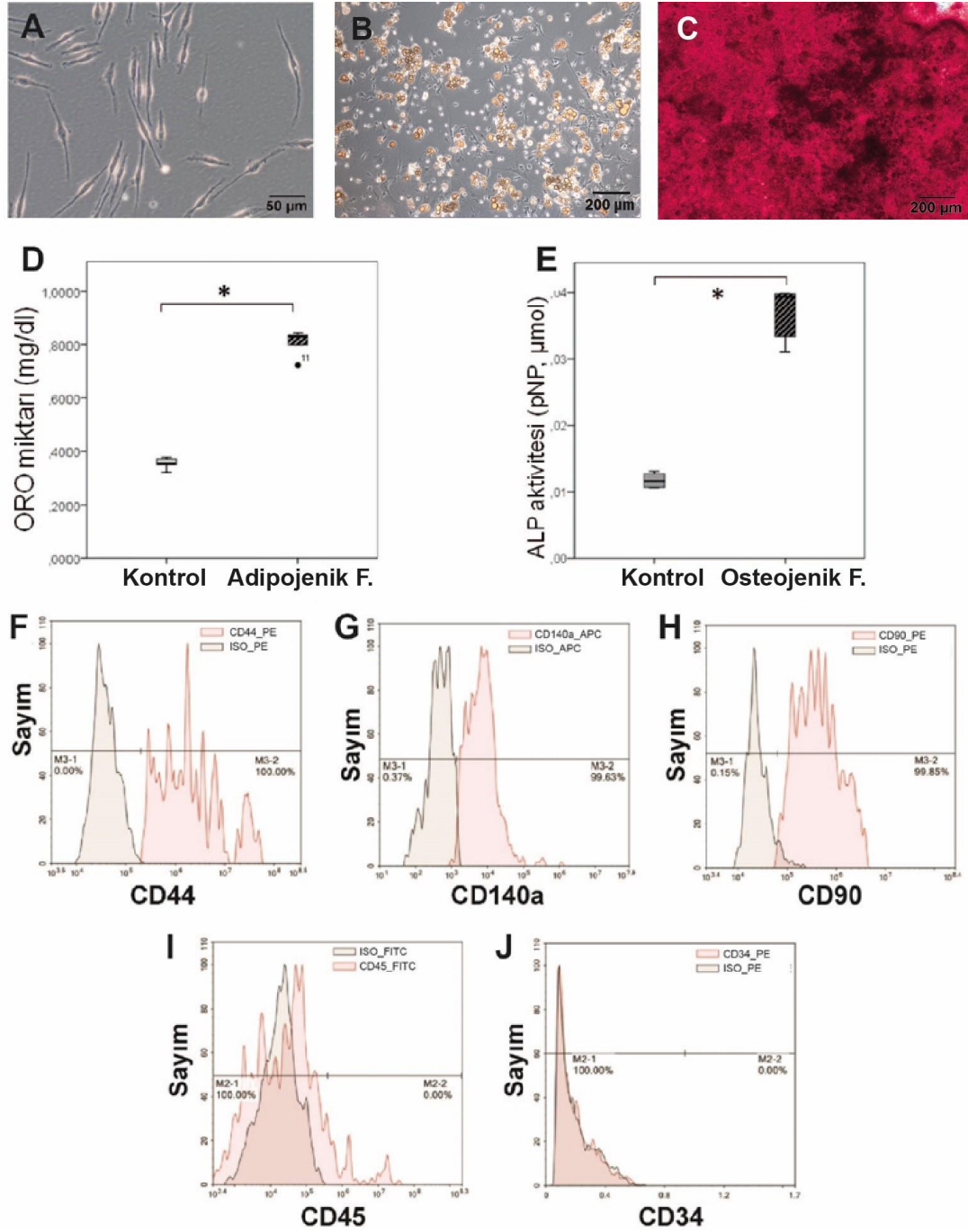
Adipojenik farklılaşma protokolü uygulanan MKH'lerde ORO ile boyanmış yağ damlacıkları saptanmıştır (Şekil 4.2.B). Spektrofotometrik ORO ölçümüne göre adipojenik yönde farklılaştırılan hücrelerin değerinin ($0,68 \pm 0,05$ mg/dl) kontrole ($0,24 \pm 0,03$ mg/dl) göre anlamlı şekilde fazla olduğu görülmüştür ($p < 0,05$, Şekil 4.2.D). Böylece, elde edilen MKH'lerin adipojenik farklılaşabilme potansiyeli gösterdiği görülmüştür.

4.2.3. MKH'ler osteojenik yönde farklılaşma kapasitesi göstermiştir

Osteojenik farklılaşma protokolü uygulanan ve ARS ile boyanan MKH'lerde kalsiyum kristali birikimi saptanmıştır (Şekil 4.2.C). Spektrofotometrik analize göre osteojenik farklılaşma kuyularındaki ALP miktarı kontrol grubuna anlamlı olarak yüksektir ($p<0.05$, Şekil 4.2.E).

4.2.4. MKH'ler spesifik yüzey belirteçlerini taşımaktadır

Hücrelerin MKH'lere spesifik CD44, CD140a ve CD90 belirteçlerini sırasıyla %100,00 (Şekil 4.2.F), %99,63 (Şekil 4.2.G) ve %99,85 (Şekil 4.2.H) oranında; hematopoietik belirteçler CD45 (Şekil 4.2.I) ve CD34'ü (Şekil 4.2.J) %0,00 oranında taşıdığı saptanmıştır.



Şekil 4.2. Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonu. (A) KİMKH'ler iğsi-poligonal şekil göstermektedir (x400). (B) Adipojenik ve (C) osteojenik farklılaşma analizinin kalitatif değerlendirme sonuçları verilmektedir (x200, ORO, ARS). (D) Adipojenik ve (E) osteojenik farklılaşma gruplarının spektrofotometrik analiz sonuçları görülmektedir (n=6, *p<0.05). Mezenkimal kök hücre yüzey belirteci analizi sonuçlarına göre (F) CD44 ile %100, (G) CD140a ile %99,63 ve (H) CD90 ile %99,85 oranında; HKH belirteçleri olan (I) CD34 ile %0,00 ve (J) CD45 ile %0,00 oranında işaretlenmiştir.

4.2.5. Bir spermatojenik siklus boyunca MAS ve AD'de MKH destekli testis kültürünün devamlılığı sağlandı

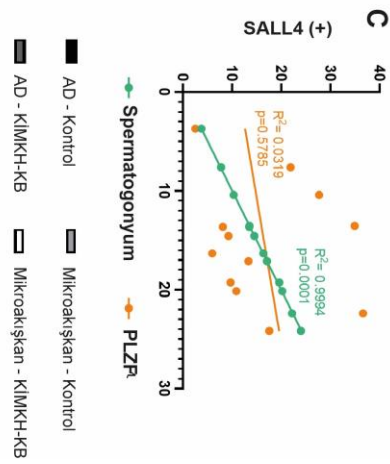
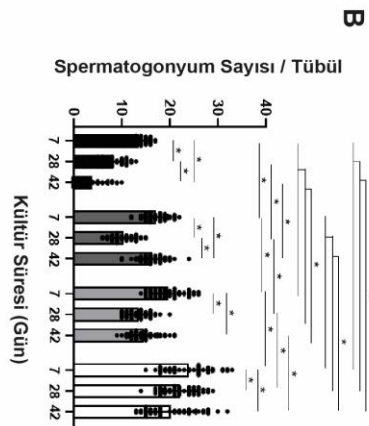
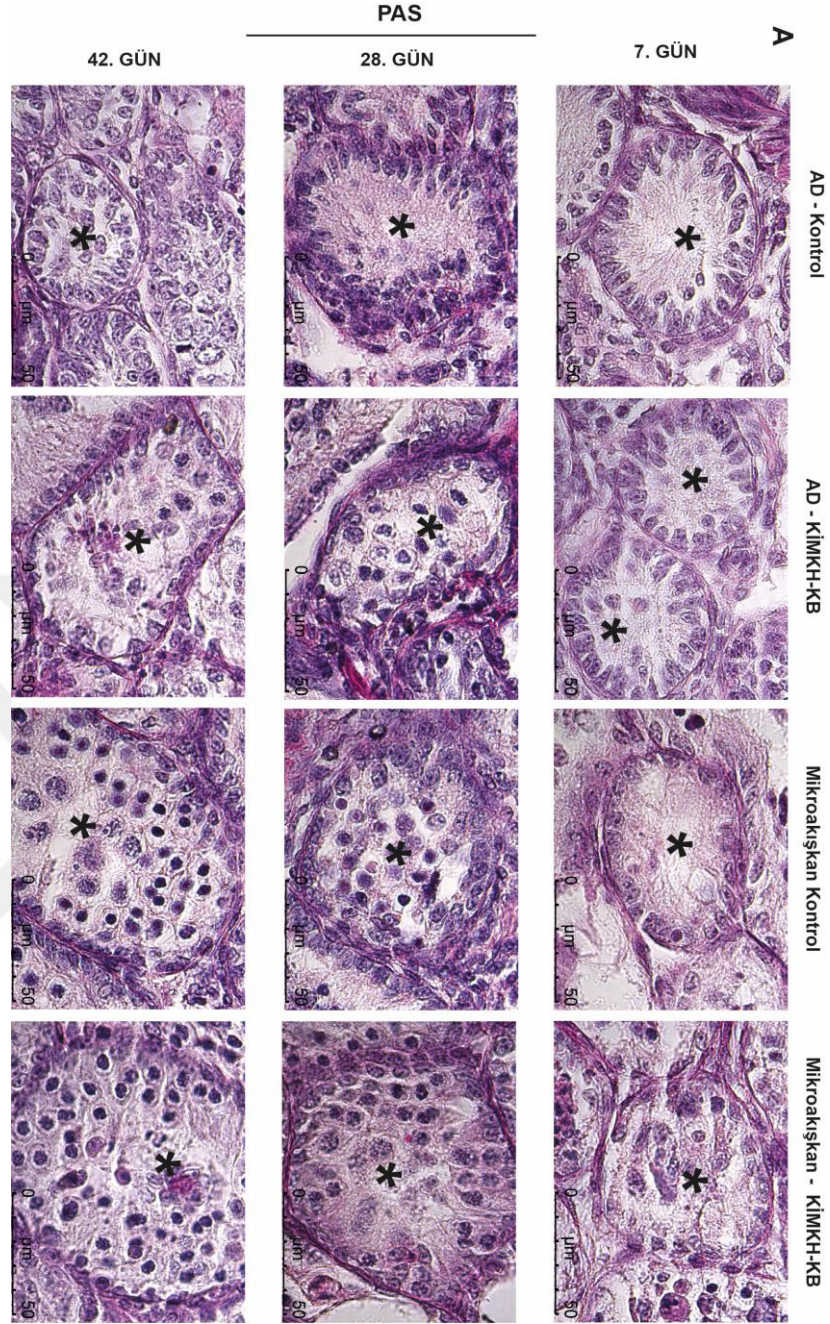
Geliştirilen pompasız tek PDMS kanallı ve hücrel tedavi ajanı eklentili MaS'a testislerin yüklenmesinin ardından yapılan izleme göre, sistem 42 gün süreyle akış hızını korumuş ve difüzyon aracılı organ beslenmesini desteklemiştir. AD platformuna yüklenen testislerin de her gün besiyeri değiştirilerek 42 gün süreyle organ beslenmesi desteklenmiştir. Kültür esnasında mikroskopta yapılan izlemlere göre MaS'ta kültüre edilen testis boyutlarının zamanla arttığı, AD'de kültüre edilen testislerin boyutlarında bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. MKH gruplarına alınan taze koşullu besiyeri düzenli olarak eklenmiş, böylece AD ve MaS platformlarında testis organ kültürü 1 spermatojenik siklus süresince devam ettirilmiştir.

4.3: MKH destekli AD ve MAS'ın SKPH havuzu, spermatogenez ve testis matürasyonuna etkisi

4.3.1 MAS ve MKH destekli MAS SALL4(+), PLZF(+) SKPH havuzunu 42. güne kadar genişletmiştir

7. ve 28. günlerde, KİMKH-KB kullanılan MaS ve ADda kültüre edilen testislerde spermatogonyum sayısı KİMKH-KB kullanılmayan kontrol gruplarına göre anlamlı şekilde fazladır ($p=0.001$, Şekil 4.3.). Koşullu besiyerinin kullanıldığı ve kullanılmadığı durumlarda MaS'ta kültüre edilen testislerdeki spermatogonyum sayısı AD grubundakilere göre sayıca fazladır ($p=0,001$). **Kırk ikinci günde,** KİMKH-KB kullanılan MaS'taki spermatogonyum sayısı KİMKH-KB kullanılmayan MaS'takine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde fazladır ($p=0,001$). Benzer şekilde, KİMKH-KB kullanılan AD sistemindeki testislerde spermatogonyum sayısı KİMKH-KB kullanılmayan AD grubuna göre anlamlı şekilde fazladır ($p=0,001$). Koşullu besiyerinin kullanıldığı ve kullanılmadığı durumlarda MaS'ta kültüre edilen testislerdeki spermatogonyum sayısı 42. günde AD grubundakilere göre sayıca fazladır ($p= 0,001$). Koşullu besiyeri kullanılmayan MaS ve kullanılan AD yöntemi gruplarında spermatogonyum sayısı 42. günde benzerlik göstermektedir (Şekil 4.3.A, B). **Kemik**

iliği kaynaklı MKH-KB kullanılan MaS'taki spermatogonyum sayısı, 7 ve 28. günler ve; 7 ve 42. günler arasında zaman içinde azalma göstermiştir ($p=0,001$). Bununla birlikte, 28 ve 42. günler arasında spermatogonyum sayısı bu grupta benzerlik göstermektedir (Şekil 4.3.). **Koşullu besiyeri kullanılmayan MaS'ta** 7 - 28 ve 7 - 42. günler karşılaştırıldığında spermatogonyum sayısında anlamlı şekilde azalma gözlenmiştir ($p=0,001$). Yirmi sekiz ve kırk ikinci günler arasında spermatogonyum sayısı benzerdir (Şekil 4.3.). **Koşullu besiyeri kullanılan AD kültür sisteminde** 7 ve 28. günler arasında spermatogonyum sayısında zamana bağlı azalma gözlenmiştir ($p=0,001$). Yirmi sekiz ve kırk ikinci günler arasında spermatogonyum sayısında artış meydana gelmiştir ($p=0.001$, Şekil 4.3.). **Koşullu besiyeri kullanılmayan AD kültür sisteminde**, 42 günlük kültür süresi boyunca istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmiştir ($p=0.001$, Şekil 4.3.).

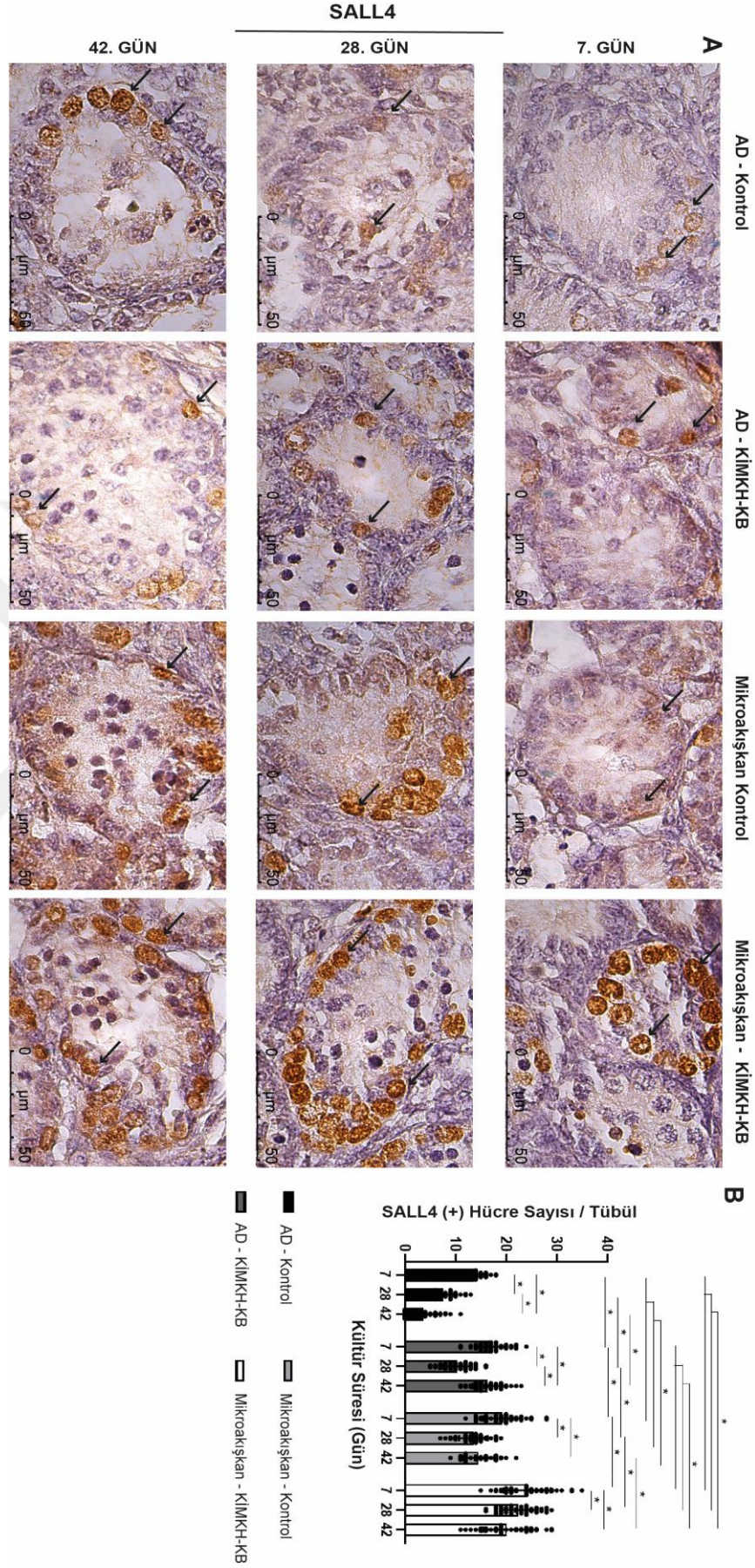


Şekil 4.3. Kültür sistemlerinin *in vitro* koşulda SKPH havuzuna etkilerinin değerlendirilmesi. (A) AD kontrol, AD KİMKH-KB, mikroakışkan kontrol ve mikroakışkan KİMKH-KB gruplarına ait 7, 28 ve 42. günlerde testis mikrografları görülmektedir (*= seminifer tübül, x1000, PAS, n=6, 50 tübül). (B) Spermatogonyum sayımı verilerine ait istatistik sonuçları ve (C) SALL4(+) SKPH sayımının spermatogonyum sayısı ($R^2=0.9994$, $p=0,001$) ve PLZF yüzdesi ($R^2= 0.0319$, $p=0,054$) ile korelasyonu gösterilmektedir (AD-Kontrol: MKH koşullu besiyeri kullanılmayan asılı damla, AD - KİMKH-KB: MKH koşullu besiyeri kullanılan asılı damla, Mikroakışkan – Kontrol: MKH koşullu besiyeri kullanılmayan mikroakışkan, Mikroakışkan – KİMKH-KB: MKH koşullu besiyeri kullanılan mikroakışkan).

Deney ve kontrol gruplarına ait parafin bloklardan elde edilen testis örneklerinde SALL4 ile işaretli SKH'ler seminifer tübüllerin bazal membranına yerleşik olarak değişen sayılarda izlenmiştir (Şekil 4.4.). Yapılan değerlendirmelere göre, **7. günde** MKH-KB kullanılan ve kullanılmayan mikroakışkan sistemlerindeki SALL4 işaretli SKH sayısı AD kültür sistemindeki kontrol gruplarına göre anlamlı şekilde yüksektir ($p=0,001$). Koşullu besiyeri kullanılan MaS'ta kullanılmayan sisteme göre SKH sayısı artış göstermiştir ($p=0,001$). Koşullu besiyeri kullanılan AD sisteminde SKH'ler kontrol grubuna göre sayıca yüksektir ($p=0.001$, Şekil 4.4.). **Yirmi sekizinci günde**, MKH-KB'nin kullanıldığı ve kullanılmadığı MaS gruplarındaki SKH sayısı AD gruplarındaki kontrollerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış göstermiştir ($p=0,001$). Mikroakışkan ve AD sistemlerinde MKH-KB kullanılan gruplarda SKH sayısı kullanılmayanlara göre anlamlı şekilde yüksektir ($p=0,001$). Koşullu besiyeri kullanılmayan MaS'taki SKH sayısı MKH-KB kullanılan AD grubundan daha yüksektir ($p=0,001$). **Kırk ikinci günde**, SKH sayısı mikroakışkan sistemlerde AD sistemlerindeki kontrollerine göre anlamlı artış göstermektedir ($p=0,001$). Koşullu besiyerinin kullanıldığı durumda MaS'ta ve AD sisteminde MKH-KB kullanılmayan kontrollerine göre SKH sayısı artmıştır ($p=0,001$). Koşullu besiyeri kullanılmayan MaS ve kullanılan AD sistemlerindeki testislerde SKH sayısı benzerlik göstermektedir (Şekil 4.4.). **Koşullu besiyeri kullanılan MaS'ta** SKH sayısı 7 ve 28. günler arasında azalma göstermiştir ($p=0,001$). Yirmi sekiz ve kırk ikinci günlerdeki SKH sayısı benzerlik göstermektedir. **Koşullu besiyeri kullanılmayan MaS'ta**, 7 ve 28. günler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlenirse de ($p=0,001$), 28. gün sonrasında SKH sayısı sabit kalmıştır. **Koşullu besiyeri kullanılan AD sisteminde**, 7 ve 28. günler ve 2 ve 42. günler arasında

anlamalı bir azalma tespit edilmiştir ($p=0,001$). Yirmi sekizinci gün ve kırk ikinci gün arasında SKH sayısında anlamalı bir artış vardır ($p=0,001$). **Koşullu besiyerinin kullanılmadığı AD grubunda**, kültür süresi boyunca SKH sayısında istatistiksel olarak anlamalı bir düşüş gözlenmiştir ($p=0.001$, Şekil 4.4.). Histomorfometrik yöntemlerle yapılan spermatogonyum sayımı ve immünohistokimyasal işaretleme ile yapılan SALL4 işaretli SKH sayımına ait veriler birbirleriyle yüksek korelasyona sahiptir ($R^2= 0.9994$, $p=0.001$, Şekil 4.3.C).





Şekil 4.4. Kültür sistemlerinin SKPH havuzuna etkisinin SALL4 immünohistokimyasal işaretleme yöntemiyle değerlendirilmesi. (A) AD kontrol, AD KİMKH-KB, mikroakışkan kontrol ve mikroakışkan KİMKH-KB gruplarına ait 7, 28 ve 42. günlerde testislerin SALL4 ile indirekt immün peroksidaz yöntemiyle işaretlenmelerini gösteren mikrograflar ve (B) immün işaretleme için istatistik sonuçları sunulmaktadır (*= $p<0.005$). Bazal membrana tutunmuş, DAB kromojeniyle sitoplazmaları kahverengi renkli SALL4 immün reaktivitesi gösteren SKH'ler okla işaretlenmiştir (x1000, n=6, 50 tübül, AD-Kontrol: MKH koşullu besiyeri kullanılmayan asılı damla, AD - KİMKH-KB: MKH koşullu besiyeri kullanılan asılı damla, Mikroakışkan – Kontrol: MKH koşullu besiyeri kullanılmayan mikroakışkan, Mikroakışkan – KİMKH-KB: MKH koşullu besiyeri kullanılan mikroakışkan).

Deney ve kontrol gruplarına ait testis örneklerinden elde edilen tek hücre süspansiyonunda PLZF işaretli SKH'ler akım sitometrisi yöntemi ile değişen yüzdelerde izlenmiştir (Şekil 4.5.). Yapılan değerlendirmelere göre, **7. günde** MKH-KB kullanılan ve kullanılmayan mikroakışkan sistemlerindeki PLZF işaretli SKH yüzdesi AD kültür sistemindeki kontrol gruplarına göre anlamlı şekilde yüksektir ($p=0,001$). Koşullu besiyeri kullanılan MaS'ta kullanılmayan sisteme göre SKH sayısı artış göstermiştir ($p=0,001$). Koşullu besiyeri kullanılan AD sisteminde SKH'ler kontrol grubuna göre sayıca yüksektir ($p=0.001$, Şekil 4.5.). **Yirmi sekizinci günde**, MKH-KB'nin kullanıldığı ve kullanılmadığı MaS gruplarındaki SKH yüzdesi AD gruplarındaki kontrollerine göre istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir ($p=0,001$). Koşullu besiyeri kullanılan ve kullanılmayan mikroakışkan sistemlerindeki SKH yüzdeleri benzerlik göstermektedir. AD sistemlerinde MKH-KB kullanılan gruplarda SKH sayısı kullanılmayana göre anlamlı artış göstermiştir ($p=0,001$). Koşullu besiyeri kullanılmayan MaS'taki SKH yüzdesi MKH-KB kullanılan AD grubundan daha yüksektir ($p=0,001$). **Kırk ikinci günde**, MKH-KB'nin kullanıldığı ve kullanılmadığı MaS gruplarındaki SKH yüzdesi AD gruplarındaki kontrollerine göre anlamlı artış göstermiştir ($p=0,001$). Koşullu besiyerinin kullanıldığı durumda AD sisteminde MKH-KB kullanılmayan kontrollerine göre SKH sayısı artmıştır ($p=0,001$). Koşullu besiyeri kullanılmayan MaS'taki SKH yüzdesi kullanılan AD sistemindekine göre artış göstermiştir ($p=0.001$, Şekil 4.5.). **Dört kültür sisteminde de** SKH yüzdesi 7 ve 28. günler arasında artış göstermiş ($p=0,001$), yirmi sekiz ve kırk ikinci günler arasında hücre yüzdesi düşmüştür ($p=0,001$). Yapılan değerlendirme

yöntemleri farklı olduğundan PLZF işaretli hücre yüzdesi ve SALL4 işaretli SKH sayısı verileri düşük düzeyde pozitif korelasyon göstermiştir (Şekil 4.5.C, $R^2=0.0319$, $p=0.5$).



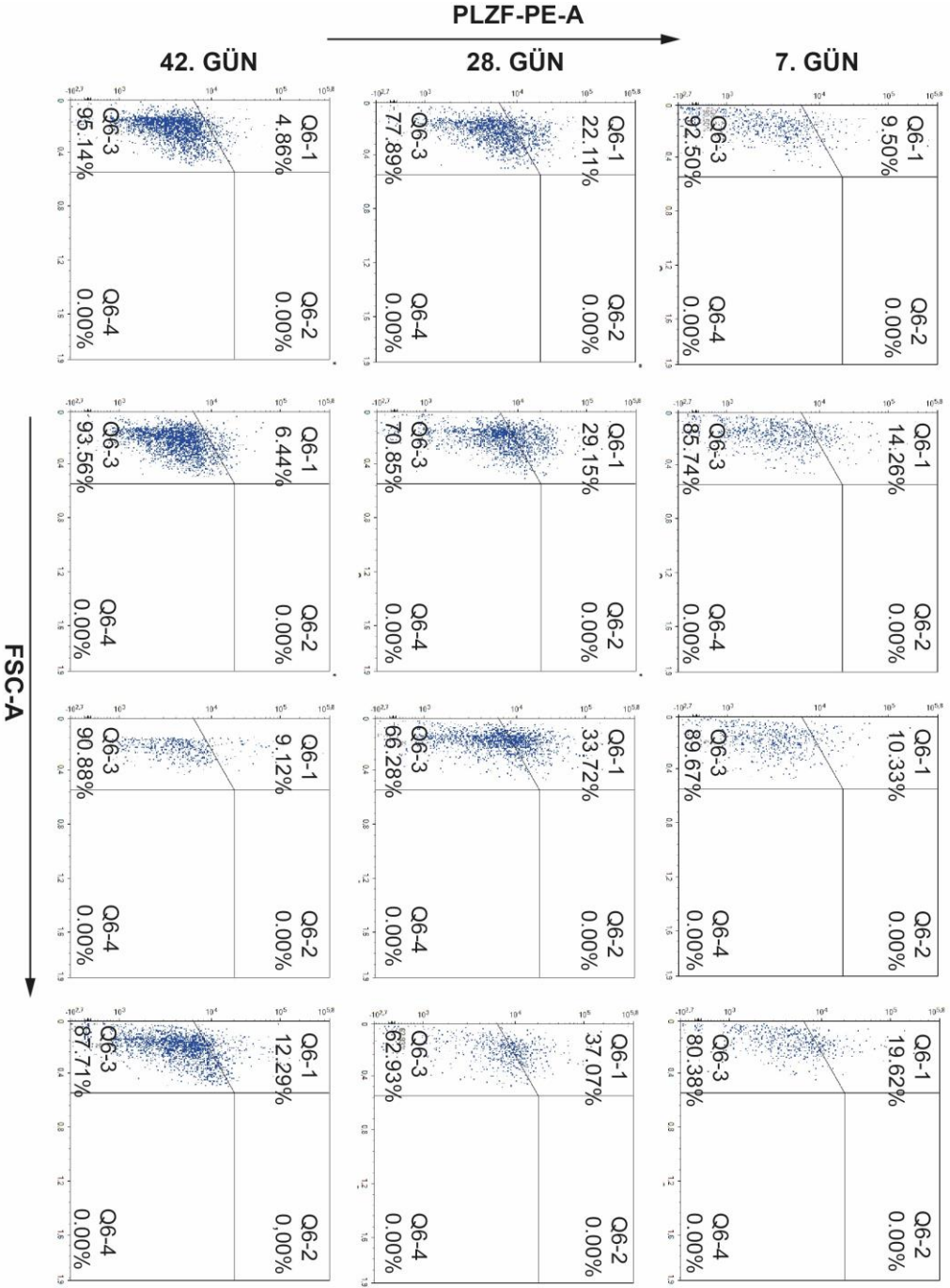
A

AD - Kontrol

AD - KIMKH-KB

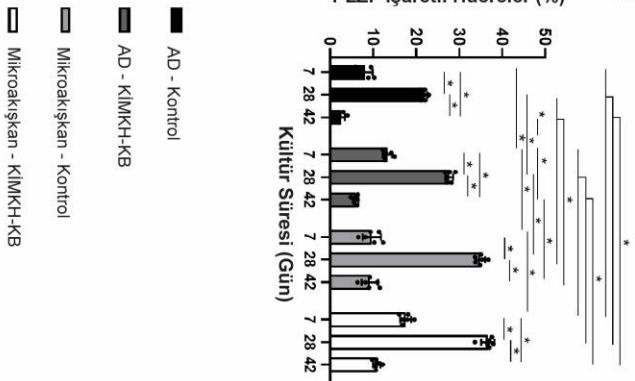
Mikroakışkan Kontrol

Mikroakışkan - KIMKH-KB



B

PLZF İşaretli Hücreler (%)

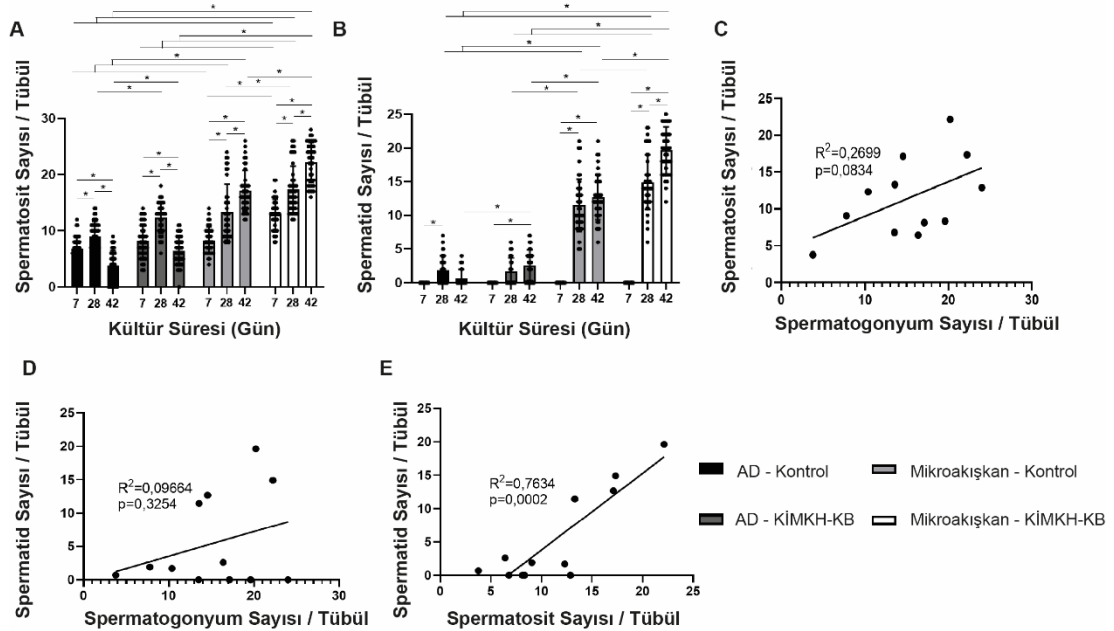


Şekil 4.5. Kültür sistemlerinin PLZF immün işaretli SKPH havuzuna etkisinin akım sitometrisi yöntemiyle değerlendirilmesi. (A) AD kontrol, AD KİMKH-KB, mikroakışkan kontrol ve mikroakışkan KİMKH-KB gruplarına ait 7, 28 ve 42. günlerde testislerdeki PLZF işaretli SKPH yüzdeleri gösteren akım sitometrisi sonuçları ve (B) immün işaretlemeye ait istatistik sonuçları sunulmaktadır (*= $p<0.005$, $n=6$, AD-Kontrol: MKH koşullu besiyeri kullanılmayan asılı damla, AD - KİMKH-KB: MKH koşullu besiyeri kullanılan asılı damla, Mikroakışkan – Kontrol: MKH koşullu besiyeri kullanılmayan mikroakışkan, Mikroakışkan – KİMKH-KB: MKH koşullu besiyeri kullanılan mikroakışkan).

4.3.2. MAS ve MKH destekli MAS *in vitro* spermatogenezi 42. güne kadar desteklemiştir

7. ve 28. günlerde, MKH-KB kullanılan mikroakışkan ve AD kültür sistemlerindeki testislerde spermatositlerin sayısı MKH-KB kullanılmayan kontrol gruplarına göre anlamlı şekilde fazladır (Şekil 4.6.A, $p=0,001$). Koşullu besiyerinin kullanıldığı ve kullanılmadığı durumlarda MaS'ta kültüre edilen testislerdeki spermatosit sayısı AD grubundaki kontrollerine göre sayıca fazladır ($p=0,001$). **Kırk ikinci günde,** MKH-KB kullanılan MaS'taki spermatosit sayısı MKH-KB kullanılmayan MaS'takine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde fazladır ($p=0,001$). Benzer şekilde, MKH-KB kullanılan AD sistemindeki testislerde spermatosit sayısı MKH-KB kullanılmayan AD grubuna göre anlamlı şekilde fazladır ($p=0,001$). Koşullu besiyerinin kullanıldığı ve kullanılmadığı durumlarda MaS'ta kültüre edilen testislerdeki spermatogonyum sayısı 42. günde AD grubundakilere göre sayıca fazladır ($p= 0,001$). Koşullu besiyeri kullanılmayan MaS ve kullanılan AD yöntemi gruplarında spermatosit sayısı 42. günde benzerlik göstermektedir (Şekil 4.6.A). **Kemik iliği kaynaklı MKH-KB kullanılan ve kullanılmayan mikroakışkan sistemlerindeki spermatosit sayısı,** 7 ve 28. günler ve; 7 ve 42. günler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde daimi bir artış göstermiştir ($p=0.001$). **Koşullu besiyeri kullanılan ve kullanılmayan AD kültür sistemlerinde** spermatosit sayısında 7 ve 28. günler arasında artış gözlenmiştir ($p=0,001$). Fakat, her iki AD grubunda da 28 ve 42. günler karşılaştırıldığında spermatosit sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmiştir ($p=0.001$, Şekil 4.6.A).

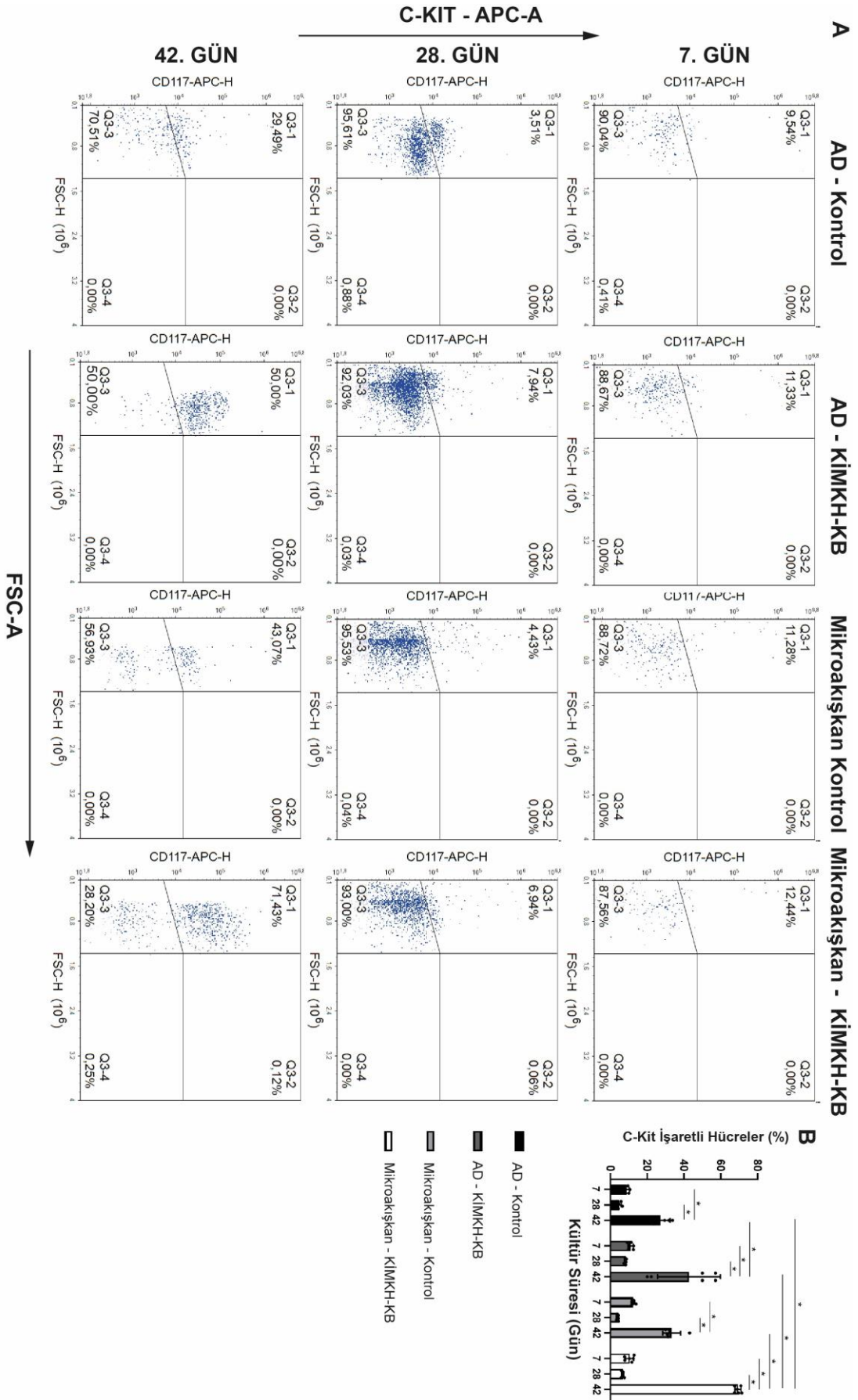
Yirmi sekizinci günde, MKH-KB kullanılan mikroakışkan sistemdeki spermatid sayısı MKH-KB kullanılmayan MaS'takilerden istatistiksel olarak anlamlı şekilde fazladır (Şekil 4.6.B, $p=0,001$). Koşullu besiyeri kullanılan ve kullanılmayan mikroakışkan sistemlerinde, AD kültür sistemindeki kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla sayıda spermatid gözlenmiştir ($p=0,001$). Koşullu besiyeri kullanılan ve kullanılmayan AD kültür sistemlerindeki spermatid sayısı 28. günde benzerlik göstermiştir. **Kırk ikinci günde**, MKH-KB kullanılan mikroakışkan ve AD kültür sistemlerindeki testislerde spermatid sayısı MKH-KB kullanılmayan kontrol gruplarına göre anlamlı şekilde fazladır ($p=0,001$). Koşullu besiyerinin kullanıldığı ve kullanılmadığı durumlarda MaS'ta kültüre edilen testislerdeki spermatid sayısı AD grubundaki kontrollerine göre sayıca fazladır ($p=0,001$, Şekil 4.6.B). Histokimyasal boyamalar ile yapılan spermatosit ve spermatogonyum (Şekil 4.6.E, $R^2=0,2699$, $p=0,0834$), spermatid ve spermatogonyum (Şekil 4.6.E, $R^2=0,09664$, $p=0,3254$), spermatid ve spermatosit (Şekil 4.6.E, $R^2=0,7634$, $p=0,00102$) sayımına ait veriler birbirleri ile pozitif korelasyon göstermiştir.



Şekil 4.6. Kültür sistemlerinin *in vitro* koşulda mayotik germ hücrelerine etkisinin değerlendirilmesi. (A) Spermatosit, (B) spermatid sayılarına ait istatistik sonuçları verilmektedir. (*= $p<0.05$, HE, $\times 1000$, $n=6$, 50 tübül). (C) Spermatosit ve spermatogonyum ($R^2=0,2699$, $p=0,0834$; (D) spermatid ve spermatogonyum

($R^2=0.09664$, $p=0.3254$) ve (E) spermatid ve spermatosit ($R^2=0.7634$, $p=0.0002$) sayımlarının birbirleriyle korelasyonları sunulmaktadır (AD-Kontrol: MKH koşullu besiyeri kullanılmayan asılı damla, AD - KİMKH-KB: MKH koşullu besiyeri kullanılan asılı damla, Mikroakışkan – Kontrol: MKH koşullu besiyeri kullanılmayan mikroakışkan, Mikroakışkan – KİMKH-KB: MKH koşullu besiyeri kullanılan mikroakışkan).

Deney ve kontrol gruplarına ait testis örneklerinden elde edilen tek hücre süspansiyonunda c-Kit işaretli spermatojenik seri hücreleri akım sitometrisi yöntemi ile değişen yüzdelerde izlenmiştir (Şekil 4.7.). Yapılan değerlendirmelere göre, **7 ve 28. günlerde** tüm gruplardaki c-Kit pozitif hücre yüzdesi benzerlik göstermiştir. **Kırk ikinci günde**, hücre yüzdesi MKH-KB kullanılan MaS'ta diğer üç gruba anlamlı artış göstermektedir ($p=0,001$). Koşullu besiyerinin kullanıldığı durumda MaS'ta ve AD sisteminde MKH-KB kullanılmayan kontrollerine göre c-Kit pozitif hücre yüzdesi artmıştır ($p=0.001$, Şekil 4.7.). Koşullu besiyeri kullanılmayan MaS ve kullanılan AD sistemlerindeki testislerdeki işaretli hücre yüzdesi benzerlik göstermektedir (Şekil 4.7.). **Koşullu besiyeri kullanılan ve kullanılmayan mikroakışkan sistemlerinde** işaretli hücre yüzdesi 7 ve 42; 28 ve 42. günler arasında artış göstermiştir ($p=0,001$). Yedinci ve 28. günlerdeki hücre yüzdesi benzerlik göstermektedir. **Koşullu besiyeri kullanılan ve kullanılmayan AD sistemlerinde**, 7 ve 42. günler ve 28 ve 42. günler arasında anlamlı artış tespit edilmiştir ($p=0,001$). Yedinci ve yirmi sekizinci gün arasında işaretli hücre yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir (Şekil 4.7.B).



Şekil 4.7. Kültür sistemlerinin c-Kit immün işaretli farklılaşmakta olan germ hücre havuzuna etkisinin akım sitometrisi yöntemiyle değerlendirilmesi. (A) AD kontrol, AD KİMKH-KB, mikroakışkan kontrol ve mikroakışkan KİMKH-KB gruplarına ait 7, 28 ve 42. günlerde testislerdeki c-Kit işaretli germ hücresi yüzdelerini gösteren akım sitometrisi sonuçları ve (B) immün işaretlemeye ait istatistik sonuçları sunulmaktadır (*= $p < 0.005$, $n=6$, AD-Kontrol: MKH koşullu besiyeri kullanılmayan asılı damla, AD - KİMKH-KB: MKH koşullu besiyeri kullanılan asılı damla, Mikroakışkan – Kontrol: MKH koşullu besiyeri kullanılmayan mikroakışkan, Mikroakışkan – KİMKH-KB: MKH koşullu besiyeri kullanılan mikroakışkan).

Deney ve kontrol gruplarına ait testis örneklerinden elde edilen tek hücre süspansiyonunda VASA işaretli germ hücreleri akım sitometrisi yöntemi ile değişen yüzdelerde izlenmiştir (Şekil 4.8.). Yapılan değerlendirmelere göre, **7. günde** MKH-KB kullanılmayan MaS'taki VASA işaretli germ hücresi AD kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksektir ($p=0,001$). Koşullu besiyeri kullanılan AD sisteminde SKH'ler kontrol grubuna göre sayıca fazladır ($p=0.001$, Şekil 4.8.). VASA işaretli hücre yüzdesi bakımından MaS grupları birbirleri ile benzerlik göstermiştir. **Yirmi sekizinci günde**, dört kültür sistemindeki germ hücresi sayısı birbirleri ile benzerlik göstermiştir. **Kırk ikinci günde**, germ hücresi sayısı MKH-KB kullanılan MaS'ta diğer üç gruba göre anlamlı artış göstermiştir ($p=0,001$). Koşullu besiyerinin kullanıldığı AD sistemi, MKH-KB kullanılmayan AD ve mikroakışkan sistemleri birbirleri ile benzerlik göstermektedir. (Şekil 4.8.). **Koşullu besiyeri kullanılan MaS'ta** germ hücresi sayısı 7 ile 28 ve 7 ile 42. günler arasında artış göstermiştir ($p=0,001$). Yirmi sekiz ve kırk ikinci günlerdeki SKH sayısı benzerlik göstermektedir. **Koşullu besiyeri kullanılmayan mikroakışkan ve AD ile koşullu besiyeri kullanılan AD sistemlerinde**, 7 ve 28. günler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenirse de ($p=0,001$), 28. gün sonrasında germ hücresi sayısında azalma meydana gelmiştir ($p=0.001$, Şekil 4.8.).

Şekil 4.8. Kültür sistemlerinin VASA immün işaretli total germ hücresi havuzuna etkisinin akım sitometrisi yöntemiyle değerlendirilmesi. (A) AD kontrol, AD KİMKH-KB, mikroakışkan kontrol ve mikroakışkan KİMKH-KB gruplarına ait 7, 28 ve 42. günlerde testislerdeki VASA işaretli germ hücresi yüzdeleri gösteren akım sitometrisi sonuçları ve (B) immün işaretlemeye ait istatistik sonuçları sunulmaktadır (*= $p < 0.005$, $n=6$, AD-Kontrol: MKH koşullu besiyeri kullanılmayan asılı damla, AD - KİMKH-KB: MKH koşullu besiyeri kullanılan asılı damla, Mikroakışkan – Kontrol: MKH koşullu besiyeri kullanılmayan mikroakışkan, Mikroakışkan – KİMKH-KB: MKH koşullu besiyeri kullanılan mikroakışkan).

4.3.3. MKH destekli MAS seminifer tübül epiteli kalınlığı, lümen çapı ve testosteron seviyesini 42. güne kadar arttırmıştır

Testiste Sertoli hücresi matürasyonu ve spermatogenezin ilerlemesi ile ilişkili olan tübül epitelinin kalınlığına ait ölçümlere göre, **7. günde** MKH-KB uygulanan ve uygulanmayan mikroakışkan sistemlerindeki testislerin tübül epiteli kalınlığının her iki AD kültür sistemine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.9.A, $p=0,001$). Yedinci gündeki tübül epiteli kalınlığı mikroakışkan sistemleri ve AD kültür sistemleri içinde benzerdir. **Yirmi sekizinci günde**, MaS'ta MKH-KB ile kültüre edilen testislerin tübül epiteli kalınlığının AD gruplarına göre anlamlı şekilde yüksek olduğu gözlenmiştir ($p=0,001$). Benzer şekilde, MKH-KB kullanılmayan MaS'taki testislerin tübül epiteli kalınlığı AD gruplarındakine göre yüksektir ($p=0,001$). Bu zaman diliminde, mikroakışkan ve AD kültür sistemlerinde grup içi farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.9.A). **Kırk ikinci günde**, MKH-KB kullanılan mikroakışkan sistemdeki tübül epiteli kalınlığı her iki AD grubuna göre anlamlı şekilde yüksektir ($p=0,001$). Koşullu besiyeri kullanılmayan MaS'ta tübül epiteli kalınlığı MKH-KB kullanılmayan AD grubuna göre anlamlı şekilde yüksekken ($p=0,001$), MKH-KB kullanılan AD grubu ile benzerdir. Kırk ikinci günde her iki MaS'taki testislerin tübül epiteli kalınlığı benzerlik göstermiştir (Şekil 4.9.A). **Koşullu besiyeri kullanılan ve kullanılmayan mikroakışkan sistemlerinde** kültüre edilen testislerin tübül epiteli kalınlığı 7-28. günler ve 7-42. günler arasında artış göstermiştir. Bu iki grupta tübül epiteli kalınlığında 28 ve 42. günler arasında artış görülse de, istatistiksel olarak

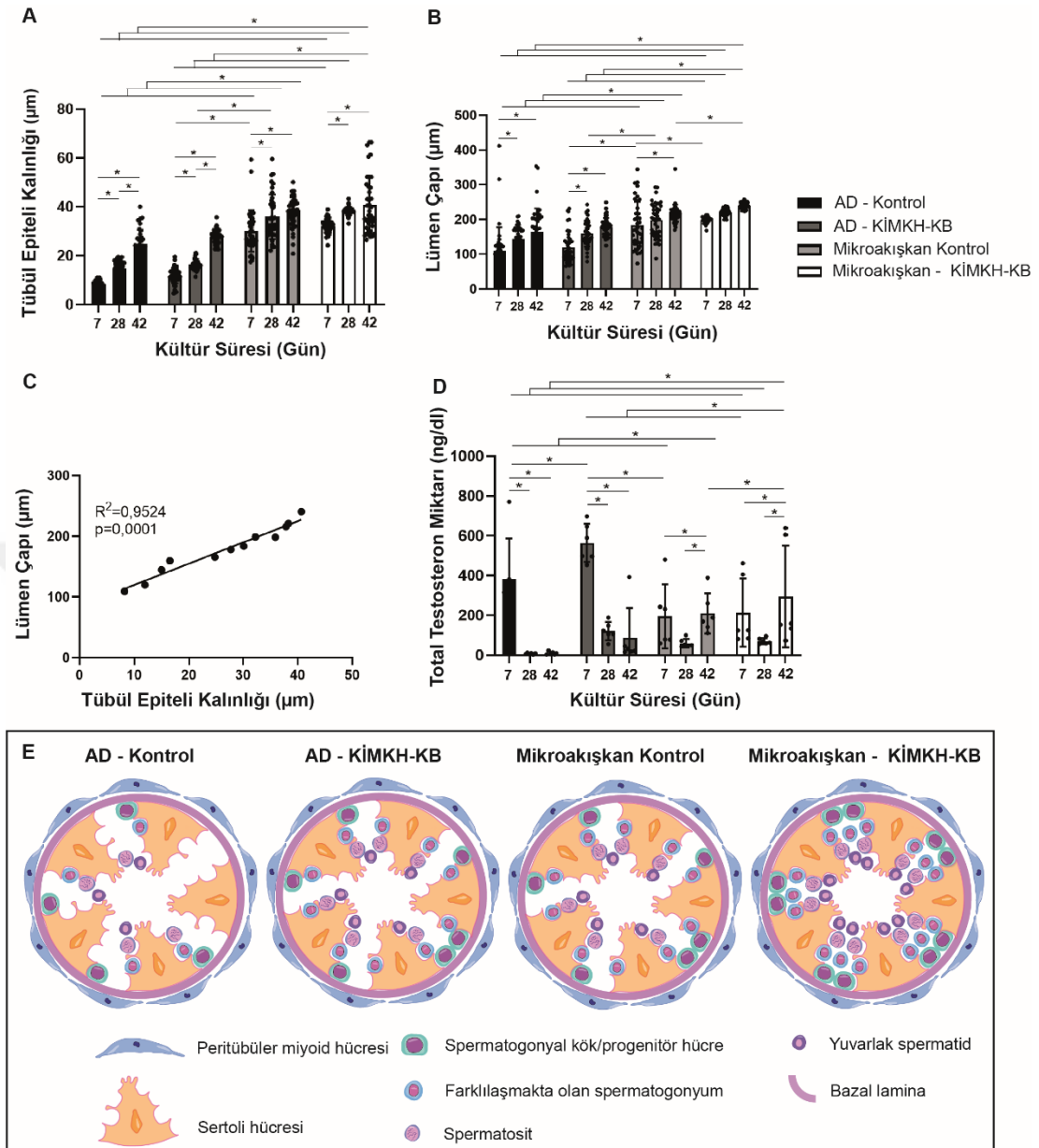
anlamli değildir (Şekil 4.9.A). Koşullu besiyeri kullanılan ve kullanılmayan AD sistemlerinde 42 gün boyunca zamana bağlı artış gözlenmiştir ($p=0.001$, Şekil 4.9.A).

İmmatür testis gelişimi sırasında Sertoli hücrelerinin matürasyonu ile ilişkili olan seminifer tübül lümeni çapına ait ölçümlere göre, **7. günde** MKH-KB kullanılan ve kullanılmayan mikroakışkan sistemlerinde AD grubundaki kontrollerine göre artış gözlenmiştir (Şekil 4.9.B, $p=0.001$). Koşullu besiyeri kullanılan MaS'taki testislerin lümen çapı koşullu besiyeri kullanılmayan mikroakışkandakilere göre anlamlı şekilde fazladır ($p=0.001$). Bu zaman diliminde AD gruplarındaki lümen çapları benzerlik göstermiştir (Şekil 4.9.B). **Yirmi sekizinci günde**, MKH-KB kullanılan ve kullanılmayan mikroakışkan sistemlerinde AD grubundaki kontrollerine göre artış gözlenmiştir ($p=0.001$). Mikroakışkan ve AD kültür sistemlerinde grup içi farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.9.B). **Kırk ikinci günde**, MKH-KB kullanılan MaS'taki testislerin lümen çapı diğer üç gruba göre anlamlı şekilde büyüktür ($p=0.001$). **Koşullu besiyeri kullanılmayan MaS'ta** kültüre edilen testislerde lümen çapı AD grubundaki kontrolüne göre büyükken ($p=0.001$), MKH-KB kullanılan AD grubu ile benzerdir (Şekil 4.9.B). **Koşullu besiyeri kullanılan MaS** grubunda lümen çapında zamana bağlı artış gözlenirse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 4.9.B). Koşullu besiyeri kullanılmayan MaS'ta 7 ve 42. günler arasında lümen çapında artış gözlenmektedir ($p=0.001$). Bu grupta, 7 ve 28, 28 ve 42. günlerdeki lümen çapı benzerdir. **Koşullu besiyeri kullanılan ve kullanılmayan AD sistemlerinde** kültüre edilen testislerde tübül lümeni çapı 7-28 ve 2-42. günler arasında artış göstermiştir (Şekil 4.9.B, $p=0.001$). Ancak, bu iki grupta 28 ve 42. günler arasında lümen çağı benzerlik göstermektedir. Seminifer tübül epiteli kalınlığı ve lümen çapına ait ölçümlerden elde edilen veriler birbirleriyle yüksek seviyede pozitif korelasyon göstermiştir (Şekil 4.9.C, $R^2= 0.9524$, $p=0.001$).

Mikroakışkan ve AD kültür sistemlerinde kontrol ve deney gruplarına ait testis kültür süpernatantlarında LC-MS tekniğiyle testislerden salınan testosteron seviyesi ng/dl cinsinden hesaplanarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.9.D). Buna göre, **7. günde**

MKH-KB kullanılan AD sistemindeki testosteron seviyesi MKH-KB kullanılan ve kullanılmayan MaS'takilere ve MKH-KB kullanılmayan AD sistemindekine göre anlamlı olarak yüksektir ($p=0,001$). Koşullu besiyeri kullanılan ve kullanılmayan mikroakışkan sistemlerindeki testosteron konsantrasyonları benzerlik göstermektedir. **Yirmi sekizinci günde**, MKH-KB'nin kullanıldığı MaS ve AD gruplarında testosteron seviyeleri benzerdir. Yirmi sekizinci günde MKH-KB kullanılan AD sistemi, kullanılmayan mikroakışkan ve AD sistemleri arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir (Şekil 4.9.D). **Kırk ikinci günde**, MKH-KB kullanılan MaS'ın testosteron konsantrasyonu diğer üç gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış göstermiştir ($p=0,001$). Koşullu besiyeri kullanılan MaS'taki testosteron konsantrasyonu kullanılmayan MaS'a göre anlamlı şekilde yüksektir ($p=0,001$). Koşullu besiyeri kullanılan ve kullanılmayan AD'lerin testosteron miktarı benzerlik göstermektedir. Koşullu besiyeri kullanılan MaS'ın testosteron seviyesi MKH-KB kullanılan AD'ye göre anlamlı şekilde yüksektir ($p=0,001$). Koşullu besiyeri kullanılmayan MaS'ta testosteron seviyesi MKH-KB kullanılmayan AD ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde yüksektir ($p=0,001$).

Kırk iki günlük kültür süresince AD kontrol, AD - MKH-KB, mikroakışkan kontrol ve mikroakışkan - MKH-KB gruplarında seminifer tübüllerdeki germ hücresi popülasyonundaki değişimler Şekil 4.9. E'de gösterilmektedir.



Şekil 4.9. KIMKH destekli MaS'ın yapısal ve fonksiyonel testis matürasyonuna etkisi. (A) Tübül epiteli kalınlığı ve (B) lümen çapı, (D) total testosteron miktarı ölçümlerine ait istatistik sonuçları verilmektedir (PAS, x400, n=6). (C) Lümen çapı ve tübül epiteli kalınlığı ölçümlerinin korelasyonu verilmektedir ($R^2= 0,9524$, $p=0,001$). (E) Kültür sonrası kültür sistemlerindeki seminifer tübülleriindeki germ hücresi popülasyonu sunulmaktadır (AD-Kontrol: MKH koşullu besiyeri kullanılmayan asılı damla, AD - KIMKH-KB: MKH koşullu besiyeri kullanılan asılı damla, Mikroakışkan - Kontrol: MKH koşullu besiyeri kullanılmayan mikroakışkan, Mikroakışkan - KIMKH-KB: MKH koşullu besiyeri kullanılan mikroakışkan).

5. TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında, pompasız, tek PDMS tabakalı yeni bir MaS özgün olarak tasarlanmış, optimize edilerek deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere seri üretim yapılmış, allojenik MKH'lerin salgısal rejeneratif potansiyeli ile desteklenen sistemin, prepubertal C57BL/6 fare testisinde SKPH havuzunun genişlemesi, *in vitro* spermatogenezin ilerletilmesi ve testis matürasyonunu 42 günlük kültür süresi boyunca AD kültür sistemine göre ileri şekilde desteklediği gösterilmiştir. Tez çalışmasından elde edilen tüm veriler, aşağıda araştırma hedeflerine ait başlıklar altında sırasıyla tartışılmaktadır.

İlk araştırma hedefi kapsamında testis organ kültürü için MKH'lerin salgısal desteğini kullanan pompasız, tek PDMS tabakalı yeni MaS'ın tasarımı, üretimi ve optimizasyonunu sağlamıştır.

Bu araştırma hedefi kapsamında ilk kez pompasız şekilde testis kültürü için optimum olan 0,5-1,0 µl/dk hız aralığında sıvı akışı sağlayabilme ve tek kat PDMS tabakası ile mikroskop görüntülemeleri esnasında yüksek kalitede görüntü sunabilme özelliklerini bir arada bulunduran, testis organ kültürüne yönelik MaS tasarlanmış, üretilmiş; elde edilen mikroyapının sıvı geçişine uyumluluğu ve besiyeri akış hızının test edilmesi ile validasyonu sağlanmıştır. Geliştirilen MaS ile TÜBİTAK'ın onayı alınarak 8 Mart 2021 tarihinde Türk Patent Ofisi'ne 2021/004441 sayılı patent başvurusu yapılmıştır.

Tez kapsamında geliştirilen yeni mikroakışkan sistemi, biyouyumlu tek PDMS katmanı ile mikroskop altında yüksek kaliteli görüş, dirençli kanallardan kaynaklanan hidrostatik basınç yoluyla 0,5-1,0 µl/dk arasında pompasız optimum akış hızı ve ek metabolik faktörler yoluyla spermatogenezin arttırılması için hücresel tedavi katkısı sunma özelliklerine sahiptir. Üretilen MaS'ta bulunan rezervuardaki besiyeri yüksekliği gün aşırı ekleme yapılması ile 38 mm'ye tamamlanmış, böylelikle sıvı akış hızı yaklaşık 0.9 µl/dk'ya sabitlenmiştir. Sınırlı sayıda çalışmada mikroakışkan fare

testis kültür platformları geliştirilmiş, tasarım ve özellikleri değişiklik gösteren bu cihazlar, *in vitro* spermatogenez açısından farklı derecelerde performans göstermiştir (6, 7, 37). Komeya'nın araştırma ekibi, harici bir şırınga pompasıyla 0,05 µl/dk akış hızında tek (37) ve çift (6) PDMS-katmanlı mikroakışkan sistemlerini üretmiş; bu cihazlar şırınga pompasının neonatal fare testisine yeterli besin ve oksijen sağlama kapasitesi açısından olumsuz etki göstermiştir. Aynı grup, cihazı 0,05-2,0 µl/dk arasında bir akış hızına izin veren iki PDMS tabakalı pompasız formata modifiye etmiş, ancak yeni sistem tek PDMS tabakalı sisteme göre mikroskop altında görüntüleme açısından daha düşük bir çözünürlük performansı sergilemiştir (7). Farklı bir grup tarafından benzer bir çift katmanlı MaS ile erişkin fare testisi kültürü için pompasız bir akış sağlanmıştır (akış hızı ile ilgili sayısal veri bulunmamaktadır) (78). Bu tez çalışmasında, literatürdeki pompasız sistemle (7) uyumlu olarak 0,5–1,0 µl/dk arasında optimum bir akış hızı aralığı elde edilmiştir. Pompasız yapısı ile oksijen ve metabolit desteğine optimum erişim sunan tek PDMS tabakalı yeni bir pompasız bir mikroakışkan yenidoğan testis organ kültürü sistemi geliştirilmiştir. MaS'ın organ haznesi, 750 µm x 2,5 mm x 150 µm (en x boy x yükseklik) boyutlarında ve her biri 500 µm genişliğinde olan perfüzyon bölmeleri ile iki taraflı olarak çevrelenecek şekilde tasarlanmıştır. Organ haznesini çevreleyen küçük ve birbirine paralel çit benzeri sütunlar ile organın hazneye sabitlenmesi sağlanmıştır. Elde edilen MaS'ın organ haznesinin boyutu ve konfigürasyonu, difüzyon etkinliğini artırmak amacı ile azaltılan genişlik açısından Yamanaka ve arkadaşlarının sistemi ile uyumludur (37). Çift rezervuardan kaynaklanan geri akış probleminin üstesinden gelmek amacı ile bu tez çalışması kapsamında Yamanaka grubunun sisteminden farklı olarak tek bir rezervuar ile optimum akış aralığı elde edilmesi yoluna gidilmiştir. Böylelikle, kültür esnasında mikroskop altında yüksek kalitede görüntü alma ve allojenik MKH'lerin salgısal desteği için özel eklentisi ile kişiselleştirilmiş hücresel tedavi olanağı sunan, pompa kullanımının ortadan kaldırılması ile fizyolojik koşulların tam simülasyonunu sağlayan yeni bir MaS geliştirilmiş, orijinal cihaz ulusal ve uluslararası patent başvuruları ile fikri ürün koruması altına alınmıştır.

İkinci araştırma hedefi kapsamında MKH destekli pompasız, tek PDMS tabakalı MaS'ın 42 gün süreyle SALL4 ve PLZF(+) SKPH havuzunu genişlettiği, spermatogonyumları sayıca arttırdığı saptanmıştır.

Sinjenik MKH'lerin hava sıvı interfaz kültür sisteminde yenidoğan fare testisleriyle kokültürü ile SKH havuzunun genişletildiği ve *in vitro* spermatogenezin başlatılarak yuvarlak spermatid aşamasına kadar tamamlanması üzerindeki destekleyici kapasitesi önceki çalışmamızda gösterilmiştir (Selin Önen - Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Bilimleri Yüksek Lisans Tezi) (12). Ancak, statik kültür platformunun etkinliğinin mikrovasküler akışın olmaması ve besiyerinin organa yetersiz difüzyonu nedeniyle sınırlı olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, bu tez çalışmasında hücreler için özel bir eklentiye sahip yeni bir pompasız, tek PDMS katmanlı MaS geliştirmiş ve AD sistemi ile karşılaştırılarak SPKH havuzunun genişletilmesi üzerindeki etkinliği valide edilmiştir. MaS'ın MKH salgılarıyla desteklenmesi ile PLZF ve SALL4(+) SKPH sayısının 42 gün boyunca arttığı gösterilmiştir. PLZF ve SALL4, farelerde SKPH havuzunun sürdürülmesinden sorumlu temel transkripsiyon faktörleridir ve Asingle, Apaired ve Aaligned spermatogonyumların spesifik belirteçleri olarak kullanılmaktadır (79).

Tez kapsamında geliştirilen özgün MKH destekli MaS, önceki hava sıvı interfaz sistemine (12) kıyasla MKH-KB kullanılan ve kullanılmayan durumlarda 7 ve 28. günlerde tübül başına SALL4(+) SKPH sayısında sırasıyla 3,3 ve 9 kat; PLZF(+) hücre yüzdesinde 1.5 ve 3 kat artış sağlamıştır. MKH salgıları ile desteklenen AD platformu kontrol grubuna göre 28. ve 42. günlerde PLZF(+) hücre yüzdesinde 1.5 ve 3 kat; 7-42. günler arasında SALL4(+) SKPH sayısında 1.5 kat artış sağlamıştır. Bu verilerden yola çıkarak, MKH salgılarının desteğiyle AD sisteminin, 7. günde PLZF işaretli SKPH oranı ve 42. günde SALL4 işaretli SKPH sayısı bakımından mikroakışkanın MKH ile desteklenmediği durumdaki performansını yakaladığı tespit edilmiştir. Bu durum, AD kültür sisteminde yetersiz difüzyon ve besiyeri ortamına direkt maruziyetten kaynaklanan statik koşul yetersizliğinin mezenkimal parakrin faktörlerin eklenmesiyle giderilebileceği şeklinde yorumlanmıştır. Bu nedenle, MKH salgısı ile desteklenen AD

testis kültür sistemi, verimliliği mezenkimal desteği verilmeyen mikroakışkan sistemine paralel olduğundan, tercih edilebilir bir statik kültür platformu olarak düşünülebilir. Diğer yandan, MKH kullanımı ile MaS'ın hava sızı interfaz ve AD kültür sistemleri ile kıyaslandığında SALL4 ve PLZF işaretli spermatogonium havuzu genişletilmesi açısından en iyi performansı gösterdiği görülmüştür.

Tez çalışmasında prepubertal testislerde MKH salgısı aracılığı ile *in vitro* SKPH havuzu indüksiyonu ile ilgili elde edilen bulgular orijinaldir ve allojenik multipotent somatik stromal hücrelerin karmaşık 3 boyutlu gonadal niş üzerindeki germ hücre mikroçevresinde destekleyici rolünü ortaya koymuştur. Bu bulgular, literatürdeki yetişkin infertil sıçan (52) ve hamster (80) modellerindeki intratestiküler allojenik MKH enjeksiyonu ile germ hücresi restorasyonunu raporlayan önceki *in vivo* çalışmalarla uyumluluk sağlamaktadır.

Tez çalışmasından elde edilen tek katmanlı pompasız MaS PLZF(+) SKPH'lerde 7, 28 ve 42. günlerde yaklaşık %20, %40 ve %12 oranlarını sağlayarak 7-42 günleri arası AD kültür sistemine göre 1,5 kat artış sağlamıştır. Ayrıca, MaS ile 7, 28 ve 42. günlerde $25,3 \pm 2,4$; $22,3 \pm 2,2$ ve $20,72 \pm 1,2$ sayılarında SALL4(+) SKPH elde edilmiş ve MaS'taki SPKH sayısı bu zaman dilimlerinde AD kültür koşuluna göre 1,5 kat artış göstermiştir. PMMA/PDMS çift katmanlı pompasız MaS'ta deselülerize testis örneklerine ekilen neonatal fare SKH'leri 28 gün süreyle kültüre edilmiş, kültür süresi sonunda tübüllerde %40 oranında PLZF immün işaretli spermatogonyum varlığı gösterilmiştir. Tez çalışmasında akım sitometrisi yöntemiyle 28 günlük örneklerde elde edilen PLZF(+) SKPH bulguları önceki çalışma ile uyumludur. Başka bir çift PDMS tabakalı pompasız mikroakışkan sistemi, 56. günde tübül başına GFRa1(+) farklılaşmamış spermatogonia sayısını yaklaşık 2 ve tübül başına GFRa1(+)/EdU(+) proliferatif SKH sayısını mikroakışkan ve AD platformlarında sırasıyla 1,5 ve 1,2 olarak göstermiştir (6). Komeya vd., farelerde doğum sonrası 0-5 gün aralığında elde edilen testis örneklerinde 56 günlük kültür süresi sonunda SKH'leri değerlendirmiş, zaman noktasını bildirmemiştir. Bu nedenle her iki çalışmaya ait AD ve MaS performansına dayalı SKPH sayısı geçerli olarak karşılaştırılabilir değildir. Buna ek olarak, Komeya

vd.'nin SKH belirteci olarak kullandığı GFRa1, sadece *Asingle*, *Apaired* ve A_{al4} spermatogonyumlara spesifik olup (81), SKPH havuzuna ait A_{al16} spermatogonyumları işaretlememektedir. Bu tez çalışmasında kullanılan SALL4, *Asingle* spermatogonyumdan A_{al16} spermatogonyumlara kadar hem kök hem de progenitör hücre popülasyonuna spesifik olduğundan tüm SKPH havuzunu kapsayıcı bir belirteçtir (82). Buna göre, SALL4(+) SKPH'lerin sayısı beklenen şekilde GFRa1(+) SKH'lere göre daha yüksektir ve tez çalışmasının 42 günlük en uzun kültür süresi diğer çalışmadaki 56. günlük takipten daha geridedir. Sonuç olarak zaman noktasının belirsizliğinin yanı sıra, SKPH havuzunun kapsamı ve takip süresinin farklılığı da eklendiğinde Komeya vd.'nin kültür platformu ile bu tez çalışmasındaki platform birbirinden oldukça farklıdır. Bu durum çıktıların karşılaştırılmasının geçerliliğini sınırlamaktadır. Diğer yandan, Komeya ve Yamanaka'nın sistemleri ile bu tez çalışmasındaki MaS birlikte ele alındığında, her üç tasarımda da pompasız platformların *in vitro* SKH/SKPH havuzu üzerindeki olumlu performansı doğrulanmaktadır. Bu tez çalışması ilk kez, otolog veya allojenik kişiselleştirilmiş hücrel tedavi ajanı olarak MKH'lerin MaS desteğinde bir siklus süresince spermatogonyum havuzunu genişletme performansını ortaya koymaktadır.

Tez çalışması **AD kültür platformunda** yenidoğan fare testislerinin SKPH havuzundaki genişlemenin 28 gün ile sınırlı olduğu ve 42 günlük tam bir spermatogenik siklusu destekleyemediğini ortaya koymuştur. AD kültür sistemi MaS'a göre daha sınırlı bir performansla 7. günden 28. güne kadar SKPH havuzunun kademeli olarak genişletilmesini sağlayabilmiştir. Önceki çalışmalardaki AD sistemleri, dondurulup çözölmüş erişkin keçi testislerinde spermatogonyal hücreler ve Sertoli hücrelerinin devamlılığını (83); 7-12 haftalık insan fetal testislerinde OCT4(+), Ki67(+) ve AP2-gamma(+) proliferatif spermatogonial progenitör hücrelerinin sayıca artışı (84); yetişkin insan sağlıklı ve kanserli testis örneklerinde (72) 14. güne kadar cCaspase3(+) apoptotik hücrelerde artış olmadan Ki67 ve BrdU(+) proliferatif germ hücrelerinin devamlılığını sağlamıştır. Bu tez çalışmasının AD sisteminde testis kültürü kapsamındaki 7 ve 28. günlere ait SKPH miktarı ile ilgili sonuçları, farklı belirteçlerle işaretlenen mitotik germ hücrelerindeki artış açısından bu çalışmalarla paralellik

göstermektedir. Tez çalışmasında kullanılan AD sistemi, yenidoğan fare testisindeki PLZF(+) hücre yüzdesini ve SALL4(+) hücre sayısını önceki çalışmadaki hava sıvı interfaz platformuna göre 7. günden 42. güne kadar 2 kat iyileştirmiştir (12). AD kültür sisteminin 42 günlük kültür süresinde SKPH devamlılığı açısından hava sıvı interfaz sisteminden daha iyi bir performans göstermesinin nedeni, haftalık besiyeri değişimi yapılan hava sıvı interfaz kültür sisteminden farklı olarak her gün yüksek hacimde (200 µl) besiyeri değişimi yapılmasından kaynaklanıyor olabilir (12, 85, 86). Hava sıvı interfaz yönteminde kültür sırasında testis şeritleri agaroz jel üzerinde kubbemsi bir şekil almakta, bu durum merkezi bölgelere yetersiz difüzyona neden olmaktadır. AD sistemi besiyerine doğrudan temas sağladığından testis şeritlerinin hem merkezi hem de periferik kısımlarında herhangi bir şekilsel bozulma olmadan homojen bir şekilde dağılmasına izin vermiştir. Bununla birlikte, tez çalışmasından elde edilen verilere göre allojenik MKH eklendiği koşulda MaS'ın performansını yakalamadığından, AD kültür sistemi *ex vivo* spermatogenez için kişiselleştirilmiş hücre terapilerini gerektiği gibi desteklemeyebilir. Önceki çalışmalarla beraber bu tez çalışmasında AD sisteminin SKPH havuzunun devamlığındaki performansı değerlendirildiğinde, süre bağımlı olarak etkinin sınırlandığı ve bu nedenle MaS kapsamında akımın desteklendiği perfüzyon iyileştirmesine ihtiyaç duyulduğu doğrulanmıştır.

Üçüncü araştırma hedefi kapsamında MaS VE MKH destekli MaS'ın *in vitro* spermatogenez ve yapısal/fonksiyonel testis matürasyonu 42 gün süreyle desteklemektedir.

Tez çalışması ile ilk kez **MKH destekli MaS'ın** VASA(+) germ hücrelerini (87, 88) ve c-Kit(+) farklılaşmakta olan spermatogonyumları, spermatosit ve spermatid sayılarını, tübül ve lümen çaplarını ve testosteron konsantrasyonu 42 günlük kültür süresince arttırdığı gösterilmiştir. Böylece spermatogenezin başlangıcı ve ilerleyişi prepubertal C57BL/6 farelerinde tam bir spermatojenik siklus boyunca 7. günde spermatosit oluşumu (13-dpp) ve 28. günde (34-dpp) spermatid oluşumunun değerlendirilmesi ile valide edilmiştir. Spermatogenez siklusu farelerde *in vivo*

koşulda doğum sonrası 7. günde başlamakta, 10-20. günler arasında SKPH ve spermatositlerin oluşumu, 18.8-25.3. günler arası spermatositlerin, yuvarlak spermatidlerin gelişimi ve spermiyogenez ile sonlanmaktadır (89). Tez çalışmasından elde edilen verilere göre 28 – 42. günler arasında eş zamanlı olarak SKPH sayısındaki düşüş ve mayotik germ hücresi sayısı, tübül genişliğindeki artış SPKH'lerin mayozu girdiğini göstermektedir. Bu zaman aralığında germ hücresi popülasyonundaki değişikliğe ek olarak testosteron seviyesinde görülen belirgin artış fonksiyonel testis matürasyonunu doğrulamaktadır.

AD kültür sisteminde allojenik MKH desteği, azalan VASA(+) germ hücresi sayısı ve tübüllerde daha az genişleme ve 28. günden 42. güne kadar daha düşük testosteron seviyesi ölçümleri ile testis olgunlaşması ve spermatojenik farklılaşma açısından MaS ile karşılaştırıldığında daha düşük bir performans sergilemiştir. Tez çalışması kapsamında geliştirilen MKH destekli MaS AD kültür platformuna kıyasla spermatositlerin, spermatidlerin sayısını, c-Kit(+) ve VASA(+) hücrelerinin oranını ve tübül genişlemesini yaklaşık 2 kat artışla iyileştirilmiş, spermatogenezin işleyişi ve testisin fonksiyonel olgunlaşmasına katkıda bulunmuştur. MKH destekli MaS 42. günde AD'ye kıyasla 4 kat daha yüksek bir performans göstermiştir. Tez çalışmasının çıktıları, MaS'ın allojenik MKH sekretomunun optimal ve kontrollü bir tübüler dağılımını sağlaması sayesinde daha iyi performans gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle, yeni tek PDMS katmanlı pompasız mikroakışkan sistemi, *ex vivo* fizyolojik testis niş koşullarını taklit ederek allojenik/otolog MKH tedavisini tam olarak uygulamak üzere bir araç olarak prepubertal erkek infertilitesi için etkili bir çözüm sunabilir.

Pompasız, tek PDMS katmanlı yeni MaS *in vitro* spermatogenez ve fonksiyonel testis matürasyonu açısından Komeya'nın uzun süreli Acr-Gfp transgenik yenidoğan fare testis kültürüne katkıda bulunan pompalı (6) ve/veya pompasız (7) 2 PDMS katmanlı şırıngalı (7) cihazlarıyla karşılaştırılabilir. Tez çalışmasında, MaS AD'ye göre 50 adet seminifer tübülde spermatosit sayısını %25 ve spermatid sayısını %30 arttırdı ve 7. günden 42. güne kadar %90'a varan VASA(+) total germ hücre sayısını

korudu. C-Kit(+) farklılaşmakta olan spermatogonyum yüzdesindeki %70 artış ve yüksek testosteron seviyeleri (28. günde 60.5~80.4 ng/dl ve 42. günde 212.3~298.7 ng/dl) ile İVS'nin indüksiyonunu ve aynı dönemde testisin fonksiyonel matürasyonunu doğruladı. İki PDMS katmanlı pompalı MaS (6), Akrozin ifade eden bölgenin toplam seminifer tübül alanına oranını 21 ila 28. günlerde %50'ye kadar arttırmış, ardından bu seviye sabitlenmiştir. Çalışma ayrıca 2 numunede 28. ve 35. günlerde SCP3(+) spermatositlerin ve PNA(+) spermatidlerin (zaman noktası belirtilmemiştir) varlığını ve (0.6~5.7 ng/dl) aralığında testosteron seviyesi bildirmiştir (6). 28-42. Günler arasında farklılaşmakta olan germ hücrelerinin sayısındaki artış bulgular tez çalışması kapsamında elde edilen pompasız MKH destekli MaS'ın önceki pompalı sisteme kıyasla daha uzun vadeli kültür imkânı sunduğunu göstermektedir. Tez bulguları, 12. haftada neonatal transgenik fare testislerinde Acr-GFP(+) ve TRA98(+) tübüllerinin %90'ını koruyan Komeya grubunun pompasız cihazıyla paralellik göstermektedir (7). Tez çalışmasında, tank yüksekliğini 38 mm olarak tutmak için günlük besiyeri ilavesiyle akış hızı 0,9 µl/dk olarak kesin olarak sabitlenmiştir. Komeya'nın pompasız mikroakışkan sistemi, 0,05 – 2,0 µl/dk arasında bir debi aralığı ve pompalı sistemi 0,05 µl/dak olarak sabit bir debi vermiştir. Tez çalışması kapsamında geliştirilmiş yeni MaS ile Komeya vd.'ninkinden daha stabilize pompasız akış hızı sağlanarak, 28. günden sonra daha ileri testis matürasyonu ve daha yüksek düzeyde testosteron üretimi sağlanabildiği düşünülmüştür.

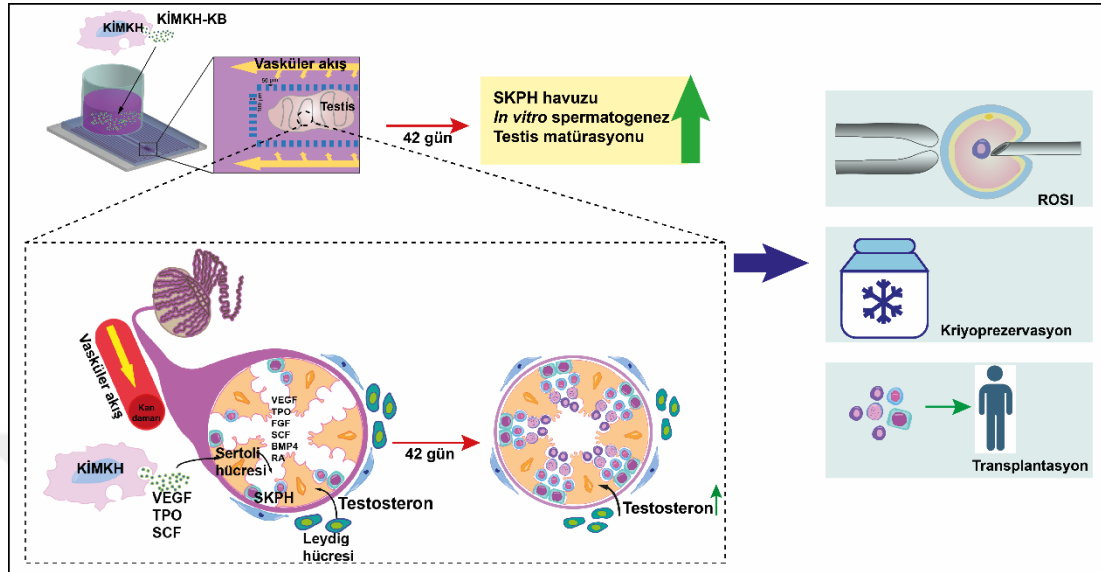
Sonuç olarak, tez çalışması kapsamında geliştirilen MAS prepubertal fare SKPH havuzunu başarılı bir şekilde genişletmiş ve verimli testosteron üretimi ile 42 gün süreyle SKH'lerden haploid spermatidlere kadar spermatogenezi ilerletmiştir. Komeya vd.'nin geliştirdiği pompalı (6), MaS ile yuvarlak/elonge spermatidler üretebildiği ve bu haploid hücrelerin gebelik sağlayabildiği bildirilmiştir. Bu tezin deneysel tasarımı yeni pompasız MAS'ın haploid germ hücresi oluşumuna kadar 42 günlük performansının değerlendirilmesi ile sınırlıdır. Diğer yandan, tez kapsamının çıktıkları prepubertal fare modelinde tam bir spermatojenik siklus boyunca farklı germ hücresi popülasyonları için ayrıntılı bir fenotipik sınıflandırma sunmaktadır. MKH desteği, SKPH'lerin çoğalması ve farklılaşması dahil olmak üzere testis

matürasyonunun sağlanmasında cihazın etkinliğini üst seviyeye çıkarmıştır. Ancak, sonuçlar *in vitro* koşullarla sınırlıdır ve ileri spermatogenez döngülerini takiben yetişkin dişi farelerde mikroinseminasyon ile *in vivo* olarak doğrulanması gerekmektedir. Aynı zamanda, elde edilen germ hücleri ve bu germ hüclerlerinden elde edilen embriyolar genetik stabilite açısından test edilmelidir. Bununla birlikte, yeni tek PDMS katmanlı pompasız mikroakışkan sistemi, normal dağılım ve elde edilen verilerin istatistiksel uygunluğu açısından *ex vivo* koşulda net bir optimal performans göstermiş ve sistemin tübül gelişimine katkısı geçerli ve güvenilir bir tasarımla valide edilmiştir. Germ hüclerinin alt popülasyonları çoklu spesifik fenotipik belirteçler (6, 7, 90) ile sınıflandırıldığından, eşzamanlı olarak LC/MS-MS ile testosteron üretim seviyelerini (6) ve kantitatif histomorfometri ile tübüler büyümeyi değerlendirdiğinden bu tez çalışmasına ait sonuçlar yapısal ve fonksiyonel çıktılar kapsamında güvenilir (51, 91). Ayrıca çalışma, MKH koşullu besiyerinin İVS üzerindeki performansının ilk ve ön gösterimini sunmaktadır ve geliştirilen kültür sistemi androloji kliniğinde kişiselleştirilmiş erkek fertilitesi tedavisi için güçlü bir aday olabilir. Öte yandan, allojenik ve/veya otolog MKH'ler, kliniğe aktarılmadan önce test edilmesi gereken öngörülmemiş bazı risklere sahip olabilir. Mezenkimal sekretomunun mutajenitesi ve metabolik içeriği, kliniğe aktarılmadan önce analiz edilmeli ve ileri çalışmalarda mutlaka optimize edilmelidir. Bu tez çalışması kapsamında tasarlanıp üretilen MaS ve MKH-KB uygulaması ile elde edilen veriler *in vitro* ortamda testis kültürü çalışmalarını salgısal destek parametreleri ile ileri boyuta taşımıştır. Biyomekanik kuvvetlerin simüle edilmesi ile elde edilen *ex vivo* platformun hücresel çıktılarının, erişkin infertil fareye transplante edilmesi, *round spermatid injection/intracytoplasmic sperm injection* (ROSI/ICSI) gibi üremeye yardımcı teknikler ile *in vivo* hayvan modellerinde doğrulanması gerekmektedir (92). *In vivo* hayvan modellerinde platform başarılı olduğu takdirde klinik faz çalışmalarına geçilmesi mümkün olabilecektir. Böylece kemoradyoterapi öncesi çocukluk çağı kanser hastalarından elde edilecek testis biyopsilerinde otojenik ya da allojenik MKH destekli MaS ile spermatogenez sağlanarak erişkindeki fertilitate performansı değerlendirilebilecektir (36).

Bu kapsamda tez çalışması bazı sınırlılıklar içermektedir. Tez kapsamında kullanılan, fiziksel koşulları optimize edilen mikroakışkan testis kültür sistemi dondurma, çözme ve *in vivo* koşullarda hayvan modellerine uygulanma aşamalarından başarıyla geçmek durumundadır. İleri deneylerde söz konusu *in vivo* validasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Bu aşamalardan geçerek geçerlilik ve güvenilirlik testleri tamamlandıktan sonra klinikte kişiye özel olarak uygulanabilecek hale getirilebilirse, çocukluk çağı kanserlerinde kemoterapi ve radyoterapi gibi gonadotoksik tedaviler öncesinde hastalardan testis biyopsisi alınabilir ve kemik iliğinden otojenik MKH izolasyonu yapılabilir; MKH destekli MaS ile SKPH ekspansiyonu ve farklılaşması sağlanarak, kültür sonunda genişletilmiş spermatojenik hücre popülasyonu içeren testis şeritleri kriyoprezervasyon teknikleriyle bireylerin erişkin reproduktif yaşa gelecekleri döneme kadar saklanabilir. Bireyler erişkin yaşa geldiklerinde dondurulmuş testis şeritleri çözülüp, testislerden SKPH izolasyonu yapılabilir; elde edilen hücrelerin testise enjeksiyonu ile spermatogenez başlatılabilir.

Sonuç olarak, tez çalışması kapsamında tasarlanan, polimer tabanlı MEMS üretim yöntemleri ile prototipi üretilen, *in vitro* gerçek ortam koşullarında hastalık modelinde denenip valide edilen mikroakışkan cihaz ile THS4 seviyesine ulaşılmıştır. Patentleme sürecindeki bu tıbbi cihazın *in vivo* gerçek ortamlı performans analizi ile validasyonu sağlanarak yapılan iyileştirmeler ve analizler ile THS4'ten THS5 seviyesine çıkarılabilir, *in vivo* transplantasyon, ROSI ve ICSI gibi *in vitro* fertilizasyon çalışmalarıyla desteklenmesinin ardından sistem prepubertal erkek infertilitesi tedavisi için kişiselleştirilmiş bir yüksek teknoloji platformu olarak kliniğe çözüm üretebilir (Şekil 5.1). TÜBİTAK 1001 projesi (#218S421) kapsamında desteklenen bu tez çalışmasında geliştirilen bu cihaza, kök hücre tedavileri için kişiselleştirilmiş ileri tıbbi tedavi ürünü eklenmiştir. Bu eklenti mikroakışkan cihazı ile entegre edilerek çip-üstü-spermatogenez platformu kurulmuştur. Tez çalışmasından elde edilen bulgularla, *Stem Cell Research & Therapy dergisinde* araştırma makalesi yayınlanmış (93) (Ek 5-7), ulusal (Ek 8) ve uluslararası (Ek 9) patent başvuruları yapılmış,

TÜBİTAK'tan destek alınarak ASRM 2022 (*American Society for Reproductive Medicine Scientific Congress & Expo*) kongresinde sözlü bildiri sunulmuştur (Ek 10).



Şekil 5.1. Tez kapsamında geliştirilmiş olan kişiselleştirilmiş hücresel tedavi temelli ileri tıbbi tedavi platformu *in vitro* koşulda SKPH havuzunu genişletmiş, testis matürasyonunu sağlayarak testosteron seviyesini arttırmış ve spermatogenez sağlamıştır. Elde edilen germ hücresi havuzu ROSİ, kriyoprezervasyon ve transplantasyon gibi yöntemlerle prepubertal kanser hastalarının karşılaştığı infertilite problemi için bir tedavi seçeneği olabilir.

6. SONUÇLAR

1. Bu tez çalışması kapsamında ilk kez pompasız şekilde testis kültürü için optimum olan 0,5-1,0 µl/dk hız aralığında sıvı akışı sağlayabilme ve tek kat PDMS tabakası ile mikroskop görüntülemeleri esnasında yüksek kalitede görüntü sunabilme özelliklerini bir arada bulunduran, testis organ kültürüne yönelik MaS tasarlanmış, üretilmiş; elde edilen mikroyapının sıvı geçişine uyumluluğu ve besiyeri akış hızının test edilmesi ile validasyonu sağlanmıştır.
2. MaS KİMKH salgılarıyla desteklenmesi ile PLZF ve SALL4(+) SKPH sayısının 42 gün boyunca arttırarak kök ve progenitör hücre havuzunu genişletmiştir.
3. KİMKH destekli MaS'ın in spermatogenezi, fonksiyonel ve yapısal testis matürasyonunu, VASA(+) germ hücrelerini ve c-Kit(+) farklılaşmakta olan spermatogonyumları, spermatosit ve spermatid sayılarını, tübül ve lümen çaplarını ve testosteron konsantrasyonu 42 gün süreli kültür boyunca arttırdığı gösterilmiştir.
4. C57BL6 türü fare KİMKHi-KB destekli, özgün, yüksek teknolojik MaS 42 gün süreyle testiste *in vitro* ortamda seminifer tübül epitelini çapını arttırıcı etki göstermiştir.
5. Kemik iliği kaynaklı MKH-KB destekli MaS *in vitro* ortamda 42 günlük kültür süresi boyunca seminifer tübül lümeni alanını arttırıcı etki göstermiştir.
6. Kemik iliği kaynaklı MKH-KB destekli MaS *in vitro* ortamda bir spermatojenik siklus süresi boyunca testiste SKH canlılığının korunmasına katkı sağlamış, SKH'lerin çoğalmasını arttırarak kök hücre ve farklılaşmış seri hücre havuzunu genişletmiştir.
7. Kemik iliği kaynaklı MKH-KB destekli MaS ortamda prepübertal fare testisinde *in vitro* spermatogenezi yuvarlak spermatid aşamasına kadar 42 gün boyunca desteklemiş, testosteron seviyesini arttırıcı etki göstermiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Wasilewski-Masker K, Seidel KD, Leisenring W, Mertens AC, Shnorhavorian M, Ritenour CW, et al. Male infertility in long-term survivors of pediatric cancer: a report from the childhood cancer survivor study. *J Cancer Surviv.* 2014;8(3):437-47.
2. Hudson MM. Reproductive outcomes for survivors of childhood cancer. *Obstet Gynecol.* 2010;116(5):1171-83.
3. Kutluk MT, Yesilipek A. Pediatric cancer registry Turkey: 2009-2016 (TPOG & TPHD). *Journal of Clinical Oncology.* 2017;35(15_suppl):e22015-e.
4. Onofre J, Baert Y, Faes K, Goossens E. Cryopreservation of testicular tissue or testicular cell suspensions: a pivotal step in fertility preservation. *Hum Reprod Update.* 2016;22(6):744-61.
5. Yamanaka H, Komeya M, Nakamura H, Sanjo H, Sato T, Yao M, et al. A monolayer microfluidic device supporting mouse spermatogenesis with improved visibility. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;500(4):885-91.
6. Komeya M, Kimura H, Nakamura H, Yokonishi T, Sato T, Kojima K, et al. Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device. *Sci Rep.* 2016;6:21472.
7. Komeya M, Hayashi K, Nakamura H, Yamanaka H, Sanjo H, Kojima K, et al. Pumpless microfluidic system driven by hydrostatic pressure induces and maintains mouse spermatogenesis in vitro. *Sci Rep.* 2017;7(1):15459.
8. ACS. Key Statistics for Childhood Cancers 2022 [Available from: <https://www.cancer.org/cancer/cancer-in-children/key-statistics.html>].
9. ASRM Pco. Fertility preservation in patients undergoing gonadotoxic therapy or gonadectomy: a committee opinion. *Fertil Steril.* 2019;112(6):1022-33.

10. ASRM ECo. Fertility preservation and reproduction in patients facing gonadotoxic therapies: an Ethics Committee opinion. *Fertil Steril*. 2018;110(3):380-6.
11. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*. 2022;72(1):7-33.
12. Önen S, Köse S, Yersal N, Korkusuz P. Mesenchymal stem cells promote spermatogonial stem/progenitor cell pool and spermatogenesis in neonatal mice in vitro. *Sci Rep*. 2022;12(1):11494.
13. Kose S, Yersal N, Onen S, Korkusuz P. Comparison of Hematopoietic and Spermatogonial Stem Cell Niches from the Regenerative Medicine Aspect. *Adv Exp Med Biol*. 2018.
14. Waheeb R, Hofmann MC. Human spermatogonial stem cells: a possible origin for spermatocytic seminoma. *International journal of andrology*. 2011;34(4 Pt 2):e296-305; discussion e.
15. Fayomi AP, Orwig KE. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem Cell Research*. 2018;29:207-14.
16. Hai Y, Hou J, Liu Y, Liu Y, Yang H, Li Z, et al. The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2014;29:66-75.
17. Phillips BT, Gassei K, Orwig KE. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2010;365(1546):1663-78.
18. von Kopylow K, Spiess AN. Human spermatogonial markers. *Stem Cell Res*. 2017;25:300-9.
19. Kaur G, Thompson LA, Dufour JM. Sertoli cells--immunological sentinels of spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2014;30:36-44.

20. Schrade A, Kyronlahti A, Akinrinade O, Pihlajoki M, Fischer S, Rodriguez VM, et al. GATA4 Regulates Blood-Testis Barrier Function and Lactate Metabolism in Mouse Sertoli Cells. *Endocrinology*. 2016;157(6):2416-31.
21. Gong D, Zhang C, Li T, Zhang J, Zhang N, Tao Z, et al. Are Sertoli cells a kind of mesenchymal stem cells? *Am J Transl Res*. 2017;9(3):1067-74.
22. Ramaswamy S, Weinbauer GF. Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone. *Spermatogenesis*. 2014;4(2):e996025.
23. Shiraishi K, Matsuyama H. Gonadotropin actions on spermatogenesis and hormonal therapies for spermatogenic disorders [Review]. *Endocr J*. 2017;64(2):123-31.
24. Albrecht M. Insights into the nature of human testicular peritubular cells. *Ann Anat*. 2009;191(6):532-40.
25. Mayerhofer A. Human testicular peritubular cells: more than meets the eye. *Reproduction*. 2013;145(5):R107-16.
26. Bomhard EM, Gelbke H-P. Hypoxaemia affects male reproduction: a case study of how to differentiate between primary and secondary hypoxic testicular toxicity due to chemical exposure. *Archives of Toxicology*. 2013;87(7):1201-18.
27. Durairajanayagam D, Sharma RK, du Plessis SS, Agarwal A. Testicular Heat Stress and Sperm Quality. In: du Plessis SS, Agarwal A, Sabanegh JES, editors. *Male Infertility: A Complete Guide to Lifestyle and Environmental Factors*. New York, NY: Springer New York; 2014. p. 105-25.
28. Perestrelo AR, Aguas AC, Rainer A, Forte G. Microfluidic Organ/Body-on-a-Chip Devices at the Convergence of Biology and Microengineering. *Sensors (Basel)*. 2015;15(12):31142-70.

29. Kimura H, Sakai Y, Fujii T. Organ/body-on-a-chip based on microfluidic technology for drug discovery. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2018;33(1):43-8.
30. Duncombe TA, Tentori AM, Herr AE. Microfluidics: reframing biological enquiry. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015;16(9):554-67.
31. Wu Q, Liu J, Wang X, Feng L, Wu J, Zhu X, et al. Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects. *BioMedical Engineering OnLine*. 2020;19(1):9.
32. Demircan Y, Ozgur E, Kulah H. Dielectrophoresis: applications and future outlook in point of care. *Electrophoresis*. 2013;34(7):1008-27.
33. Sanjo H, Komeya M, Sato T, Abe T, Katagiri K, Yamanaka H, et al. In vitro mouse spermatogenesis with an organ culture method in chemically defined medium. *PLoS One*. 2018;13(2):e0192884.
34. Sato T, Katagiri K, Kojima K, Komeya M, Yao M, Ogawa T. In Vitro Spermatogenesis in Explanted Adult Mouse Testis Tissues. *PLoS One*. 2015;10(6):e0130171.
35. Kojima K, Nakamura H, Komeya M, Yamanaka H, Makino Y, Okada Y, et al. Neonatal testis growth recreated in vitro by two-dimensional organ-spreading. *Biotechnol Bioeng*. 2018.
36. Sadri-Ardekani H, Atala A. Testicular tissue cryopreservation and spermatogonial stem cell transplantation to restore fertility: from bench to bedside. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(3):68.
37. Yamanaka H, Komeya M, Nakamura H, Sanjo H, Sato T, Yao M, et al. A monolayer microfluidic device supporting mouse spermatogenesis with improved visibility. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018;500(4):885-91.

38. Kankilic B, Kose S, Korkusuz P, Timucin M, Korkusuz F. Mesenchymal Stem Cells and Nano-Bioceramics for Bone Regeneration. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2016;11(6):487-93.
39. Kose S, Aerts-Kaya F, Kopru CZ, Nemutlu E, Kuskonmaz B, Karaosmanoglu B, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells secrete endocannabinoids that stimulate in vitro hematopoietic stem cell migration effectively comparable to beta-adrenergic stimulation. *Exp Hematol*. 2018;57:30-41 e1.
40. Ghaem Maghami R, Mirzapour T, Bayrami A. Differentiation of mesenchymal stem cells to germ-like cells under induction of Sertoli cell-conditioned medium and retinoic acid. *Andrologia*. 2018;50(3).
41. Salem M, Mirzapour T, Bayrami A, Sagha M. Germ cell differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Andrologia*. 2019;51(4):e13229.
42. Hsiao C-H, Ji AT-Q, Chang C-C, Cheng C-J, Lee L-M, Ho JH-C. Local injection of mesenchymal stem cells protects testicular torsion-induced germ cell injury. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015;6(1):113.
43. Cai YT, Xiong CL, Shen SL, Rao JP, Liu TS, Qiu F. Mesenchymal stem cell-secreted factors delayed spermatogenesis injuries induced by busulfan involving intercellular adhesion molecule regulation. *Andrologia*. 2019;51(6):e13285.
44. Aghamir SM, Salavati A, Yousefie R, Tootian Z, Ghazaleh N, Jamali M, et al. Does bone marrow-derived mesenchymal stem cell transfusion prevent antisperm antibody production after traumatic testis rupture? *Urology*. 2014;84(1):82-6.
45. Badawy AA, El-Magd MA, AlSadrah SA, Alruwaili MM. Altered expression of some miRNAs and their target genes following mesenchymal stem cell treatment in busulfan-induced azoospermic rats. *Gene*. 2020;737:144481.

46. Elbaghdady HAM, Alwaili MA, El-Demerdash RS. Amelioration of cadmium-induced testes' damage in rats by the bone marrow mesenchymal stem cells. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2018;148:763-9.
47. Vahdati A, Fathi A, Hajihoseini M, Aliborzi G, Hosseini E. The Regenerative Effect of Bone Marrow-Derived Stem Cells in Spermatogenesis of Infertile Hamster. *World journal of plastic surgery*. 2017;6(1):18-25.
48. Wang YJ, Yan J, Zou XL, Guo KJ, Zhao Y, Meng CY, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells repair cadmium-induced rat testis injury by inhibiting mitochondrial apoptosis. *Chemico-biological interactions*. 2017;271:39-47.
49. Ghasemzadeh-Hasankolaei M, Batavani R, Eslaminejad MB, Sayahpour F. Transplantation of Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into the Testes of Infertile Male Rats and New Germ Cell Formation. *Int J Stem Cells*. 2016;9(2):250-63.
50. Hassan AI, Alam SS. Evaluation of mesenchymal stem cells in treatment of infertility in male rats. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(6):131.
51. Tamadon A, Mehrabani D, Rahmanifar F, Jahromi AR, Panahi M, Zare S, et al. Induction of Spermatogenesis by Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells in Busulfan-induced Azoospermia in Hamster. *Int J Stem Cells*. 2015;8(2):134-45.
52. Monsefi M, Fereydouni B, Rohani L, Talaei T. Mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous tubules of sterile rats. *Iran J Reprod Med*. 2013;11(7):537-44.
53. Lue Y, Erkkila K, Liu PY, Ma K, Wang C, Hikim AS, et al. Fate of bone marrow stem cells transplanted into the testis: potential implication for men with testicular failure. *Am J Pathol*. 2007;170(3):899-908.

54. Prihatno SA, Padeta I, Larasati AD, Sundari B, Hidayati A, Fibrianto YH, et al. Effects of secretome on cisplatin-induced testicular dysfunction in rats. *Vet World*. 2018;11(9):1349-56.
55. Chen H, Tang QL, Wu XY, Xie LC, Lin LM, Ho GY, et al. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into germ-like cells in mouse seminiferous tubules. *Molecular medicine reports*. 2015;12(1):819-28.
56. Yang R-F, Liu T-H, Zhao K, Xiong C-L. Enhancement of mouse germ cell-associated genes expression by injection of human umbilical cord mesenchymal stem cells into the testis of chemical-induced azoospermic mice. *Asian J Androl*. 2014;16(5):698-704.
57. Yang RF, Liu TH, Zhao K, Xiong CL. Enhancement of mouse germ cell-associated genes expression by injection of human umbilical cord mesenchymal stem cells into the testis of chemical-induced azoospermic mice. *Asian J Androl*. 2014;16(5):698-704.
58. Sagaradze G, Basalova N, Kirpatovsky V, Ohobotov D, Nimiritsky P, Grigorieva O, et al. A magic kick for regeneration: role of mesenchymal stromal cell secretome in spermatogonial stem cell niche recovery. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):342.
59. Cakici C, Buyrukcu B, Duruksu G, Haliloglu AH, Aksoy A, Isik A, et al. Recovery of fertility in azoospermia rats after injection of adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells: the sperm generation. *Biomed Res Int*. 2013;2013:529589.
60. Hsiao CH, Ji AT, Chang CC, Cheng CJ, Lee LM, Ho JH. Local injection of mesenchymal stem cells protects testicular torsion-induced germ cell injury. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:113.
61. Mehrabani D, Hassanshahi MA, Tamadon A, Zare S, Keshavarz S, Rahmanifar F, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous tubules of busulfan-induced azoospermic rats. *J Hum Reprod Sci*. 2015;8(2):103-10.

62. Qian C, Meng Q, Lu J, Zhang L, Li H, Huang B. Human amnion mesenchymal stem cells restore spermatogenesis in mice with busulfan-induced testis toxicity by inhibiting apoptosis and oxidative stress. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):290.
63. Belanger MC, Marois Y. Hemocompatibility, biocompatibility, inflammatory and in vivo studies of primary reference materials low-density polyethylene and polydimethylsiloxane: a review. *J Biomed Mater Res.* 2001;58(5):467-77.
64. Park JY, Yoo SJ, Lee E-J, Lee DH, Kim JY, Lee S-H. Increased poly(dimethylsiloxane) stiffness improves viability and morphology of mouse fibroblast cells. *BioChip Journal.* 2010;4(3):230-6.
65. Padova B. Microfluidic networking: modelling and analysis: Padova University; 2012.
66. Mäki A-J, Hemmilä S, Hirvonen J, Girish NN, Kreutzer J, Hyttinen J, et al. Modeling and Experimental Characterization of Pressure Drop in Gravity-Driven Microfluidic Systems. *Journal of Fluids Engineering.* 2014;137(2):021105.
67. Kose S, Aerts-Kaya F, Kopru CZ, Nemutlu E, Kuskonmaz B, Karaosmanoglu B, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells secrete endocannabinoids that stimulate in vitro hematopoietic stem cell migration effectively comparable to beta-adrenergic stimulation. *Exp Hematol.* 2018;57:30-41.e1.
68. Huang S, Xu L, Sun Y, Wu T, Wang K, Li G. An improved protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *J Orthop Translat.* 2015;3(1):26-33.
69. Zhang T, Lee YW, Rui YF, Cheng TY, Jiang XH, Li G. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote growth and angiogenesis of breast and prostate tumors. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(3):70.

70. Himeno T, Kamiya H, Naruse K, Cheng Z, Ito S, Kondo M, et al. Mesenchymal stem cell-like cells derived from mouse induced pluripotent stem cells ameliorate diabetic polyneuropathy in mice. *Biomed Res Int*. 2013;2013:259187.
71. Yokonishi T, Sato T, Katagiri K, Ogawa T. In vitro spermatogenesis using an organ culture technique. *Methods Mol Biol*. 2013;927:479-88.
72. Jørgensen A, Young J, Nielsen JE, Joensen UN, Toft BG, Rajpert-De Meyts E, et al. Hanging drop cultures of human testis and testis cancer samples: a model used to investigate activin treatment effects in a preserved niche. *Br J Cancer*. 2014;110(10):2604-14.
73. Griswold MD. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiological Reviews*. 2016;96(1):1-17.
74. Sato T, Katagiri K, Yokonishi T, Kubota Y, Inoue K, Ogonuki N, et al. In vitro production of fertile sperm from murine spermatogonial stem cell lines. *Nature Communications*. 2011;2:472.
75. Chen SR, Tang JX, Cheng JM, Li J, Jin C, Li XY, et al. Loss of Gata4 in Sertoli cells impairs the spermatogonial stem cell niche and causes germ cell exhaustion by attenuating chemokine signaling. *Oncotarget*. 2015;6(35):37012-27.
76. Zhang L, Tang J, Haines CJ, Feng HL, Lai L, Teng X, et al. c-kit and its related genes in spermatogonial differentiation. *Spermatogenesis*. 2011;1(3):186-94.
77. Wang Y, Gay GD, Botelho JC, Caudill SP, Vesper HW. Total testosterone quantitative measurement in serum by LC-MS/MS. *Clin Chim Acta*. 2014;436:263-7.
78. Naeemi S, Sabetkish S, Kiani MJ, Dehghan A, Kajbafzadeh AM. Ex-Vivo and In-Vivo Expansion of Spermatogonial Stem Cells Using Cell-Seeded Microfluidic Testis Scaffolds and Animal Model. *Cell Tissue Bank*. 2022.

79. Hobbs RM, Fagoonee S, Papa A, Webster K, Altruda F, Nishinakamura R, et al. Functional antagonism between Sall4 and Plzf defines germline progenitors. *Cell Stem Cell*. 2012;10(3):284-98.
80. Vahdati A, Fathi A, Hajihoseini M, Aliborzi G, Hosseini E. The Regenerative Effect of Bone Marrow-Derived Stem Cells in Spermatogenesis of Infertile Hamster. *World J Plast Surg*. 2017;6(1):18-25.
81. Ibtisham F, Honaramooz A. Spermatogonial Stem Cells for In Vitro Spermatogenesis and In Vivo Restoration of Fertility. *Cells*. 2020;9(3):745.
82. Tseng Y-T, Liao H-F, Yu C-Y, Mo C-F, Lin S-P. Epigenetic factors in the regulation of prospermatogonia and spermatogonial stem cells. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2015;150.
83. Patra T, Pathak D, Gupta MK. Comparison of two culture methods during in vitro spermatogenesis of vitrified-warmed testis tissue: Organ culture vs. hanging drop culture. *Cryobiology*. 2021;100:142-50.
84. Jørgensen A, Nielsen JE, Perlman S, Lundvall L, Mitchell RT, Juul A, et al. Ex vivo culture of human fetal gonads: manipulation of meiosis signalling by retinoic acid treatment disrupts testis development. *Hum Reprod*. 2015;30(10):2351-63.
85. Matsumura T, Sato T, Abe T, Sanjo H, Katagiri K, Kimura H, et al. Rat in vitro spermatogenesis promoted by chemical supplementations and oxygen-tension control. *Scientific Reports*. 2021;11(1):3458.
86. Yuan Y, Li L, Cheng Q, Diao F, Zeng Q, Yang X, et al. In vitro testicular organogenesis from human fetal gonads produces fertilization-competent spermatids. *Cell Research*. 2020;30(3):244-55.
87. Castrillon DH, Quade BJ, Wang TY, Quigley C, Crum CP. The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(17):9585-90.

88. Tanaka SS, Toyooka Y, Akasu R, Katoh-Fukui Y, Nakahara Y, Suzuki R, et al. The mouse homolog of *Drosophila* Vasa is required for the development of male germ cells. *Genes Dev.* 2000;14(7):841-53.
89. Margolin G, Khil PP, Kim J, Bellani MA, Camerini-Otero RD. Integrated transcriptome analysis of mouse spermatogenesis. *BMC Genomics.* 2013;15:39 -
90. Robinson M, Bedford E, Witherspoon L, Willerth SM, Flannigan R. Using clinically derived human tissue to 3-dimensionally bioprint personalized testicular tubules for in vitro culturing: first report. *F S Sci.* 2022;3(2):130-9.
91. Montoto LG, Arregui L, Sanchez NM, Gomendio M, Roldan ER. Postnatal testicular development in mouse species with different levels of sperm competition. *Reproduction.* 2012;143(3):333-46.
92. Morgan-Bathke M, Harteneck D, Jaeger P, Sondergaard E, Karwoski R, Espinosa De Ycaza A, et al. Comparison of Methods for Analyzing Human Adipose Tissue Macrophage Content. *Obesity (Silver Spring).* 2017;25(12):2100-7.
93. Önen S, Atik AC, Gizer M, Köse S, Yaman Ö, Külah H, et al. A pumpless monolayer microfluidic device based on mesenchymal stem cell-conditioned medium promotes neonatal mouse in vitro spermatogenesis. *Stem Cell Res Ther.* 2023;14(1):127.

8. EKLER

EK-1 Hacettepe Üniversitesi Yerel Etik Kurulu Karar Yazısı



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575-109

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 18.09.2018 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2018/09
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2018/54
KARAR NUMARASI	: 2018/54 – 05
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Prof. Dr. Petek KORKUSUZ
HAYVAN DENEYLERİNDE	: Selin ÖNEN, Prof. Dr. Petek KORKUSUZ, Dr. Öğr.
GÖREVLİ ARAŞTIRMACILAR	: Üyesi Sevil KÖSE
DİĞER YARDIMCI	: Prof. Dr. Haluk KÜLAH, Dr. Işık AKÇAKAYA,
ARAŞTIRMACILAR	: Prof. Dr. Önder YAMAN
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve	77 Adet C57BL/6 Fare (6 Günlük)
SAYISI	:

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Petek KORKUSUZ'un araştırma yürütücüsü olduğu 2018/54 kayıt numaralı **"Allojenik Mezenkimal Kök Hücreler ve Mikroakışkan Sistemle Vücut Dışında Testisteki Spermatogonyal Kök Hücre Mikroçevresinin Devamlılığının Sağlanması"** isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

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

Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_hdk.php

Ayrıntılı Bilgi için:

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

EK-2: Deney Hayvanı Kullanım Sertifikası

574

 T.C. Çevre, Şehircilik ve İklim Bakanlığı

 HAYVAN DENEYLERİ MERKEZİ ETİK KURULU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI

Sayın SELİN ÖNEN

04.06.2018 - 12.06.2018 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi HADYEK tarafından Ankara İlde düzenlenen "Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası" eğitimini başarı ile tamamlayarak A kategorisi sertifikası almaya hak kazanmıştır.



EK-3: Turnitin Orijinallik Raporu

Tezin Tam Başlığı: Allojenik Mezenkimal Kök Hücreler ve Mikroakışkan Sistemle Vücut Dışında Testisteki Spermatogonyal Kök Hücre Mikroçevresinin Devamlılığının Sağlanması
Öğrencinin Adı Soyadı: Selin Önen
Dosyanın Toplam Sayfa Sayısı: 75

ORIGINALITY REPORT

3%

SIMILARITY INDEX

3%

INTERNET SOURCES

0%

PUBLICATIONS

0%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1

[openaccess.hacettepe.edu.tr:8080](https://openaccess.hacettepe.edu.tr/8080)

Internet Source

2%

2

[www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080](https://www.openaccess.hacettepe.edu.tr/8080)

Internet Source

1%

3

Selin Onen, Ali Can Atik, Merve Gizer, Sevil Köse Asst, Onder Yaman, Haluk Külâh, Petek Korkusuz. "A CELL THERAPY ASSISTED NOVEL MICROFLUIDIC DEVICE PROMOTES IN VITRO SPERMATOGENESIS IN NEONATAL MICE", Fertility and Sterility, 2022

Publication

<1%

4

"Mesenchymal Stem Cells", Springer Nature, 2016

Publication

<1%

Exclude quotes On

Exclude matches < 5 words

Exclude bibliography On

EK-4: Dijital Makbuz



Digital Receipt

This receipt acknowledges that **Turnitin** received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Selin Önen
 Assignment title: SELİN ÖNEN DOKTORA TEZİ
 Submission title: Selin Önen - H.Ü. Kök Hücre Doktora Tezi
 File name: Selin_Onen_Doktora_Tezi.docx
 File size: 261.47K
 Page count: 75
 Word count: 16,252
 Character count: 112,453
 Submission date: 30-May-2023 02:37PM (UTC+0300)
 Submission ID: 2105190900



EK 5: Hacettepe Üniversitesi Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu

	T.C. HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU		
Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne		30.05.2023	
I. ÖĞRENCİ BİLGİLERİ			
Adı:	Selin	Anabilim Dalı:	Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı
Soyadı:	Önen	Programı:	Kök Hücre Doktora Programı
Numarası:	N19149935	Danışmanı:	Prof. Dr. Petek Korkusuz
Statüsü:	☐ Yüksek Lisans ☒ Doktora ☐ Bütünleşik Doktora		
II. TEZ BİLGİLERİ			
Önerilen Tez Başlığı:	Allojenik Mezenkimal Kök Hücreler ve Mikroakışkan Sistemle Vücut Dışında Testisteki Spermatogonyal Kök Hücre Mikroçevresinin Devamlılığının Sağlanması		
III. BEYAN			
Yukarıda başlığı / konusu gösterilen tez çalışmamın; a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler, d) Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 75 sayfalık kısmına ilişkin, 30.05.2023 tarihinde şahsım / tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından, aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 3 olarak tespit edilmiştir. Uygulanan filtrelemeler: 1- Kaynakça hariç 2- Alıntılar hariç / dahil 3- 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç Hacettepe Üniversitesi "Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim. Gereğini saygılarımla arz ederim. Ad – Soyad Selin Önen İmza			
Ek 1: 1 adet; tezin tam başlığını, öğrencinin ad-soyad bilgisini ve dosyanın toplam sayfa sayısını gösterecek şekilde, raporlama işlemi tamamlandıktan sonra alınacak ekran görüntüsü. Ek 2: Dijital makbuz			
IV. DANIŞMAN ONAYI:			
UYGUNDUR Ad – Soyad – İmza Prof. Dr. Petek Korkusuz 30.05.2023			
Telefon: (312) 305 15 54 Fax: (312) 309 31 90 e-posta: sbe@hacettepe.edu.tr Detaylı Bilgi: https://saglikbilimleri.hacettepe.edu.tr/			

EK 6: Tez kapsamında üretilen yayınlar – I (*Web of Science* bilgisi)

STEM CELL RESEARCH & THERAPY

PublisherName: BMC

Journal Impact Factor™

2021	Five Year
8.088	8.387

JCR Category	Category Rank	Category Quartile
CELL & TISSUE ENGINEERING <i>in SCIE edition</i>	4/29	Q1
CELL BIOLOGY <i>in SCIE edition</i>	46/195	Q1
MEDICINE, RESEARCH & EXPERIMENTAL <i>in SCIE edition</i>	27/139	Q1

Source: Journal Citation Reports 2021. [Learn more](#)

Journal Citation Indicator™ New

2021	2020
1.29	1.27

JCI Category	Category Rank	Category Quartile
CELL & TISSUE ENGINEERING <i>in SCIE edition</i>	6/31	Q1
CELL BIOLOGY <i>in SCIE edition</i>	35/204	Q1
MEDICINE, RESEARCH & EXPERIMENTAL <i>in SCIE edition</i>	35/195	Q1

EK 7: Tez kapsamında üretilen yayınlar – I (Kabul yazısı)

Date:
To:
cc:
From:
Subject

SCRT-D-23-00260R1

A Pumpless Monolayer Microfluidic Device Based on Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium Promotes Neonatal Mouse in vitro Spermatogenesis

Selin Önen; Ali Can Atik; Merve Gizer; Sevil Köse; Önder Yaman; Haluk Külâh; Petek Korkusuz
Stem Cell Research & Therapy

Dear Prof. Korkusuz,

I am pleased to inform you that your manuscript "A Pumpless Monolayer Microfluidic Device Based on Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium Promotes Neonatal Mouse in vitro Spermatogenesis" (SCRT-D-23-00260R1) has been accepted for publication in Stem Cell Research & Therapy.

Before publication, our production team will check the format of your manuscript to ensure that it conforms to the standards of the journal. They will be in touch shortly to request any necessary changes, or to confirm that none are needed.

Articles in this journal may be held for a short period of time prior to publication. If you have any concerns please contact the journal.

We look forward to publishing your manuscript and we do hope you will consider Stem Cell Research & Therapy again in the future.

EK 8: Tez kapsamında üretilen yayınlar – I (Yayın)

Önen et al. *Stem Cell Research & Therapy* (2023) 14:127
<https://doi.org/10.1186/s13287-023-03356-x>

Stem Cell Research & Therapy

RESEARCH

Open Access



A pumpless monolayer microfluidic device based on mesenchymal stem cell-conditioned medium promotes neonatal mouse in vitro spermatogenesis

Selin Önen^{1,2}, Ali Can Atik^{3,4}, Merve Gizer¹, Sevil Köse⁵, Önder Yaman⁶, Haluk Külâh^{3,4} and Petek Korkusuz^{7*}

Abstract

Background Childhood cancer treatment-induced gonadotoxicity causes permanent infertility/sub-sterility in nearly half of males. The current clinical and experimental approaches are limited to cryopreservation of prepubertal testicular strips and in vitro spermatogenesis which are inadequate to achieve the expanded spermatogonial stem/progenitor cells and spermatogenesis in vitro. Recently, we reported the supportive effect of bone marrow-derived mesenchymal cell co-culture which is inadequate after 14 days of culture in static conditions in prepubertal mouse testis due to lack of microvascular flow and diffusion. Therefore, we generated a novel, pumpless, single polydimethylsiloxane-layered testis-on-chip platform providing a continuous and stabilized microfluidic flow and real-time cellular paracrine contribution of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells.

Methods We aimed to evaluate the efficacy of this new setup in terms of self-renewal of stem/progenitor cells, spermatogenesis and structural and functional maturation of seminiferous tubules in vitro by measuring the number of undifferentiated and differentiating spermatogonia, spermatocytes, spermatids and tubular growth by histochemical, immunohistochemical, flow cytometric and chromatographic techniques.

Results Bone marrow-derived mesenchymal stem cell-based testis-on-chip platform supported the maintenance of SALL4(+) and PLZF(+) spermatogonial stem/progenitor cells, for 42 days. The new setup improved in vitro spermatogenesis in terms of c-Kit(+) differentiating spermatogonia, VASA(+) total germ cells, the meiotic cells including spermatocytes and spermatids and testicular maturation by increasing testosterone concentration and improved tubular growth for 42 days in comparison with hanging drop and non-mesenchymal stem cell control.

Conclusions Future fertility preservation for male pediatric cancer survivors depends on the protection/expansion of spermatogonial stem/progenitor cell pool and induction of in vitro spermatogenesis. Our findings demonstrate that a novel bone marrow-derived mesenchymal stem cell-based microfluidic testis-on-chip device supporting the maintenance of stem cells and spermatogenesis in prepubertal mice in vitro. This new, cell therapy-based microfluidic platform may contribute to a safe, precision-based cell and tissue banking protocols for prepubertal fertility restoration in future.

Keywords In vitro spermatogenesis, Microfluidics, Mesenchymal stem cells, Male infertility, Prepubertal boys



© The Author(s) 2023. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Background

The American Cancer Society estimated a 85% survival rate for around ten thousand prepubertal cancer patients being diagnosed in 2022 [1], of whom half will suffer from permanent infertility [2–5]. Spermatogonial stem/progenitor cells (SSPC) constitute the only source for fertility preservation since spermatogenesis is not initiated until puberty. In vitro spermatogenesis (IVS) from SSPCs is a challenging process that takes place in a complex 3D niche consisting of vascular flow sourcing mediators, accessory cells and stromal elements regulating paracrine and physical signals. Previously, we demonstrated the potential of a monolayer cell culture setup in prepubertal C57BL/6 mice SSPCs to initiate spermatogenesis [6]. However, human SSPCs display inadequate colonization in vitro when other niche components are absent [7].

Mouse [8–10], rat [11], goat [12] and human [13, 14] testicular organ cultures comprising niche components supported further differentiation up to spermatid state and improved testicular maturation in terms of tubular and luminal diameter and enlargement of the spermatogonial pool. Those experimental settings use a variety of supplements consisting of 10% KSR, AlbuMAX (10–40 mg/ml), hormones, antioxidants and lysophospholipids on 3D supporting air–liquid interphase (ALI) [9, 10, 15], hanging drop (HD) [12], soft agar [16] and alginate [8] matrixes. However, these systems have serious limitations in terms of inadequate accessory cell performance and also lack of physiologic microcirculation that could mimic the in vivo niche conditions.

Recently testis-on-chip microfluidics including pumpless two polydimethylsiloxane (PDMS) layered [17] and pumped with single [18] and double PDMS-layered [19] setups provided effective testosterone levels for improved spermatogenesis. Those systems require high performance of all niche components in addition to microvascular flow. Mesenchymal stem cells and their exosomes promote the restoration of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia [20], abdominal cryptorchidism [21], busulfan [22, 23], cisplatin [24] or lead nitrate [25]-induced infertility and ischemia–reperfusion [26, 27] and torsion–detorsion injury [28, 29] in rodents in vivo. In a previous study from our laboratory, we demonstrated that syngeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSC) enlarged the SSPC pool and induced IVS up to the round spermatid stage when added to the static ALI co-culture platform [30]. The efficacy of the BMSC containing co-culture system, however, was limited due to the lack of microvascular flow and inadequate diffusion of nutrients in the medium. Therefore, ex vivo long-term spermatogenesis requires a dynamic platform simulating the microvascular 3D physiology of the testicular niche. We designed, developed and

produced a novel pumpless, single PDMS-layered microfluidic device (MFD) combined with BMSC-conditioned medium (BMSC-CM) and validated its performance for IVS in this study. We assessed whether the novel system could provide in vitro testicular maturation as measured by increased spermatogenesis and effective testosterone production in vitro. Then, we hypothesized that the newly generated monolayer pumpless MFD based on syngeneic BMSC-CM could support maintenance and expansion of the neonatal mice SSPC pool, spermatogenesis and functional testicular maturation for 42-day-long culture in vitro. We, therefore, generated and validated the syngeneic BMSC-CM pumpless monolayer microfluidic platform for culture of prepubertal C57BL/6 mouse testes by evaluating the increase in epithelial thickness of the seminiferous tubules and luminal diameter, enlargement of the SSPC and differentiating germ cell (GC) pool and measured testosterone levels on days 7, 28 and 42 using flow cytometric (FCM), histologic and mass spectrometric tools.

Methods

Study design

The ex vivo experimental study was carried out in compliance with the ARRIVE guideline 2.0. Dependent variables were SSPC pool, IVS and functional testicular maturation parameters; independent variables were time (days 7, 28 and 42) and groups (control and BMSC-conditioned medium, HD and MFD). Experiments were carried out as two parallel and three repeats (Fig. 1a–d).

Animals

Six days postpartum (dpp) C57BL/6 male mice were purchased from the Experimental Animal Breeding and Application Center (Başkent University, Ankara, Turkey) and served as BMSC and testis donor. The mice were housed in air-conditioned, pathogen-free rooms with a 12/12-h lightning cycle at 20 ± 2 °C and a humidity of $55 \pm 5\%$ and fed with a standard mouse diet and tap water ad libitum. The methods used in all animal experiments all conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Local Ethical Board of Animal Experiments (Hacettepe University, Ankara, Turkey (#52338575-109, September 18, 2018).

Design, fabrication and validation of MFD

A new pumpless microfluidic platform composed of a medium flow channel ($500 \mu\text{m} \times 8865 \mu\text{m}$, WxL), a core organ chamber, medium perfusion compartments and a highly resistant microchannel region of $150 \mu\text{m} \times 500 \text{mm}$ (WxL) was designed. The height of the microchannel network ($170 \mu\text{m}$) was defined as slightly higher than the achievable thickness of the testicular

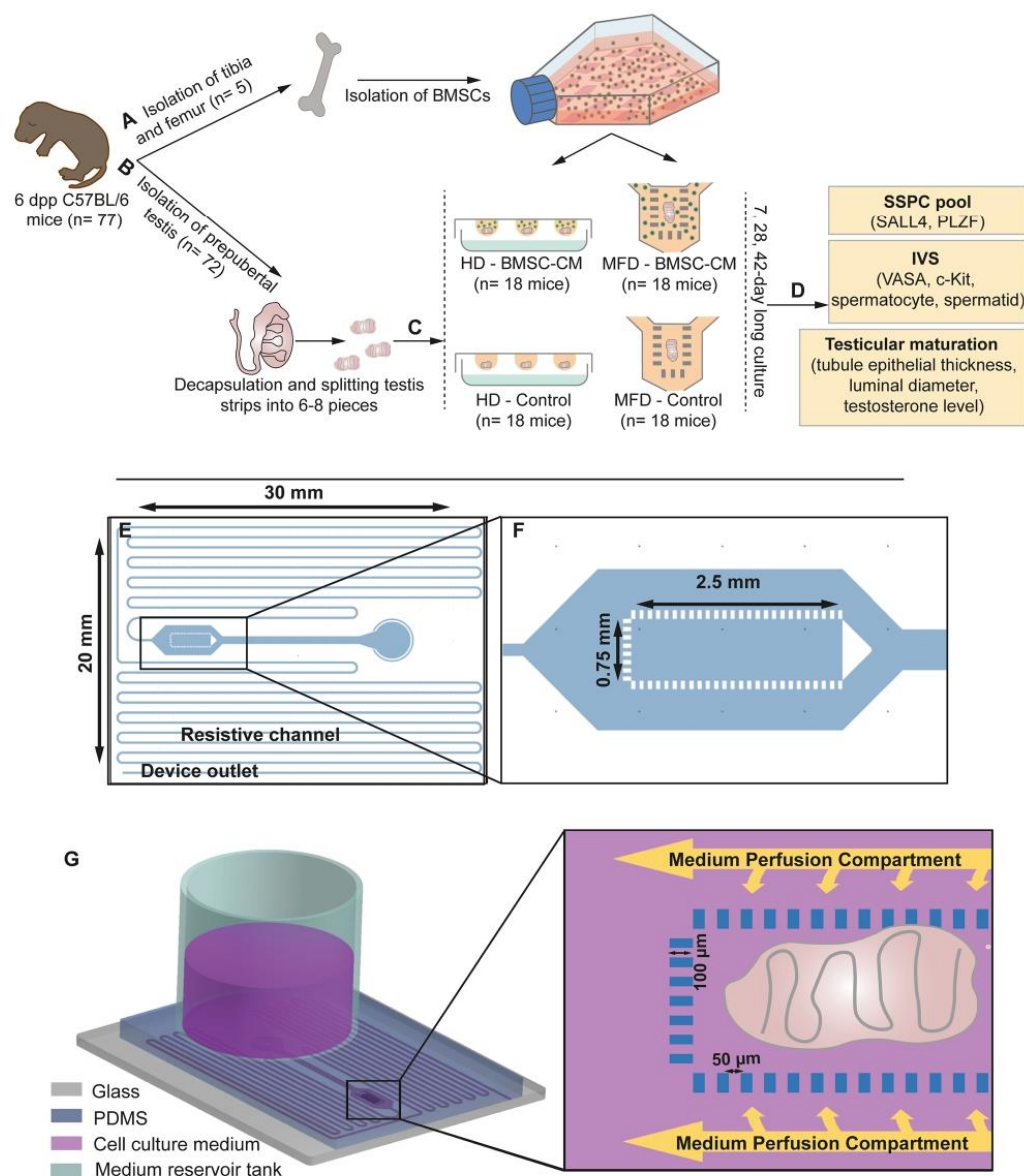


Fig. 1 Workflow of the study and design of MFD. **a** Isolation of BMSCs. **b** Testicular tissue collection. **c** Generation of HD and MFD culture systems. **d** Evaluation of SSPC pool, IVS and testicular maturation. **e** Sketch of the mold with resistive channel, device outlet and **f** organ chamber. **g** 3D illustration of MFD with organ placement

strips. The organ chamber was fed by two-sided perfusion compartments (each 500 μm in width) through an array of rectangular micropillars. The continuous

flow of medium was induced by the hydraulic head at the medium reservoir tank. A long, narrow and necked microchannel region ensured the desired flow rate range

by introducing a high resistance to the pumpless flow of the medium (Fig. 1e–g).

Time-dependent flow rate (Q) with respect to the hydraulic head of the medium was analytically calculated using MATLAB R2018a. A time-varying dynamic range is obtained roughly between 0.5 and 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ for passive flow rate control with respect to the change in hydraulic head from 38 to 19 mm (Additional file 1: Info. 1). A 3D computational fluid dynamics (CFD) simulation model was performed to compute the steady-state velocity field distribution inside the microsystem with organ chamber for 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ by utilizing the laminar flow physics of COMSOL Multiphysics v5.6 software. The surface plot validates that micropillar geometry leads to a lower velocity profile inside the organ chamber respective to the side perfusion channels; thus, microsystem enables low shear stress and a more in vivo-like physical environment for the proper growth of the tissue.

The 4-inch silicon master, containing the inverse of the desired geometry, was patterned with deep-reactive ion etching (DRIE), which yielded high aspect ratio microstructuring. For easy peeling off PDMS from the mold, a low energy surface was created by sputtering a chromium layer of 20 nm as an adhesion layer and then a gold layer of 100 nm. Then, the PDMS prepolymer was mixed with the curing agent at a ratio of 10:1, poured on the mold and cured at 80 °C for 2 h following degasification. The PDMS layer was permanently bonded with a glass substrate using O_2 plasma treatment at 40 W for 60 s. Before bonding, the testicular tissue fragment was placed inside the tissue chamber under a stereomicroscope. The drops of remaining medium containing metabolic by-products were collected from a lateral outlet, defined at the edge of the glass substrate and used for testosterone measurement.

Isolation and characterization of BMSCs from male mice

BMSCs were isolated from 6-dpp mice ($n=5$), as described previously [30, 31]. In brief, after killing by cervical dislocation, tibias and femurs were collected in phosphate-buffered saline (PBS) (Thermo Fisher Scientific, USA) with 1% penicillin–streptomycin (BI, Israel) and flushed with α -minimum essential medium (α -MEM) (BI, USA) with 15% fetal bovine serum (BI, USA) and 1% penicillin–streptomycin, followed by culture at 37 °C, 5% CO_2 . BMSCs were characterized for further experiments by evaluation at passage three of spindle-shaped morphology, differentiation capacity in adipogenic and osteogenic directions and surface antigen analysis by FCM, as described before [30, 32–35]. The BMSCs were distributed as 2×10^5 cell/tube. The cells were immunolabeled with CD44, CD140a, Sca-1 mesenchymal and CD34, CD45 mouse hematopoietic stem cell

markers (Additional file 1: Table 1) [36]. Flow cytometric measurements and analyses were performed with a Novocyte (ACEA Biosciences, USA) flow cytometer and Novoexpress 1.3.0. (ACEA Biosciences, USA) software with 10,000 events recorded for each sample.

Testicular tissue collection and culture

Mice (6-dpp, $n=72$) testicles were isolated, decapsulated by removal of the tunica albuginea under a stereomicroscope (Leica, Wetzlar, Germany) with a following division of testes into 8–10 seminiferous tubule fragments ($<1 \text{ mm}^3$ in size) and placed into organ chamber and wells of MFD and HD, respectively. Testicular strips were grown with 7.5% FBS, 5% KSR and 1% pen-strep supplemented α -MEM medium at 5% CO_2 at 37 °C. In conditioned media groups, the medium (15% FBS, 1% pen-strep in α -MEM) collected from 24-h culture of BMSCs was mixed with medium including α -MEM with 10% KSR and 1% pen-strep in 1:1 proportion in volume in order to equalize the supplement concentration in culture media of both control and BMSC-CM groups. Culture medium was added into the MFD reservoir every 3 days and was changed every day in the HD setup for 42 days ($n=12$, each).

Flow cytometry

Testicular single cell suspensions from each sample were obtained by chemical digestion with DNase I (Serva, Israel), 0.25% EDTA–trypsin solution (1:9, v/v) and mechanical disruption through pipetting through 40- μm cell strainers (Corning, USA) [30]. The cells were fixed by 3% PFA and permeabilized by 0.2% Tween 20 in PBS. Then, they were labeled with rabbit-anti-mouse VASA (total GC marker) and PLZF (SSPC marker) and c-Kit (differentiating spermatogonia) antibodies for 30 min at RT. For labeling of VASA, the cells were incubated with a secondary FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Additional file 1: Table 1) at RT for 30 min. Measurements were taken by Novocyte FCM, and data were analyzed with Novoexpress 1.3.0. software, with 10,000 events recorded for each sample. Immune-positive cells were detected by gating according to unstained and isotype control samples.

Histomorphometry

Testis fragments were fixed in Bouin's fixative, underwent tissue processing by dehydration and clearing and were embedded in paraffin. Paraffin sections of 3 μm thickness were obtained, stained with periodic acid Schiff (PAS, Sigma, USA) and evaluated under a light microscope with an attached digital camera (Leica DMR 6000, Germany). Epithelial thickness of the tubules and the luminal diameter of fifty seminiferous tubule cross sections per

group were measured using an image analysis program (LASv3 Leica, Germany) [30].

Immunohistochemistry

An indirect immune peroxidase method was performed on deparaffinized and rehydrated 3- μ m-thick sections. Hydrated slides were exposed to H_2O_2 for quenching of endogenous peroxidase activity and subjected to heat-induced antigen retrieval with citrate buffer (pH=6.5). A specific protein blocking was carried out with goat serum (Abcam, USA). The slides were incubated with sequentially an anti-SALL4 primary antibody (1:200) and HRP-goat anti-rabbit IgG secondary antibodies (Additional file 1: Table 1). DAB was applied to samples as chromogen. The slides on which the primary antibody incubation was omitted were used as negative control (Additional file 1: Fig. 1). Hematoxylin was used for counter-staining. The immunolabeled cells were counted in 50 cross sections of seminiferous tubules from each group under a bright-field microscope (Leica DM 6000 BM, Germany) with an analysis program (LASv3 Leica, Germany), as described previously [30].

Testosterone measurement by LC/MS–MS

The total testosterone concentration in the testicular culture supernatant of HD and MFD setups was assessed using liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS–MS). The 24-h medium samples were collected into separate tubes on days 7, 28 and 42. The 5- μ m-sized LC column (C18, XBridge, WATERS, USA) and testosterone standard (T1500, Sigma-Aldrich, USA) were used for operation. The LC/MS–MS analyses were performed with a Xevo TQ-S spectrometer (WATERS, USA).

Statistical analysis

The normality of the distribution was determined by Shapiro–Wilk. Paired t-test and Wilcoxon signed-rank tests were used for comparison of parametric and nonparametric data, respectively, with a 95% confidence interval. Parametric data were presented as mean $\pm$ S.D. Nonparametric data were presented as median, minimum and maximum values. Analyses were performed with the SPSS 23.0 Bivariate Correlation A program.

Results

Generation and validation of a novel, single PDMS-layered pumpless MFD

A profilometer and a digital microscope were used to achieve dimensional accuracy during the microfabrication of the mold (Fig. 2a–c). After generation of a BMSC-CM inlet-inserted MFD (Fig. 2d) and placement of testicular strips (Fig. 2e), a continuous flow was developed within the microchannel by a hydraulic medium head of 38 mm. The flow rate estimated as 0.9 μ L/min on average for the first 100 min of the operation by the accumulated volume measurement at the outlet, which is slightly below the numerically achieved flow rate of 0.98 μ L/min (Fig. 2f) mainly due to the wafer-level nonuniformity in etch depth. The testicular tissue was immobilized within the chamber for 42 days of culture (patent applications for MFD: #TPTO/2021/004441, #PCT/TR2022/050188). The findings regarding the microfluidic device were presented at the ASRM 2022 Scientific Congress following the national and international patent applications and published in the Fertility & Sterility as Abstract Supplement in Volume 118, Issue 4.

Characterization of BMSCs

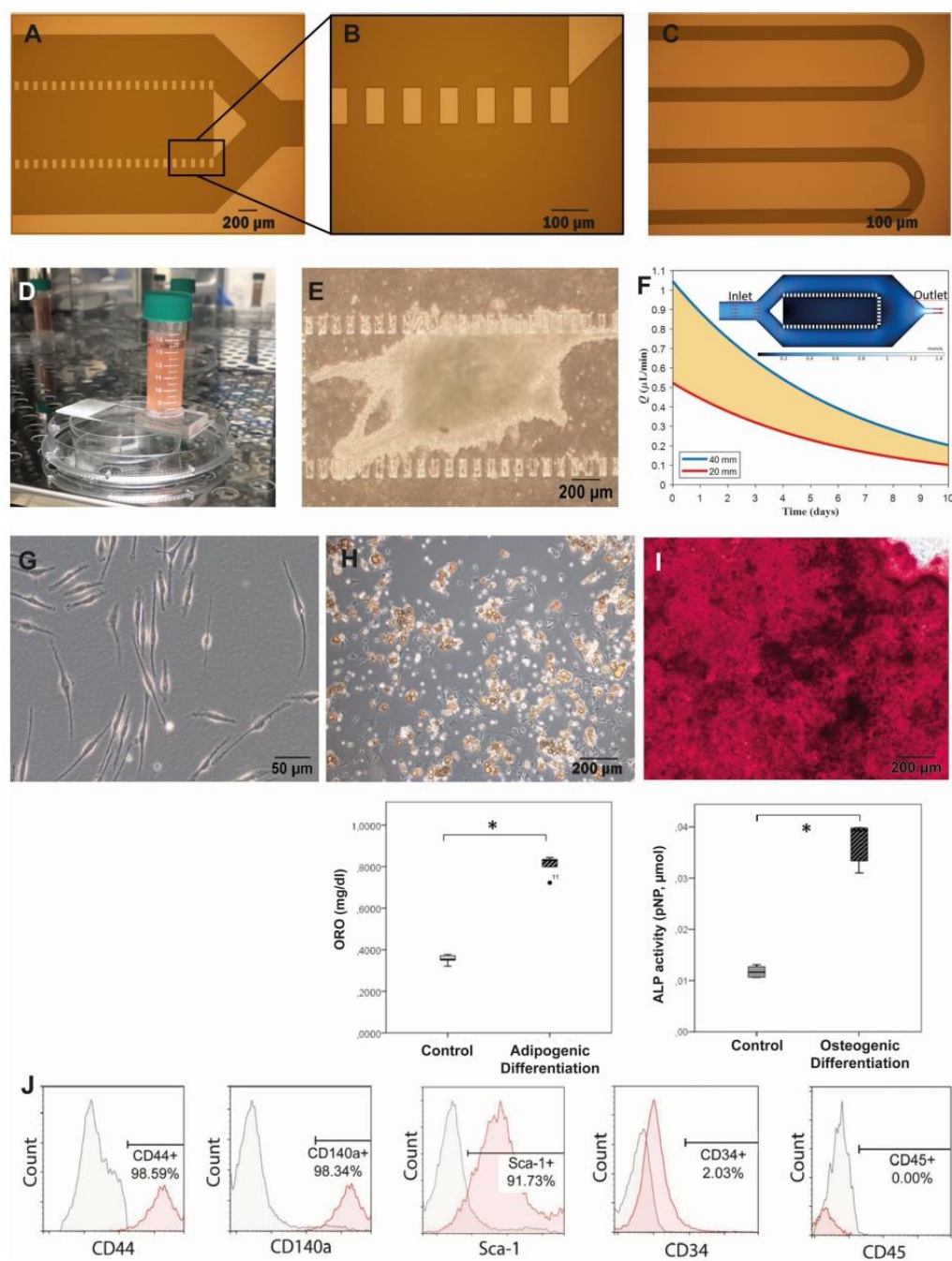
Passage three BMSCs attached to culture plastics and demonstrated a typical spindle–polygonal-shaped morphology (Fig. 2g). Isolated cells underwent adipogenic (Fig. 2h) and osteogenic differentiation (Fig. 2i) successfully. BMSCs homogeneously (>90%) expressed CD44, CD140a and Sca-1 and were negative for hematopoietic markers CD34 and CD45 (<3%) (Fig. 2j).

BMSC-CM-enhanced MFD provides maintenance and expansion of the SSPC pool

Addition of BMSC-CM increased the number of SALL4(+) SSPCs (Fig. 3a, b), the PLZF(+) SSPC ratio (Fig. 3c, d) and spermatogonia per tubule (Fig. 3e, f) in the HD setup on days between 7 and 42 for each time point, when compared to non-BMSC controls ($p=0.001$ for all). Similarly, supplementation of CM increased the number of SSPCs and spermatogonia from day 7 to 42 for each time point, when compared to non-BMSC-CM control group. In terms of the PLZF-labeled SSPC ratio, the BMSC-CM-enhanced MFD was superior to the non-BMSC-CM group on day 7. However, they were similar from this time point forward. The percentage of

(See figure on next page.)

Fig. 2 Validation of new MFD and characterization of BMSCs. Micrographs of **a** organ chamber, **b** pillars and **c** resistive channels after photolithography and **d** picture of MFD with BMSC-CM insert. **e** Micrograph of seminiferous tubules within organ chamber during culture. **f** The graph presents the flow rate in resistive channels with different medium levels in the reservoir tank (MATLAB R2018a). Surface plot represents the velocity field inside the microsystem where the red arrows indicate the flow direction (COMSOL Multiphysics v5.6). **g** Micrograph of passage three spindle-shaped BMSCs adhering to culture plate. **h** Adipogenic and **i** osteogenic differentiation of BMSCs (ORO, 20x; ARS, 100x, respectively, * $p < 0.01$). **j** Characteristic surface antigenic expression of BMSCs by FCM



PLZF-labeled cells in the total testicular cell suspension increased in time from day 7 to 42 in all groups, with an obvious increase in BMSC-CM and/or MFD groups. The BMSC-CM-enhanced MFD was superior to all other groups throughout the experiment, in terms of SSPC pool maintenance and expansion. The number of SALL4(+) SSPCs and PAS-stained spermatogonia decreased between days 7 and 28 ($p=0.001$) and remained unchanged from this time point forward in BMSC-CM-enhanced and control MFD groups. SALL4(+) SSPC spermatogonial pool presented a constant reduction, when BMSC-CM was not applied in the HD setup from day 7 to 42 ($p=0.001$). Addition of BMSC-CM not only prevented reduction, but also increased the SALL4(+) SSPC/spermatogonial pool between days 28 and 42 in static HD setup ($p=0.001$). The number of SALL4(+) cells per tubule presented a strong positive correlation with spermatogonia count and a mild correlation with PLZF-labeled cell ratio (Fig. 3g, $R^2=0.9994$, $p=0.001$; $R^2=0.0319$, $p=0.5785$, respectively).

BMSC-CM-enhanced MFD promotes IVS

BMSC-CM increased the number of PAS-stained spermatocytes (Fig. 4a) per seminiferous tubule at all time points in MFD ($p=0.001$). BMSC-CM also increased the number of round spermatids per tubule on day 42 in HD and on days 28 and 42 in MFD compared to their non-BMSC-CM controls (Fig. 4b). BMSC-enhanced HD was superior to the control group in terms of number of spermatocytes for a 42-day-long period at every time point ($p=0.001$). The number of spermatids was higher in the BMSC-CM-enhanced HD setup on days 28 and 42, when compared to the non-BMSC-CM control, and they were similar to each other on day 7. The number of spermatocytes was higher in the both the BMSC-CM-enhanced and control MFDs, compared to HD from day 7 to 42 at every time point ($p=0.001$ for all). The number of spermatids was elevated in both BMSC-CM-enhanced and control MFDs, compared to HD on days 28 and 42 ($p=0.001$). The BMSC-CM-enhanced MFD was superior to all other groups throughout the experiment in terms of spermatocyte and spermatid numbers except for day 7 for the number of round spermatids, since the spermatid pool was not generated at that time point ($p=0.001$). The number of spermatocytes increased continuously in

BMSC-CM-enhanced and control MFD in progress during the 42-day-long culture period ($p=0.001$). However, it started to decrease after day 28 in both HD setups with and without BMSC-CM ($p=0.001$). In the BMSC-CM-enhanced MFD, the number of spermatids increased drastically between days 7 and 42 in a time-dependent manner ($p=0.001$). The spermatid pool increased between days 7 and 28, but stayed constant after day 28 in control MFD and HD setups. The number of PAS-stained spermatogonium per tubule presented a mild positive correlation with spermatocyte count (Fig. 4c, $R^2=0.2699$, $p=0.0834$) and weak correlation with number of spermatid (Fig. 4d, $R^2=0.09664$, $p=0.3254$). There was an overall increase in spermatids from day 7 to 42 with BMSC-CM supplement in the HD platform. The number of spermatid and spermatocyte per tubule demonstrated a strong correlation (Fig. 4e, $R^2=0.7634$, $p=0.0002$). BMSC-CM supplement furthermore increased the ratio of c-Kit(+) differentiating spermatogonia to total testicular cells and was higher in both MFD and HD setups on day 42 when compared to their respective controls (Fig. 4f, g). The ratio of c-Kit(+) cells in testicles was constant between days 7 and 28, after which it started to increase from day 28 to 42 in both BMSC-CM-enhanced and control MFD and HD setups. The BMSC-CM-enhanced MFD was superior to the other three groups on day 42 (Fig. 4f, g, $p=0.001$ for all). BMSC-CM also provided a higher VASA(+) total GC number per tubule in MFD and HD setups, when compared to their controls on days 42 and 7, respectively (Fig. 4h, i, $p=0.001$). Microfluidic and HD systems with and without BMSC-CM supplementation resulted in similar VASA(+) GC counts on day 28. From day 28 to 42, BMSC-CM supplementation maintained the total GC ratio when applied to MFD, while other groups showed a decline. On day 42, the GC ratio within the testicular cell suspension increased up to 90% in the BMSC-CM-enhanced MFD ($p=0.001$).

BMSC-CM-enhanced MFD supports structural and functional maturation of testes

Epithelial thickness of seminiferous tubules and luminal diameter were higher in BMSC-CM-enhanced and control MFDs from day 7 to 42 at every time point when compared to HD setups (Fig. 5a, b, $p=0.001$). Epithelial thickness increased in time with and without BMSC-CM

(See figure on next page.)

Fig. 3 BMSC-contributed MFD provides maintenance and enlargement of SALL4(+) and PLZF(+) SSPC pool and PAS-stained spermatogonia in vitro. Immune labelling of **a** SALL4(+) and **c** PLZF(+) SSPCs, and **e** PAS-stained spermatogonia in prepubertal mice testes from day 7 to 42 in BMSC-CM-applied and non-applied HD and MFD (SALL4 IHC and PAS-hematoxylin, 1000x). Note the presence of SSPCs indicated by arrow on SALL4-labeled sections. In time change in **b** number of SALL4(+) cells, **d** ratio of PLZF(+) cells to total testicular cells and **f** spermatogonium count in BMSC-CM-applied and non-applied groups are illustrated in bar graph with standard deviation and data distribution (* $p<0.05$, $n=6$ testes, 50 tubules for SALL4; $n=6$ testes for PLZF). **g** Line graph illustrates positive correlation of SALL4 with PLZF labeling and spermatogonium number for SSPCs in control and BMSC groups ($R^2=0.0319$, $p=0.5785$; $R^2=0.9994$, $p=0.001$, respectively) (arrows: SSPCs; asterisks: seminiferous tubules)

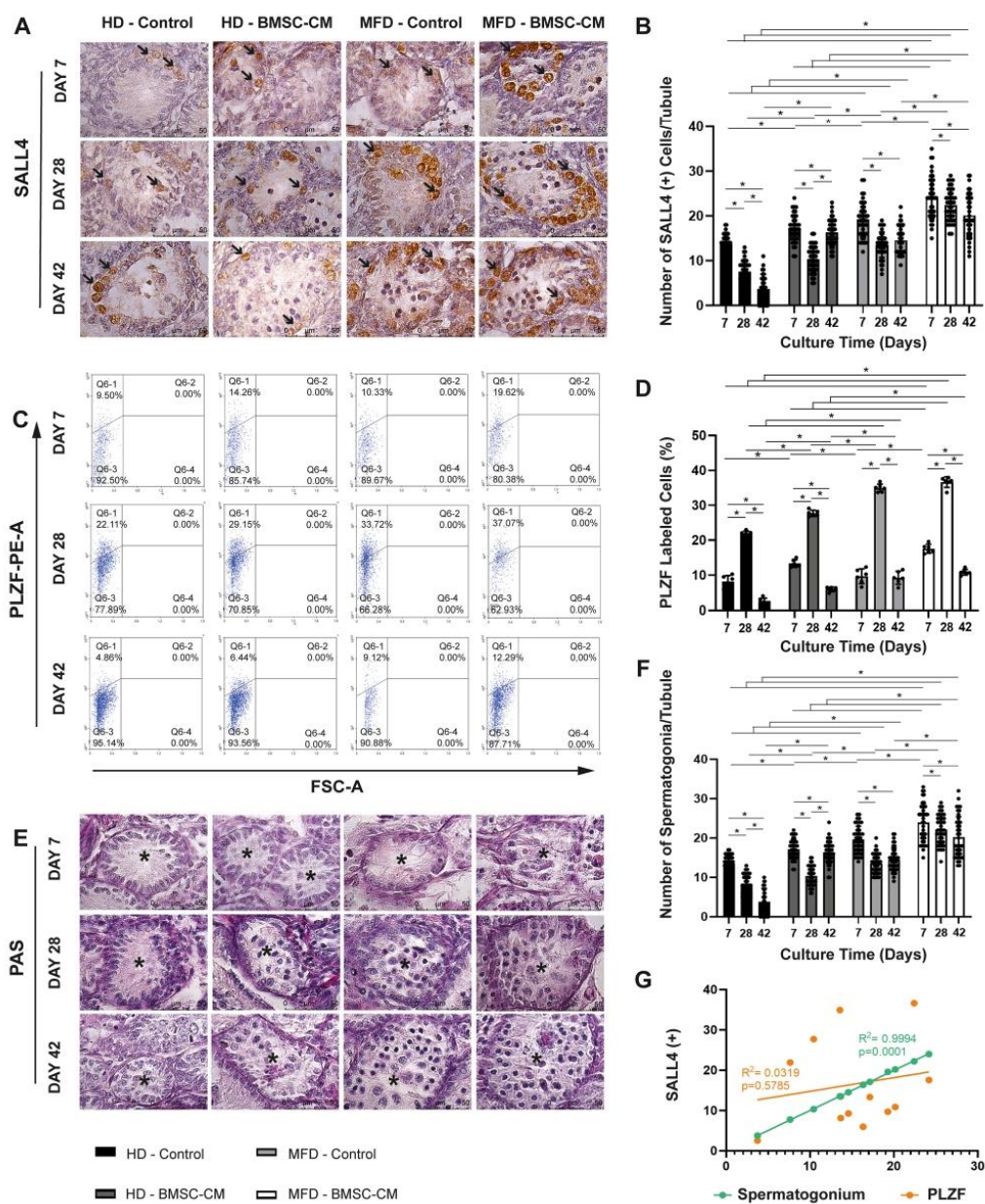


Fig. 3 (See legend on previous page.)

HDs. The thickness increased until day 28 and then remained constant from day 28 to 42 in MFDs with and/or without BMSC-CM supplementation. The luminal diameter increased from day 7 to 28 in BMSC-CM-supplemented and control HDs and remained unchanged from this time point forward. The diameter of the lumen was the highest in BMSC-CM MFDs compared to all other groups from day 7 to 42 ($p=0.001$) ($p=0.001$). Epithelial thickness of seminiferous tubules presented a strong positive correlation with the luminal diameter (Fig. 5c, $R^2=0.9524$, $p=0.0001$). BMSC-CM contribution increased testosterone levels in both HD and MFD when compared to their controls on days 7 to 42 (Fig. 5d, $p=0.001$ for day 7 in HD, day 42 in MFD; ns for other groups). The total testosterone concentration was higher in both BMSC-CM-supplemented and control HDs compared to MFDs; however, BMSC-CM-supplemented and control MFDs were superior to HDs on day 42 ($p=0.001$). The total testosterone level presented a sharp decline in both BMSC-CM and other HDs from day 7 to 42 (Fig. 5d, $p=0.001$ from day 7 to 28; ns from 28 to 42). Total testosterone concentration decreased also but more mildly from day 7 to 28 ($p=0.001$) and then raised from day 28 to 42 in both BMSC-applied and non-applied MFDs ($p=0.001$). Spermatogenic functionality of HD and MFD setups in BMSC-CM-applied and non-applied groups on culture day 42 is summarized by illustration (Fig. 5e).

Discussion

We designed and produced a single PDMS-layered, pumpless MFD as a novel testicular organ culture platform with a special insert for cell therapy in this study. We successfully validated the new system's performance on expansion of SSPCs, initiation and maintenance of IVS and progress of functional testicular maturation in a C57BL/6 neonatal mouse model, in which allogeneic BMSCs were used as cellular therapeutics for 42 days. Our microfluidic testis-on-chip system allows a high-quality vision under a microscope with biocompatible single PDMS layer, provides a pumpless medium flow rate between 0.5 and 1.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ via hydrostatic pressure arising from resistive channels and possesses a cell-based therapy insert for enhancement of spermatogenesis via additional metabolic factors. The flow rate was stabilized nearly to 0.9 $\mu\text{L}/\text{min}$ by completing the medium height

in reservoir to 38 mm daily. A limited number of studies recently developed microfluidic mouse testis culture platforms, and those devices present slightly different designs with various performances on IVS [17–19]. Komeya et al. generated single [18] and double [19] PDMS-layered MFD with 0.05 $\mu\text{L}/\text{min}$ of flow rate by an external syringe pump that had a negative impact in terms of inadequate nutrient and oxygen supply in neonatal mouse testis. The same group modified the device to a two PDMS-layered pumpless format allowing a flow rate between 0.05 and 2.0 $\mu\text{L}/\text{min}$, but the new system exhibited a lower visibility performance under microscope [17]. A similar double-layered MFD by a different group provided a pumpless medium flow (with no numerical data) for adult mouse testis [37]. In our study, we achieved an optimal range for flow rate between 0.5 and 1.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ in line with previous study [17] without pump. We were able to generate a new, pumpless MFD that offers optimal access to oxygen flow and metabolic supply with a single PDMS layer. Our organ chamber measured 750 $\mu\text{m} \times 2.5 \text{ mm} \times 150 \mu\text{m}$ (WxLxD), and it was bilaterally surrounded by perfusion compartments each 500 μm in width. Tiny, rectangular, fence-like, parallel pillars at the base are designed to ensure gentle fixation of seminiferous tubules within the chamber. The size and configuration of our organ chamber are in line with Yamanaka et al.'s system with a slight decrease in width to increase diffusion efficiency [18]. We achieved the same optimal flow range as Yamanaka's group by using a single medium reservoir unlike their setup in order to overcome the backflow challenge due to double reservoir. We finally designed a special tube insertion that offers a precision-based assessment of personalized therapeutics, i.e., allogeneic stem cells. Thus, we generated a BMSC-contributed MFD and validated the performance of the new platform for IVS and ex vivo maturation of neonatal mice testis strips for the first time.

Our group previously demonstrated the inductive capacity of allogeneic BMSCs on enlargement of SSC pool and initiation and maintenance of IVS up to round spermatid stage when added to ALI co-culture system [30]; however, the efficiency of static platform was limited due to lack of microvascular flow and inadequate diffusion of nutrients into the organ. Therefore, in this study, we generated a novel pumpless, single PDMS-layered MFD with a special input for cell therapeutics

(See figure on next page.)

Fig. 4 BMSC-CM-contributed MFD promotes IVS. In time change in number of **a** spermatocytes and **b** spermatids per tubules in BMSC-CM-applied and non-applied groups are shown in bar graph with standard deviation and data distribution (* $p < 0.05$, $n=6$ testes, 50 tubules). Line graphs illustrate positive correlation between the **c** number of spermatocyte and spermatogonium, **d** spermatid and spermatogonium and **e** spermatocyte and spermatid in BMSC-CM-applied and non-applied HD and MFD ($R^2=0.02699$, $p=0.0894$; $R^2=0.09664$, $p=0.3254$; $R^2=0.7634$, $p=0.0002$, respectively). Flow cytometric analysis of **f** c-Kit(+) and **h** VASA(+) cell ratio to total testicular cells. Bar graph with standard deviation and data distribution illustrates in time change in **g** c-Kit and **i** VASA-labeled cell ratio to total testicular cells in BMSC-CM-applied and non-applied HD and MFD (* $p < 0.05$, $n=6$ testes)

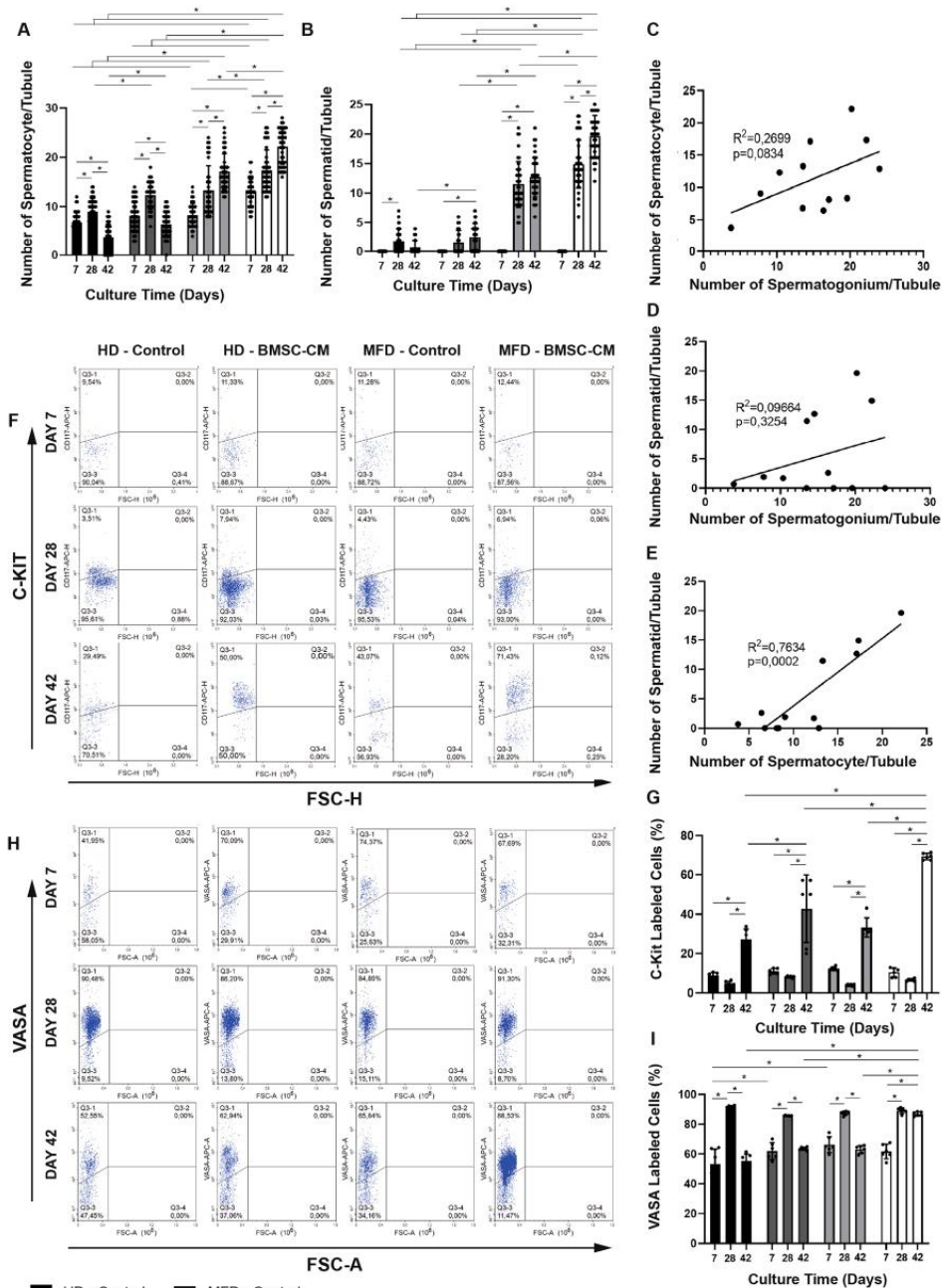


Fig. 4 (See legend on previous page.)

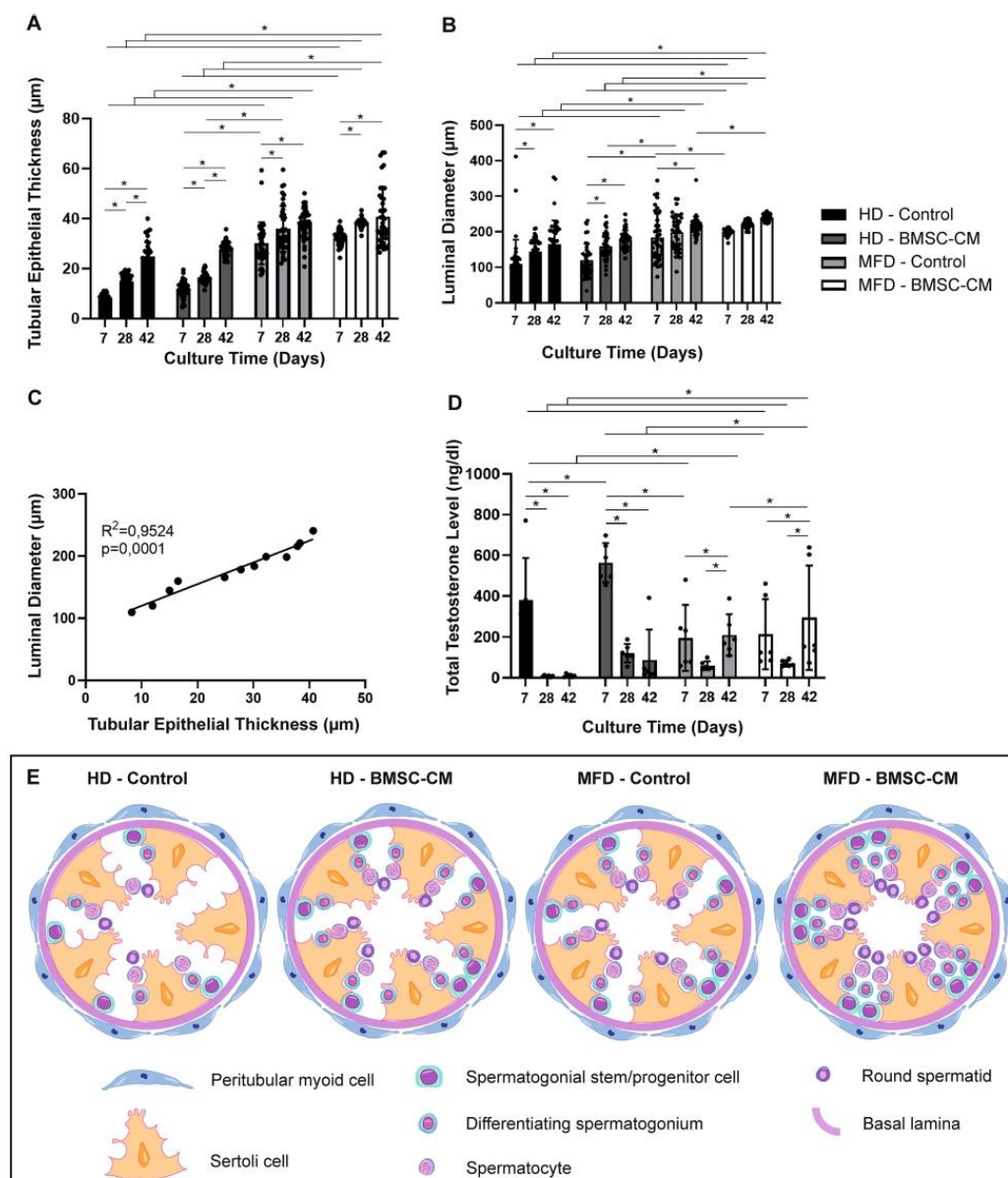


Fig. 5 BMSC-CM-contributed MFD supports testicular maturation by increasing tubule epithelial thickness, luminal diameter and testosterone level in vitro. Bar graphs illustrate time-dependent change by standard deviation and data distribution of **a** tubule epithelial thickness, **b** luminal diameter and **c** testosterone concentration ($*p < 0.05$, $n = 6$ testes, 50 tubules). **d** Line graph illustrates a positive correlation of tubule epithelial thickness with luminal diameter in control and BMSC groups ($R^2 = 0.9524$, $p = 0.0001$). **e** Illustration of germ cell populations in tubules on day 42

and compared to HD. Here in, we demonstrate that the BMSC-CM-supplemented MFD increased integrity and proliferation of progenitor GC pool in terms of increased number of SALL4(+) SSPCs per tubules and increased ratio of PLZF(+) SSPCs in neonatal mouse testis for 42 days. Both PLZF and SALL4 are highly specific to A_{single} , A_{paired} and A_{aligned} spermatogonia as essential transcription factors responsible for maintenance of SSPC pool in mice [38]. The novel MFD increased SALL4(+) SSPC number per tubule by 3.3 and 9 times compared to our previous ALI setup [30] with and without BMSC-CM, respectively. MFD also induced PLZF(+) SSPCs ratio to total testicular cells by 1.5 and 1.7 times when compared to ALI that is set with and without BMSCs in the previous study [30]. The contribution of BMSC to HD provided 1.5 and 3 times increase in PLZF(+) cell percentage on days 28 and 42 and 1.5 times increase in SALL4(+) cell number from day 7 to 42 compared to HD-only setup during ex vivo culture of prepubertal mouse testicular strips. With the contribution of BMSC, HD is able to catch/attain the performance of MFD-alone on day 7 in terms of PLZF and on day 42 in terms of SALL4. The inadequacy of static conditions arising from insufficient nutrition and direct exposure to medium might be covered by addition of mesenchymal paracrine factors. BMSC-contributed HD setup might be considered as a preferable static culture platform since its efficiency is parallel to MFD only. Nevertheless, MFD performed best among ALI and HD and SSPC pool reached its maximum volume in terms of SALL4(+) and PLZF(+) spermatogonia when BMSCs contribute. Our findings related to BMSC mediated in vitro induction of SSPC pool in prepubertal testes are original and establish the precise supporting performance of allogeneic multipotent somatic stromal cells on the complex 3D gonadal niche. This gives strong evidence for the BMSCs to play a major role as an accessory element of testicular stroma and is in line with previous in vivo studies suggesting spermatogonial restoration by intratesticular allogeneic BMSC injection in adult sterile rat and hamster models in vivo [39, 40].

Our monolayered pumpless MFD gave a rate of PLZF immunolabeled cells as nearly 20%, 40% and 12% on days 7, 28 and 42, and it provided 1.5 times increase compared to HD from day 7 to 42 on neonatal testis strips. Our MFD setup also exhibited the number of SALL4(+) SSPCs per tubule as 25.3 ± 2.4 , 22.3 ± 2.2 and 20.72 ± 1.2 on days 7 to 42, with 1.5 times enlargement as against to HD from day 7 to 42 in each time point. PMMA/PDMS double-layered pumpless MFD revealed the presence of spermatogonia (with 40% PLZF immune labeling) in tubules after 28 days of follow-up when used with allogeneic neonatal mouse SSC-seeded decellularized testicular tissues. Our 28-day PLZF findings by FCM are

in accordance with the previous study. Another double PDMS-layered pumpless MFD provided GFR α 1(+) undifferentiated spermatogonia number per tubule as near to 2, and GFR α 1(+)/EdU(+) proliferative SSC number per tubule as 1.5 and 1.2 in MFD and ALI platforms, respectively, on day 56 [19]. They evaluated SSCs on day 56 from an interval between 0 and 5 days postnatally; thus, the time period is not precise to be compared with our study. GFR α 1 marker labels only the SSCs, including A_{single} , A_{paired} and barely A_{al4} spermatogonia, but not A_{al8} and A_{al16} spermatogonia [41]. Though, SALL4 is specific for both the stem and progenitor cell population from A_{single} to A_{al16} in rodents [42]. The number of SALL4(+) SSPCs is naturally higher in our study when compared to GFR α 1(+) SSCs and our 42-day time point is earlier than day 56. Though the time point is not the same, the stem cell number is obviously high in our system showing superior performance that could attribute to short width of the organ chamber that may provide higher diffusion capacity comparing to previous system [19]. Taken together, all three studies confirm the good performance of the pumpless systems on the maintenance of spermatogonial pool in vitro. Our study further demonstrates in time change of the whole SSPC pool from day 7 to 42 in a complete mouse spermatogenic cycle that detail the pool enlargement success for possible personalized clinical use such as autologous or allogeneic cell therapies. This study reveals for the first time the efficiency of BMS-CM on the new MFD in terms of induction of SSPC pool in prepubertal testes.

Our recent study revealed a limited capacity of HD culture platform for a complete spermatogenic cycle up to 42 days with enlargement of SSPC pool for 28 days in neonatal mouse testes. Thus, HD allowed a progressive enrichment of SSPC pool from day 7 to 28 with a lower performance than MFD. HD setups maintained the spermatogonial and Sertoli cells in vitrified-warmed adult goat testes [12]; increased OCT4(+), Ki67(+) and AP2-gamma(+) proliferative spermatogonial progenitor cells in gestational 7–12 week human fetal testis [43]; sustained Ki67 and BrdU(+) proliferative GCs with no increase in cCaspase3(+) apoptotic cells from adult human healthy and cancer testicular samples [14] up to 14 days. Our 7- and 28-day results on SSPC amount are parallel to those studies in terms of increase in mitotic GCs shown by different labels. Here in, our HD setup ameliorates the PLZF(+) cell percentage and SALL4(+) cell number on neonatal mouse testis 2 times compared to ALI platform of the previous study from day 7 to 42 [30]. Human [13] and rat [11] neonatal testis ALI setups preserved of PLZF immunolabeled SSPCs up to 50 and 42 days, respectively. Those qualitative results are similar with our 42-day results on HD platform. Our HD

setup not only caught the success of ALI, but also demonstrated a better performance in terms of SSPC survival for 42 days that may be due to daily refreshment of medium at high volume (up to 200 μ l) when compared to weekly changes at a volume of 1 ml [11, 13, 30]. Thus, we suggest a slightly superior performance of HD platform when compared to ALI for enlargement of SSPC pool in neonatal mice since testicular strips are directly exposed to medium, while diffusion-based nutrition intake is the basic principle in ALI setup. The testis fragments take dome-like shape on agarose gel during the culture in interphase method that causes inadequate diffusion into central regions. HD platform allowed a homogenous distribution of SSPCs in both central and peripheral parts of the strips with no disturbance in testicular shape. This presents strong evidence for HD to be superior to ALI as static culture platform in terms of ex vivo stem/progenitor cell survival in testis. However, HD may not support ex vivo personalized cell therapies properly since the allogeneic BMSC-CM did not even perform well in terms of SSPC pool enlargement compared to MFD according to our data.

Here, we report that BMSC-CM-supported MFD induces both spermatogenesis and testicular maturation in terms of increased percentages of VASA(+) total GCs [44, 45] and c-Kit(+) differentiating spermatogonia, the numbers of spermatocytes and spermatids, and tubular and luminal diameter and testosterone concentration for 42 days. We assessed the proliferation of progenitor cells and onset of meiosis by spermatocyte formation on day 7 (13-dpp) and production of spermatids on day 28 (34-dpp) for a complete spermatogenic cycle in prepubertal C57BL/6 mice [46]. We evaluated maintenance of SSPCs, IVS and testicular maturation until day 42 (48-dpp) in order to interpret post-cycle progression of IVS and to establish whether there is any possible delay in spermatogenic progress toward in vivo development of neonatal mice. Spermatogenesis begins from 7-dpp with the formation of SSPCs and spermatocytes from day 10 to 20 and terminates with formation of spermatids from day 18.8 to 25.3 and sperms on day 34.5 in mice in vivo [47]. The incline of spermatocytes, round spermatids and the total GC number was simultaneous with progressive enlargement of tubules and also with a decline of SSPC pool from day 28 and 42 that show the spermatogonial stem cells entering meiotic cycle. Significant augmentation in testosterone levels confirmed the functional testicular maturation within the same period. Allogeneic BMSCs presented an inferior performance on the HD platform when compared to MFD in terms of spermatogenic differentiation with decreasing number of VASA(+) GCs and testicular maturation with a lesser tubular enlargement and a lower

testosterone level measurements from day 28 to 42. Allogeneic BMSCs were not able to increase neonatal mice VASA(+) cells from day 28 to 42 when applied to ALI in our previous study [30] revealing their limited induction capacity on both ALI and HD static setups. Recent BMSC-contributed MFD noticeably improved spermatogenesis and functional maturation of testis by a nearly 2 times increase in number of spermatocytes, spermatids, ratio of c-Kit(+) and VASA(+) cells and tubular enlargement compared to ALI and HD platforms with BMSCs on day 28 of culture. BMSC-CM-supplemented MFD demonstrated a 4 times higher performance compared to ALI and HD on day 42. These results clearly suggest that allogeneic BMSCs perform better in the vicinity of the microvascular circulation, which might provide an optimal and controlled tubular distribution of stem cell secretome compared to simple diffusion of static culture setups. Therefore, the new single PDMS-layered pumpless MFD may present an effective solution for prepubertal male infertility as a tool to precisely apply allogeneic/autologous BMSC and BMSC-CM therapy by mimicking the physiological testicular niche conditions ex vivo.

Our novel pumpless single PDMS-layered MFD is comparable in terms of IVS and testicular functional maturation to Komeya's 2 PDMS-layered syringe pumped [19] and/or pumpless [17] devices that contributed to a long-term *Acr-Gfp* transgenic neonatal mice testicular culture with successful spermatogenic differentiation in vitro. Our system increased the number of spermatocyte by 25% and spermatid by 30% on 50 seminiferous tubules and offered a ratio of VASA(+) total GCs up to 90% from day 7 to 28 maintained until day 42. A 70% increase in c-Kit(+) differentiating spermatogonia with high testosterone levels (60.5 ~ 80.4 ng/dl on day 28 and 212.3 ~ 298.7 ng/dl on day 42) confirmed progressive induction of IVS and functional maturation of testis in the same period. A two PDMS-layered pumped MFD [19] increased the ratio of GFP-expressing acrosin(+) to total seminiferous tubular area up to 50% from day 21 to 28 and then a constant expression. The study also reported the presence of SCP3(+) spermatocytes and PNA(+) spermatids (timepoint was unspecified) with a testosterone range between 2.4 and 24.0 μ g/day/g testis (0.6–5.7 ng/dl) in 2 samples (from 4 measurements) on days 28 and 35 of culture. Our 28- to 42-day induction findings on differentiating GC maintenance and testosterone production contribute to a longer-term capacity of new pumpless MFD when compared to previous pumped system. Our findings are in line with Komeya group's pumpless device that maintained 90% of *Acr-GFP*(+) and *TRA98*(+) tubules within the neonatal transgenic mice testis on week 12 [17]. In our study, the flow rate has been strictly fixed to 0.9 μ l/min by daily addition of medium to

keep the tank height as 38 mm. Komeya's pumpless MFD give a flow rate range between 0.05 and 2.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ and the pumped system a fixed flow rate as 0.05 $\mu\text{l}/\text{min}$. The higher stabilized pumpless flow rate in the recent platform might lead to further improvement in IVS after day 28 and the higher amount of testosterone production in our study compared to previous systems. Therefore, our platform successfully enlarged neonatal mouse SSPC pool and induced spermatogenesis from SSCs up to haploid spermatids for 42 days by efficient production of testosterone. Komeya's pumped [19], but not the pumpless [17] MFD has been able to produce both round/elongated spermatids and further functional performance of those haploid cells was assessed by microinsemination to adult female ICR mice in which healthy offspring were collected in a longer period comparing to our study. Our group's results are limited to 42-day-long performance of the novel pumpless MFD until haploid GC formation; however, it comprises a detailed phenotypic classification of enlarging SSPC pool and differentiating spermatogonial cells for a whole spermatogenic cycle. This study also reveals the variation in different stage GC populations throughout a complete spermatogenic cycle and shows the efficiency of the new single PDMS-layered pumpless system. BMSC-CM supplementation maximized the efficiency of the device on induction of testicular maturation including the proliferation and differentiation of SSPCs.

The generated MFD using an insert for BMSC-CM as therapeutic in a pumpless and monolayered platform induced enlargement and maintenance of the SSPC pool, testicular maturation and spermatogenesis up to round spermatids in prepubertal newborn C57BL/6 mice for 42 days in vitro. The secretory potential of BMSCs maximized the efficiency of the microfluidic system in terms of male GC production ex vivo. However, the results are limited to in vitro conditions and need to be validated in vivo in microinseminated adult female mice following further cycles of spermatogenesis. Meanwhile, the obtained GCs should be tested in terms of genetic integrity during fertilization and embryonic development of offspring. However, the new single PDMS-layered pumpless MFD demonstrated a clear optimal performance ex vivo in terms of normal distribution and statistical relevance of the obtained data and confirmed accurate flow rate that is assisted to tubular growth. Our validation results are reliable since we classified subpopulations of GCs multiple specific phenotypic markers [17, 19, 48], simultaneously assessed the testosterone production levels by LC/MS-MS [19] and tubular growth by full-quantitative histomorphometry [35, 49]. Moreover, the study presents the first and preliminary demonstration of BMSC-CM performance on IVS and may be a strong

candidate for personalized male infertility treatment in the andrology clinic. On the other hand, allogeneic and/or autologous BMSCs may still have unknown risks that need to be eliminated before translation to the clinics. The mutagenicity and metabolic content of mesenchymal secretome should be analyzed and precisely optimized in further studies prior to introduction to clinic.

Conclusion

The regenerative potential of BMSC is sustained by a new microfluidic system with a single PDMS layer, which does not require a pump and also provides high-quality imaging. The new platform induced testicular growth, self-renewal of SSPC and differentiation of spermatogenic cells up to round spermatids for a whole cycle ex vivo. We applied BMSC-CM as a model therapeutic in the current study, whereas the generated MFD might be used as a high-technology platform for validation of different personalized cell-based therapeutic agents in order to cure prepubertal and adult infertility cases. Furthermore, the new theragnostic microfluidic platform may contribute to a safe, precision-based cell and tissue banking protocol for prepubertal fertility restoration in future.

Abbreviations

SSC	Spermatogonial stem cell
SSPC	Spermatogonial stem/progenitor cell
GC	Germ cell
IVS	In vitro Spermatogenesis
PDMS	Polydimethylsiloxane
MFD	Microfluidic device
ALI	Air-liquid interphase
BMSC	Bone marrow-derived mesenchymal stem cell
BMSC-CM	Bone marrow-derived mesenchymal stem cell-conditioned medium
LC/MS-MS	Liquid chromatography/mass spectrometry- mass spectrometry
KSR	Knockout serum replacement
FBS	Fetal bovine serum
PBS	Phosphate buffer saline
Pen-strep	Penicillin-streptomycin
HD	Hanging Drop
FCM	Flow cytometry
CFD	Computational fluid dynamics
Q	Flow rate
DRIE	Deep-reactive ion etching
dpp	Days postpartum
PAS	Periodic Acid Schiff

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03356-x>.

Additional file 1: Supplementary Table 1. The information of antibodies which were used in IHC and FCM. **Supplementary Information 1.** The calculation of time-dependent flow rate with respect to the height of culture medium based on Hagen-Poiseuille equation. **Supplementary Figure 1.** Negative control micrograph presenting noni-mmunolabelling for the SALL4 SSPC marker (1000x).

Acknowledgements

Not applicable.

Author contributions

PK and SÖ generated the hypothesis of the study, designed the MFD and wrote the manuscript. HK and ACA modelled and manufactured the MFD. SÖ conducted all animal works, harvested and characterized BMSCs and performed in vitro experiments, histochemical, immunohistochemical and flow cytometric analyses. MG assisted with in vitro experiments and flow cytometric analysis. PK organized and supervised the study and analyzed the data. PK, ÖY, HK and SK critically revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

The Scientific and Technological Research Council of Turkey funded the study within the context of 1001—The Scientific and Technological Research Projects Funding Program (#2185421), and played no role in the design of the study and collection, analysis and interpretation of data and in writing the manuscript.

Availability of data and materials

The data from this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Declarations**Ethics approval and consent to participate**

All experimental procedures in all animal experiments were approved by the Local Ethical Board of Animal Experiments, Hacettepe University, Ankara, Turkey (Title of The Project: Maintaining the Microenvironment of Spermatogonial Stem Cell Microenvironment in the Testicle with Allogeneic Mesenchymal Stem Cells and Microfluidic System, approval number: 52338575-109, date of approval: September 18, 2018).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Department of Stem Cell Sciences, Hacettepe University, Ankara, Turkey. ²Department of Medical Biology, Atılım University, Ankara, Turkey. ³Department of Electrical and Electronics Engineering, Middle East Technical University, Ankara, Turkey. ⁴METU MEMS Center, Ankara, Turkey. ⁵Department of Plastic, Reconstructive, and Aesthetic Surgery, Akdeniz University, Antalya, Turkey. ⁶Department of Urology, Ankara University, Ankara, Turkey. ⁷Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Hacettepe University, Sıhhiye, Ankara 06100, Turkey.

Received: 6 March 2023 Accepted: 27 April 2023

Published online: 11 May 2023

References

1. ACS. Key Statistics for Childhood Cancers; 2022. <https://www.cancer.org/cancer/cancer-in-children/key-statistics.html>.
2. Pco ASRM. Fertility preservation in patients undergoing gonadotoxic therapy or gonadectomy: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2019;112(6):1022–33.
3. ASRM ECo. Fertility preservation and reproduction in patients facing gonadotoxic therapies: an Ethics Committee opinion. *Fertil Steril*. 2018;110(3):380–6.
4. Wasilewski-Masker K, Seidel KD, Leisenring W, Mertens AC, Shnorhavorian M, Ritenour CW, et al. Male infertility in long-term survivors of pediatric cancer: a report from the childhood cancer survivor study. *J Cancer Surv*. 2014;8(3):437–47.
5. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*. 2022;72(1):7–33.
6. Yersal N, Köse S, Horzum U, Özkavukcu S, Orwig KE, Korkusuz P. Leptin promotes proliferation of neonatal mouse stem/progenitor spermatogonia. *J Assist Reprod Genet*. 2020;37(11):2825–38.
7. Medrano JV, Rombaut C, Simon C, Pellicer A, Goossens E. Human spermatogonial stem cells display limited proliferation in vitro under mouse spermatogonial stem cell culture conditions. *Fertil Steril*. 2016;106(6):1539–49 e8.
8. Gholami K, Vermeulen M, Del Vento F, de Michele F, Giudice MG, Wyns C. The air-liquid interface culture of the mechanically isolated seminiferous tubules embedded in agarose or alginate improves in vitro spermatogenesis at the expense of attenuating their integrity. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2020;56(3):261–70.
9. Yokonishi T, Sato T, Katagiri K, Ogawa T. In vitro spermatogenesis using an organ culture technique. *Methods Mol Biol*. 2013;927:479–88.
10. Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, et al. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature*. 2011;471(7339):504–7.
11. Matsumura T, Sato T, Abe T, Sanjo H, Katagiri K, Kimura H, et al. Rat in vitro spermatogenesis promoted by chemical supplementations and oxygen-tension control. *Sci Rep*. 2021;11(1):3458.
12. Patra T, Pathak D, Gupta MK. Comparison of two culture methods during in vitro spermatogenesis of vitrified-warmed testis tissue: Organ culture vs. hanging drop culture. *Cryobiology*. 2021;100:142–50.
13. Yuan Y, Li L, Cheng Q, Diao F, Zeng Q, Yang X, et al. In vitro testicular organogenesis from human fetal gonads produces fertilization-competent spermatids. *Cell Res*. 2020;30(3):244–55.
14. Jørgensen A, Young J, Nielsen JE, Joensen UN, Toft BG, Rajpert-De Meyts E, et al. Hanging drop cultures of human testis and testis cancer samples: a model used to investigate active treatment effects in a preserved niche. *Br J Cancer*. 2014;110(10):2604–14.
15. de Michele F, Poels J, Vermeulen M, Ambroise J, Gruson D, Guiot Y, et al. Haploid germ cells generated in organotypic culture of testicular tissue from prepubertal boys. *Front Physiol*. 2018;9:1413.
16. Gholami K, Pourmand G, Koruji M, Ashouri S, Abbasi M. Organ culture of seminiferous tubules using a modified soft agar culture system. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):249.
17. Komeya M, Hayashi K, Nakamura H, Yamanaka H, Sanjo H, Kojima K, et al. Pumpless microfluidic system driven by hydrostatic pressure induces and maintains mouse spermatogenesis in vitro. *Sci Rep*. 2017;7(1):15459.
18. Yamanaka H, Komeya M, Nakamura H, Sanjo H, Sato T, Yao M, et al. A monolayer microfluidic device supporting mouse spermatogenesis with improved visibility. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;500(4):885–91.
19. Komeya M, Kimura H, Nakamura H, Yokonishi T, Sato T, Kojima K, et al. Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device. *Sci Rep*. 2016;6:21472.
20. Zhankina R, Baghban N, Askarov M, Saipiyeva D, Ibragimov A, Kadirova B, et al. Mesenchymal stromal/stem cells and their exosomes for restoration of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia: a systemic review. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):229.
21. Sagaradze G, Basalova N, Kirpatovsky V, Ohobotov D, Nimiritsky P, Grigorieva O, et al. A magic kick for regeneration: role of mesenchymal stromal cell secretome in spermatogonial stem cell niche recovery. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):342.
22. Qian C, Meng Q, Lu J, Zhang L, Li H, Huang B. Human amnion mesenchymal stem cells restore spermatogenesis in mice with busulfan-induced testis toxicity by inhibiting apoptosis and oxidative stress. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):290.
23. Lu J, Liu Z, Shu M, Zhang L, Xia W, Tang L, et al. Human placental mesenchymal stem cells ameliorate chemotherapy-induced damage in the testis by reducing apoptosis/oxidative stress and promoting autophagy. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):199.
24. Sherif IO, Sabry D, Abdel-Aziz A, Sarhan OM. The role of mesenchymal stem cells in chemotherapy-induced gonadotoxicity. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):196.
25. Hassan AI, Alam SS. Evaluation of mesenchymal stem cells in treatment of infertility in male rats. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(6):131.
26. Chen Y-T, Chuang F-C, Yang C-C, Chiang JY, Sung P-H, Chu Y-C, et al. Combined melatonin-adipose derived mesenchymal stem cells therapy effectively protected the testis from testicular torsion-induced ischemia-reperfusion injury. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):370.

27. Zhong L, Yang M, Zou X, Du T, Xu H, Sun J. Human umbilical cord multi-potent mesenchymal stromal cells alleviate acute ischemia-reperfusion injury of spermatogenic cells via reducing inflammatory response and oxidative stress. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):294.
28. Hsiao C-H, Ji AT-Q, Chang C-C, Chien M-H, Lee L-M, Ho JH-C. Mesenchymal stem cells restore the sperm motility from testicular torsion-detorsion injury by regulation of glucose metabolism in sperm. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):270.
29. Hsiao C-H, Ji AT-Q, Chang C-C, Cheng C-J, Lee L-M, Ho JH-C. Local injection of mesenchymal stem cells protects testicular torsion-induced germ cell injury. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6(1):113.
30. Önen S, Köse S, Yersal N, Korkusuz P. Mesenchymal stem cells promote spermatogonial stem/progenitor cell pool and spermatogenesis in neonatal mice in vitro. *Sci Rep*. 2022;12(1):11494.
31. Huang S, Xu L, Sun Y, Wu T, Wang K, Li G. An improved protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *J Orthop Transl*. 2015;3(1):26–33.
32. Sareen N, Sequiera GL, Chaudhary R, Abu-El-Rub E, Chowdhury SR, Sharma V, et al. Early passaging of mesenchymal stem cells does not instigate significant modifications in their immunological behavior. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):121.
33. Dreila K, Stanaszek L, Nowakowski A, Kuczynska Z, Lukomska B. Experimental strategies of mesenchymal stem cell propagation: adverse events and potential risk of functional changes. *Stem Cells Int*. 2019;2019:7012692.
34. Yang YK, Ogando CR, Wang See C, Chang TY, Barabino GA. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):131.
35. Tamadon A, Mehrabani D, Rahmani F, Jahromi AR, Panahi M, Zare S, et al. Induction of spermatogenesis by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in Busulfan-induced azoospermia in hamster. *Int J Stem Cells*. 2015;8(2):134–45.
36. Houlihan DD, Mabuchi Y, Morikawa S, Niibe K, Araki D, Suzuki S, et al. Isolation of mouse mesenchymal stem cells on the basis of expression of Sca-1 and PDGFR- α . *Nat Protoc*. 2012;7(12):2103–11.
37. Naeemi S, Sabetkish S, Kiani MJ, Dehghan A, Kajibafzadeh AM. Ex-vivo and in-vivo expansion of spermatogonial stem cells using cell-seeded microfluidic testis scaffolds and animal model. *Cell Tissue Bank*. 2022.
38. Hobbs RM, Fagoonee S, Papa A, Webster K, Altruda F, Nishinakamura R, et al. Functional antagonism between Sall4 and Plzf defines germline progenitors. *Cell Stem Cell*. 2012;10(3):284–98.
39. Monsefi M, Fereydouni B, Rohani L, Talei T. Mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous tubules of sterile rats. *Iran J Reprod Med*. 2013;11(7):537–44.
40. Vahdati A, Fathi A, Hajihoseini M, Aliborzi G, Hosseini E. The regenerative effect of bone marrow-derived stem cells in spermatogenesis of infertile hamster. *World J Plast Surg*. 2017;6(1):18–25.
41. Ibtisham F, Honaramooz A. Spermatogonial stem cells for in vitro spermatogenesis and in vivo restoration of fertility. *Cells*. 2020;9(3):745.
42. Tseng Y-T, Liao H-F, Yu C-Y, Mo C-F, Lin S-P. Epigenetic factors in the regulation of prospermatogonia and spermatogonial stem cells. *Reproduction* (Cambridge, England). 2015;150.
43. Jørgensen A, Nielsen JE, Perlman S, Lundvall L, Mitchell RT, Juul A, et al. Ex vivo culture of human fetal gonads: manipulation of meiosis signalling by retinoic acid treatment disrupts testis development. *Hum Reprod*. 2015;30(10):2351–63.
44. Castrillon DH, Quade BJ, Wang TY, Quigley C, Crum CP. The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(17):9585–90.
45. Tanaka SS, Toyooka Y, Akasu R, Katoh-Fukui Y, Nakahara Y, Suzuki R, et al. The mouse homolog of Drosophila Vasa is required for the development of male germ cells. *Genes Dev*. 2000;14(7):841–53.
46. Cooke H, Saunders P. Mouse models of male infertility. *Nat Rev Genet*. 2002;3:790–801.
47. Margolin G, Khil PP, Kim J, Bellani MA, Camerini-Otero RD. Integrated transcriptome analysis of mouse spermatogenesis. *BMC Genom*. 2013;15:39.
48. Robinson M, Bedford E, Witherspoon L, Willerth SM, Flannigan R. Using clinically derived human tissue to 3-dimensionally bioprint personalized testicular tubules for in vitro culturing: first report. *F S Sci*. 2022;3(2):130–9.
49. Montoto LG, Arregui L, Sanchez NM, Gomenio M, Roldan ER. Postnatal testicular development in mouse species with different levels of sperm competition. *Reproduction*. 2012;143(3):333–46.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



EK 9: Tez kapsamında üretilen yayınlar – II (Ulusal patent başvurusu belgesi)

PATENT BAŞVURUSU			
Tahakkuk No	751758	Başvuru Numarası	
Evrak Numarası	2021-GE-162415	Evrak Tarihi	
Erken Yayın Talebi	Hayır, başvurum 18 aylık süre dolduktan sonra yayımlansın.	Başvuru ile Birlikte Araştırma/İnceleme Talebi	
Tarifname Dili	Türkçe	Genetik Kaynak	
Tarifname Sayfa Sayısı	17	Kaynağın / Bilginin Coğrafi Kökeni	-
İstem Sayısı	7	Kamu Desteği	Hayır
Resim Sayfa Sayısı	7	Destek Sağlayan Kamu Kurumu	-
		Proje Numarası	-
Patent Sınıfı	-		
Referans No	P20/0967		
BULUŞ BAŞLIĞI / ÖZETİ			
Buluş Başlığı	TEK PDMS TABAKALI POMPASIZ MİKROAKIŞKAN SİSTEMİ		
Buluş Özeti	Buluş; vücut dışında testisteki spermatogonyal kök hücre mikroçevresinin devamlılığını sağlanacağı tek PDMS tabakalı pompasız mikroakışkan sistemi ile ilgilidir.		
BULUŞ SAHİPLERİ			

EK 10: Tez kapsamında üretilen yayınlar – II (Uluslararası patent başvuru belgesi)



Receipt of Electronic Submission

The Receiving Office (RO/TR) acknowledges the receipt of a PCT International Application filed using ePCT-Filing. An Application Number and Date of Receipt have been automatically assigned (Administrative Instructions, Part 7).

Submission Number:

Application Number:

Date of Receipt:

Receiving Office:

Your Reference:

Applicant:

Number of Applicants:

Title:

Documents Submitted:

Submitted by:

Timestamp of Receipt:

Official Digest of Submission:

EK 11 : Tez çıktıların sunulduğu ASRM 2022 Kongresi bildirisi özeti

CONCLUSIONS: Poor surgical ergonomics can predispose surgeons to chronic pain, discomfort, and ultimately shorten operating careers. The 4K-3D exoscope was associated with decreased neck flexion, rotation, and perceived surgical discomfort. Optic and teaching aid ratings were also found to be superior with the exoscope. While this study showed quantitative differences and clear male fertility surgeon/trainee preferences, further investigation is required to determine impacts in other urological specialties.

IMPACT STATEMENT: The 4K-3D exoscope technology shows great promise in improving surgical ergonomics and augmenting educational experience in the realm of male fertility surgery.

ORAL ABSTRACT SESSION: REGENERATIVE MEDICINE AND STEM CELLS

O-85 10:45 AM Monday, October 24, 2022

PERTURBATION OF DNA METHYLTRANSFERASES IN HUMAN TROPHOBLAST STEM CELLS LEADS TO A FAILURE OF TROPHOBLAST DIFFERENTIATION - A PUTATIVE CAUSE FOR HUMAN MISCARRIAGE.

Yu Jin Jang, PhD,¹ Philip Spinelli, BS,² Martha Susiarjo, PhD,² Winifred Mak, MD, PhD³ ¹UT Austin, Austin, TX; ²University of Rochester School of Medicine and Dentistry, Rochester, NY; ³University of Texas Dell Medical School, Women's Health, Austin, TX.

OBJECTIVE: To investigate the role of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) in the etiology of miscarriages using a novel human trophoblast stem cell (TSC) model. The DNMTs are an important family of proteins that catalyze the transfer of methyl groups to specific CpG structures in DNA (DNA methylation). DNMT1 has an essential function in development to maintain proper DNA methylation during cell divisions. Prior studies have shown that human chorionic villi from sporadic miscarriages have a 50% reduction of DNMT1 protein with a concomitant decrease in global DNA methylation compared to chorionic villi from control pregnancies (elective terminations). Based upon the prior observation, our study investigated the effect of depleting DNMT1 protein in human TSCs, an new *in-vitro* model of early human placentation. Human TSC cells represent the cytotrophoblasts in the human placenta and can be differentiated into extravillous trophoblast (EVT) and syncytiotrophoblast (ST), recapitulating the early *in-vivo* events in human placentation.

MATERIALS AND METHODS: A previously characterized female TSC cell line (from first trimester chorionic villi) was used in our experiments. Depletion of DNMT1 protein was carried out using RNAi by lentiviral-mediated transduction with DNMT1 shRNAs (Sigma). The control was the female TSC cell line transduced with a scrambled shRNA construct. The DNMT1 knockdown (KD) TSC cells were cultured for 13 days to observe their proliferation capacity. TSC differentiation to EVT and ST lineages was carried out after day 3 of transduction. Pyrosequencing assays were used to quantify DNA methylation globally and at imprinted genes in TSCs cultured for 13 days. Expression of TSC and EVT/ST specific gene were assessed using real-time RT-PCR in KD and control TSC, EVT and ST cells. Statistical analysis: The mean DNA methylation at CpG sites were compared using paired student t-test. Unpaired student t-test was used to compare gene expression data.

O-86 11:00 AM Monday, October 24, 2022

A CELL THERAPY ASSISTED NOVEL MICROFLUIDIC DEVICE PROMOTES *IN VITRO* SPERMATOGENESIS IN NEONATAL MICE.

Selin Onen, PhD, Candidate,¹ Ali Can Atik, PhD, Student,² Merve Gizer, PhD, Candidate,³ Sevil Köse Asst., Prof.,⁴ Onder Yaman, Prof.,⁵ Haluk Külah, Prof.,² Petek Korkusuz, MD, PhD⁶ ¹Hacettepe University / Atilim University, Ankara, Turkey; ²Middle East Technical University, Faculty of Engineering, Ankara, Turkey; ³Hacettepe University, Graduate School of Health Sciences, Ankara, Turkey; ⁴Atilim University, Faculty of Health Sciences, Golbasi, Turkey; ⁵University of Ankara, School of Medicine, Ankara, Turkey; ⁶Hacettepe University, Faculty of Medicine, Ankara, Turkey.

OBJECTIVE: Chemo-radiotherapy applications result in permanent infertility in half of male pediatric cancer survivors¹. Spermatogonial stem cells (SSC) constitute the only option for fertility preservation since spermatogenesis is not initiated yet². The rationale of study is that bone marrow derived mesenchymal stem cells (BMMSC) have similar embryonic origin and gene expression profile with Sertoli cells^{3,4} that play crucial role in proliferation of SSCs, and microfluidic devices (MD) simulate microvascular flow in the body that could promote for *in vitro* spermatogenesis (IVS). We hypothesized that, syngeneic BMMSC-conditioned medium (BMMSC-CM) contributed monolayer pumless MD leads to survival, expansion and differentiation of SSC pool *in vitro*.

In this study we combined MSC's paracrine contribution with MDs' amelioration. We aimed to design and validate a novel pumless and monolayer MD in which syngeneic BM-MSC-CM supports spermatogenesis of neonatal C57BL/6 mice testes and to evaluate the efficiency of platform.

MATERIALS AND METHODS: Hacettepe University Ethical Board approved the study (#52338575-109). Dynamic PDMS-based MD with an insert for cellular secretome was designed to test BM-MSC-CM induced spermatogenesis-on-chip platform comparing to static hanging drop set up. Testicular strips were cultured for days 7-42. Epithelial thickness of seminiferous tubules and luminal diameter, number of SSCs, differentiating and total germ cells and testosterone level in culture media by flow cytometry, histology and LC-MS/MS evaluated efficacy of the system. One-way ANOVA and Kruskal Wallis tests analyzed parametric and nonparametric correlative outputs, respectively.

RESULTS: The novel pumless monolayer MD has been successfully optimized for organ chamber size and vascular flow rate parameters and our group applied for patent (#PCT/TR2022/050188). MD provided higher spermatogenic cell numbers in all time intervals comparing to static conditions ($p < 0.005$). BMMSC-CM and MD induce tubular epithelial thickness, luminal diameter, number of spermatogonium, spermatocyte, spermatid and SALL4 immune labeled SSCs comparing to controls from day 7 to 42 ($p < 0.005$). The correlated increase in PLZF, c-Kit and VASA immune labeling by flow cytometry and high testosterone levels by LC-MS confirmed induced spermatogenesis from day 7 to 42 ($p < 0.005$).

CONCLUSIONS: In conclusion, the overall outputs revealed that syngeneic BMMSC derived cell therapy-assisted novel MD platform can promote survival, expansion of SSC pool and IVS up to round spermatids during 42 day-long culture.

9.ÖZGEÇMİŞ

Eğitim

- 2019-** Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Bilimleri AbD, Doktora
- 2017- 2019** Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Bilimleri AbD., YL
- 2011- 2017** Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Lisans
- 2007- 2011** Ankara Atatürk Anadolu Lisesi, Fen Bilimleri Alanı

Deneyim

- 2019-2023** Atılım Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AbD, Araştırma Görevlisi
-

Tez

2021- 2023 Doktora Tezi- Kök Hücre Bilimleri AbD., Tez Başlığı: Allojenik Mezenkimal Kök Hücreler ve Mikroakışkan Sistemle Vücut Dışında Testisteki Spermatogonyal Kök Hücre Mikroçevresinin Devamlılığının Sağlanması, Danışman: Prof. Dr. Petek Korkusuz

2018- 2019 Yüksek Lisans Tezi- Kök Hücre Bilimleri AbD., Tez Başlığı: Mezenkimal Kök Hücrelerin *in vitro* Koşullarda Testis Mikroçevresi ve Spermatogonyal Kök Hücre Havuzunun Korunmasına Etkisinin Araştırılması

Burslar

2022- TÜBİTAK 1005 Ulusal Yeni Fikirler ve Ürünler Araştırma Destek Programı. Proje Numarası: 321S058, Proje Adı: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Tedavisi İçin Kontrollü ACPA İlaç Taşıyıcı Sistem Temelli Teknoloji Platformu Geliştirilmesi, Doktora Bursiyeri, Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Petek Korkusuz.

2019- 2021 TÜBİTAK 1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı, Proje Numarası: 218S421, Proje Adı: Allojenik Mezenkimal Kök Hücreler ve Mikroakışkan Sistemle Vücut Dışında Testisteki Spermatogonyal Kök Hücre Mikroçevresinin Devamlılığının Sağlanması, Doktora Bursiyeri, Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Petek Korkusuz.

2019- 2021 TÜBİTAK 3501 Kariyer Geliştirme Programı, Proje Numarası: 119S182, Proje Adı: Kemik İliği Hedefli Endokannabinoid Yüklü Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemin Geliştirilmesi ve *in vitro* Analizi, Doktora Bursiyeri, Proje Yürütücüsü: Dr. Öğr. Üyesi Sevil Köse.

2017- 2018 TÜBİTAK 2544 Japon Bilimi Destekleme Kurumu (JSPS) İkili İş Birliği Programı, Proje Numarası: 215S834, Project Adı: Osteoindüktif

Nanoseramikler ve Kemik Morfojenik Proteini (BMP) Kombinasyonu ile Kemik Rejenerasyonu İçin Yeni Bir Teknolojinin Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Bursiyeri Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Petek Korkusuz.

Yer Alınan Projeler

1. Küçük Hücreli Dışı Akciger Kanseri Tedavisi İçin Kontrollü ACPA İlaç Taşıyıcı Sistem Temelli Teknoloji Platformu Gelistirilmesi, -Tübitak 1005, Ulusal yeni fikirler ver ürünler araştırma destek projesi, 321S058, 2022 (Devam Ediyor), Bursiyer
2. AD ve Hava Sıvı İnterfaz Tekniğiyle Tasarlanmış Fare Epididimal Beyaz Yağ Dokusu Testis Kokültür Sistemlerinin İn Vitro Spermatogenez Açısından Karşılaştırılması, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinasyon Birimi, 2021- 2022; Araştırmacı
3. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Kaynaklı İnsan Spermatogonyal Kök Hücrelerinin Veriminin İnfertilite Tedavisi için Kannabinoidler Aracılığıyla Arttırılması, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinasyon Birimi, 2021- devam ediyor; Araştırmacı (TSA-2021-19204)
4. Allojenik mezenkimal kök hücreler ve mikroakışkan sistemle vücut dışında testisteki spermatogonyal kök hücre mikro çevresinin devamlılığının sağlanması, TÜBİTAK, 1001 Projesi, 2018S421, 2019-2021; Bursiyer
5. Kemik İliği Hedefli Endokannabinoid Yüklü Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemin Geliştirilmesi ve *In Vitro* Analizi, TÜBİTAK 3501, 2019-2021; Bursiyer (119S182)

6. Fare Testisi Mikroskop Görüntülerinden Görüntü İşleme Teknikleri ile Tübül ve Spermatogonyal Kök Hücre Tespiti, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinasyon Birimi, 2019-2021; Araştırmacı, (TYL-2019-18375)
7. Mezenkimal kök hücrelerin *in vitro* koşullarda testis mikroçevresi ve spermatogonyal kök hücre havuzunun korunmasına etkisinin araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinasyon Birimi, 2018-2019, Tez Öğrencisi (TYL-2018- 17531)
8. Osteoindüktif nanoseramikler ve kemik morfojenik proteini BMP kombinasyonu ile kemik rejenerasyonu için yeni bir teknolojinin geliştirilmesi, TÜBİTAK 2544, Japonya ile Uluslararası İkili İş Birliği Projesi, 2017 – 2019; Bursiyer, (215S834)

Yayınlar (Uluslararası ve Ulusal Dergilerde)

1. **Önen, S.**, Atik, A.C., Gizer, M., Köse, S., Yaman, Ö., Külah, H., Korkusuz, P., (2022). A Pumpless Monolayer Microfluidic Device Based on Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium Promotes Neonatal Mouse *in vitro* Spermatogenesis, Stem Cell Research & Therapy, (Araştırma Makalesi), (*minör revizyon*).
2. Kahveci B, **Önen S**, Akal F, Korkusuz P. Detection of spermatogonial stem/progenitor cells in prepubertal mouse testis with deep learning. J Assist Reprod Genet. 2023 Mar 30. doi: 10.1007/s10815-023-02784-1. Epub ahead of print., (Araştırma Makalesi), PMID: 36995558.
3. Külekci Ç, Özer S, **Önen S**, Korkusuz P, Yılmaz T. Topical Intranasal Insulin Enhances Healing of Nasal Mucosa: An Experimental Animal Study. Am J Rhinol Allergy. 2022 Nov 16:19458924221139018. doi: 10.1177/19458924221139018. Epub ahead of print, (Araştırma Makalesi), PMID: 36384319.

4. Mesenchymal stem cells promote spermatogonial stem/progenitor cell pool and spermatogenesis in neonatal mice in vitro. (2022)., **Önen Selin**, Köse Sevil, Yersal Nilgün, Korkusuz Petek. Sci Rep. 2022 Jul 7;12(1):11494. doi: 10.1038/s41598-022-15358-5, (Araştırma Makalesi), PMID: 35798781.
5. Targeted mesoporous silica nanoparticles for improved inhibition of disinfectant resistant *Listeria monocytogenes* and lower environmental pollution. (2021)., Sudagidan M, Yildiz G, **Önen S**, Al R, Temiz ŞN, Yurt MNZ, Tasbasi BB, Acar EE, Coban A, Aydın A, Dursun AD, Ozalp VC., J Hazard Mater., Sep 15;418:126364. doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.126364. Epub 2021 Jun 9. (Araştırma Makalesi), PMID: 34329020.
6. Comparison of Hematopoietic and Spermatogonial Stem Cell Niches from the Regenerative Medicine Aspect. (2018)., Köse Sevil, Yersal Nilgün, **Önen Selin**, Korkusuz Petek, Advances in experimental medicine and biology, Edition:3, ISBN:978-3-030-04184-7, (Kitap Bölümü)
7. Methods in Molecular Biology, Skin Stem Cells, Department Name:(Magnetic Based Cell Isolation Technique for The Selection of Stem Cells) (2018)., Korkusuz Petek, Köse Sevil, Yersal Nilgün, **Önen Selin**, Springer Protocols, Issue Number: 1, Page Number 463, ISBN:978-1-4939-8870-9, (Kitap Bölümü)

Konferans/ Kongre Bildirileri (Uluslararası ve Ulusal)

1. **Önen, S.**, Atik, A.C., Gizer, M., Köse, S., Yaman, Ö., Külâh, H., Korkusuz, P., (2022). A Cell Therapy Assisted Novel Microfluidic Device Promotes in vitro Spermatogenesis in Neonatal Mice, American Society for Reproductive Medicine Scientific Congress & Expo (ASRM 2022), Proceeding Book, Fertility and Sterility, Volume 118, Issue 4, e35 - e36 (Özet Bildiri Kitabı, Sözlü Sunum)

2. **Önen Selin**, Köse Sevil, Yersal Nilgün, Korkusuz Petek (2022). Mesenchymal Stem Cells Induce in vitro Spermatogenesis on Indirect Air liquid Interphase Platform. 15th National, 1st International Congress of Histology and Embryology (NICHE2022) (Tam Metin Bildiri Kitabı / Sözlü Sunum)
3. Daldal, O. E., Yersal N., **Önen, S.**, Gizer, M., Korkusuz, P., Epididimal Beyaz Yağ Dokusunun In Vitro Spermatogenez Üzerine Etkisinin İki Farklı Kültür Platformunda Karşılaştırılması, NICHE 2022,15. Ulusal ve 1.Uluslararası Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Mayıs 26-28 2022, Kongre Kitabı ss229-230, bildiri no: 203 (Tam Metin Bildiri Kitabı / Sözlü Sunum)
4. Külekçi Çağrı, Özer Serdar, **Önen Selin**, Korkusuz Petek (2022). Topical Intranasal Insulin Enhances The Healing of Nasal Mucosa. 15th National, 1st International Congress of Histology and Embryology (NICHE2022) (Tam Metin Bildiri Kitabı / Poster Sunum)
5. **Önen Selin**, Petek Korkusuz (2021). Mesenchymal Stem Cells Promote Proliferation Of Spermatogonial Stem/Progenitor Cells And Spermatogenesis in vitro. In vitro germ cell maturation (IVGCM) webinar, (Konuşmacı)
6. **Önen Selin**, Köse Sevil, Korkusuz Petek (2019). A Novel Mesenchymal Stem Cell Contributed Co- Culture System Provides Enlargement and Maintenance of Spermatogonial Stem Cell Pool in vitro. 24th International Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED 2019) (Özet Bildiri Kitabı / Sözlü Sunum)
7. **Önen Selin**, Köse Sevil, Korkusuz Petek (2019). Mesenchymal Stem Cells Protect Testicular Spermatogonial Stem Cell Niche in vitro. ISSCR 2019 Annual Meeting (Özet Bildiri Kitabı / Poster Sunum)

8. **Önen Selin**, Köse Sevil, Korkusuz Petek (2019). Protective Effect of Testicular Coculture with Mesenchymal Stem Cells on Microenvironment of Spermatogonial Stem Cells. 24th National Electron Microscopy Congress (EMK 2019) (Özet Bildiri Kitabı / Sözlü Sunum)
-

Katılınan Kongreler/Kurslar

1. ASRM, *American Society for Reproductive Medicine Scientific Congress & Expo*, 22-26 Ekim 2022, Anaheim/ABD
 2. NICHE, 15. Ulusal ve 1. Uluslararası Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 26-28 Mayıs 2022, Çevrimiçi
 3. BIOMED, 24th *International Biomedical Science and Technology Symposium*, 17-20 Ekim 2019, İzmir/Türkiye
 4. Erkek İnfertilitesi İçin Kök Hücreler, She 4 He, 11-13 Aralık 2019, Ankara/Türkiye.
 5. ISSCR, *International Society of Stem Cell Research*, 25-29 Haziran 2019, Los Angeles/ABD
 6. Uluslararası katılımlı 24. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi (EMK 2019), 24- 26 Nisan 2019, Edirne/Türkiye.
-

Sertifikalar

1. IVGCM, *In vitro* Germ Cell Maturation Çalıştayı, 2021, Çevrimiçi.
 2. Akım Sitometri Tekniğinin Üreme Biyoteknolojisinde Kullanım Alanları, Beckman Coulter Life Sciences, 2018, Ankara/Türkiye.
 3. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Kurs Kategorisi: B, Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu, 04.06.2018-12.06.2018
-

Laboratuvar Deneyimleri

Hücre/Organ Kültürü Teknikleri: Fare kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre izolasyonu, insan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre izolasyonu, adherent ve süspanse hücre kültürü ve karakterizasyonu, yenidoğan/erişkin fare testis/epididimal beyaz yağ dokusu izolasyonu, AD, hava-sıvı interfaz ve MaS'ta testis kültürü, insan/fare mezenkimal kök hücrelerinde adipojenik, osteojenik yönde farklılaştırma protokolleri.

Histolojik Teknikler: Histokimyasal boyamalar (hematoksilen eozin, Masson Trikrom, Periyodik Asit *Schiff*), immünhistokimyasal işaretlemeler, doku fiksasyonu ve takibi, parafine gömme, parafin kesit alma, kriyokesit için doku takibi ve OCT'ye doku gömme, kriyostatta kesit alma, ışık mikroskopunda histomorfometrik analiz yapma, geçirimli elektron mikroskopisi (*Transmission Electron Microscopy-TEM*) teknikleri, hücre proliferasyon-toksisite testleri, akım sitometrisi (doku/hücreden örnek hazırlığı ve analiz), MACS ile hücre izolasyonu yöntemi, ELISA tekniği.

Yetenek ve İlgiler

Bilgi Teknoloji Yetenekleri: MS Office, IBM SPSS, Graphpad Prism, Adobe Illustrator CC

Dil Yetenekleri: İngilizce (YÖKDİL)

Üyesi Olunan Bilimsel Topluluklar: Uluslararası Kök Hücre Araştırmaları Topluluğu (*International Society Stem Cell Research- ISSCR*), Amerika Üreme Tıbbı Topluluğu (*American Society for Reproductive Medicine- ASRM*)

Öğrenci Toplulukları: Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoloji ve Genetik Topluluğu (BİYOGEN), 2011-2013; Orta Doğu Teknik Üniversitesi LODOS Topluluğu, 2016.