



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

SIÇANLARDA CERRAHİ OLARAK OLUŞTURULAN
TESTİS HASARLARINDA TESTİS KAYNAKLI STROMAL
KÖK HÜCRELERİN TESTİS DOKUSUNA ETKİSİ

FARUK ALTINBAŞAK

Aralık 2022

Denizli

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA CERRAHİ OLARAK OLUŞTURULAN
TESTİS HASARLARINDA TESTİS KAYNAKLI STROMAL
KÖK HÜCRELERİN TESTİS DOKUSUNA ETKİSİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

FARUK ALTINBAŞAK

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Murat Serkant Ünal

Denizli 2022

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Faruk ALTINBAŞAK

İmza

ÖZET

SIÇANLARDA CERRAHİ OLARAK OLUŞTURULAN TESTİS HASARLARINDA TESTİS KAYNAKLI STROMAL KÖK HÜCRELERİN TESTİS DOKUSUNA ETKİSİ

Faruk ALTINBAŞAK

Yüksek Lisans Tezi, Histoloji ve Embriyoloji AD
Tez Yöneticisi: Dr. Öğr. Üyesi Murat Serkant ÜNAL

Aralık 2022, 81 Sayfa

Azospermi, infertil erkeklerin %10-20'sinde bulunan ve ejakülat ile atılan semen içerisinde spermatozoanın olmaması olarak tanımlanır. Azospermi hastalarında, sperm elde edilmesi için yapılan TESE ameliyatlarında testislerde doku kayıpları ve hasar meydana gelmektedir. Testislerde bu hasarın iyileşmesi uzun bir süre gerekmede ve testosteron seviyelerinin tekrar yükselbilmesi aylarca sürebilmektedir.

Bu çalışmadaki amacımız testisin kendi mikroçevresine ait olan stromal kök hücreleri, cerrahi olarak lezyon oluşturduğumuz testis hasarında transplante ederek etkilerini incelemektir. Stromal kök hücreler, bu lezyonların daha çabuk olarak iyileşmesine neden olabilir.

Çalışmamızda 10 haftalık 21 adet Wistar-Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubu (n:6), Cerrahi Hasar grubu (CH), CH Sağ ve CH Sol şeklinde (n:6) ve Testiküler Stromal Hücre grubu (TSC), TSC Sağ Ve TSC Sol şeklinde ayrıldı. (n:6). CH ve TSC gruplarının, sol testisine hasar verirken sağ testislerine hiçbir uygulama yapılmadı. Cerrahi olarak hasar verdiğimiz sıçanlara, testisten elde ettiğimiz testiküler stromal kök hücreler (TSC) transplante edildi. Daha sonra dokular hematoksil-eozin (H&E) ile boyandı ve Modifiye Johnsen skorlaması ile fonksiyonel yapılarıdaki iyileşme oranları değerlendirildi. TSC'lerin testis dokusu üzerindeki etkileri Kaspas 3, BCL-2 ve BAX kullanılarak immünohistokimya tekniği ile gösterildi. Testisteki serum testosteron seviyeleri ise ELISA yöntemi ile incelendi.

15. günün sonunda, CH Sol grubundaki bazı seminifer tübüllerin germ hücrelerinde dejenerasyon olduğu ve interstisyel alanların azaldığı, TSC Sol grubunda ise seminifer tübüllerin normal histolojisine yakın bir görünüme sahip olduğu belirlendi. İmmünohistokimyasal teknikle dokulardaki ekspresyonlar incelendiğinde CH Sol grubunda, Kaspas 3, BAX düzeylerinin arttığı Kontrol ve TSC Sol grubunda ise azaldığı tespit edildi. BCL-2 düzeylerinin hasar grubunda arttığı, Kontrol ve TSC Sol grubunda ise azaldığı izlendi ($p < 0.004$). Serum testosteron seviyelerinde TSC grubunda, Kontrol ve CH gruplarına göre artış olmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.119$). Bütün bunlara bağlı olarak TSC'lerin testis dokusunda oluşan cerrahi hasar üzerinde iyileştirici etkiler yaptığı görüldü.

Anahtar Kelimeler: Testis, Azospermi, İnfertilite, Testis hasarı, Testiküler stromal kök hücre

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2021SBE006).

ABSTRACT**THE EFFECT OF TESTICULAR STROMAL STEM CELLS ON TESTICULAR TISSUE IN SURGICALLY INDUCED TESTICULAR INJURIES IN RATS**

ALTINBASAK, Faruk
MSC Thesis in Histology and Embryology
Supervisor: Ast. Prof. Murat Serkant UNAL

December 2022, 81 Sayfa

Azoospermia is defined as the absence of spermatozoa in ejaculate semen, which is found in 10-20% of infertile men. In azoospermia patients, tissue loss and damage occur in the testicles in TESE surgeries performed to obtain sperm. This damage to the testicles takes a long time to heal, and it can take months for testosterone levels to rise again.

Our aim in this study is to examine the effects of transplanting stromal stem cells, which belong to the microenvironment of the testis, in the testicular damage that we have surgically created a lesion. Stromal stem cells can cause these lesions to heal more quickly.

In our study, 21 10-week-old male Wistar-Albino rats were used. The rats were divided into 3 groups. The control group (n:6) was divided into the Surgical Damage group (CH), CH Right and CH Left (n:6), and the Testicular Stromal Cell group (TSC), TSC Right and TSC Left. (n:6). While damaging the left testis of the CH and TSC groups, no application was made to the right testis. Testicular stromal stem cells (TSC) obtained from the testis were transplanted into rats that we had surgically damaged. Tissues were then stained with hematoxylin-eosin (H&E) and recovery rates in functional structures were evaluated with Modified Johnsen scoring. The effects of TSCs on testicular tissue were demonstrated by immunohistochemistry technique using Kaspas 3, BCL-2 and BAX. Serum testosterone levels in the testis were analyzed by ELISA method.

At the end of the 15th day, it was determined that there was degeneration in the germ cells of some seminiferous tubules in the CH Left group and the interstitial areas were reduced, while the seminiferous tubules in the TSC Sol group had an appearance close to the normal histology. When the expressions in the tissues were examined by immunohistochemical technique, it was determined that Kaspas 3 and BAX levels increased in the CH Sol group and decreased in the Control and TSC Sol groups. It was observed that BCL-2 levels increased in the damage group and decreased in the Control and TSC Sol groups ($p < 0.004$). Although there was an increase in serum testosterone levels in the TSC group compared to the Control and CH groups, this increase was not statistically significant ($p >> 0.119$). As a result of all these, it was observed that TSCs had curative effects on the surgical damage in the testicular tissue.

Keywords: Testis, Azoospermia, Infertility, Testicular damage, Testicular stromal stem cell

This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit through project numbers 2021SBE006.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince tezimin tüm aşamasında önerilerini ve tecrübelerini benden esirgemeyen tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Murat Serkant ÜNAL hocama sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Eğitimim boyunca bilgi ve birikimleri için Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE, Prof.Dr. Saim ÖZDAMAR, Prof.Dr. Hülya ÇETİN, Doç. Dr. Nazan KESKİN, Doç. Dr. Üyesi Nazlı ÇİL'e teşekkür ederim. Ayrıca manevi anlamda her zaman yanımda olan ve fikirlerini esirgemeyen Prof.Dr. Hülya ÇETİN'e teşekkürü borç bilirim.

Tezimin içeriğinin düzenlenmesinde, sonuçlarımın analizinde ve tezin her konusunda manevi açıdan destek olan, yol gösteren ve bilgilerini paylaşan Dr. Öğr. Üyesi Emine Nazlı HAYIRLI ÖZYOL'a ve Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin Erdiç BEŞİKÇİOĞLU'na sonsuz teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarımda, tezimin yazılmasında ve deneylerin her aşamasında bana yardım eden ve destek olan, Arş. Gör. Semih TAN'a, yüksek lisans arkadaşım Gül YILDIRIM'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca istatistiksel analizimi yapan Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Yavuz'a, ELISA yönteminde desteklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Mücahit SEÇME'ye, Pamukkale Üniversitesi Histoloji Anabilim Dalında yüksek lisans yapan diğer arkadaşlarıma ve Asistan arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

Bu süreçte manevi açıdan desteğini esirgemeyen çok değerli arkadaşım Esra ARAR'a sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Beni bugünlere getiren, maddi ve manevi açıdan destek olan, yardımlarını esirgemeyen ve her zaman arkamda olan sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	V
ABSTRACT	VI
TEŞEKKÜR	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ	XI
SİMGELER VE KISALTMALAR	XII
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç.....	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Testis Anatomisi.....	3
2.2. Testis Embriyolojisi.....	4
2.3. Testis Histolojisi.....	6
2.3.1. Seminifer Tübüller.....	7
2.3.2. Sertoli Hücreleri (Destek Hücreleri).....	8
2.3.3. Spermatojenik Hücreler.....	9
2.3.4. Spermiyogenez.....	11
2.3.5. Olgun (Matür) Sperm.....	12
2.4. Spermatogenezin Hormonal Kontrolü.....	13
2.5. İnterstisyum ve Leydig Hücreleri.....	14
2.6. Testis Histofizyolojisi.....	15
2.7. Azospermi.....	16
2.7.1. Azosperminin Etiyolojisi.....	17
2.7.2. Azosperminin Epidemiyolojisi.....	17
2.8. Kök Hücreler.....	18
2.8.1. Kök Hücrelerin Özellikleri.....	19
2.8.1.1. Plastisite (Farklanma).....	19
2.8.2. Kök Hücre Belirteçleri.....	21
2.9. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH).....	22
2.10. Spermatojenik Kök Hücreler.....	23
2.11. Testiküler Stromal Kök Hücreler.....	24

2.12. Hipotezler	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Etik Kurul ve Bilimsel Araştırma Proje Desteği	26
3.2. Deney Hayvanları ve Bakım Şartları	26
3.3. Testiküler Stromal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Kültüre Edilmesi	26
3.3. Deneysel Uygulamalar	28
3.3.1. Deney Grupları	28
3.3.2. Testis Dokusunun Çıkarılması	29
3.3.3. Solüsyonların Hazırlanması	30
3.3.4. Histolojik İnceleme için Dokuların Hazırlanması	30
3.4. Serum Testosteron Düzeyinin Ölçülmesi	31
3.5. Uygulanan Yöntemler	32
3.5.1. Doku Takibi Tekniği	32
3.5.2. Hematoksilen-Eozin Boyama	32
3.5.3. İmmünohistokimyasal Tekniğinin Uygulanması	33
3.6. Modifiye Johnsen Skorlanması	34
3.8. İstatiksel Analiz	36
4. SONUÇLAR	36
4.1. Testiküler Stromal Kök Hücrelerin Kültürü ve Karakterizasyonu	36
4.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Sonuçları	38
4.3. Modifiye Johnsen Skorunun Değerlendirilmesi	42
4.4. İmmünohistokimyasal Boyama Sonuçları	43
4.4.1. BAX Ekspresyonu	43
4.4.2. BCL-2 Ekspresyonu	46
4.4.3. Kaspas 3 Ekspresyonu	49
4.5. Serum Testosteron Seviyelerinin Karşılaştırılması	53
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ	61
7. KAYNAKÇA	62
8. ÖZGEÇMİŞ	66
9. EKLER	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.3: İnsan testisin ve epididimisinin baş ve gövdesinin H&E ile boyanmış sagittal kesiti (Ross ve Pawlina 2011).....	7
Şekil 2.3 1: Seminifer tübülün genel görünümü (enine kesit) (Eroschenko ve Di Fiore 2013).....	8
Şekil 2.3.2: Sertoli hücresi ve etrafındaki hücrelerin ince yapısı (Eroschenko ve Di Fiore 2013).....	9
Şekil 2.3.3: Seminifer tübülde yer alan spermatojenik seri hücreleri (Junqueira 2006).....	10
Şekil 2.3.5: Olgun spermatozoanın yapısı (Ross ve Pawlina 2011).....	13
Şekil 2.10: İnterstisyel/peritübüler hücrelerin SKH nişine katkıları (Potter ve DeFalco 2017).....	24
Şekil 3.3: Testis dokusundan TSC'lerin izole edilmesi.....	27
Şekil 3.3.2: Cerrahi lezyon oluşturulan testisler.....	30
Şekil 4.1.2: Testisten izole edilen stromal kök hücrelerin flow sitometri analizi ile immünofenotiplendirilmesi.....	37
Şekil 4.1.3: Testisten izole edilen stromal kök hücrelere ait flow sitometri analizi sonuçlarının grafik görüntüleri.....	38
Şekil 4.2.1: Kontrol grubundan alınan testis kesitinde normal görünüme sahip seminifer tübüller ve interstisyel aralık. a) X10, b) X40, c) X60; spermatojenik seri hücreler (kalın ok), interstisyel aralık (ince ok), seminifer tübülün dolu lümeni (ok başı), H&E boyası.	39
Şekil 4.2 2: CH Sol grubundan alınan testis kesitinde (a-b), Kontrol grubuna benzerlik gösterse de bazı alanlarda seminifer tübüllerdeki spermatojenik seri bozulmuş ve lümen boştu. Hatta bazı seminifer tübüllerde sadece spermatogonyumların varlığı ile karşılaşıldı (c-d). Ayrıca interstisyel alandaki dokuda ve Leydig hücrelerinde azalma olduğu görülmektedir. a) X10, b) X20, c) X40, d) X60; spermatojenik seri (kalın ok), interstisyel aralık (ince ok), seminifer tübülün lümeni (ok başı), H&E boyası.....	40
Şekil 4.2.3: TSC sol grubundan alınan testis kesitinde, seminifer tübüllerdeki spermatojenik serinin düzgün olduğu ve seminifer tübüllerdeki açıklıkların azaldığı görüldü. Ayrıca tübüldeki lümenlerin spermatozoa kuyrukları ile dolu olduğu görüldü. İnterstisyel alanlar ve vasküler yapılar korunmuştur. a) X10, b) X40, c) X60; spermatojenik seri (kalın ok), interstisyel aralık (ince ok), seminifer tübülün lümeni (ok başı), H&E boyası.....	41
Şekil 4.3: Grupların Modifiye Johnsen Skor ortalamaları.....	43
Şekil 4.4.2.1: Gruplara ait BCL-2 ekspresyon görüntüleri. a) Kontrol X40, b) CH sağ X40, c) TSC Sağ X40; zayıf ekspresyon gösteren hücreler (ok ucu), orta ekspresyon gösteren hücreler (ince ok).....	47
Şekil 4.4.3.1: Gruplara ait Kaspas 3 ekspresyon görüntüleri. a) Kontrol X40, b) CH sağ X40, c) TSC Sağ X40; zayıf ekspresyon gösteren hücreler (ok ucu), orta ekspresyon gösteren hücreler (ince ok).....	50
Şekil 4.5: Grupların serum testosteron seviye ortalamaları.....	54

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.11: Farklı canlılardan elde edilen TSC'ler ile ilgili yapılan çalışmalar.	25
Tablo 3.3.1: Deney Grupları	28
Tablo 3.5.3: BCL-2, BAX ve Kaspas 3'ün boyanma ekspresyonlarının değerlendirilmesi.....	34
Tablo 3.6: Modifiye Johnsen Skoru.	35
Tablo 4.3: Modifiye Johnsen Skorunun karşılaştırılması.....	43
Tablo 4.4.1: Gruplar arasındaki BAX ekspresyonun H skor analiz sonuçları.	46
Tablo 4.4.2: Gruplar arasındaki BCL-2 ekspresyonun H skor analiz sonuçları.	49
Tablo 4.4.3: Gruplar arasındaki Kaspas 3 ekspresyonun H skor analiz sonuçları.....	52
Tablo 4.4: Serum Testosteron seviyelerinin karşılaştırılması.....	53



SİMGELER VE KISALTMALAR

ABP.....	Androjen Bağlayıcı Proteini
aER.....	Düz Granüllü Endoplazmik Retikulumu
AMH.....	Anti-Müllerian Hormon
CD.....	Farklanma Kümeleri=Clusters Of Differentiation
CHES.....	Ters Akım Isı Değişim Sistemi
CSF1.....	Koloni Stimüle Edici Faktör1
DH.....	Dendritik Hücre
DMEM.....	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DSÖ.....	Dünya Sağlık Örgütü
FBS.....	Fetal Bovine Serum
FSH.....	Folikül Uyarıcı Hormonu
GDNF.....	Glial Hücre Hattından Köken Alan Nörotrofik Faktör
gER.....	Granüllü Endoplazmik Retikulumu
GKH.....	Gonadal Kök Hücre
GSC.....	Gonadal Kök Hücreler
CH sağ.....	Cerrahi Hasar Sağ
CH sol.....	Cerrahi Hasar Sol
H&E.....	Hematoksilen-eozin
HTERT.....	İnsan Telomeraz Reverse Transkriptaz
HTR.....	İnsan Telomeraz RNA
IGF1.....	İnsülin Büyüme Faktörü
ISCT.....	Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği
LH.....	Luteinizan Hormon
mikroTESE.....	Microdissection Testicular Sperm Extraction
MIS.....	Müllerian İnhibitör Madde
MKH.....	Mezenkimal Kök Hücre
SKH.....	Spermatojenik Kök Hücre
NK.....	Doğal Öldürücü
NOA.....	Nonobstrüktif Azospermi
OA.....	Obstrüktif Azospermi
PBS.....	Phosphate Buffered Saline
RA.....	Retinoik Asit

TDF.....	Testis Belirleyici Faktör
TESE.....	Testiküler Sperm Ekstraksiyonu
TSC.....	Testiküler Stromal Kök Hücre
TSC Sağ.....	Testiküler Stromal Kök Hücre Sağ
TSC Sol.....	Testiküler Stromal Kök Hücre Sol
VEGF.....	Endotelyal Büyüme Faktör



1. GİRİŞ

Canlıların varoluş amaçları dikkate alındığında, genetik bilgilerini nesilden nesile aktararak soylarını devam ettirme içgüdüsünde oldukları bilinmektedir. Amacı, soyunu devam ettirmek olan bir canlının, bu kabiliyetini kaybetmesi önemli bir sorun oluşturmaktadır. Günümüzde tüketilen besin maddelerinin genetiğinin değiştirilmiş ürünler olması, kemoterapi, radyoterapi, alkol ve sigara tüketimindeki yaygın kullanım, bilinçsiz ilaç alımı ve genetik etkenler infertilitenin ana nedenleri olarak nitelendirilmektedir (Dabaja ve Schlegel 2014).

Birey ve bireylerin yaşam kalitesini olumsuz olarak etkileyen ve infertiliteye sahip erkeklerin %10-15'inde görülen azospermi, ejakülatta spermatozoanın olmaması olarak tanımlanır. Azospermi, tıkanıklığa bağlı olan obstrüktif (OA) ve tıkanıklığa bağlı olmayan nonobstrüktif (NOA) olmak üzere iki çeşidi vardır. Klinik alanda nonobstrüktif azospermi (NOA) için mikroTESE yöntemi ile sperm bulma imkânı vardır (Aziz 2013). Ancak bu tedavi yöntemi her zaman olumlu sonuçlar vermemektedir. İnfertilitenin en şiddetli şekli olan azosperminin, mikroTESE ile tedavisinin hem maliyet açısından hem de daha az farklı alternatiflerinin olması, bireyler için endişe kaynağı olmaya devam etmektedir. Bunun dışında pre-klinik açıdan azosperminin tedavisi için gen terapisi, in vitro maturasyon ve mezenkimal kök hücreler kullanılmaktadır. Bu tedavi yöntemlerinin arasında mezenkimal kök hücrelerin, çoğalma ve farklılaşma için yüksek potansiyellerinin olmasının yanı sıra reparatif (tamir edici) ve rejeneratif (yenileyici) etkilerinden dolayı bilim insanları ve klinisyenler için büyük ilgi odağı olmuştur (Kadam vd. 2017). Azospermi modeli oluşturulan canlılara nakledilen MKH'lerin, testisteki doku hasarını onarımında önemli bir role sahip oldukları gösterilmiştir.

Azospermili hastalarda, düşük seviyede bulunan testosteron miktarı spermatogonezin başlatılmasını ve devamlılığını olumsuz olarak etkilediğinden dolayı MKH'ler ile testosteron konsantrasyonu yükseltılarak eşik değerine ulaştırılır. Bu da

SKH'lerin üreme fizyolojisi açısından önemli bir rol oynadığı görülmektedir (Meligy vd. 2019). Hatta bunun dışında testis mikroçevresinde germ hücrelerine farklılaşma kapasitelerinin olması, MKH'lerin tercih sebepleri arasındadır (Zahkook vd. 2014).

Yapılan birçok çalışmada alınan sonuçlar olumlu etkiler ortaya koysa da araştırmaların kısıtlılığı ve klinik alandaki sonuçsallık MKH'lerin infertiliteye sahip bireyler ve daha birçok çeşitli hastalık için umut ışığı taşıdığı yönündedir. Bu araştırmada klinik açıdan deneysel hayvanlar üzerinde MKH'ler kullanılarak azospermili sıçanlardaki etkileri incelenerek literatüre pre-klinikten kliniğe geçiş için olumlu-olumsuz sonuçları sunulmak istenmiştir.

1.1. Amaç

Bizim bu çalışmadaki amacımız testiküler kaynaklı stromal hücreleri, cerrahi olarak lezyon oluşturduğumuz sıçanlarda testis hasarı üzerindeki sonuçlarını incelemek ve iyileştirici etkisini göstermektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Anatomisi

İnsanlarda her testis, 2.5-3 cm kalınlığında ortalama 4-5 cm uzunluğunda ve 2-3 cm genişliğindeki bir çift oval şekilli organdır. Her bir testis 10-20 gr ağırlığında olup, hacimsel olarak 15-25 ml arasındadır (Snell 2018)

Testisler, skrotum adı verilen fibromusküler yapının içerisinde, funiculus spermaticus aracılığıyla asılı haldedirler. Testisin;

- İki yanı, margo anterior ve margo posterior
- İki yüzü, facies medialis ve facies lateralis
- İki ucu ise margo anterior ve margo posterior olarak adlandırılmaktadır.

Margo posterior'un çevresinde epididimis ve epididimisin ortasında funiculus spermaticus yerleşmiştir. Testisin visseral periton ile çevrelenmiş kısımları; iki yüzü, ön yanı ve uçları olup margo posterior'un sadece dış kısmı periton ile kaplıdır. Peritonun olmadığı medial kısma, epididimis tutunur ve testise ait olan kan damarları, sinirler ve kanallar buradan geçer (Arıncı ve Elhan 1995).

Testis, üç tabakadan meydana gelmektedir. Bunlar; tunika vajinalis, tunika albuginea ve tunika vaskülozadır. Testisler, abdominal kavitede retroperitoneal şekilde gelişip skrotuma göç ederken, peritondan köken almış tunika vajinalisi de getirir. En içteki tabaka olan tunika vajinalis, visseral yaprak ve pariyatel yaprak olmak üzere iki tabakadan oluşur. Visseral yaprak, testise bakan kısma yakındır ve epididimisi örterken, pariyatel ise dış kısımda bulunur. Orta tabakadaki tunika albuginea, kalın ve kollojenden yoğun bağ dokusuna sahip olup tunika vajinalisin visseral yaprağı tarafından örtülmüştür. Testisleri çevreleyen bu tabaka, testisin posteriyor yüzeyinde kalınlaşarak mediastinum testisi meydana getirir. Tunika albugineadan çıkan fibröz uzantılar (septum), testisi ortalama 250-300 adet lobüle ayırır. Görünüm olarak piramite benzeyen bu lobüllerde, 1-4 adet kıvrımlı şeklindeki seminifer tübüller yer alır. Seminifer

tübüller rete testis ile devam eder. Tunika vasküloza ise kapsülün en iç tabakasında ki gevşek bağ dokusudur ve kan damarlarını bulundurur (Kuran 1983).

Testisi beslenmesinde rol oynayan ana damar testiküler arterdir. Testisin çevresine yaklaştıkça kıvrıntısı artmaktadır. Bu damar önce spermatik kordon yapılarında yer alır. Birden fazla dallara da ayrılabilen testiküler arter, testisin posteriyor bölgesine giderek oblik haldeki tunika albuginea'nın içinden geçip tunika vaskülozada dallanır. Testiküler arterlerin dallanması temelde extremitas inferior'un ön, orta ve kenarlarında gerçekleşir. Daha sonra testiküler arterdeki dalların bölünmesi devam eder ve seminifer tübüllerin arasında bulunan interlobüller arteriollerini meydana getirir. Testiküler arter dışında testisi besleyen diğer damarlar ise duktus deferentis arter ve kremasterik arterdir.

Testislerdeki venöz drenaj, testisin posteriyor bölgesindeki birçok venin, epididimis kökenli dallar ile kaynaşması sonucu zengin bir ağa sahip plexus pampiniformis'i meydana getirir. Plexus pampiniformis, abdominal venlere kanın taşınmasında önemli rol oynar. Sağ testiküler ven, doğrudan alt vena kava inferiora boşalırken, sol testiküler ven ise sol renal venlere boşalır.

Testisteki lenfatikler, intertübüler bölümlerden başlayarak spermatik kord içerisinden devam eder ve perikaval, paraaortik ve interaortokaval lenf nodlarına boşalır. Seminifer tübüllerde lenfatik drenaj bulunmamaktadır (Arıncı ve Elhan 1995).

Testislerin innervasyonu, sempatik ve parasempatik sinirlerden meydana gelir. Bu sinirler, renal ve abdominal aort plexuslarının içerisinden geçer. Daha sonra testis arterleri seyri boyunca innervasyon noktasına kadar takip eder (Kuran 1983).

2.2. Testis Embriyolojisi

Cinsel gelişim, bir organizmanın yaşamındaki temel evrelerden biridir. Gelişmekte olan gonadlardaki germ hücreleri, ergenlikle birlikte olgunlaşmasını tamamlayarak, sonraki nesillere aktarılan tek genetik mirastır. Üreme sistemi organlarının cinsel farklılaşması ve belirlenmesi, Y veya X kromozomunun varlığı ile yönlendirilir. Başka bir deyişle insan, fertilizasyon sonucunda, genetik olarak bir erkek veya bir dişi embriyo olarak gelişmeye mahkûmdur. Bununla birlikte gonad gelişiminin 7. haftasına kadar, erkek ve dişi gonad arasında ayırım yapmak oldukça imkânsızdır. Bu

nedenle bu aşamaya 'farklılaşmamış safha' denirken, gonadlara ise 'farklılaşmamış gonad' olarak isimlendirilmektedir (Moore vd. 2015).

Primordiyal germ hücreleri, epiblast tabakasından köken alır ve 4. haftada yolk kesesinin allantoise yakın duvarındaki endodermal hücreleri arasında bulunur. Embriyonun katlamaları esnasında vitellüs kesesinin dorsal tarafı, embriyonun iç kısmına yerleşir. Bu sırada primordiyal germ hücreleri, arka bağırsağın dorsal mezenteri süresince gonadal kabartılara migrasyon yaparlar. Primordiyal germ hücreleri altıncı haftada, altındaki mezenkimi istila ederek gonadal kordonlara katılırlar.

Gonadlar, sperm ve oosit üretmeye özelleşmiş organlardır ve üç kaynaktan gelişir:

- Arka karın duvarını kaplayan mezotelyum (mezodermal epitel)
- Altındaki stromal doku (embriyonik bağ doku)
- Primordial germ hücreleri (farklanmamış cinsiyet hücreleri) (Sadler 1996).

Mezotelyum 5. haftada, mezonefrozun medialinde bir doku çıkıntısı olan genital kabartıyı oluşturmak üzere çoğalır. Görünüş olarak parmak şeklini anımsatan gonadal kordonlar, altındaki mezenkime nüfuz ederek büyürler. Farklılaşmamış gonadlar artık bir medulla ve korteksten oluşur. XX embriyolarda over korteksten köken alacak ve medulla gerileyecektir. XY embriyosunda medulla testislere dönüşecek ve korteks gerileyip dejenere olacaktır. Gelişmekte olan embriyo, genetik açıdan erkek ise primordiyal germ hücreleri Y kromozomu taşımaktadır. Testis belirleyici faktör (Testis Determining Factor), Y kromozomunun kısa kolundaki SRY geni tarafından kodlanır. SRY tarafından düzenlenen testis belirleyici faktör (TDF), gonadal kordonları, seminiferöz kordonlara dönüştürür. TDF, seminiferöz kordonları indükler ve bunları farklanmamış gonadın medullasının iç kesimlerine doğru uzamasına sebep olur. Ardından kordonlar dallanarak, birbirleri ile anastomoz yapan bir ağa ayrılır ve olgun spermin, testislerden ayrıldığı bir dizi yapının ilki olan rete testisleri oluşturur. Yoğun bir fibröz bağ dokusu tabakası olan tunika albuginea, gelişimini tamamladıktan sonra gonadal kordonların yüzey epiteli ile bağlantılarını koparır. Testiküler gelişim için tunika albugineanın gelişimi önemli bir olaydır. Genişleyen testis, kademeli olarak dejenere olan mezonefrozdaki kordonlardan ayrılır ve kendine has mezenteri olan mezorşiyum ile asılı duruma gelir. Seminifer kordonlar, rete testise, tubuli rekti ve seminifer tübüllere farklılaşırlar (Partin vd. 2020).

İnterstisyel hücreleri (Leydig hücreleri) meydana getiren mezenkimden Seminiferöz tübüller ayrılırlar. Gebeliğin sekizinci haftasında, Leydig hücreleri androjen olan testosteron ve androstenedione üretimine başlar ve böylelikle de mezonefrik kanallar ile dış genital organların cinsel farklılaşmasını indükler. İnsan koryonik gonadotropin hormonu (hCG) 8.haftayla birlikte, testosteron üretimini stimüle eder ve üretilen hormon

miktarı 8-12 haftalık dönemde maksimum değerine ulaşır. Testosteron haricinde fetal testislerde anti-Müllerian hormon (AMH) veya Müllerian inhibitör madde (MIS) olarak isimlendirilen glikoprotein yapıda bir hormon da salgılamaktadır. Sertoli hücreleri (destek hücreler) tarafından salgılanan anti-Müllerian hormon, puberteye kadar salgısını devam ettirir ve daha sonra salgı miktarı azalır. AMH, paramezonefrik (Müllerian) kanalların gelişimini baskılayarak uterus ve tuba uterinaya farklılaşmasını önler (Moore vd. 2015).

Puberte çağına kadar katı (solid) bir halde kalan seminifer tübüllerin lümeni yoktur. Puberte ile birlikte lümen kazanırlar. Seminifer tübüllerin duvarında, destek hücreleri olan Sertoli hücreleri ile primordiyal germ hücrelerinden farklı spermatozoyum olmak üzere iki tip hücre bulunur (Sadler 1996).

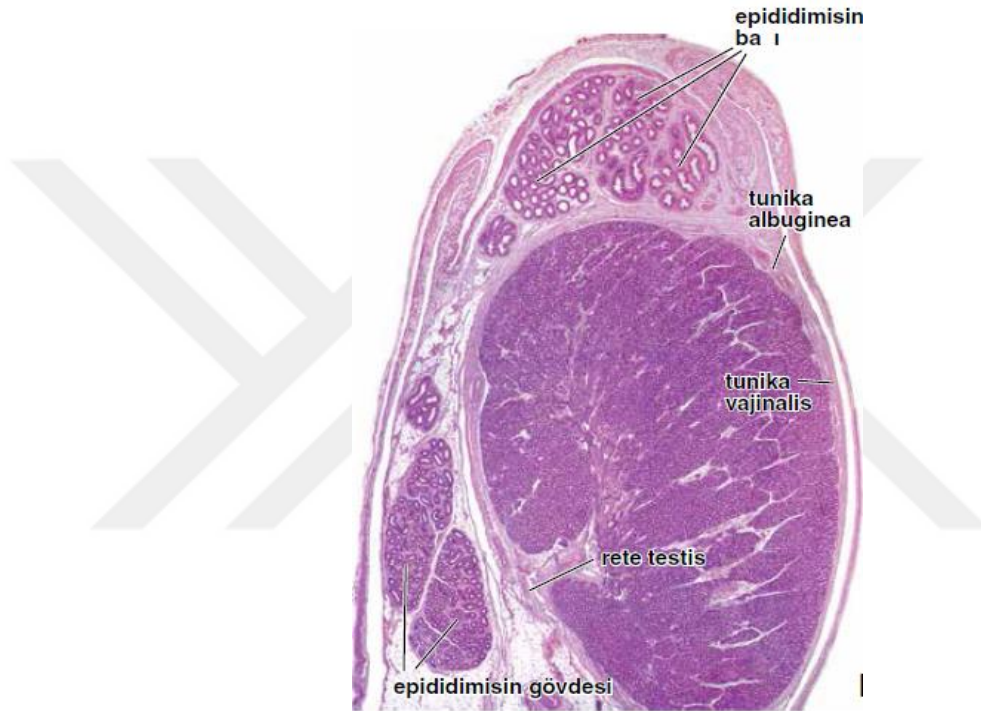
Fetal testiste, seminifer tübül epitelinin büyük kısmını Sertoli hücreleri oluşturur. İleri ki fetal gelişim esnasında, testisin yüzey epiteli düzleşerek yetişkin testisin dış yüzeyinde bulunan mezoteli meydana getirir. Duktuli efferentesleri oluşturan rete testis, 15-20 adet mezonefrik tübüllerle devam eder. Buradaki duktuliler, mezonefrik kanal (Wolffian) ile birbirlerine bağlanırlar. Ayrıca Wolffian kanalını duktus epididimisi de oluşturur.

2.3. Testis Histolojisi

Testisler, spermatik kordon ile asılı halde duran ve vücut boşluğu dışında yer alan, fibromusküler yapıdaki skrotum içerisindeki bir çift organdır. Fetusun gelişimi sırasında abdominal kaviteden skrotuma göç eden testisler, kendileri ile beraber kan ve lenfatik damarları, otonomik sinirleri ve testislerin anterolateral kısmını kaplayan, peritondan gelişmiş tunika vajinalisi de getirir. Testislerin skrotum içerisinde bulunma sebebi, spermatogenez için gerekli olan sıcaklığın, vücut sıcaklığından 2-3 derece altında olmasından kaynaklıdır. Bu durum hayati bir önem arz etmektedir. Fakat hormon üretimi (steroidogenez) için gerekli değildir (Ross ve Pawlina 2011).

Testisler, kalın ve yoğun bir bağ dokusu kapsüle sahip olan tunika albuginea tarafında çevrelenmiştir. Kapsülün daha içinde yer alan tunika vasküloza, gevşek bağ dokusu yapısında olup kan damarlarına sahiptir. Tunika albuginea, testisin arka yüzeyinde kalınlaşarak, içeriye doğru mediastinum testisi oluşturur. Her bir testis, kapsülden uzanan ince bağ dokusundaki fibröz uzantılar (septum) ile ortalama 250-300

adet lobüle ayrılır. Her lobülde, Leydig hücrelerini içeren gevşek bir bağ dokusu bulunur ve bu bağ doku, spermatozoonların üretildiği 1-4 adet seminifer tübülü çevreler. Lobüldeki uzun, kıvrımlı tübüller kangallar oluşturarak kendi üzerine katlanır. Testisin mediastinumuna yakın bölümünde kangalın uç kısımları kısalarak düz kısa segmentler halini alır. Bu bölüm düz tübül (tubulus rektus) olarak isimlendirilir. Testis mediastinumda labirent şeklinde birbiriyle bağlantılı olan ve epitel hücreleri ile döşeli kanalların bulunduğu rete testis ile devam eder (Şekil 2.3) (Gartner ve Hiatt 2012).



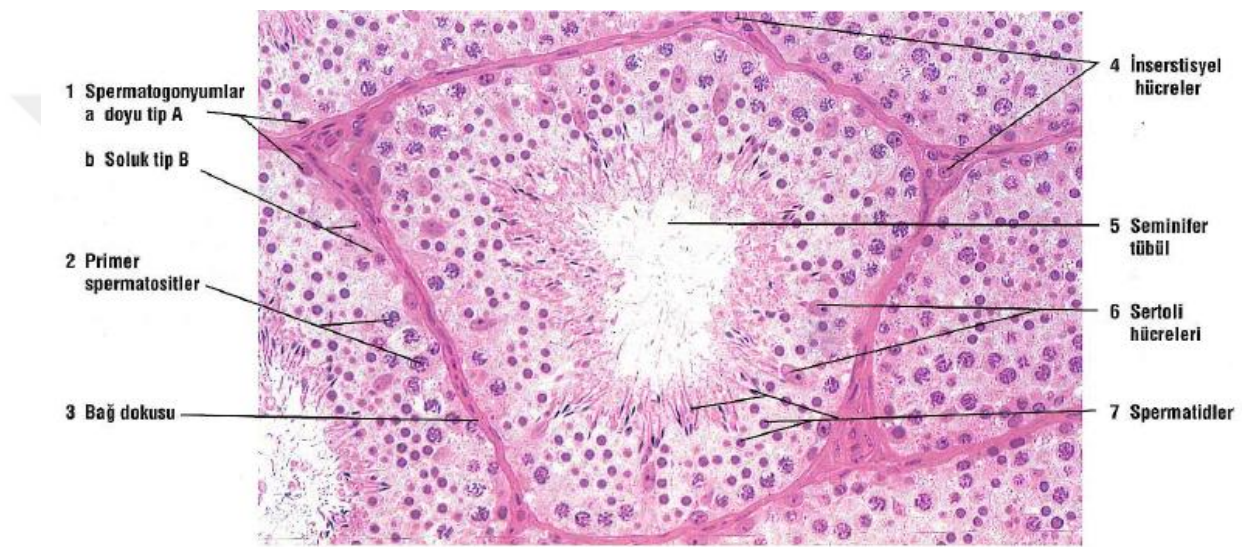
Şekil 2.3: İnsan testisin ve epididimisinin baş ve gövdesinin H&E ile boyanmış sagittal kesiti (Ross ve Pawlina 2011).

2.3.1. Seminifer Tübüller

Seminifer tübüller, spermatojenik germ hücrelerinin, bölünüp olgunlaşarak spermatozoonlara farklılaştığı yerdir. Yaklaşık 150-250 μm çapında, 30-70 cm uzunluğunda olan tübüllerin epitelini, çok katlı epitel döşemektedir. Bu epitelde Sertoli hücresi olarak bilenen destek hücreleri ve olgun spermi oluşturacak spermatojenik hücreler yer almaktadır. Sertoli hücreleri, puberteye kadar çoğalan ve spermatojenik seri hücrelerini saran uzamış pirimidal hücrelerdir. Bu hücrelerin tabanları, seminifer tübülün bazal laminasına otururken, apikal uçları ise lümeneye doğru uzanır. Spermatojenik hücreler ise bazal lamina ile lümen arasında yerleşen 4-8 katlı hücre

serileridir. Bazal laminada spermatogonyum denilen olgunlaşmamış (immatur) hücreler bulunurken, lümenin apikal kısmında ise olgun spermatid hücreler tutunurlar (Junqueira 2006).

Seminifer tübülü çevreleyen fibröz tunika propriya, çok katmanlıdır ve fibroblast hücreleri içermez. Tunika propriyanın bazal laminasına bitişik olan içteki katmanda, bol miktarda aktin filamentleri içermesinden dolayı düz kas fonksiyonuna sahip miyoid hücre bulunur. Bu hücreler seminifer tübüllerdeki spermatozooların ve testis sıvısının boşaltım kanallarına taşınmasında rol oynayan peristaltik kasılmalar yapar (Şekil 2.3.1) (Gartner ve Hiatt 2012).



Şekil 2.3 1: Seminifer tübülün genel görünümü (enine kesit) (Eroschenko ve Di Fiore 2013).

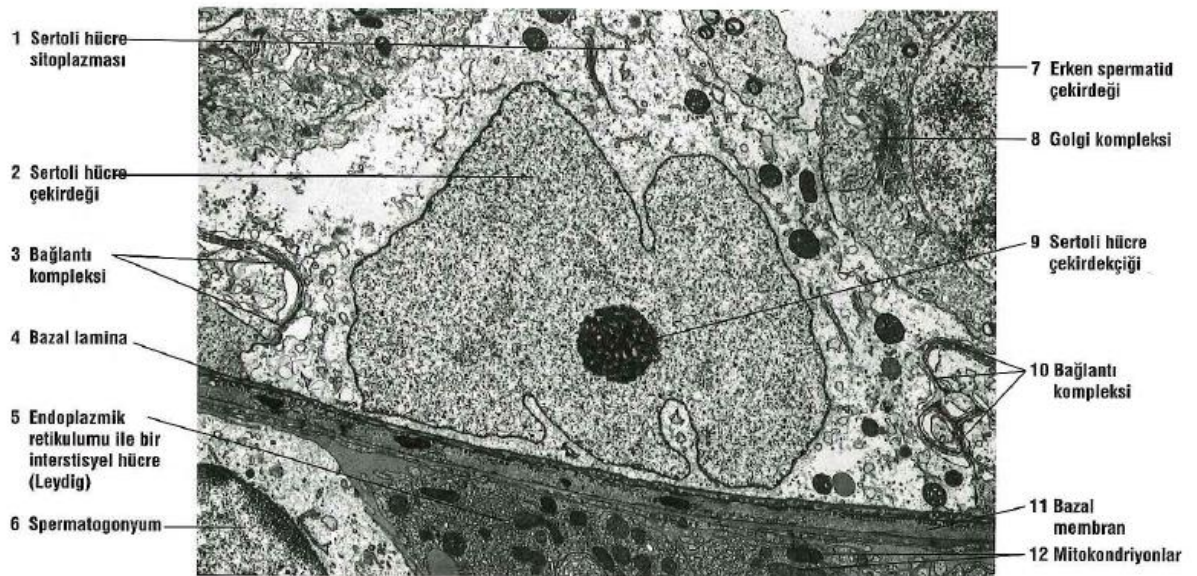
2.3.2. Sertoli Hücreleri (Destek Hücreleri)

Testisin fonksiyonu için önemli etkiye sahip olan Sertoli hücreleri, spermatojenik hücreleri çevreleyen, uzun, pirimidal ve çoğalamayan destek hücreleridir. Seminifer tübülün, bazal laminasından lümenine doğru uzanan bu hücrelerin çekirdekleri, oval ve çentikli olup, az sayıda granüllü endoplazmik retikulumu (gER), çok sayıda düz granüllü endoplazmik retikulumu (aER), iyi gelişmiş golgi kompleksi ve çok sayıda lizozom ile mitokondriye sahiptir. Bunların dışında lipid damlacıkları, vezikülleri, glikojen granüllerini, filamentleri ve inklüzyon cisimcikleri de içermektedir (Şekil 2.3.2) (Johnson 1991).

Sertoli hücrelerinin, testislerde çok sayıda önemli fonksiyona sahiptir. Bu fonksiyonlar;

- Gelişen spermatozoonları besler, korur ve destekler.

- Yan yana olan Sertoli hücreleri, kendi aralarında zonula okludens (sıkı bağlantı) şeklindeki engelleyici bağlantılar yaparak kan-testis bariyerini oluşturur.
- Spermatidlerin spermiyogenez aşamasında fazla sitoplazmalarını ve ayrıca mutasyona uğramış germ hücrelerini, gelişmiş lizozomları sayesinde fagosite eder.
- Spermatozoonların seminifer tübüllerden boşaltım kanallarına doğru iletilmesini sağlayan sıvıyı salgılayarak sekresyon yapar.
- Spermatozoonların, beslenmesi için ihtiyaç duyduğu fruktozdan bol testiküler sıvı salgılar.
- Testosteron ve follikül uyarıcı hormonun (FSH) kontrolü altında Sertoli hücreleri, spermatogenez için ihtiyaç duyulan testosteronu, seminifer tübüllerde yoğunlaştıran androjen bağlayıcı proteini (ABP) salgılar.
- Testosteronu östrojene çevirerek az miktarda da olsa salgılanmasını sağlar.
- Ön hipofiz bezinden FSH üretimini ve salınımını engelleyen inhibin hormonu salgılar.
- Fetal gelişim esnasında erkekte, Müller kanallarının gerilmesine neden olan ve dışı üreme organlarının gelişimini baskılayan AMH üretir (Ovalle ve Nahirney 2013).



Şekil 2.3.2: Sertoli hücresi ve etrafındaki hücrelerin ince yapısı (Eroschenko ve Di Fiore 2013).

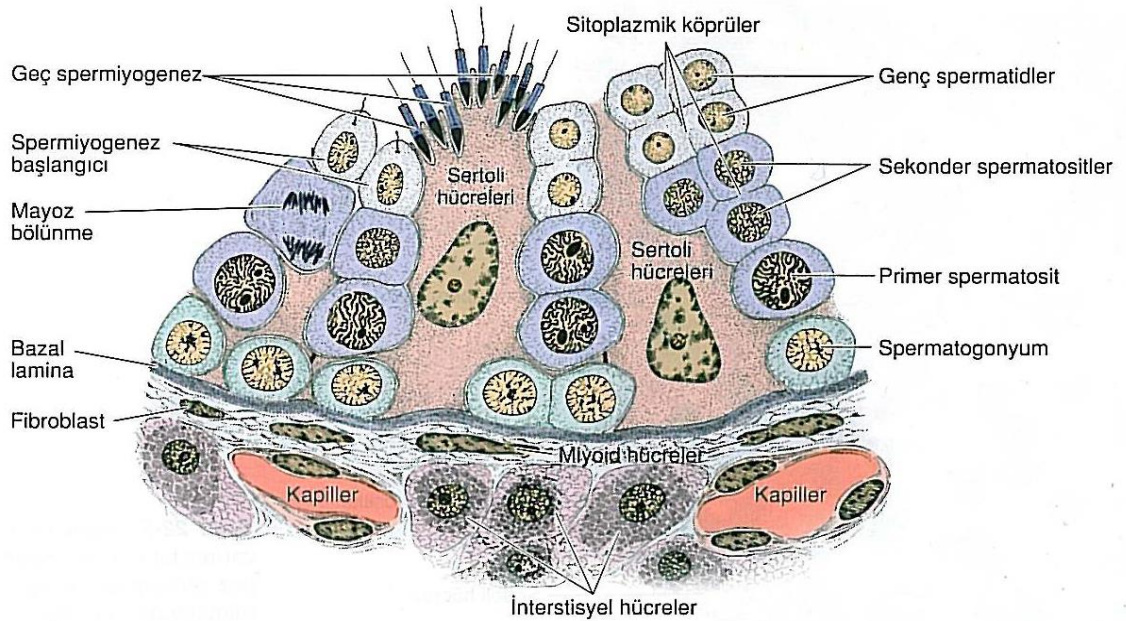
2.3.3. Spermatojenik Hücreler

Spermatojenik hücreler, seminifer tübülün bazal laminası ile lümeni arasına yerleşmiş, 4-8 hücre katındaki çok katlı epitelin germ hücreleridir. Bazal laminadan

itibaren çoğalan hücreler, seminifer tübülün lümenine doğru ilerleyerek spermatozoonlara dönüşür ve epitel ile bağlantılarını kopararak lümeninde serbest hale gelirler (Şekil 2.3.3).

Spermatogenez, primitif germ hücresi olan spermatogonyumların, çoğalıp farklılaşarak spermatozoonları oluşturduğu bir süreçtir. Bu süreç üç 3 evrede meydana gelmektedir.

- Spermatogonyal faz: Spermatogonyumlar mitoz bölünmelerle çoğalıp farklılaşarak, diploid sayıdaki primer spermatositleri meydana getirir.
- Spermatosit fazı (Mayoz): Primer spermatositlerin, üst üste iki defa mayoz geçirerek DNA miktarlarını ve kromozom sayılarını azaltıp, haploid sayıdaki spermatidleri oluşturur.
- Spermatid fazı: Spermatidler, farklılaşarak spermatozoonlara dönüşür (Ross ve Pawlina 2011)



Şekil 2.3.3: Seminifer tübülde yer alan spermatojenik seri hücreleri (Junqueira 2006).

Spermatogonyum germ hücreleri, diploid kromozoma (44 otozom + XY) sahip, bazal laminanın üstünde yerleşmiş ve puberte çağı ile birlikte mitoz bölünmeler geçirerek yeni hücreleri meydana getirirler. Nükleuslarının görünüşleri göz önüne alındığında spermatogonyumlar, insanlarda; tip A koyu spermatogonyum, tip A açık spermatogonyum ve tip B spermatogonyum olmak üzere 3'e ayrılmaktadır.

1. Tip A koyu spermatogonyumlar, oval biçimindeki koyu boyanan nükleuslara sahiptir ve ince granüllü kromatinleri içermektedirler. Bu hücreler, mitotik

sikluslar geçirerek ya tip A koyu spermatogonyumları oluşturur ya da tip A açık spermatogonyumları meydana getirir.

2. Tip A açık spermatogonyumların, nükleusları oval şeklinde olup açık renkte boyanma gösterirler. Bu hücreler de art arda birçok mitoz bölünmeler geçirerek tip A açık spermatogonyumları ve tip B spermatogonyumları oluştururlar.
3. Tip B spermatogonyumlar ise nüklear membrana bağlı şekilde kümelenmiş heterokromatine sahip, yuvarlak nükleuslar içerir. Tip B spermatogonyumlar, mitoz bölünmeler ile primer spermatozoonları oluşturacak öncül (progenitör) hücrelerdir (Johnson 1991).
 - Tip B spermatogonyumların, mitoz bölünme geçirmesi sonucu oluşan primer spermatozoonlar, 4N DNA ve 46 kromozom (44+XY) içerirler. Bu hücreler germinal epitelin orta bölümünde bulunur ve seminifer tübülde yer alan spermatojenik serinin en büyük hücreleridir. Primer spermatozoonlar, ilk mayoz bölünmesini geçirerek 23 kromozoma (23+XY) sahip sekonder spermatozoonları oluşturur. Kromozom sayısının yarıya düşmesi, hücrelerdeki DNA miktarının da (2N) yarıya düşmesine neden olur. Sekonder spermatozoonlar ise, primer spermatozoonlara göre lümeneye daha yakın olup yarısı kadar bir boyuta sahiptir. Sekonder spermatozoonlar meydana geldikten çok kısa bir süre sonra spermatozoonları oluşturmak için ikinci mayoz girdiklerinden dolayı testis kesitlerinde görülmesi oldukça zordur. İkinci mayoz sonucunda oluşan spermatozoonlar, 23 kromozom sahip ve haploid (1N) sayıdadırlar. Bunun nedeni ise, sekonder spermatozoonların S fazına (DNA replikasyon) geçmeden direkt olarak ikinci mayozun profaz fazına girdiklerinden dolayıdır. Spermatozoonlar, hem primer spermatozoon hem de sekonder spermatozoonlara göre daha küçüktür ve lümeneye daha yakın konumdadırlar. Ayrıca Sertoli hücreleri ile yakın bağlantı içerisindedirler. Bu bağlantı, spermatozoonların Sertoli hücrelerine sıkı bağlanması şeklindedir. Spermatozoonların farklılaşması (metamorfoz) sonucunda meydana gelen spermatozoonların, seminifer tübüllerin lümenine salınması ve Sertoli hücreleri ile spermatozoonların arasındaki bağlantıların kopması, spermiasyon denilen süreç ile gerçekleşir (Ross ve Pawlina 2011).

2.3.4. Spermijenez

Spermijenez, spermatozoonların morfolojik olarak farklılaşma geçirmesi sonucu spermatozoonları (olgun sperm) oluşturduğu son aşamadır. Spermijenez 4 safhaya ayrılır:

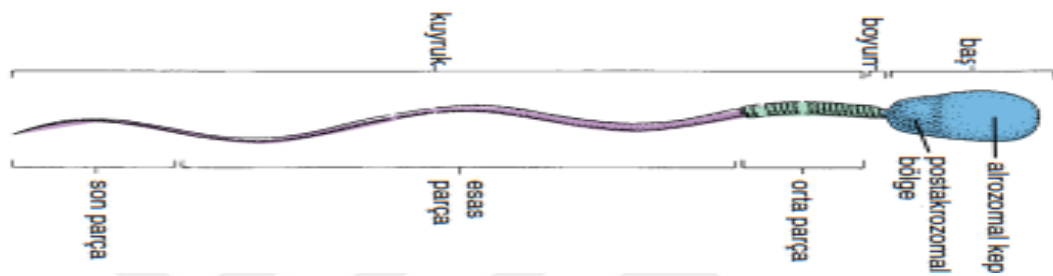
- Golgi safhası: Spermatidin nükleus çevresine yakın olan Golgi kompleksinde, PAS pozitif granül olan proakrozomal granüller birikir. Ardından proakrozomal granüller akrozomal vezikülleri oluşturmak üzere bir araya gelir. Akrozomal vezikül Golgiden kaynaklı bir membran ile sarılıdır. Ayrıca bu safhada akrozomal vezikül büyüyerek içeriğini artırır.
- Kep safhası: Akrozomal vezikül, yoğun halde olan nükleusun ön yüzeyinin yaklaşık yarısını örtecek kadar yayılır. Bu yapı akrozomal kep adını alır.
- Akrozom safhası: Bu safhada spermatid, kendi konumunu değiştirerek baş kısmını Sertoli hücrelerinin içerisine gömer. Olgunlaşmasını devam ettiren flagellum ise lümeneye yönelir. Spermatid nükleusu, yassı bir görünüm alarak uzar. Akrozom, hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve etki olarak tripsinle aynı görev gören akrozin gibi hidrolitik enzimleri barındırır. Nükleus ve akrozom, plazma membranının ön bölümüne yakın bir konuma göç ederken mikrotübüller ise akrozomun arkasından, spermatidin arka kutup bölgesine kadar ilerleyen silindirik kılıf olan manşeti meydana getirir. Gelişmekte olan flagellumu, plazma membranı kuşatmak üzere posteriyora göç ederken, manşet yok olur ve mitokondriyonlar da flagellumun proksimal tarafında heliks şeklinde bir kılıf oluşturmak üzere toplanarak, spermatidin orta parçasını oluşturur. Orta parçanın distalindeki fibröz kılıf esas parçayı çevreleyerek flagellumun uç kısmına kadar ilerler. Fibröz kılıfın distalinde kalan kuyruk bölümü son parçayı meydana getirir.
- Olgunlaşma (Maturasyon) safhası: Flagellanın çevresindeki fazla sitoplazma azaltılarak spermatozoonlar oluşur. Geriye kalan artık sitoplazma olan rezidüel cisimcik ise Sertoli hücrelerinin fagosite özelliği ile ortadan kaldırılır. Spermatidler arasındaki bağlantılar koparak, Sertoli hücreleri aracılığıyla seminifer tübülün lümenine serbest bırakılır (Ross ve Pawlina 2011).

2.3.5. Olgun (Matür) Sperm

50-70 µm uzunluğundaki olgun sperm hücresi, hareketli olup DNA'yı içeren baş, orta parça ve hareketten sorumlu kuyruktan oluşmaktadır. Sperm başı 3 µm genişliğinde, 4,5 µm uzunluğunda ve 1 µm kalınlığındaki sivri, yassı şeklindedir. Nükleusun 2/3'lük kısmı zarla kuşatılmış olan akrozom içerir. Akrozom; hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve akrozin gibi hidrolitik enzimleri içerir. Bu enzimler fertilizasyon için hayati önem taşımaktadır. Özellikle zona pellusidanın geçilmesinde büyük rol oynarlar. Bunun dışında oosit ile sperm ilk temasında, akrozomal reaksiyon

başlayarak akrozom enzimleri salınır, böylelikle hem fertilizasyon kolaylaşır hem de oosite, birden fazla spermin girmesine engel olunur.

Olgun spermin kuyruğu, periferde 9 çiftli, santralde ise 2 tane tekli mikrotübül içerir. Boyun, orta, esas ve son parçadan oluşmaktadır. Boyun kısmı spermatozoonun baş bölgesi ile orta parçasını birbirine bağlayarak eklem görevi görür. Orta parça, spermin hareketliliği için gerekli enerjiden sorumlu olan mitokondriyonları barındırır. Esas parça ise kalın fiberler, aksonemal kompleks ve fibröz kılıfı barındıran ve spermatozoonun ilerletilmesinde rol oynar. Son parça 9 çift mikrotübül içerir ve yalnızca aksonemal kompleksi barındırır (Ovalle ve Nahirney 2013).



Şekil 2.3.5: Olgun spermatozoonun yapısı (Ross ve Pawlina 2011).

2.4. Spermatozoonun Hormonal Kontrolü

Spermatozoonun gelişimi, gonadotropin salgılamasının artırılması sonucu puberte çağında başlar ve FSH, luteinizan hormon (LH), ABP ve testosteron hormonlarının etkisi altında kontrol edilir. FSH, hipofizin ön bezinden salgılanarak, seminifer tübüldeki Sertoli hücrelerinin uyarılmasını sağlar. Böylelikle spermatozoonun başlatılmasına ve ABP hormonun salgılanmasına neden olur. Hipofizin ön lobundan salgılanan bir diğer hormon olan LH, interstisyumdaki Leydig hücrelerindeki LH reseptörlerinin uyarılmasını sağlayarak steroid yapıdaki testosteronun sekresyonuna neden olur. Testosteron, sekonder seks karakterlerinin gelişmesi ve sürekliliği için gerekli olan önemli bir hormondur.

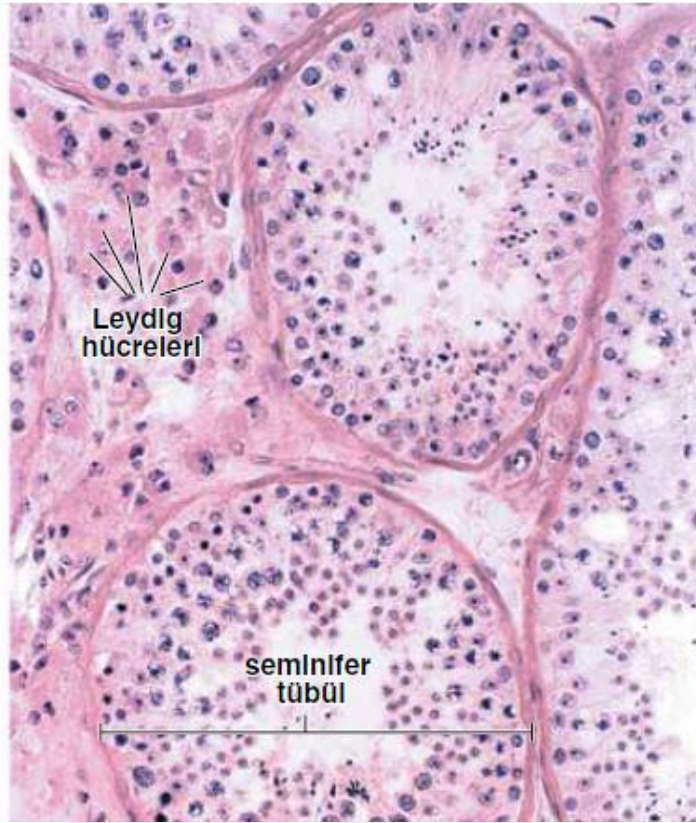
FSH ve LH'in aksine testosteron, kan-testis bariyerinden difüzyon aracılığıyla rahatlıkla geçebilmektedir. Sertoli hücrelerinden salgılanan ABP, testosteronu bağlanarak testosteronun seminifer tübülün lümenine taşınmasını ve spermatozoonun olgunlaşması için gerekli yoğunlaşmayı sağlar. Sertoli hücrelerinden ayrıca FSH salgılamasını engelleyen inhibin ve az düzeyde de olsa Sertoli hücrelerinin testosteronu dönüştürmesi sonucu oluşan östrojen salgılanır (Sofikitis vd. 2008).

2.5. İnterstisyum ve Leydig Hücreleri

Testisin interstisyum dokusu, seminifer tübüllerin boşluklarında bulunan, kollajen lifleri, kan ve lenf damarları ile birlikte sınırları içeren ve androjen üretimi için önemli işleve sahip bağ dokusudur. Bu dokuda; Leydig hücreleri, mast hücreleri, makrofajlar, fibroblastlar ve farklılaşmamış stromal hücreler bulunmaktadır. İnterstisyumun ana hücresi olan Leydig hücreleri, poligonal veya yuvarlak olup, bol miktarda küçük lipid damlacıkları içeren ve sitoplazma açısından eozinofilik özelliğe sahip hücrelerdir. İnsanlardaki Leydig hücrelerinin sitoplazmalarında ek olarak, Reinke kristalleri adı verilen lipofuskin pigmente sahip ve çubuk görünümündeki kristallere sahiptir. Leydig hücrelerinin en büyük görevi steroid yapısındaki testosteron üretimi olup, bu hormon;

- Embriyoda, gonadların gelişimi,
- Pubertede, spermatogenezin başlatılması, cinsiyet bezlerinin sekresyonu ve sekonder seks karakterlerinin gelişmesi,
- Yetişkinlerde ise spermatogenezin, sekonder seks karakterlerinin, cinsiyet bezlerinin ve boşaltım kanallarının sürekliliği için gereklidir (Ross ve Pawlina 2011).

Leydig hücreleri, erkeklerde fetal dönemin erken periyodundan itibaren farklılaşmaya başlar ve testosteron üretimindeki azalma ile birlikte, 5. ayda inaktif hale gelir. Bu durumdaki Leydig hücreleri, fibroblastlardan ayırt edilemeyecek kadar benzer bir görünüme sahip olurlar. Puberte çağına gelindiğinde ise, gonadotropin hormonunun sekresyonu ile uyarılan inaktif durumdaki Leydig hücreleri, aktif hale gelerek androjen üretimine tekrar devam ederler (Şekil 2.5) (Junqueira 2006).



Şekil 2.5: Komşu seminifer tübüllerin arasında kalan interstisyumdaki Leydig hücreleri (Ross ve Pawlina 2011).

2.6. Testis Histofizyolojisi

Spermatogenez gerçekleşebilmesi için testis ısısının, vücut sıcaklığı olan 37 °C'den düşük olması gerekmektedir. Vücut sıcaklığı, spermatozoonların hem gelişimini hem de olgunlaşmasını negatif yönde etkilemektedir. Skrotum içerisindeki testisin ısı, yaklaşık olarak 35 °C olup bu ısının kontrolü çeşitli mekanizmalarla dengede tutulmaktadır. Bu mekanizmalardan ilki; venlerin meydana getirdiği pampiniform pleksusun, kıvrıntılı olan testiküler arteri çevrelemesidir. İkincisi ise testise gelmekte olan arteriyel kanın, testisten giden soğuk venöz kan ile Ters Akım Isı Değişim Sistemi (CHES) olan bir mekanizma ile soğutulmasıdır. Ayrıca testis sıcaklığı 35 °C'den daha düşük bir dereceye indiğinde, testiste bulunan kremaster kası ve dartos kaslarının kasılması sonucu, testisleri abdominal kaviteye yaklaştırarak, sıcaklığın normal seviyeye gelmesini sağlar. Embriyonik dönemde, bir veya her iki testisin inmediği bir durumda (kriptorşidizm), testisler abdominal kavitede kalır. Bu durum testislerin 37 °C'de kalmasına bağlı olarak spermatogenezin gerçekleşmesini engeller (Ross ve Pawlina 2011).

Hem endokrin hem de ekzokrin fonksiyon sahip testis, hormonların kontrolü altında çalışmaktadır. Ekzokrin salgısı, Leydig hücrelerinin ürettiği testosteronudur. Testosteron, spermatogenezin başlamasını, sekonder seks karakterlerin gelişmesini ve kan-testis bariyeri ile cinsiyet bezlerinin uyarılmasını sağlar. Bu hormonun kontrolü, ön hipofiz bezinden salgılanan LH'ın, Leydig hücrelerinde bulunan LH reseptörleri ile etkileşmesi sonucu sağlanır. Eğer testosteron miktarı, normal seviyelerin üzerinde ise LH salınımı durur. Ön hipofizden salgılanan FSH, testosteronu etkileyen diğer bir hormondur. FSH, seminifer tübüllerdeki Sertoli hücrelerini uyarması sonucu ABP üretimine neden olur. ABP, testosteronu bağlanarak bu hormonun yoğunlaşmasını sağlar ve seminifer tübülün lümenine gitmesine aracılık eder. Sertoli hücrelerinden üretilen inhibin ise, FSH salınımı inhibe eder (Weinbauer vd. 2010).

Testisin endokrin salgısı, ejakülasyon ile atılan spermatozoonlardır. Bu germ hücrelerinin testislerdeki üretimi, günde yaklaşık olarak 200 milyondur. Meydana gelen semen miktarı ise 2.5 ml olup içerisinde ortalama 40-100 milyon/ml spermatozoon bulunmaktadır. Eğer bu yoğunluk, 20 milyon/ml'den az ise oligozoospermi denen sorun ortaya çıkmaktadır. Ek olarak semen içerisinde spermatozoon bulunmadığında durumda ise azospermi adı verilen rahatsızlık meydana gelmektedir (Ilacqua vd. 2018).

Spermatogenez sonucu oluşan spermatozoonların, sayısal açıdan azalmasında, mutasyona uğramasında veya bozuk olarak üretilmesinde, alkol, uyuşturucu, kemoterapi, radyoterapi, sigara ve bilinçsiz ilaç kullanımı gibi faktörlerin etkisi oldukça fazladır. Bu etmenlerin sonucunda, spermatozoonlarda herhangi bir sorun olması, erkeklerde infertiliteye neden olmaktadır (Ilacqua vd. 2018).

2.7. Azospermi

Azospermi terimi, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) göre Eliason tarafından ilk kez 1981'de "santrifüjlenmiş bir semen numunesinin pelletinde spermatozoa bulunmaması" olarak tanımlanmıştır. Amerikan Üroloji Derneği ise, daha detaylı bir tanım yaparak "15 dakika boyunca 3000x g'da santrifüjlemeden sonra pelletin incelenmesi sonucunda spermin bulunmaması" şeklindedir. Temel olarak azosperminin; nonobstrüktif (tıkanıklığa bağlı olmayan) ve obstrüktif (tıkanıklığa bağlı) olmak üzere iki tipi vardır (Aziz 2013). Obstrüktif azospermide (OA), seminifer tübüllerde spermatogenez olmasına rağmen iletili kanallardaki sorunlar nedeniyle sperm çıkışı gerçekleşmemektedir. Nonobstrüktif azospermi (NOA) ise spermatogenezin olmaması

sebebiyle, ejakülatta sperm bulunmaması olarak tanımlanır ve erkek kısırlığının en şiddetli şeklidir (Baker ve Sabanegh Jr 2013).

2.7.1. Azosperminin Etiyolojisi

Azosperminin birçok sebebi olmasına rağmen, bu sorunun etiyolojisi OA ve NOA olmak üzere iki genel kategoriye ayrılır. OA'nın oluşmasına sebep olan durumlar; vas deferens konjenital yokluğu vazektomi, herni tamiri, ejakülatör kanal obstrüksiyonu, epididimal kist çıkarılması, prostatektomi ve idiyopatik olaylardır (Baker ve Sabanegh Jr 2013). NOA'ya neden olan sebepler; Klinefelter, Y kromozomundaki AZF mikrolezyonları ve Kallman sendromu, testis torsiyonu, inmemiş testis (Kriptorşizm), radyoterapi ve kemoterapi, testiküler travma ve idiyopatik olabilmektedir (Cocuzza vd. 2013).

2.7.2. Azosperminin Epidemiyolojisi

Azospermi, infertiliteye sahip erkeklerde %10-15'inde görülür ve dünyadaki erkek nüfusunun %1'lik dilimini oluşturur. Azosperminin tanısı için hastanın öyküsü, fizik muayene ve cinsel gelişimin takibinin yapılması gerekir. Ayrıca testis boyutlarının kontrolü oldukça önemlidir. Sağlıklı yetişkin testisi, 2.5-3 cm kalınlığında, 4-5 cm uzunluğunda, 2-3 cm genişliğinde ve 15-25 ml hacminde değişkenlik gösterir. Testis hacminin %85'i spermatogenez ile ilişkili olduğundan, testis boyutundaki azalma, spermatojenik potansiyelin bozulmuş olduğunu gösterir. NOA'lı hastalarının testisleri, sağlıklı bir yetişkine kıyasla daha az ölçülecek olup edidimisleri de düz olacaktır. Klinik tanı parametreleri göz önüne alındığında OA, NOA'ya göre daha kolay ayırt edilmektedir. OA'lı hastaların %96'sının FSH seviyeleri, 7.6 mIU/ml veya daha az ve testisin uzunluğu ise 4-5 cm'den daha büyüktür. Aksine NOA'lı hastaların FSH düzeyleri 7.6 mIU/m büyük olup testis uzunlukları 4-5 cm'den daha küçüktür (Wosnitzer vd. 2014).

Endokrin değerlendirmesi, infertilite tanılarının ve tedavi yöntemlerinin belirlenmesine yardımcı olur. Serum testosteron ve FSH seviyeleri baz alındığında sperm sayısı 10 milyon/ml'nin altında olması klinik açıdan anlamlı bir endokrin taraması olduğunu gösterir. Eğer testosteron seviyesinde bir düşüklük gözlemlenirse LH, prolaktin ve östrojen seviyelerinin de analizi ile genel bir değerlendirme yapılması

gerekir. Tam bir endokrin taraması, etiyolojinin aydınlatılmasına yardımcı olmaktadır. Endokrinin yanı sıra 3-4 hafta ile yapılan iki semen analizi, azospermi teşhis için önemli bir faktördür. Hacimsel olarak 1.5 ml'den az olan ejakülatlarda, sperm analizleri tekrarlanır. Tanının konulmasının en keskin yolu ise testis biyopsisinin histolojik olarak incelemektir. Böylelikle testis dokusunun heterojenliği ve seminifer tübüllerdeki spermatogenezin gerçekleşip gerçekleşmediği rahatlıkla görülür (Cocuzza vd. 2013).

Nonobstrüktif azospermi olgularında sperm üretimi olmadığı için, daha önceleri en sık olarak testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) tercih edilmekteydi. Ancak son yıllarda mikroTESE işlemi daha sık olarak yapılmaya başlanmıştır. Bunun en büyük nedeni TESE operasyonunda daha fazla doku kaybı olmasıdır. MikroTESE işleminde ise daha küçük miktarda tübül alındığı için doku kaybı daha az olmaktadır. Bu operasyon mikroskop ile yapılmakta ve vasküler yapılar korunmaktadır (Ünal ve Özer 2019).

2.8. Kök Hücreler

Kök hücreler, bir organizmanın herhangi bir hücrelerine farklılaşabilen, kendini yenileme yeteneğine sahip ve bölünmesi uzun olan özelleşmemiş hücrelerdir. Bir hücrenin bilimsel alanlarda, kök hücre olup olmadığını belirlemek için beş ölçüt kullanılmaktadır.

- 1) Uzun zaman dilimi süresince hem bölünüp hem de kendini yenileyebilme kabiliyetinde olmalıdır.
- 2) Özelleşmemiş hücreler olmalıdır.
- 3) Farklılaşma kapasiteleri oldukça güçlüdür.
- 4) Bir doku hasar gördüğünde, fonksiyonel olarak tekrardan yapılandırılarak çoğaltılabilmelidir.
- 5) İn vitro ortamda, herhangi bir hasar olmadığı durumda dahi, farklılaşma kabiliyetine sahiptirler (Ural 2006).

Zigotun art arda 5-6 kez bölünmesi sonucu meydana gelen blastokistin, iç hücre kütlelerinde bulunan hücrelerine, embriyonik kök hücre adı verilmektedir. Embriyonik kök hücreler, üç germ tabakasına (endoderm, mezoderm ve ektoderm) ve bu germ tabakalarından köken alan, organları oluşturma kabiliyetindeki hücrelerdir. Gelişim sürecindeki bir organizmada, kemik iliği öncelikli olup, birçok organda ve yine bu

organların dokularında, ihtiyaç olması durumunda bölünebilen ve farklılaşabilen hücreler bulunmaktadır. Bu hücrelere yetişkin kök hücreler denmektedir. Yetişkin kök hücreler, embriyonik kök hücrelerin aksine totipotent özelliğine sahip değildir. Bu yüzden bazı zaman, öncü hücre (progenitör) olarak yorumlanır. Bu kök hücrelerin dışında erkeklerdeki spermatozoonları oluşturan spermatogonyumları, dişilerde ise oositlerin öncüsü olan oogonyumları meydana getiren kök hücreler vardır. Bu kök hücreler, primordiyal germ hücreleri olarak isimlendirilmektedir ve epiblast tabakasından köken alırlar. Ayrıca insan gelişiminin 4. haftasında ilk kez vitellüs kesesinde gözlemlenir (Girlovanu vd. 2015). Son zamanlarda fetüs kök hücresi olarak bilenen bir kök hücre grubunun, doku hasarı ve onarımsal tıpta ilgisinin artması sonucu, fetüsten köken alınarak izole edilmekte ve muhafaza edilebilmektedir. Göbek kordonu, plasenta ve amniyon sıvısı kök hücreleri, fetüs kök hücre grubundaki hücrelerdir (Watt ve Driskell 2010).

2.8.1. Kök Hücrelerin Özellikleri

2.8.1.1. Plastisite (Farklanma)

Kök hücrelerin en önemli özelliklerinden biri olan farklanma, birçok sürecin iç içe geçtiği karmaşık bir işlemler dizisidir. Gelişim sürecinde sıkı kontrol altında olan farklanma, yaşam boyunca çok hücreli canlıların dokularında devam etmektedir. Farklanma evresindeki hücre, hem bölünmeyi sonlandırırken hem de etrafından gelen uyarılara cevap vermeye hazırlanır. Hücrelerde ileri farklanma süreci, çoğunlukla çoğalma evresinin bittiği andan itibaren başlamaktadır. İlk önce hücreler sayısal anlamda yeterli düzeye gelir, daha sonra çoğalarak ilgili hücre yüzeyi ve hücre içi yolakları kapatır ve farklanmaya ait mekanizmalar işin içine girer. Bu olay, hücre siklusundan kalıcı veya geçici bir şekilde çıkılması (G_0) manasına gelir. Farklanmayı başlatan ve devam ettiren etmenlerin ortadan kalkması, çok sayıda ki hücrenin tekrardan hücre siklusuna girmesine neden olur (G_1) (Hale 2019).

İn vitro ortamda, bazı kimyasal ve fiziksel etkenlerle veya hücrenin genetik modifikasyonlar sonucu, kök hücrelerin belirli bir yönde farklanması sağlanır. Yetişkin bir kök hücreyi, yağ hücresine farklanmasını sağlamak için besiyeri ortamına deksametazon, indometazin, izobutil metilksantin ve insülin gibi hormonlar ile birlikte bazı kimyasallar verilmektedir. Ancak bu hormonların ve kimyasalların in vitro ortamda

yağ hücrelerine farklanmasını sağladığını tam olarak bilinmemektedir. Birkaç hafta sonunda, yağ hücreleri in vivo olarak karşılaştırılabilir olgunluğuna kavuşmaktadır.

Bir hücre kendisini yenilerken, birçok genini aktif hale getirir fakat gen ekspresyonu oldukça azdır. Bunun aksine farklanma sürecindeki bir hücrede, aktif gen sayısı az iken gen ekspresyonu fazla olarak gözlemlenir. Bir hücrede gen ekspresyonunun fazla olması, o hücrede protein sentezinin de fazla olması anlamına gelir. Artık hücre hem fonksiyonel hem de yapısal olarak tüm özelliklerini elde etmek için kendine has proteinler üretilip sekresyon yapar. Örneğin; embriyonik kök hücreler, üç germ tabakasına ait proteinlerini sentezleme potansiyeli varken, yetişkin kök hücrelerde ise üç germ tabakasından yalnızca bir tanesine ait proteini ekspresyon eder (Tekeli vd. 2016).

Bir kök hücreyi diğer hücrelerden farklı kılan en önemli özelliği, farklanma olgularının oldukça yüksek olmasıdır. Böylelikle de organizmanın üretim ve onarım durumlarında, azalan hücreleri restorasyonunu yapmak için imkân sağlar.

2.8.1.2. Kök Hücrelerin Kendini Yenilemesi, Bölünme Şekilleri, Kök Hücre Nişi ve Köklülük

Kök hücrelerin, muazzam bir kendini yenileme kapasitesi vardır. Kök hücrelerin, yaşamları boyunca kök hücre havuzunu sürdüreceği şekilde bölünür ve ihtiyaç olması durumunda, hem organ hem de dokuya has progenitör hücrelere farklılaşırlar (Fuchs ve Chen 2013).

Hücrelerin bölünmelerini sınırlandırmada en önemli etmen olan telomer, kromozomların terminal bölgesinde bulunur ve gen kodlamayan çok sayıda kısa tekrar dizileri içeren DNA zinciridir. Telomer, kromozomun başka bir kromozomla füzyon olmasına, kromozom uçlarının kırılmasına ve rastgele rekombinasyonlara engel olur. Böylelikle de kromozomların stabilitesi sağlanır. Telomerler, her hücre bölünmesiyle kısaldığından, telomer uzunluğunun işlevsel ve sağlıklı olması için ribonükleoprotein yapısındaki telomeraz'a ait iki alt ünite içermesi gerekir. Bunlar; aslında bir reverse transkriptaz olan ve telomerin katalitik aktivitesinin gösterdiği büyük protein yapısı olan insan telomeraz reverse transkriptazı (hTERT) ile tekrar eden dizilimin çoğaltılması için gerekli olan ve hTERT'e üzerinde aktivitesini gösterebileceği RNA şablonu oluşturan nükleotid dizilimi olan insan telomeraz RNA (hTR)'dir (Zhao vd. 2015). Bir hücre, her bölünmeden sonra telomer yapıları 50-200 nükleotid kadar kısalmaktadır. Vücut

hücrelerinde, telomeraz aktif olmadığından, telomerler kısalır. Bununla birlikte, germ hücrelerinde, kanser hücrelerinde ve embriyonik kök hücrelerde telomeraz aktivitesi bulunmaktadır.

Kök hücreler, simetrik ve asimetric bölünme olmak üzere iki farklı tür bölünme geçirebilir. Simetrik bölünme, kök hücre havuzunun, sürekliliğini sağlamak amacıyla yapılan bölünme şeklidir. Asimetrik bölünme ise DNA, sitoplazma ve hücre zarının asimetric bölünmesi sonucu meydana gelirken, oluşan yavru hücrelerden biri kök hücre olarak kalırken, diğeri diferansiye olur (Tekeli vd. 2016).

Kök hücrelerin bulunduğu mikro-çevrede çoğalmayı destekleyen, kendi kendini yenileyebilen ve farklılaşmayı önleyen özellikleri taşıyan düzenleyici ortam, niş olarak adlandırılır. Bu ortamın özellikleri değişmesi ile kök hücrelerde farklılaşma süreci indüklenebilir. Bir kök hücre nişinin, mikro-çevre ve kök hücre olmak üzere iki temel bileşeni vardır ve bunların her birinin işlevi diğereine bağlıdır. Mikro-çevre, hücrelerin farklılaşmasını engelleyen kök hücrelere uyarı veya sinyaller yayar. Yani, hücreleri çeşitli hücrelere dönüştürmeyi sağlar. Bu sinyallerin bazıları nişi kaplayan hücrelerden kaynaklanır ve diğere durumlarda ise hücre dışı matris uyarıları sağlar. Ek olarak, kök hücrenin kendisinden gelen otokrin sinyalleri, hücreleri farklılaşmamış durumlarında tutabilir. Niş içinde kalan kök hücreler, vücudun diğere hücrelerini oluşturmak için tetiklenebilecek bir hücre havuzu sağlar. Kök hücre nişinde hücreler biterse, dokuların yenilenmesi için hiçbir öncü yoktur. Buna karşılık, aşırı çoğalmaya neden olan, yani çok fazla kök hücre oluşturan hücre dışı bir ortam, tümörlere yol açabilir. Bu nedenle, uygun niş işlevi bir denge gerektirir (Clark ve Pazdernik 2016).

Köklülük, kendini yenilemenin ve farklılaşmış yavru hücrelerin oluşumunun, temel kök hücre özelliklerinin altında yatan moleküler süreçlerini ifade eder. Bu süreçler, translasyon sonrası modifikasyonlar ya da özgün gen ekspresyonlarını içerir. Böylelikle kök hücreler, kendine has fonksiyonlarını ve yapılarını saklarlar. Diğere bir deyişle, embriyonun üç germ tabakası ve bunun diğere yapılarına farklılaşabilme kapasitesidir (Tekeli vd. 2016).

2.8.2. Kök Hücre Belirteçleri

Bir kök hücrenin türünü tanımlamak için kullanılan en sık yöntem, kök hücre belirteçleridir. Hücrelerin yüzeyini kaplayan, diğere sinyal moleküllerine seçici olarak bağlanabilen veya bunlara yapışabilen bu özel belirteçlerden çoğu 'CD' (Farklanma

Kümeleri=Clusters of Differentiation) olarak tanımlanır ve her hücreye çeşidine özgün olarak bulunur (Tekeli vd. 2016). Mezenkimal kök hücreler için en sık kullanılan CD belirteçleri CD29, CD73 ve CD105'tir. Hematopoetik kök hücrelerde ise CD34 ve CD45 kullanılır.

2.9. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)

Mezenkimal Kök Hücreler (MKH), farklılaşma potansiyeli olan ve kendi kendini yenileyebilen fibroblast benzeri heterojen hücre popülasyonudur. Bu özellikleri sayesinde hücre tedavileri için uygun bir alternatif olmuştur. MKH'ler; kemik iliği, yağ dokusu, kıkırdak, diş, kordon kanı, plasenta (wharton jeli) ve testis gibi birçok dokudan izole edilmektedir (Kadam vd. 2017). MKH'ler, heterojen bir popülasyona sahip oldukları için tanımlanmaları zor olmuştur. Bu yüzden Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT), MKH'leri tanımlamak için 3 kriter önermiştir. Bunlar;

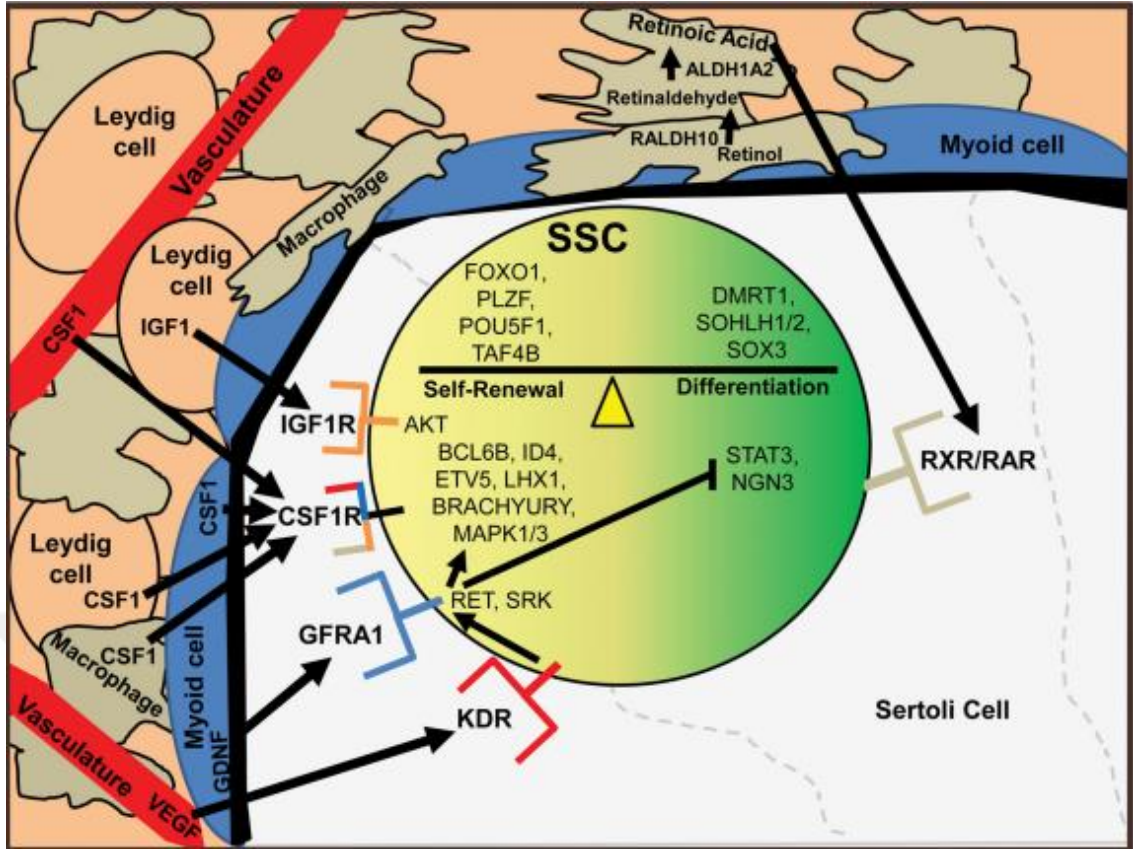
1. Standart kültür koşullarında muhafaza edildiğinde hücreler, plastiğe yapışık olmalıdır.
2. MKH'ler CD105, CD90 ve CD73 gibi yüzey moleküllerini ekspre ederken, CD14, CD19, CD34 ve CD45 yüzey belirteçlerini ekspre etmemelidir.
3. İn vitro ortamda, adipositlere, kondroblastlara ve osteoblastlara farklılaşma kapasitesine sahip olmalıdır (Şekil 2.9) (Dominici vd. 2006).

MKH'ler, doku onarımı ve rejenerasyonda önemli rol oynamaktadır. Yara onarımında MKH'lerin kullanılması; antifibrotik, antiinflamatuvar ve dokunun restore edilmesi gibi yanıtlarının düzenlenmesinde önemli rollere sahip olduğu gösterilmiştir (Rastegar vd. 2010). Ayrıca MKH'ler, hem doğal hem de adaptif bağışıklık sistemlerinde bağışıklık hücreleri ile etkileşim yoluyla geniş bağışıklık düzenleyici özelliklere sahiptir. MKH'ler tarafından salgılanan çok sayıda biyoaktif molekül, MKH'lerin fizyolojik süreçlerini modüle eden otokrin/parakrin etkiler uygular (Wang M. vd. 2018). MKH'lerin bu paha biçilmez erdemleri, doku hasarı ve inflamatuvar potansiyelli tedavilere yeni bir bakış açısı sağlar. Özellikle, kapsamlı immünosupresif özellikleri, bağışıklık bozukluklarında umut verici terapötik uygulamaların araştırılmasına aracı olmuştur. MKH'ler, B hücreleri, T hücreleri, dendritik hücreler (DH), doğal öldürücü (NK) hücreler, nötrofil ve makrofajlar dahil olmak üzere birçok

türde bağışıklık hücresi ile etkileşime girme yeteneğine sahiptir. Etkileşim mekanizmalarının, MKH tarafından düzenlenen immünosupresyonu indüklemek için çözünür immün faktörlerin salgılanmasıyla iş birliği içinde çalışan hücre-hücre temasına dayanır. Çok sayıda immün modülatör faktör, sitokin ve büyüme faktörü dahil olmak üzere bu spesifik modülatörler, inflamatuvar yanıtları modüle eder. İnsan immünolojik hastalıklarını tedavi etmek için MKH'leri kullanan birçok klinik çalışma halen devam etmektedir. Bununla birlikte, MKH'lerin immünosupresif etkisine aracılık eden moleküler mekanizma hala belirsizdir ve MKH'lerin hastalarda kullanımının güvenliğinin, daha fazla teyit edilmesi gerekmektedir (P De Miguel vd. 2012).

2.10. Spermatojenik Kök Hücreler

Spermatojenik kök hücreler (SKH), seminifer tübüllerde bulunan ve germ hücrelerin üretilmesi için sürekli olarak bölünen, doğumdan sonra hareket yeteneği olmayan progenitor hücrelerden köken alır. Bu hücreler yetişkin bir testiste hem kendini yenileme hem de farklılaşmış soyları üretebilme gibi önemli yeteneklere sahiptir. SKH'lerin sahip olduğu kendini yenileme ve farklılaşma arasındaki bu denge, sadece hücrenin iç faktörlere bağlı olmayıp aynı zamanda dış faktörlere de (Leydig hücreleri, peritübüler myoid hücreleri, makrofajları ve vasküler yapıları) bağlıdır. Bu faktörler MKH'lerin aktivitesine yardımcı olarak bu hücrelerin bölünme, olgunlaşma ve sperme farklılaşma aşamalarında, hücresel ve moleküler etkileşimlerin korunmasını sağlamaktadır. Leydig hücreleri, insülin büyüme faktörü (IGF1) ve koloni stimüle edici faktör'1'i (CSF1) sekrete ederek spermatogonial kök hücrelerin fonksiyonlarını düzenler. Makrofajlar, CSF1 ve retinoik asit (RA) salgılarıyla SKH'lerin çoğalmasında (proliferasyon) ve farklılaşmasını (diferansiyasyon) sağlar. Vasküler yapılar, CSF1 ve endotelial büyüme faktörü (VEGF) salgılarıyla; peritübüler myoid hücreler, glial hücre hattından köken alan nörotrofik faktör (GDNF) ve CSF1 sekresyonlarıyla MKH'in kendini yenilemesi (self-renewal) ve çoğalmasında etkili olurlar. SKH'lerin nişinde bulunan seminifer tübül hücreleri, intrinsik faktörler olarak katkıda bulunurken, nişin dışındaki interstisyum hücreleri de ekstrinsik faktörler olarak MKH'in fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli roller oynar (Şekil 2.10) (Potter ve DeFalco 2017).



Şekil 2.10: İnterstisyel/peritübüler hücrelerin SKH nişine katkıları (Potter ve DeFalco 2017).

2.11. Testiküler Stromal Kök Hücreler

SKH'ler, testis dokusunda en yaygın kök hücre çeşidi olarak kabul görür ve germ hücrelerinin üretilmesi için sürekli olarak bölünür. Son zamanlarda yapılan araştırmalar testiste, SKH'lerden ziyade SKH'lere benzeyen kök hücre kaynağı izole edildi. Testiküler stromal kök hücre olarak adlandırılan bu hücreler; insan, maymun ve fareden izole edilerek birçok çalışmada kullanıldı. TSC'ler ile yapılan ilk çalışma, 2009 yılında Gonzalez ve ark.'ı tarafından olup insan testisinden izole etmişlerdir ve bu hücreler gonadal kök hücre (GKH) adını vermişlerdir (Gonzalez vd. 2009). Bunun yanı sıra fare testisinden ilk izole edilen çalışma ise 2017 yılında Ahmed ve ark.'ı tarafından yapılmıştır (Ahmed vd. 2017). Ayrıca Eildermann ve ark. marmoset maymununun testis dokusundan, testis kaynaklı multipotent stromal hücreleri izole etmeyi başarmışlardır (Tablo 2.11) (Eildermann vd. 2012).

Tablo 2.11: Farklı canlılardan elde edilen TSC'ler ile ilgili yapılan çalışmalar.

Canlılar	Farklılaşma potansiyelleri	Referanslar
İnsan	Adipojenik, kondrojenik ve osteojenik	Gonzalez ve ark.
	Adipojenik, kondrojenik ve osteojenik	Chikhovskaya ve ark.
	Adipojenik ve kondrojenik	De Chiara ve ark.
	Adipojenik, kondrojenik ve osteojenik	Smith ve ark.
Marmoset Maymun	Adipojenik, kondrojenik ve osteojenik	Eildermann ve ark.
Fare	Adipojenik ve kondrojenik	Ahmed ve ark.
	-	Kim ve ark.

2.12. Hipotezler

Hipotezlerimiz şunlardır:

- 1) Azospermi hastalarında, sperm elde edilmesi için yapılan TESE ve mikroTESE ameliyatlarında testislerde doku kaybı ve hasar meydana geldiği göz önünde bulundurulduğunda, cerrahi hasarın; seminifer tübüllere, spermatojenik hücrelere ve interstisyel alanda bulunan hücrelere de hasar verir.
- 2) Seminifer tübüllerdeki bu hasarın onarılmasında, TSC'lerin terapötik etkisi olduğu düşünülmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul ve Bilimsel Araştırma Proje Desteği

Bu alışma Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleti Etik Kurulundan 01.04.2021 tarihinde PAUHDEK-2021/03 numarasıyla araştırma projesi olarak onay almıştır. Proje Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinatörlüğünce (BAP No: 2021SABE006) desteklenmiştir.

3.2. Deney Hayvanları ve Bakım şartları

Çalışmamızda, toplam 21 adet, 10 haftalık sağlıklı, Wistar Albino cinsi 150 ± 15 gram ağırlığında erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar deney süresince, ortam sıcaklığı (21 ± 3 ° C) ve havalandırılması (65-70%) kontrol edilen, 12 saat ışık-karanlık döngüsünde ve sessiz bir odada, ayrı kafeslerde bulunduruldu. Deney hayvanları, %21 protein içeren pelet yemi ve eşme suyu ile ad libitum olarak beslendi.

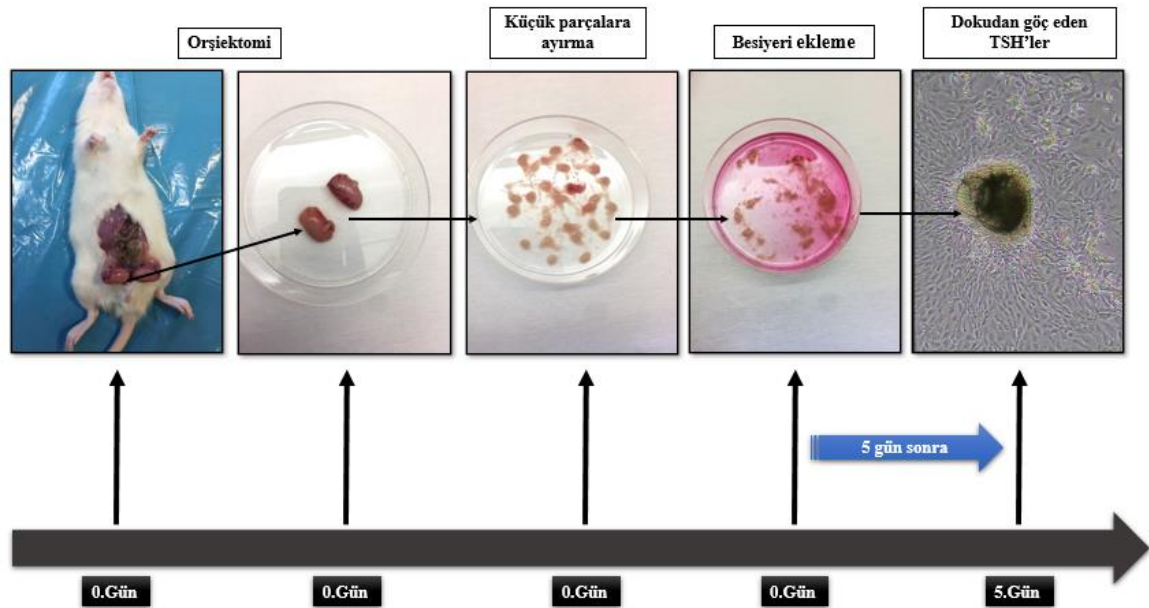
3.3. Testiküler Stromal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Kültüre Edilmesi

23-25 günlük 3 adet erkek prepubertal Wistar Albino sıçanın, testisleri eksize edildi. Alınan testisler Phosphate Buffered Saline (PBS) özeltine atılarak yıkanması sağlandı ve içerisinde Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS), Penisilin-Streptomisin barındıran santrifüj tüplerine alınarak steril koşullarda laboratuvara getirildi.

Testis dokuları, steril olan bisturi yardımıyla, içinde besiyeri bulunan (DMEM; 50 U/ml penisilin, 50 μ g/mL streptomisin, %10 FBS) petri kabında ayrılabilir en ufak

parçalara ayrıldı. Küçük parçalar halindeki testis dokularının üzerlerine 12 ml DMEM eklenerek %5 nem ve 37°C'de olan inkübatöre kaldırıldı. 24 saat sonunda hücreler kontrol edildi. 5 gün boyunca her gün besiyeri değişimi yapıldı. Daha sonra gün aşırı besiyeri değişimi yapıldı. İnkübasyona bırakıldıktan sonraki 3. günde hücrelerin testis dokularından göçleri (migrasyon) ve çoğalmaları takip edildi. Flasklarda bulunan hücreler konfluent (%70-80) duruma geldikten sonra tripsinize edilerek (%0.25 tripsin bulunduran, 1 mM EDTA) kapların yüzeyine yapışmış hücreler kaldırılması sağlandı. Bu hücreler farklı flasklara ekildi ve tekrarlayan pasajlar ile çoğalmaları incelendi. (Şekil 3.3).

Flow sitometri analizi ile farklılaşmayan TSC'lerinin tanımlanması için, Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezinde Sysmex Cube 8 Model kullanılarak, mezenkimal kök hücre belirteçleri (CD29, CD54 ve CD90) ve hematopoietik yüzey belirteçleri (CD45) incelendi.



Şekil 3.3: Testis dokusundan TSC'lerin izole edilmesi.

3.3. Deneysel Uygulamalar

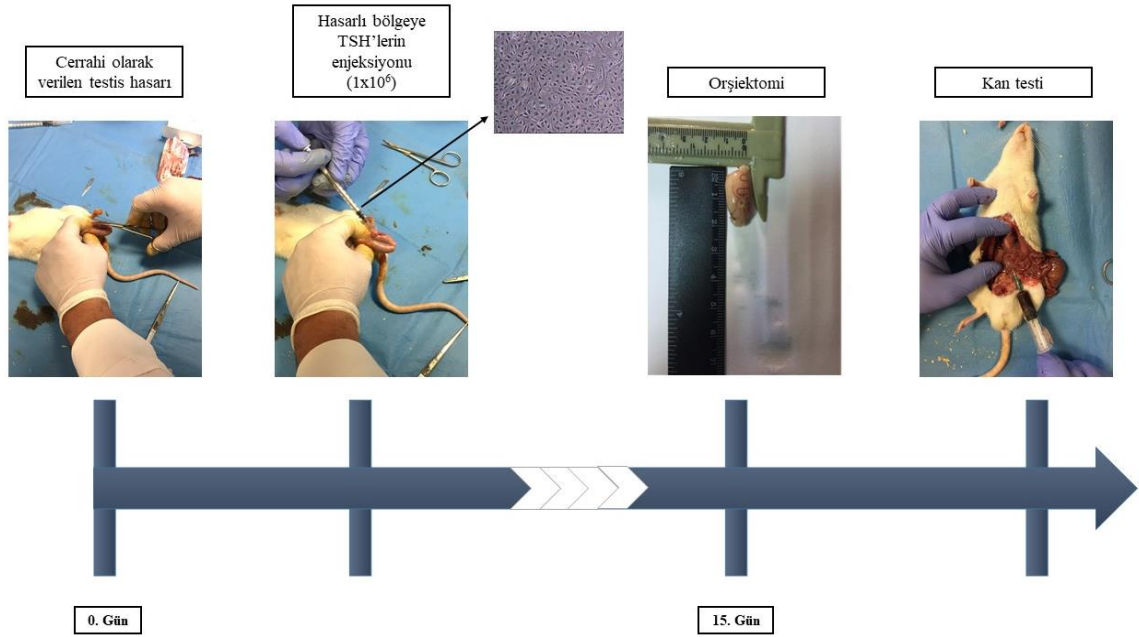
3.3.1. Deney Grupları

21 adet Wistar Albino cinsi sıçan; kontrol, cerrahi testis hasarı ve cerrahi testis hasarı + testisküler stromal kök hücre olmak üzere, 3 gruba rastgele olacak şekilde ayrılmıştır (Tablo 3.3.1).

Tablo 3.3.1: Deney Grupları

Gruplar	Grup Başına Düşen Hayvan Adedi
Kontrol Grubu	6
Cerrahi Testis Hasarı Grubu (Hasar Grubu → CH Sağ Ve CH Sol Olarak Ayrıldı).	6
Cerrahi Testis Hasarı + Testisküler Stromal Kök Hücreler (TSC Grubu → TSC Sağ Ve TSC Sol Olarak Ayrıldı.)	6
Testis Dokudan Stromal Kök Hücrelerin İzolasyonu	3
Kullanılan Toplam Hayvan Sayısı	21

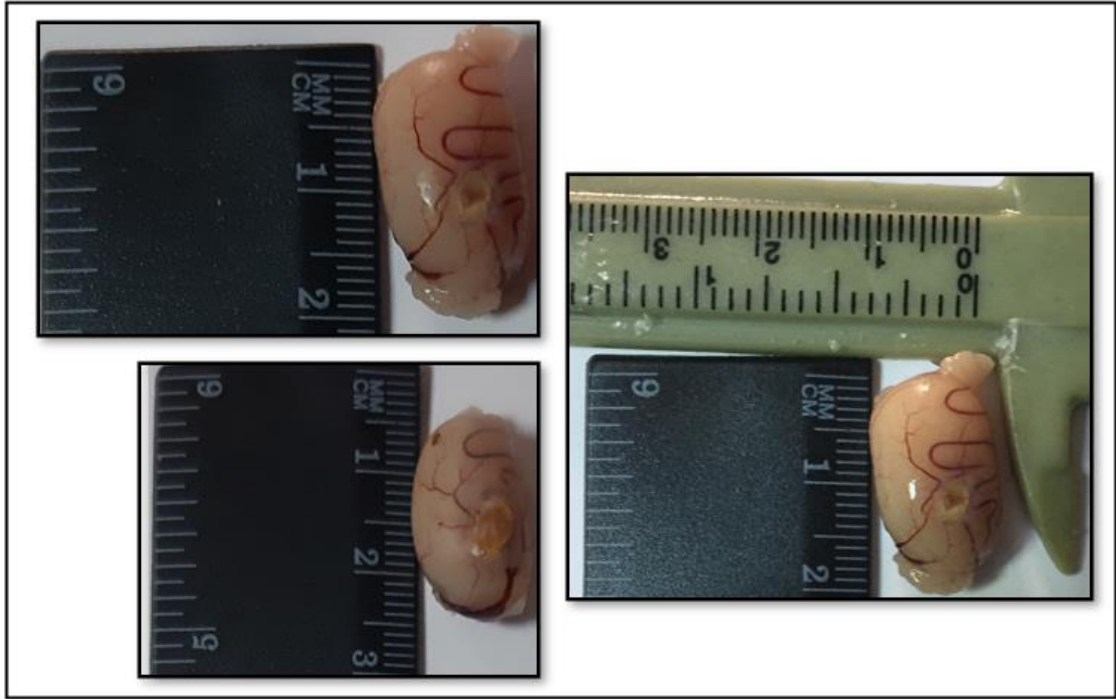
CH grubunda ve TSC grubunda bulunan sıçanlara, makas yardımıyla sol testislerinde 1 adet 0.5 mm büyüklüğünde lezyon oluşturuldu. Daha sonra sadece TSC grubuna, testis lezyonu oluşturulduktan sonra, testis dokusundan 3. pasaj sonunda elde ettiğimiz stromal kök hücreler (Her bir testise 1.00.000 stromal kök hücreleri 0.01ml PBS içerisinde) testis dokusuna enjekte edildi (Şekil 3.3.1). CH Sağ ve TSC Sağ testislerine herhangi bir uygulama yapılmadı.



Şekil 3.3.1: Testis dokusunda verilen cerrahi hasarda TSC'lerin etkisinin incelenmesi.

3.3.2. Testis Dokusunun Çıkarılması

TSC grubuna TSC'lerin enjeksiyonu yapıldıktan 15 gün sonra, tüm gruptaki sıçanlar, anestezi (Xylazine hidroklorür ve Ketamin hidroklorür) altında sakrifiye edildi. Sıçanların alt abdomen duvarında, skrotal insizyon yapılarak, her iki testis skrotumdan dışarı çıkarıldı ve formalin solüsyonuna alındı (Şekil 3.3.2).



Şekil 3.3.2: Cerrahi lezyon oluşturulan testisler

3.3.3. Solüsyonların Hazırlanması

Bouin Solüsyonun Hazırlanışı:

A saturated aqueous solution of Picric Acid.....1500 ml

%37'lik Formaldehit.....500 ml

Glacial acetic acid.....100 ml

%10 'luk Formaldehit Solüsyonun Hazırlanışı:

Hassas terazide tartılan 8 gram Sodyum dihidrojen fosfat ve 13 gram Sodyum fosfat dibasic 1800 ml saf suda çözdürüldükten sonra üzerine 200 ml formaldehit eklendi ve çözdürülmesi sağlandı.

3.3.4. Histolojik İnceleme için Dokuların Hazırlanması

Testisleri, etrafındaki dokulardan izole etmek için diseksiyon yapıldı. Elde edilen dokuların tespitini yapmak için önce 1 saat boyunca bouin çözeltisinde fiksasyonu sağlandı. Bouin solüsyonundan alınan testis dokuları, bisturi yardımıyla üç eşit parçaya bölündükten sonra 2 saat boyunca yine bouin solüsyonunda bekletildi. 2 saatin

sonunda çıkarılan testis dokuları %10'luk formaldehit çözeltisinde 48 saat boyunca bekletildi. 3 parça halinde olan dokular, kasetlere alınarak özel kodlar ile etiketlendi ve her doku için parafin blokları hazırlandı. Parafin bloklar haline gelen dokulardan, mikrotom yardımıyla 5 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Elde edilen kesitlerden, histolojik inceleme yapmak için Hematoksilen-Eozin boyama yapıldı. Ayrıca BAX, BCL-2 ve Kaspas 3 primer antikorlar ve bu antikorlara özgü sekonder antikorlar kullanılarak immünohistokimyasal boyama uygulanarak değerlendirildi.

3.4. Serum Testosteron Düzeyinin Ölçülmesi

1. Sıçanların kalbinden alınan kan örneklerinin hemolize olması önlenecek şekilde steril antikoagulanlı tüplere aktarıldı.
2. Santrifüj cihazlarına konulan antikoagulanlı tüpler, 10 dakika boyunca 1500 rpm'de santrifüjlendi.
3. Santrifüj sonrası çıkarılan örneklerden pellet kısmı atıldı ve pipet aracılığıyla süpernatant kısmı alınarak eppendorflara aktarıldı.
4. Santrifüj cihazına konulan eppendorf tüplerindeki örnekler, 10 dakika 2500 rpm'de santrifüjlendi.
5. Bütün örneklerdeki pelletler atıldı, pipet yardımıyla süpernatant kısmı çekildi ve önce -20 °C'de 1 saat bekletilen örnekler daha sonra -80 °C'de saklandı.
6. Çalışmanın yapılacağı zaman -80 °C'den çıkarılan örneklerin çözmek için 37 °C'de bekletildi.
7. Testosteron seviyelerini ölçmek için testosteron kiti (Testosteron kiti, Sunred, China) yöntemi kullanıldı.

3.5. Uygulanan Yöntemler

3.5.1. Doku Takibi Tekniği

1. Önce 3 saat boyunca bouin çözeltilisinde ve daha sonra da 48 saat formaldehitte bekletilen kasetler içerisindeki testis dokuları akar çeşme suyunda 1 gün boyunca yıkandı.
2. Akarsudan alınan dokular 1 saat boyunca %70'lik etil alkolde bekletildi.
3. 1 saat boyunca %80'lik etil alkolde bekletildi.
4. 1 saat boyunca %96'lık etil alkolde bekletildi.
5. 1 saat boyunca %100'lük etil alkolde bekletildi.
6. 1 saat boyunca %100'lük etil alkolde bekletildi.
7. 1 saat boyunca Ksilen I'de bekletildi.
8. 1 saat boyunca Ksilen II'de bekletildi.
9. 1 saat boyunca Parafin I'de bekletildi.
10. 1 gece boyunca Parafin II'de bekletildi.
11. Dokular parafine gömülerek bloklandı ve etiketlendi.
12. Bloklanan dokulardan 5 µm kalınlığında seri kesitler alındı ve lam üzerine yerleştirildi.

3.5.2. Hematoksilen-Eozin Boyama

1. Kesitler, 1 saat etüvde bekletildikten sonra 1 saat boyunca ksilende bekletildi.
2. Bir saatin ardından ksilenden çıkarılan preparatlar, azalan alkol serilerinden (%100, %96, %80, %70 ve %50 etil alkol)15'er dakika bekletildi.
3. Preparatlar alkolden çıkarılıp akarsuda yıkandı.
4. Daha sonra preparatlar hematoksilende 1 dakika bekletildi ve akarsuya alındı.
5. Önce %1'lik asit-alkol çözeltilisine batırılıp çıkarılan dokular akarsuda yıkandıktan sonra %1'lik amonyaklı suya batırılıp çıkarılarak yine akarsuya alındı.
6. Preparatlar 10 saniye boyunca eozinde bekletilerek akarsuya alındı.
7. Artan alkol serilerde (%50, %70, %80, %96 ve %100'lik etil alkolde) 3-5 dakika bekletildikten sonra önce ksilen II' de 5 dakika, sonra ksilen I'de 5 dakika kadar bekletildi.
8. Lamaların üzerlerine entellan damlatılarak lamellerle kapatıldı.

3.5.3. İmmünohistokimyasal Tekniğinin Uygulanması

Histolojik takibi biten testis dokularından mikrotom cihazı kullanılarak 5 µm kalınlığında seri kesitler alındı ve aşağıdaki protokoller uygulandı:

1. Alının 5 µm'luk kesitler lamların üzerine alındı ve taşıma sepetine sıralandı.
2. Sepetteki lamlar, 60 °C'de 1 gece boyunca etüvde bekletildi.
3. 1 gece sonunda etüvden alınan lamlar, deparafinizasyon metodunu uygulamak için önce ksilende I'de 30 dakika, daha sonra ksilen II'de 30 dakika boyunca bekletildi.
4. Kesitler azalan alkol serilerinde (%100, %100, %90, %80, %70 ve %50 olmak üzere) 10 dakika boyunca bekletildi.
5. Son alkol serisinden geçen kesitler, distile suda 3 defa 5 dakika boyunca yıkandı.
6. Yıkanan kesitler Sitrat Buffer içerisine konuldu ve mikrodalgada kaynayana kadar bekletildi.
7. Daha sonra kesitler PBS'te 3x5 olmak üzere 15 dakika boyunca bekletildi.
8. %3'lük H₂O₂ 'da 15 dakika boyunca bekletildi
9. 3x5 olmak üzere PBS'te yıkanan kesitler daha sonra PAP pen ile işaretlendi.
10. İşaretlenen dokuların üzerine Ultra V Block damlatılarak 30 dakika boyunca bekletildi.
11. 30 dakikanın sonunda primer antikor eklendi ve 1 gece boyunca +4'te bekletildi. Kullanılan primer antikorlar Kaspas 3 (FineTest Catalog no: FNab01289, dilüe 1:50, China), BCL-2 (FineTest Catalog no: FNab00839, dilüe 1:50, China), BAX (FineTest Catalog no: FNab00810, dilüe 1:50, China)
12. PBS içerisinde 15 dakika bekletildi.
13. Ardından dokuların üzerlerine biotinlenmiş afinitite özelliğindeki sekonder antikor eklenerek 30 dakika boyunca muamelesi sağlandı.
14. 15 dakika boyunca PBS'te yıkandı.
15. PBS'ten arındırılan dokulara, Streptavidin Peroxidase (HRP-SA) damlatıldı ve 30 dakika boyunca beklendi.
16. Kesitler son defa 15 dakika süresince PBS ile yıkandı.
17. Kromojen boyası olan DAB damlatılarak 20 dakika boyunca muamale edildi.
18. 15 dakika boyunca distile suda bekletildi.
19. Distile sudan alınan kesitleri zıt boyama yapmak için Hematoksilen ile boyanması sağlandı.
20. Daha sonra artan alkol serilerinde (%50, %70, %80, %90, %100, %100) 2'şer dakika bekletildi.

21. Alkol serilerinden alınan dokular önce ksilen II'de 3 dakika, daha sonra ksilen I'de 3 dakika bekletildi.
22. 3 dakikanın sonunda ksilen I'den alınan dokular hemen entellan ile kapatıldı.
23. Yapılan immünohistokimyasal boyamayı değerlendirmek için aşağıdaki skala kullanıldı.

BCL2, BAX ve Kaspas 3'ün ifadesi, H skoru [$H \text{ SCORE} = \sum P_i (I+1)$] ile semikantitatif bir biçimde değerlendirilmesi sağlandı. I: boyanma yoğunluğu (0: ekspresyon yok, 1: zayıf, 2: orta ve 3: kuvvetli) (Tablo 3.4.2). H skorunun değerlendirilmesi ise ImageJ programı ile gerçekleştirildi.

Tablo 3.5.3: BCL-2, BAX ve Kaspas 3'ün boyanma ekspresyonlarının değerlendirilmesi.

Derece	Karşılığı
3	Kuvvetli Ekspresyon
2	Orta Derece Ekspresyon
1	Zayıf Ekspresyon
0	Ekspresyon yok

3.6. Modifiye Johnsen Skorlanması

Seminifer tübüller boyunca karşılaşılan spermatojenik hücre tiplerinin varlığına veya yokluğuna göre, spermatogenezin başarısını değerlendirmeye yardımcı olan ve 12 skorluk bir puanlama sistemine sahip Modifiye Johnsen skorlaması kullanıldı (Tablo 3.5) (Yoshida vd. 1997).

Tablo 3.6: Modifiye Johnsen Skoru.

SKOR	HİSTOLOJİK KRİTERLER
1	Seminifer tübüllerde hücreninin bulunmaması, skleroz var.
2	Seminifer tübüllerde germ hücrelerinin olmaması ve sadece Sertoli hücrelerinin olması.
3	Tübüllerde germ hücreleri arasında yalnızca spermatogonyumlar bulunması ($\leq \%10$)
4	Çok sayıda spermatogonyumun bulunurken, sekonder spermatozoid, spermatid ve spermatozoanın gözlemlenmemesi ($\geq \%10$)
5	Birkaç primer spermatozoid bulunurken, sekonder spermatozoidlerin, spermatidlerin ve spermatozoaların olmaması ($\leq \%10$)
6	Çok sayıda primer spermatozoid bulunurken, sekonder spermatozoidlerin, spermatidlerin ve spermatozoaların bulunmaması ($\geq \%10$)
7	Birkaç sekonder spermatozoid bulunurken, spermatidlerin ve spermatozoaların olmaması ($\leq \%10$)
8	Çok sayıda sekonder spermatozoid bulunurken, spermatidlerin ve spermatozoaların bulunmaması ($\geq \%10$)
9	Birkaç round spermatid bulunurken, geç spermatidlerin ve spermatozoa gözlemlenmemesi ($\leq \%10$)
10	Çok sayıda round spermatid bulunurken, geç spermatidlerin ve spermatozoa gözlemlenmemesi ($\geq \%10$)
11	Birkaç tane spermatozoa ve/veya geç spermatid bulunması ($\leq \%10$)
12	Çok sayıda spermatozoa ve/veya geç spermatid bulunması ($\geq \%10$)

Johnsen skorunun 11 veya 12 olması seminifer tübüllerde normal histolojiyi açıklarken, 10 puan olması hipospermatogenezin olduğunu kanıtlar, 3-9 puan olması ise matürasyon durması anlamına gelir, 2 skorunda yalnızca Sertoli hücre olması ve germ hücrelerinin olmaması germinal hücre aplazisini gösterirken 1 skoru tübüler sklerozu ifade eder. Tüm testislerde, 25 adet seminifer tübülün germinal epitelyumu incelendi.

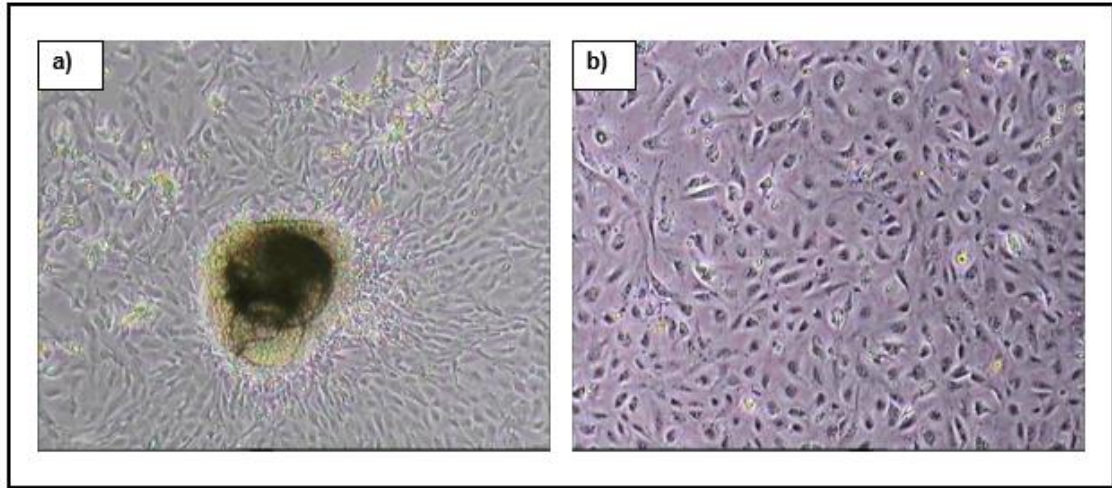
3.8. İstatiksel Analiz

Tanımlayıcı istatistikler nicel değişkenler için ortanca (minimum-maksimum) değerler olarak sunulmuştur. Testosteron düzeylerinin ve İmmünohistokimyada H skorunun gruplar arasında kıyaslanmasında Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Kruskal-Wallis testi SPSS (Statistical Package for Social Sciences, Version 15.0, Chicago, IL) ile değerlendirilmiştir. Kontrol, CH ve TSC grubundaki ratların 25 seminifer tübüllerine ilişkin Johnsen skoru karşılaştırmasında her bir rat bir küme olarak değerlendirilip kümelenmiş veriler için Wilcoxon Sıra Toplamı Testi (Wilcoxon Sum Rank Test) gerçekleştirilmiştir. İkişerli karşılaştırmalar yine bu test ile değerlendirildikten sonra p değerleri üzerinde Bonferroni düzeltmesi (karşılaştırma sayısı =3) gerçekleştirilmiştir. Analiz, RStudio (Version 1.2.5033, RStudio, Inc., Boston, MA) programı yardımıyla gerçekleştirilmiş olup “clusrank” paketi (Datta-Setten metodu) kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık seviyesi tüm analizlerde 0,05 olarak kabul edilmiştir (Jiang vd. 2020).

4. SONUÇLAR

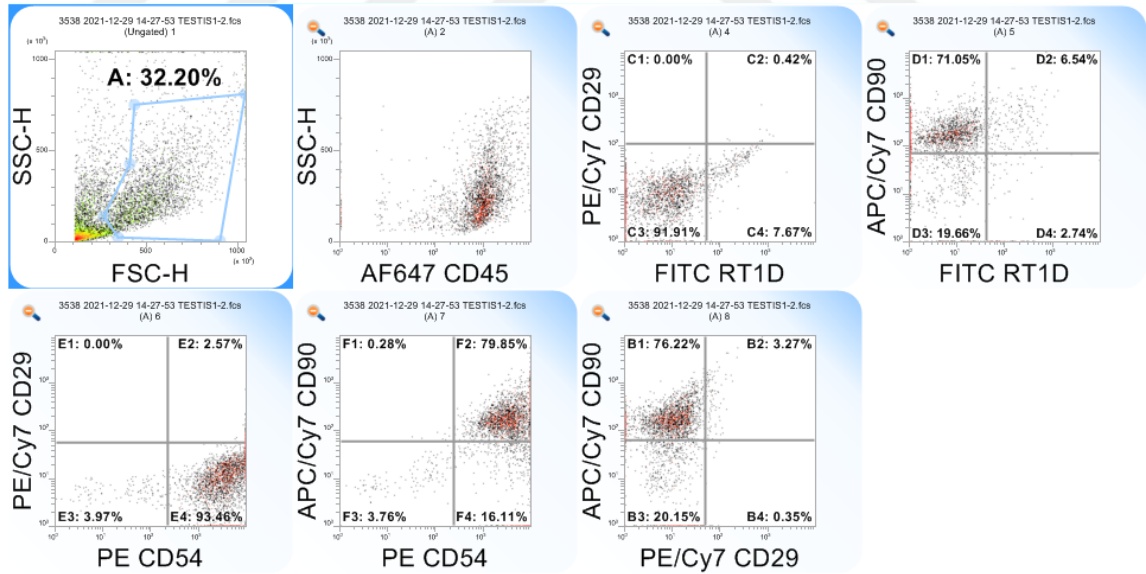
4.1. Testiküler Stromal Kök Hücrelerin Kültürü ve Karakterizasyonu

Faz-kontrast mikroskopisi ile yapılan incelemede, TSC'lerin 3. günde testis dokusundan migrasyona başladı ve kültür kaplarına yapıştıkları görüldü. 9. günde ise hücreler konflue oldu. 3. Pasaja gelindiğinde mikroskopi ile yapılan sayımda yaklaşık her kültür kabında $1,5 \times 10^6$ - 2×10^6 hücrenin ürediği belirlendi. Ayrıca hücrelerin morfolojik görünümünün iç şekildedinde ve fibroblast benzeri olduğu tespit edildi (Şekil 4.1.1).

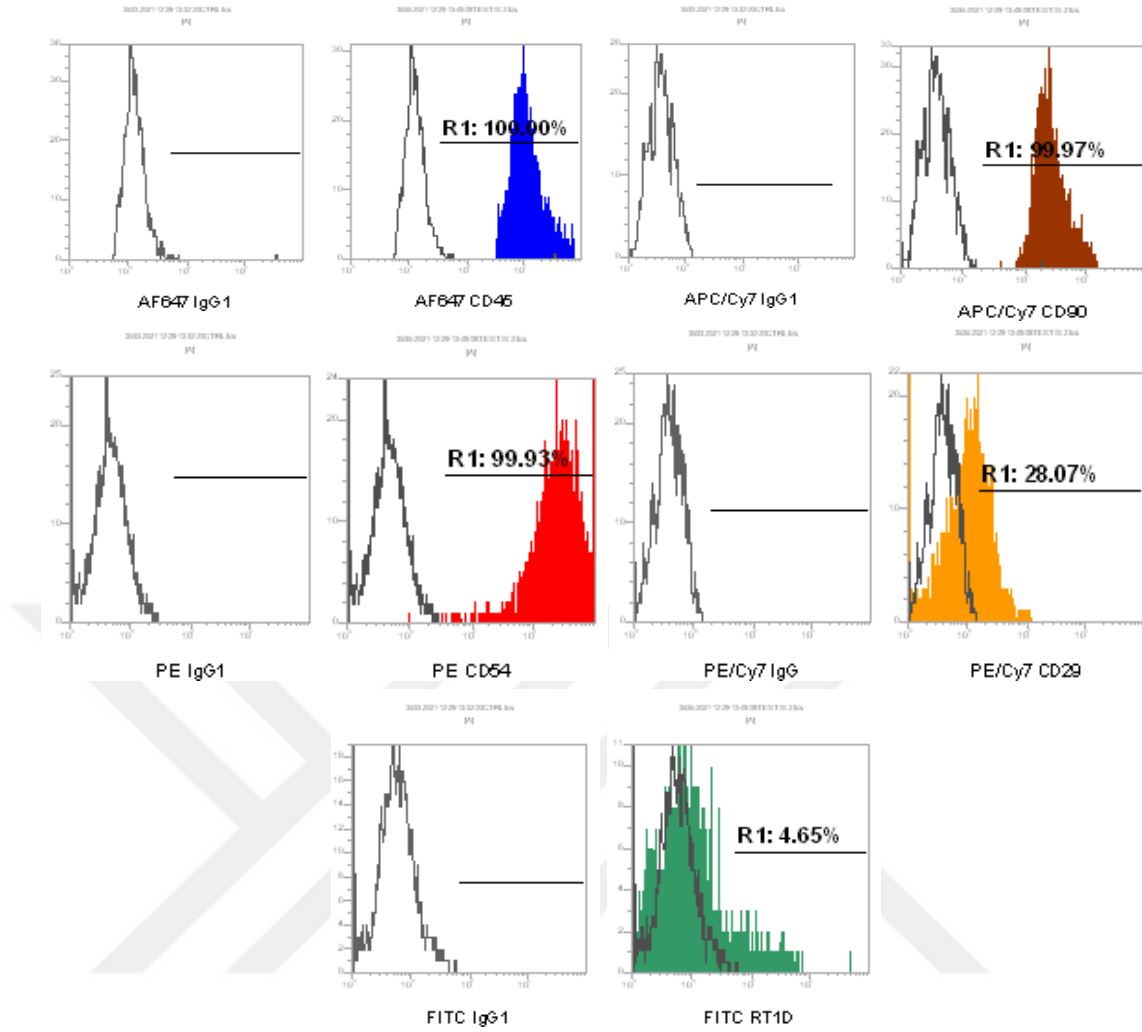


Şekil 4.1.1: Sıçan testisinden üretilen stromal kök hücrelerin morfolojisi. a) 5. gün sonunda testis dokusundan göç eden TSC'ler. b) 9. günde konflue olan TSC'ler.

Flow sitometri analizinde testiküler stromal kök hücrelerin; CD90'ı %99.97 oranında, CD 54'ü %99.93 oranında hematopoetik kök hücre belirteci olan CD45'i ise %100.00 oranında ekspres etti. CD54 ve CD90'ı birlikte %79.85 oranında ekspres ettiği belirlendi. Ayrıca CD29'u %28.07 oranında ve MHC II'yi (RT1D) ise %4.65 ekspres ettiği tespit edildi. (Şekil 4.1.2, 4.1.3). Bu sonuçlar, bizim mezenkimal özellikteki stromal kök hücreleri elde ettiğimizi göstermektedir.



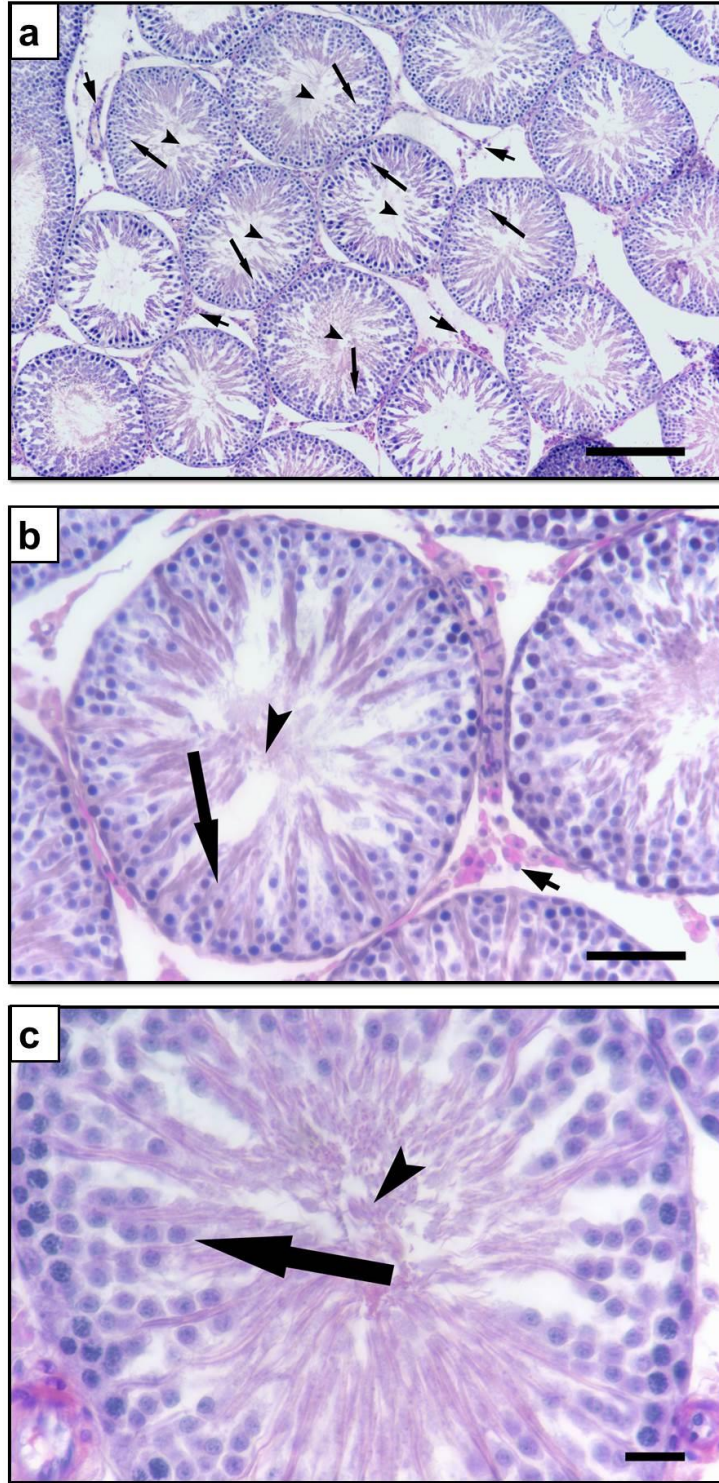
Şekil 4.1.2: Testisten izole edilen stromal kök hücrelerin flow sitometri analizi ile immünofenotiplendirilmesi.



Şekil 4.1.3: Testisten izole edilen stromal kök hücrelere ait flow sitometri analizi sonuçlarının grafik görüntüleri.

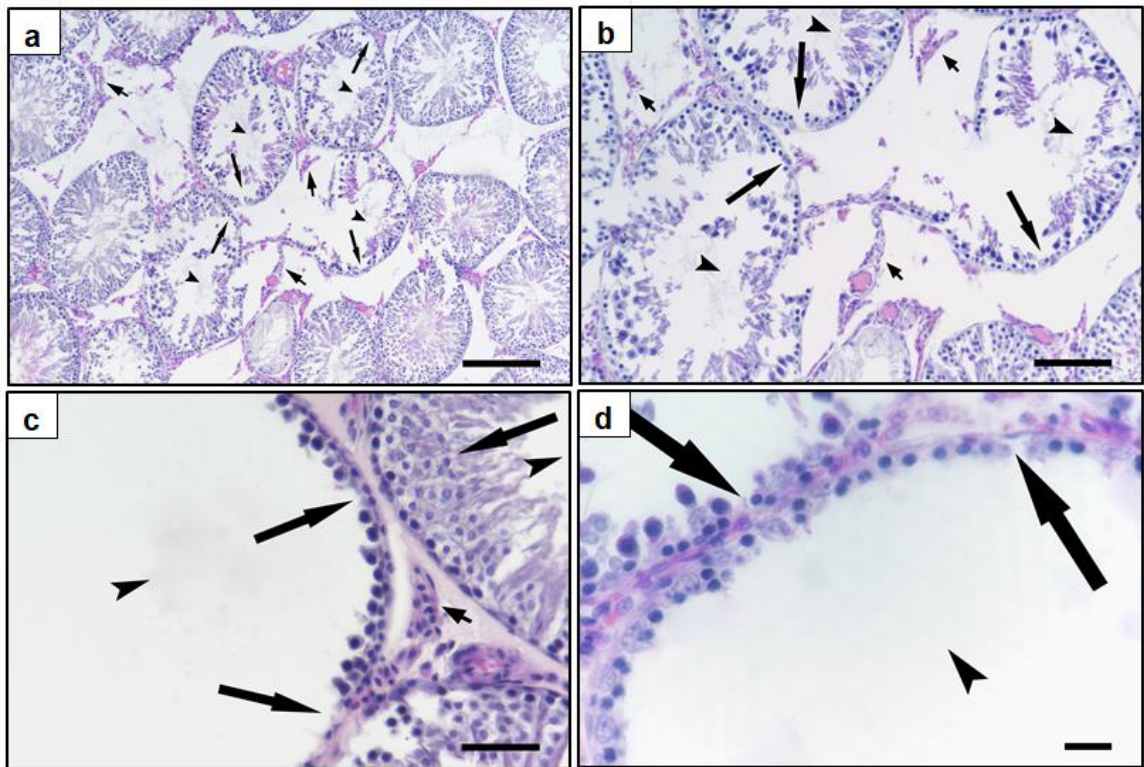
4.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Sonuçları

Kontrol grubunda interstisyel alan ve seminifer tübüller histolojik olarak normal görünüme sahipti. Seminifer tübüllerdeki spermatojenik seri hücrelerinin, bazaldan lümene doğru düzenli bir organizasyona sahip olduğu izlendi. Her tübülde normal bir spermatogenezin olduğu tespit edildi. Spermatozoonların baş kısımlarının Sertoli hücrelerinin arasında, kuyruk kısımlarının ise lümene doğru olduğu saptandı. İnterstisyel alanda ise normal görünüme sahip Leydig hücreleri ve vasküler yapılar görüldü (Şekil 4.2.1).



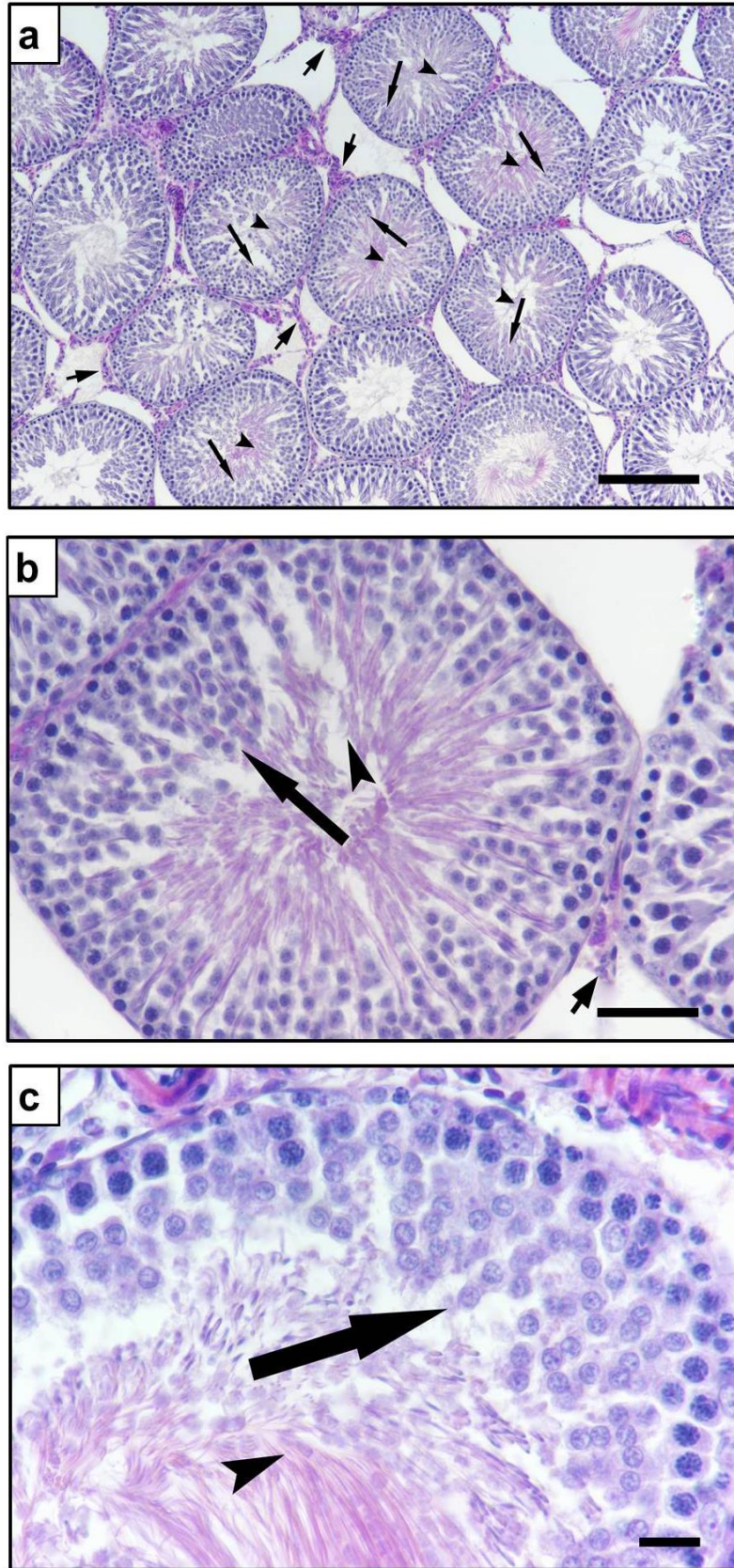
Şekil 4.2.1: Kontrol grubundan alınan testis kesitinde normal görünüme sahip seminifer tübüller ve interstisyel aralık. a) X10, b) X40, c) X60; spermatojenik seri hücreler (kalın ok), interstisyel aralık (ince ok), seminifer tübülün dolu lümeni (ok başı), H&E boyası.

CH Sol grubunda yapılan incelemelerde testis dokusu histolojisinin Kontrol grubuna benzer olduğu görüldü. Dokunun bazı bölümlerinde seminifer tübüller arasında açıklıkların bulunduğu tespit edildi. Bazı seminifer tübüllerde ise spermatojenik seri hücrelerinin olmadığı ve yer yer sadece spermatogonyumların varlığı ile karşılaşıldı. Ayrıca yine bazı seminifer tübüllerde, spermatojenik serideki düzenli sıralamanın ve tübül yapısının bozulduğu gözlemlendi. İnterstisyel alandaki Leydig hücrelerinde hafif düzeyde azalma olduğu gözlemlendi.



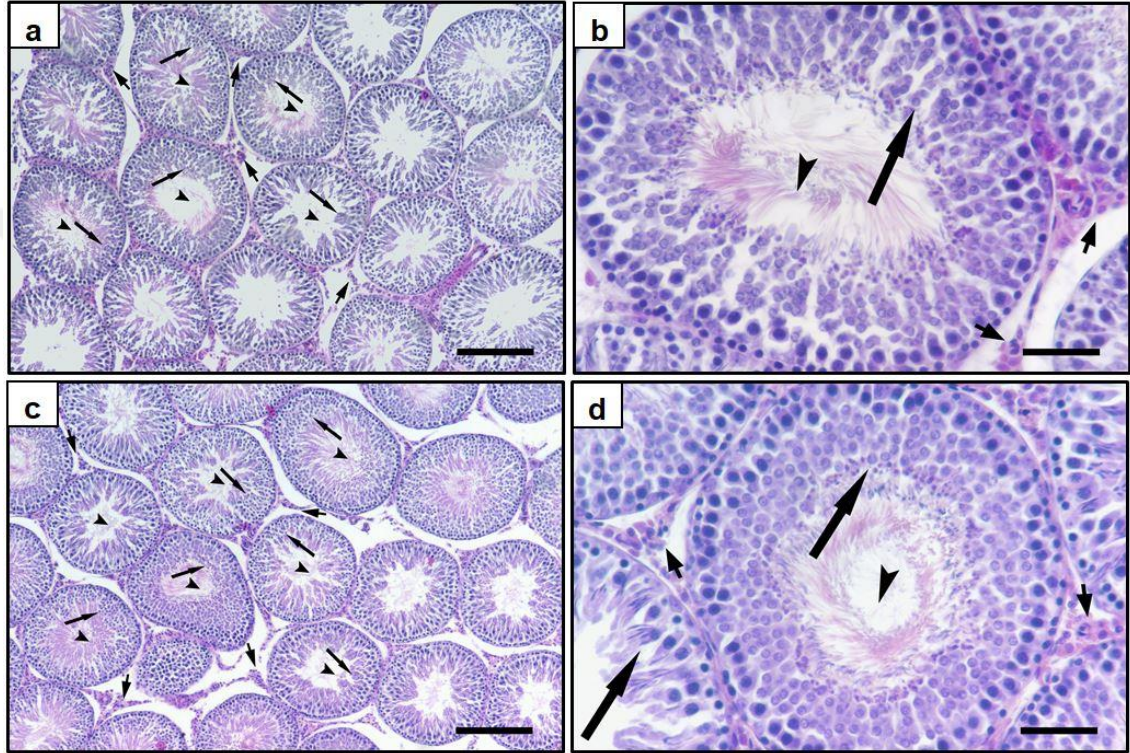
Şekil 4.2 2: CH Sol grubundan alınan testis kesitinde (a-b), Kontrol grubuna benzerlik gösterse de bazı alanlarda seminifer tübüllerdeki spermatojenik seri bozulmuş ve lümen boştu. Hatta bazı seminifer tübüllerde sadece spermatogonyumların varlığı ile karşılaşıldı (c-d). Ayrıca interstisyel alandaki dokuda ve Leydig hücrelerinde azalma olduğu görülmektedir. a) X10, b) X20, c) X40, d) X60; spermatojenik seri (kalın ok), interstisyel aralık (ince ok), seminifer tübülün lümeni (ok başı), H&E boyası.

TSC Sol grubunda boyanan kesitler ışık mikroskopunda incelendi ve testis dokusunun genel görünümünün Kontrol grubuna benzediği tespit edildi. Seminifer tübül açıklıklarının azaldığı, spermatojenik hücrelerin daha düzenli olduğu saptandı. İnterstisyel alanda yer alan Leydig hücrelerin ve vasküler yapılarında korunduğu saptandı.



Şekil 4.2.3: TSC sol grubundan alınan testis kesitinde, seminifer tübüllerdeki spermatojenik serinin düzgün olduğu ve seminifer tübüllerdeki açıklıkların azaldığı görüldü. Ayrıca tübüllerdeki lümenlerin spermatozoa kuyrukları ile dolu olduğu görüldü. İnterstisyel alanlar ve vasküler yapılar korunmuştur. a) X10, b) X40, c) X60; spermatojenik seri (kalın ok), interstisyel aralık (ince ok), seminifer tübülün lümeni (ok başı), H&E boyası.

CH Sağ ve TSC Sağ grubunda yapılan histolojik gözlemede, Kontrol grubunda elde edilen bulgular ile aynı sonuçlar elde edildi. Seminifer tübüller arasında sınırların normal olduğu ve tübül içerisindeki germ hücre organizasyonu, bazaldan spermatogonyumlardan başlayıp lümeninde yer alan spermatozalara doğru düzenli bir biçimde olduğu gözlemlendi. İnterstisyel alandaki Leydig hücrelerin ise yine Kontrol grubunda olduğu gibi normal bir görünüm sergiledi.



Şekil 4.2.4: CH sağ ve TSC sağ grubundan alınan kesitlerde Kontrol grubuna benzer sonuçlar elde edildi. Seminifer tübüldeki spermatojenik seri hücrelerin dizilişinin normal olduğu ve tübül lümenlerinde spermatozooların kuyruklarıyla dolu olduğu görülmektedir. İnterstisyel alanda Leydig hücreleri normal görünümüne sahipti. a) CH sağ X10, b) CH sağ X40, c) TSC sağ X10, d) TSC sağ X40; spermatojenik seri (kalın ok), interstisyel aralık (ince ok), seminifer tübülün lümeni (ok başı), H&E boyası.

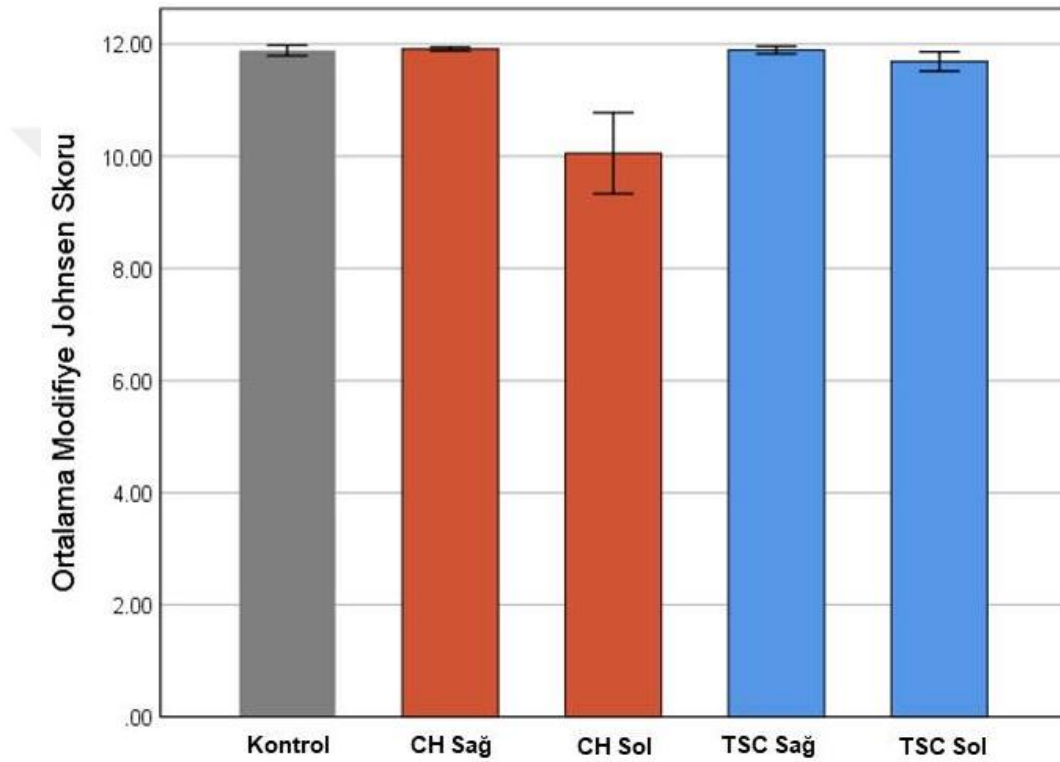
4.3. Modifiye Johnsen Skorunun Değerlendirilmesi

Her sıçanın testisinden enine olarak alınan kesitlerde, 25 adet seminifer tübülün, epitel tabakası değerlendirildi. Yapılan değerlendirmede, CH grubu, Kontrol ve TSC grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulundu ($p < 0,002$, $p < 0,015$). Kontrol grubu ile TSC grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p < 0,149$) (Tablo 4.3 ve Şekil 4.3).

Tablo 4.3: Modifiye Johnsen Skorunun karşılaştırılması.

Gruplar	Ortalama \pm SD	Medyan (Minimum-Maksimum)	p değeri
Kontrol (n=6)	11,90 \pm 0,089	11.90 (11,72-11,96) ^a	<0.001
CH Sol (n=6)	10.12 \pm 0,689	10.12 (8.92-11.00) ^b	
TSC Sol (n=6)	11.64 \pm 0,184	11.64 (11.52-11.92) ^a	

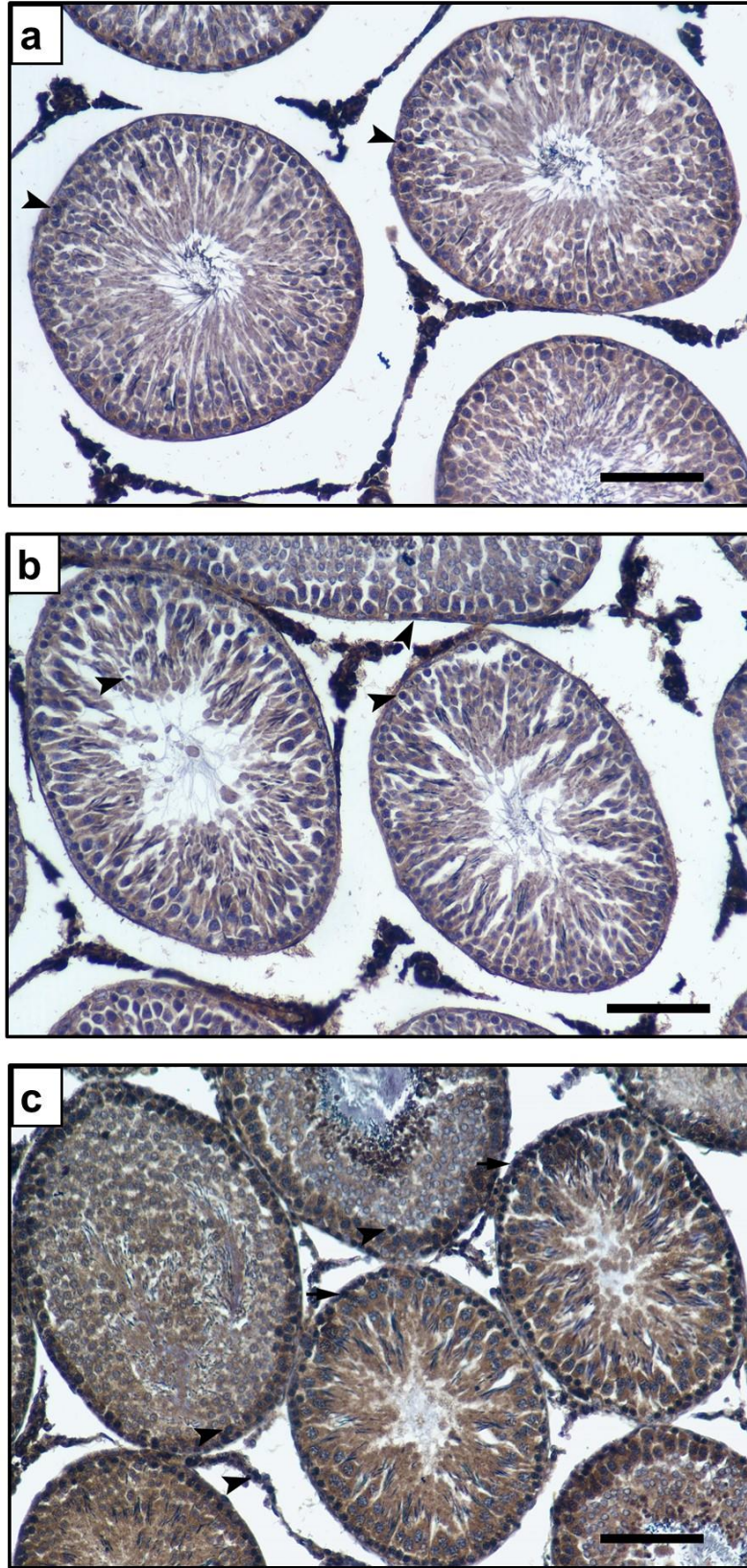
a,b: Farklı notasyona sahip gruplar arasında 0,05 anlamlılık düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık söz konusu iken aynı notasyona sahip gruplar arasında fark yoktur.

**Şekil 4.3:** Grupların Modifiye Johnsen Skor ortalamaları

4.4. İmmünohistokimyasal Boyama Sonuçları

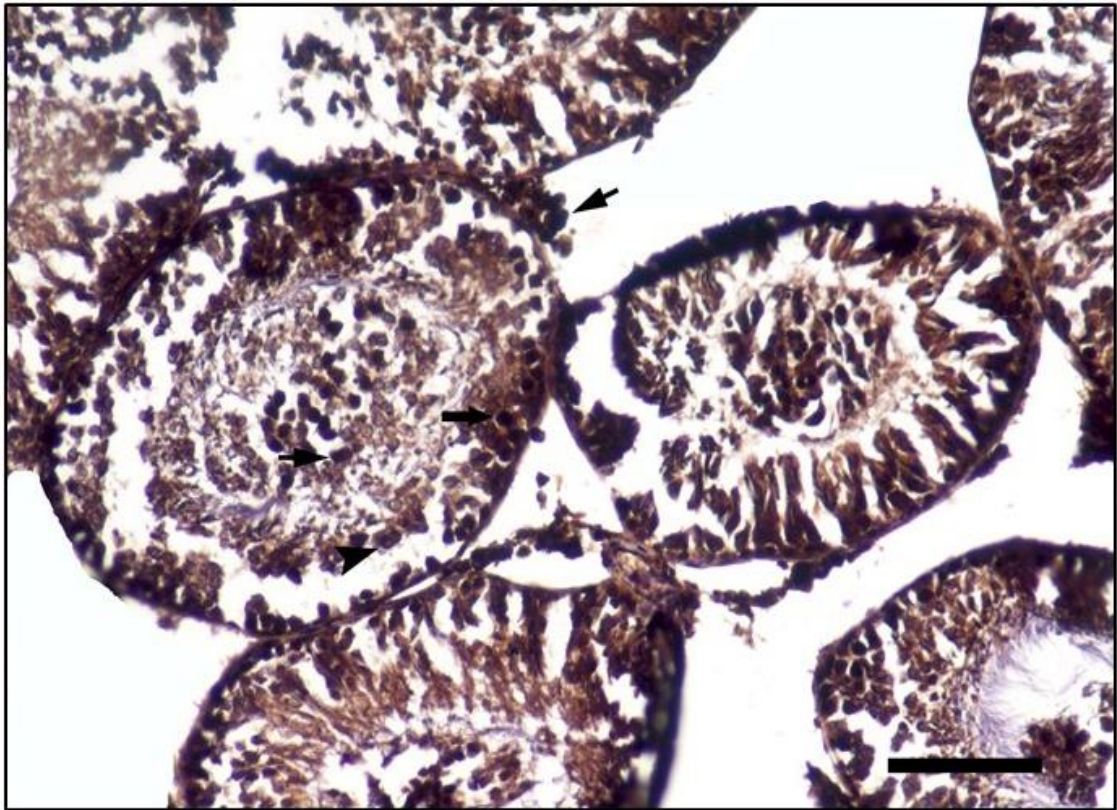
4.4.1. BAX Ekspresyonu

BAX ile boyanan testis kesitlerinde, Kontrol, CH sağ ve TSC sağ gruplarında hem seminifer tübüldeki spermatojenik seri hücrelerde hem de interstisyel alandaki Leydig hücrelerinde sitoplazmik boyanma açısından genel olarak negatif ekspresyon gözlemlendi. Ancak bazı seminifer tübüllerde zayıf ekspre olan hücrelerin de varlığı ile karşılaşıldı (Şekil 4.4.1.1).



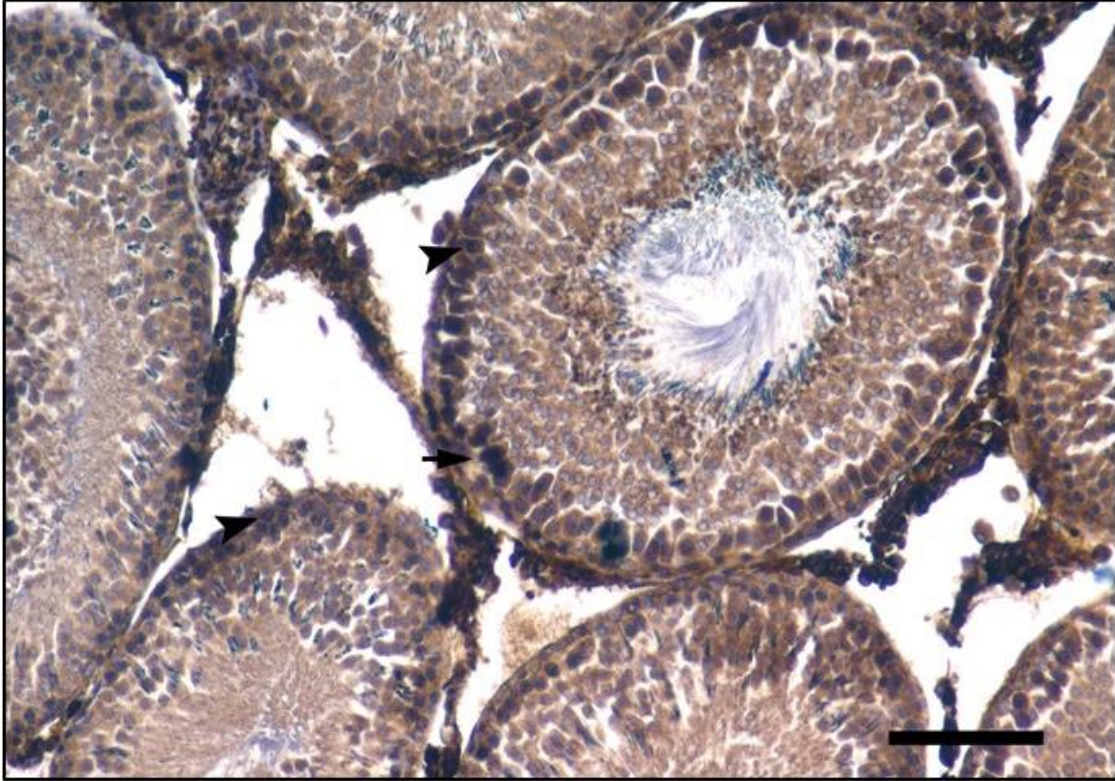
Şekil 4.4.1.1: Gruplara ait BAX ekspresyon görüntüleri. a) Kontrol X40, b) CH sağ X40, c) TSC Sağ X40; zayıf ekspresyon gösteren hücreler (ok ucu), orta ekspresyon gösteren hücreler (ince ok).

CH sol grubunda yapılan incelemelerde, spermatojenik seri hücreler arasında en fazla spermatogonyum ve primer spermatositlerin sitoplazmalarında zayıf ekspresyon görülürken yer yer orta ve yüksek ekspresyon reaksiyon izlendi. Sekonder spermatosit ve spermatozoaların ise bazılarında zayıf ekspresyon tespit edildi. İnterstisyel alandaki bazı Leydig hücrelerinde de zayıf ekspresyon gösterdi (Şekil 4.4.1.2, Şekil 4.4.3). Yapılan H skoru analizinde, CH sol grubu, Kontrol ve TSC sol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p<0.007$, $p<0.022$).



Şekil 4.4.1.2: CH Sol grubuna ait BAX ekspresyon görüntüsü X40; zayıf ekspresyon gösteren hücreler (ok ucu), orta ekspresyon gösteren hücreler (ince ok), yüksek ekspresyon gösteren hücreler (kalın ok).

TSC sol grubu BAX boyanması açısından Kontrol grubu ile benzerlik gösterdi. Seminifer tübül hücrelerinde ve interstisyel dokuda bulunan Leydig hücrelerinde genelde sitoplazmik ekspresyon negatifti. Kontrol grubunda olduğu gibi yer yer zayıf ekspresyon gösteren germ hücrelerinde olduğu görüldü (Şekil 4.4.1.3). Kontrol ve TSC Sol grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan bir fark yoktu ($p<1.000$) (Tablo 4.4.1, Şekil 4.4.3).



Şekil 4.4.1.3: TSC Sol grubuna ait BAX ekspresyon görüntüsü X40; zayıf ekspresyon gösteren hücreler (ok ucu), orta ekspresyon gösteren hücreler (ince ok), yüksek ekspresyon gösteren hücreler (kalın ok).

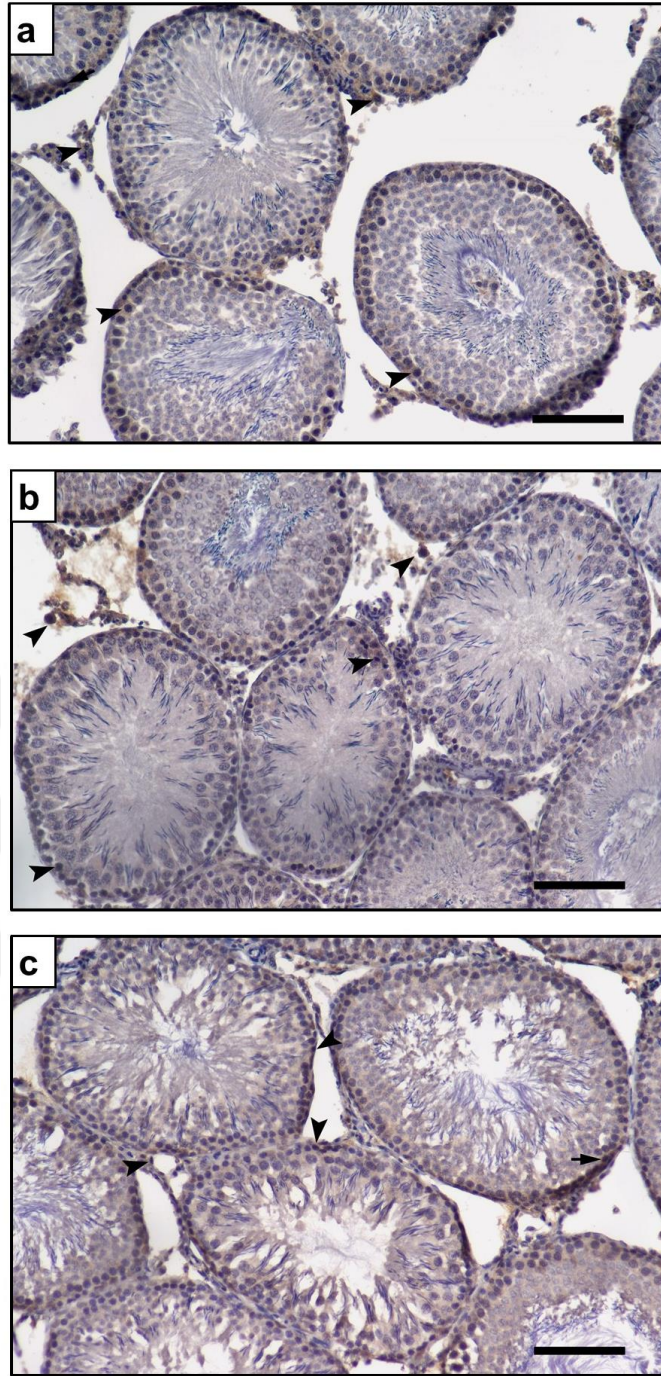
Tablo 4.4.1: Gruplar arasındaki BAX ekspresyonunun H skor analiz sonuçları.

Gruplar	Ortalama \pm SD	Medyan (Minimum-Maksimum)	p değeri
Kontrol (n=6)	118.54 \pm 12.30	117.28 (101.18 - 101.18) ^a	<0.004
CH Sol (n=6)	165.45 \pm 22.77	22.77 (140.53 - 140.53) ^b	
TSC Sol (n=6)	115.05 \pm 9.74	111.99 (104.22 - 129.98) ^a	

a,b: Farklı notasyona sahip gruplar arasında 0,05 anlamlılık düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık söz konusu iken aynı notasyona sahip gruplar arasında fark yoktur.

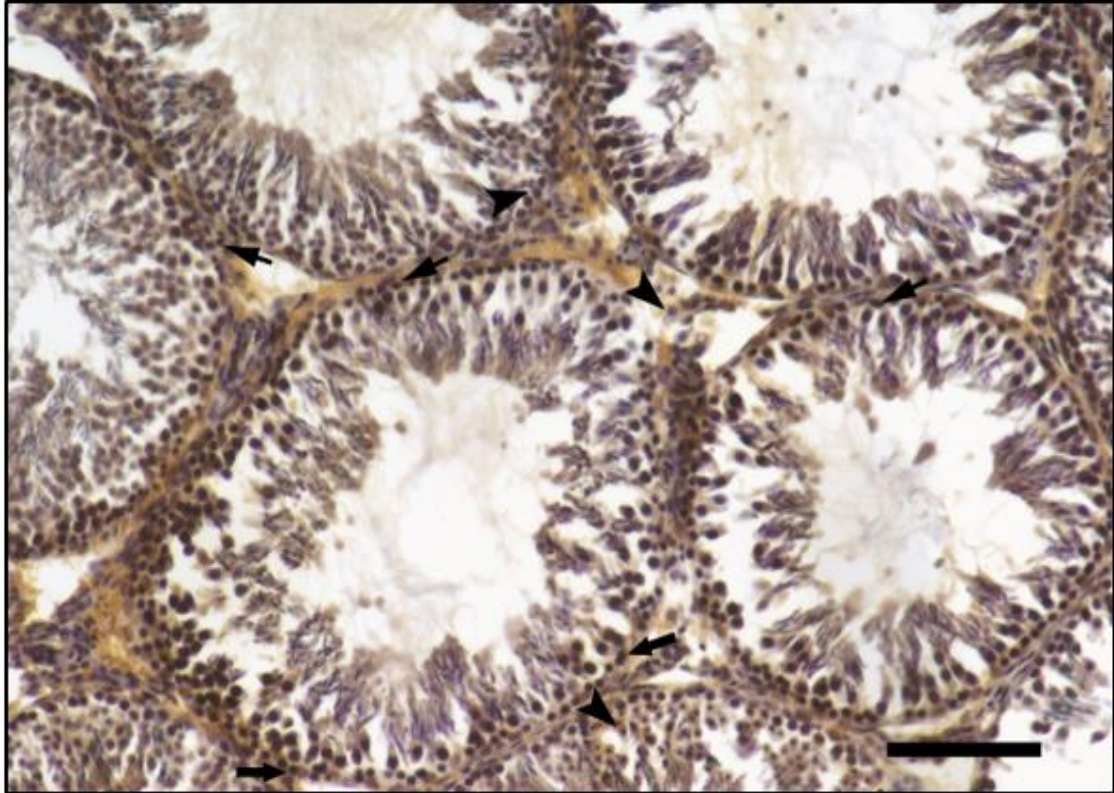
4.4.2. BCL-2 Ekspresyonu

BCL-2 boyaması yapılan kesitlerde, Kontrol, CH sağ ve TSC sağ gruplarında spermatojenik seri hücreleri ve Leydig hücrelerinin nükleuslarında ve sitoplazmalarında ekspresyon genel olarak negatif olarak belirlendi. Bazı spermatojenik hücrelerde zayıf ekspresyon gözlemlendi (Şekil 4.4.2.1, Şekil 4.4.3).



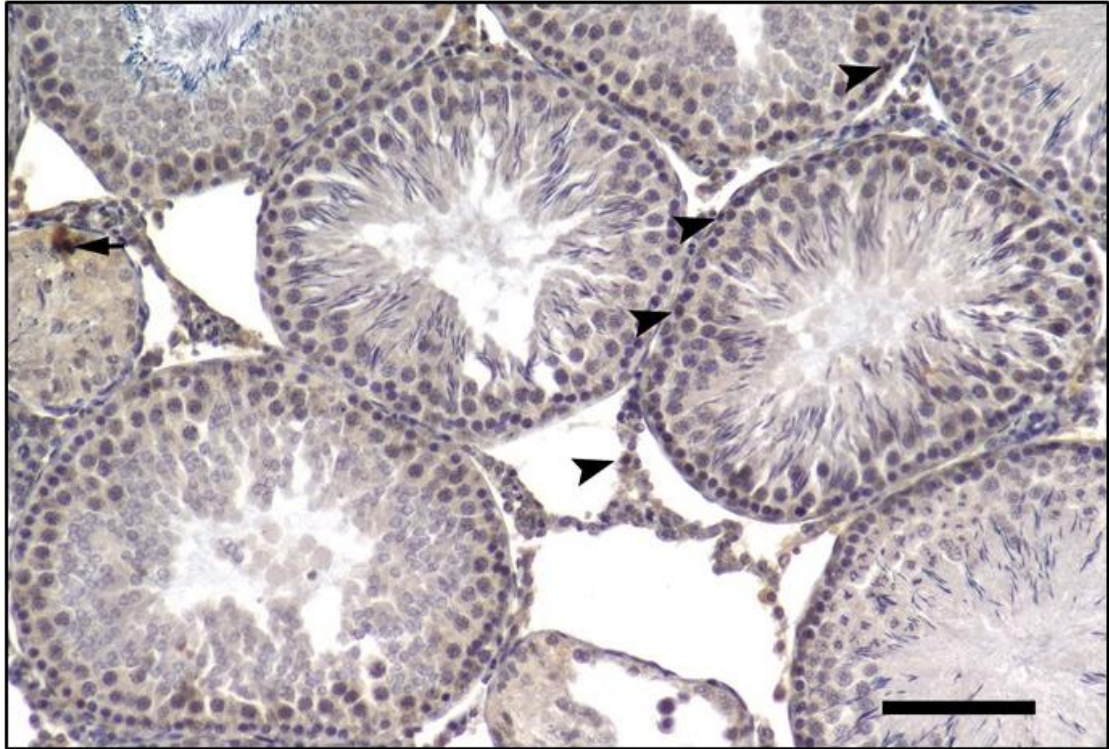
Şekil 4.4.2.1: Gruplara ait BCL-2 ekspresyon görüntüleri. a) Kontrol X40, b) CH sağ X40, c) TSC Sağ X40; zayıf ekspresyon gösteren hücreler (ok ucu), orta ekspresyon gösteren hücreler (ince ok).

CH sol grubunda seminifer tübül hücrelerinde en fazla spermatogonyum ve primer spermatozoidlerin nükleuslarında ve sitoplazmalarında zayıf ekspresyon görülürken, bazı sekonder spermatozoid spermatozoa ve interstisyel alanda bulunan Leydig hücrelerinin nükleuslarında orta ve yüksek derecede ekspresyon gözlemlendi (Şekil 4.4.2.2, Şekil 4.4.3). BCL-2 ekspresyonunun H skoru analizinde CH sol grubu, Kontrol ve TSC sol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan fark anlamlı bulundu ($p < 0.005$, $p < 0.035$).



Şekil 4.4.2.2: CH sol grubuna ait BCL-2 ekspresyon görüntüsü. X40; zayıf ekspresyon gösteren hücreler (ok ucu), orta ekspresyon gösteren hücreler (ince ok), yüksek ekspresyon gösteren hücreler (kalın ok).

TSC sol grubunda boyanma şiddeti, seminifer tübüldeki spermatojenik hücrelerde ve Leydig hücrelerin nükleuslarında ve sitoplazmalarında ekspresyon negatif reaksiyon gösterse de az sayıda germ hücresinde zayıf ekspresyon vardı (Şekil 4.4.2.3). Kontrol ve TSC sol grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p < 1.000$) (Tablo 4.4.2, Şekil 4.4.3).



Şekil 4.4.2.3:TSC Sol grubuna ait BCL-2 ekspresyon görüntüsü X40; zayıf ekspresyon gösteren hücreler (ok ucu), orta ekspresyon gösteren hücreler (ince ok).

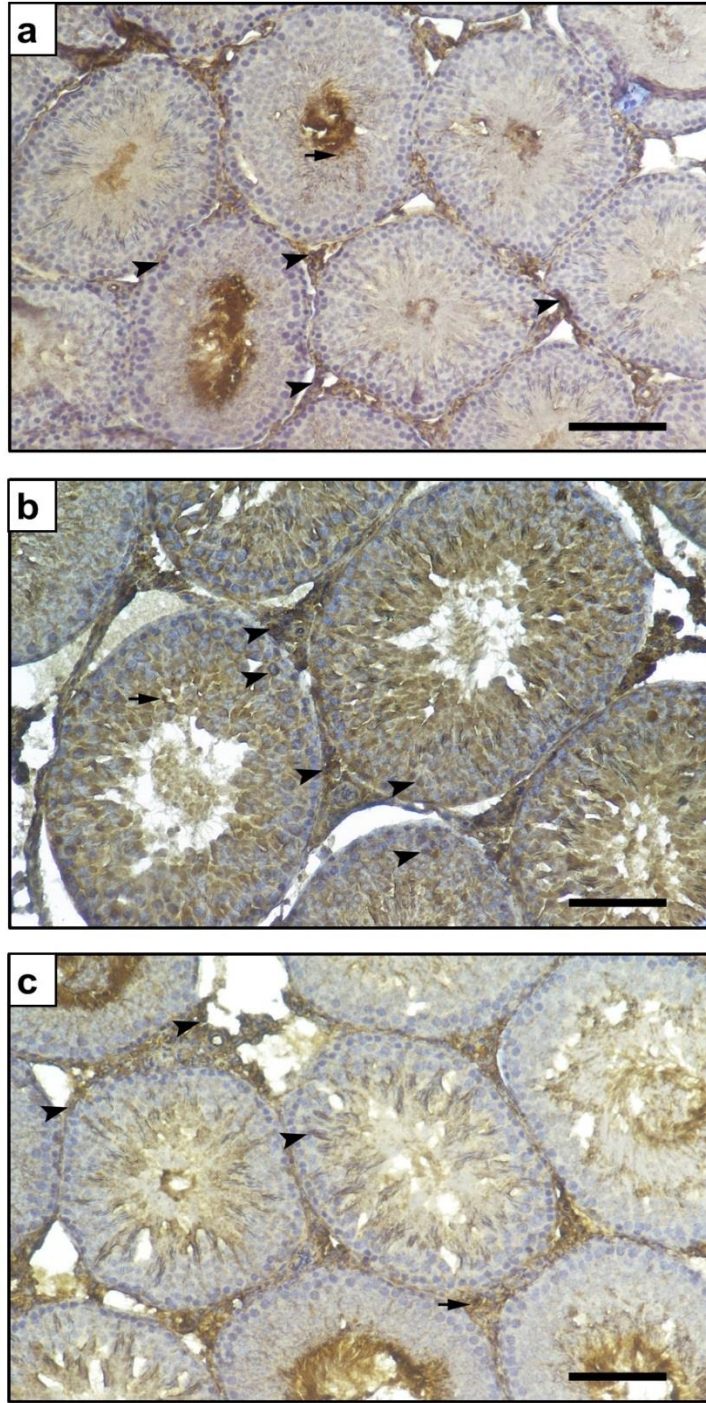
Tablo 4.4.2: Gruplar arasındaki BCL-2 ekspresyonun H skor analiz sonuçları.

Gruplar	Ortalama \pm SD	Medyan (Minimum-Maksimum)	p değeri
Kontrol (n=6)	107.42 \pm 8.20	103.51 (100.26 - 119.29) ^a	<0.004
CH Sol (n=6)	179.31 \pm 16.13	179.42 (160.85 - 204.29) ^b	
TSC Sol (n=6)	116.31 \pm 13.76	114.18 (100.59 - 138.44) ^a	

a,b: Farklı notasyona sahip gruplar arasında 0,05 anlamlılık düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık söz konusu iken aynı notasyona sahip gruplar arasında fark yoktur.

4.4.3. Kaspas 3 Ekspresyonu

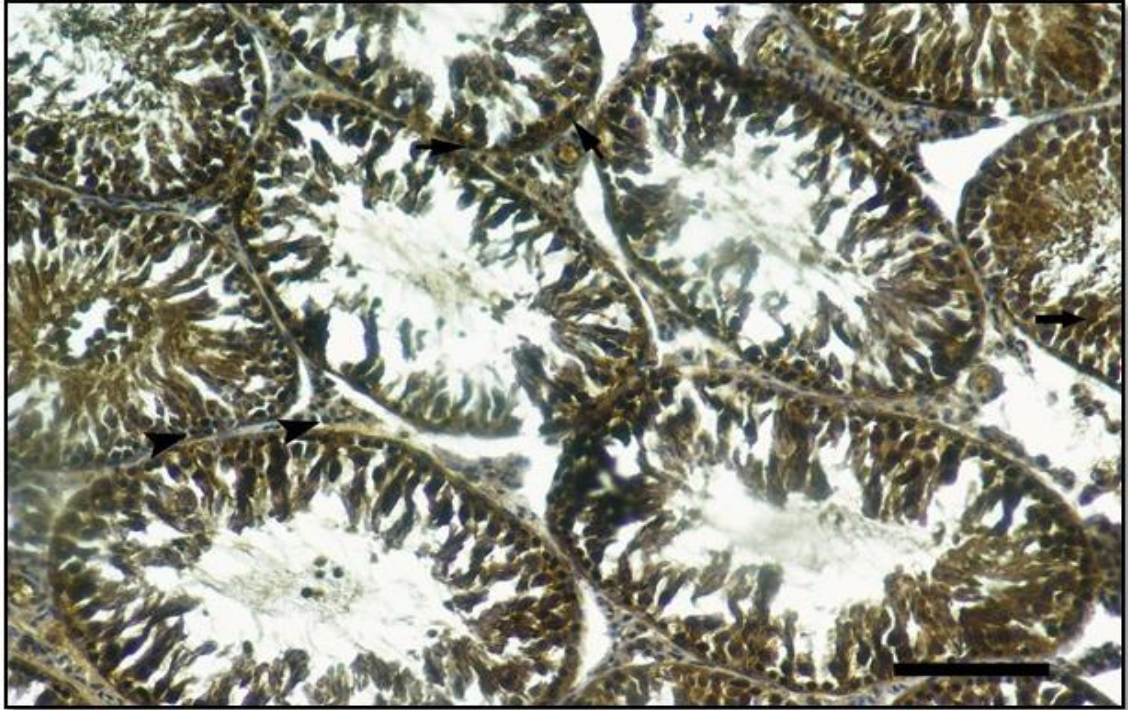
Testis kesitlerinin Kaspas 3 ekspresyonları Kontrol, CH sağ ve TSC sağ gruplarının hem seminifer tübüldeki spermatojenik seri hücrelerin hem de Leydig hücrelerin sitoplazmalarında genel olarak negatif olarak reaksiyon gösterdi. Ancak zayıf reaksiyon veren germ hücrelerinde olduğu izlendi (Şekil 4.4.3.1, Şekil 4.4.3).



Şekil 4.4.3.1: Gruplara ait Kaspas 3 ekspresyon görüntüleri. a) Kontrol X40, b) CH sağ X40, c) TSC Sağ X40; zayıf ekspresyon gösteren hücreler (ok ucu), orta ekspresyon gösteren hücreler (ince ok).

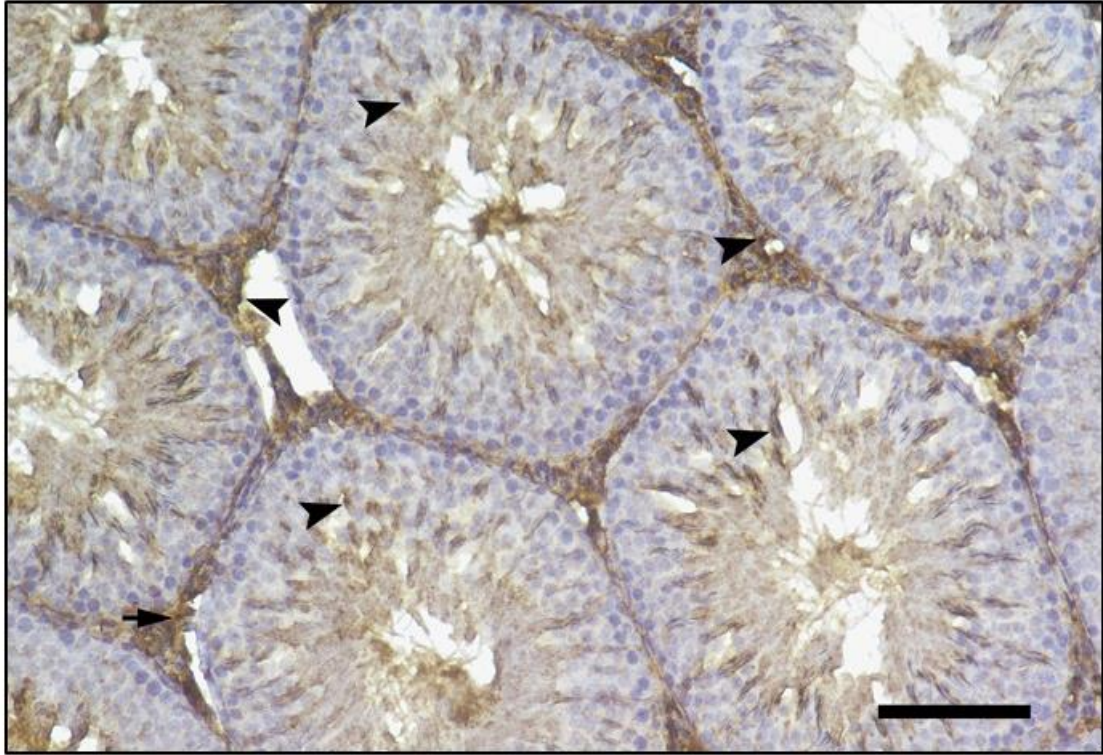
CH sol grubunda yapılan incelemede, Kaspas 3'ün boyanma şiddeti seminifer tübül hücreleri arasında en çok primer spermatositlerde görülürken, az sayıda spermatogonyum ve sekonder spermatositlerin sitoplazmalarında zayıf ekspresyon gözlemlendi. Bazı germ hücrelerinde ise orta ve yüksek ekspresyon tespit edildi (Şekil 4.4.3.2, Şekil 4.4.3). H skoru yapılan Kaspas 3 boyanmış testis kesitlerinde CH sol

grubu, Kontrol ve TSC sol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel fark anlamlı bulundu ($p<0.007$, $p<0.024$).



Şekil 4.4.3.2: CH Sol grubuna ait Kaspas 3 ekspresyon görüntüsü. X40; zayıf ekspresyon gösteren hücreler (ok ucu) orta ekspresyon gösteren hücreler (ince ok) yüksek ekspresyon gösteren hücreler (kalın ok).

TSC sol grubu Kaspas 3 boyanması açısından Kontrol grubu ile benzer sonuçlar gösterdi. Seminifer tübüldeki seri hücreler ve Leydig hücrelerin sitoplazmalarında ekspresyon genelde negatif olup yer yer zayıf ekspresyon olan hücrelerinde olduğu görüldü. Kontrol ve TSC sol grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise istatistiksel açıdan bir fark bulunamadı ($p<1.000$) (Tablo 4.4.3, Şekil 4.4.3.4).

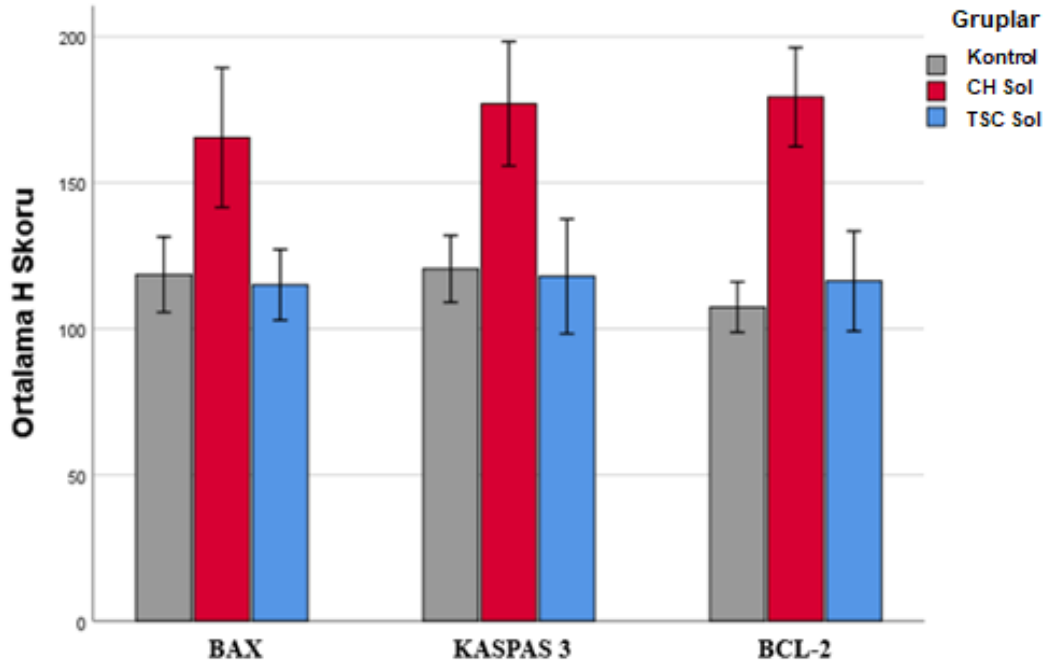


Şekil 4.4.3.3: TSC Sol grubuna ait BCL-2 ekspresyon görüntüsü. X40; zayıf ekspresyon gösteren hücreler (ok ucu) orta ekspresyon gösteren hücreler (ince ok).

Tablo 4.4.3: Gruplar arasındaki Kaspas 3 ekspresyonunun H skor analiz sonuçları.

Gruplar	Ortalama \pm SD	Medyan (Minimum-Maksimum)	p değeri
Kontrol (n=6)	120.46 \pm 10.88	123.12 (100.16 - 132.24) ^a	<0.004
CH Sol (n=6)	177.01 \pm 20.26	185.24 (142.44 - 193.46) ^b	
TSC Sol (n=6)	117.94 \pm 15.81	126.83 (100.51 - 131.43) ^a	

a,b: Farklı notasyona sahip gruplar arasında 0,05 anlamlılık düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık söz konusu iken aynı notasyona sahip gruplar arasında fark yoktur.



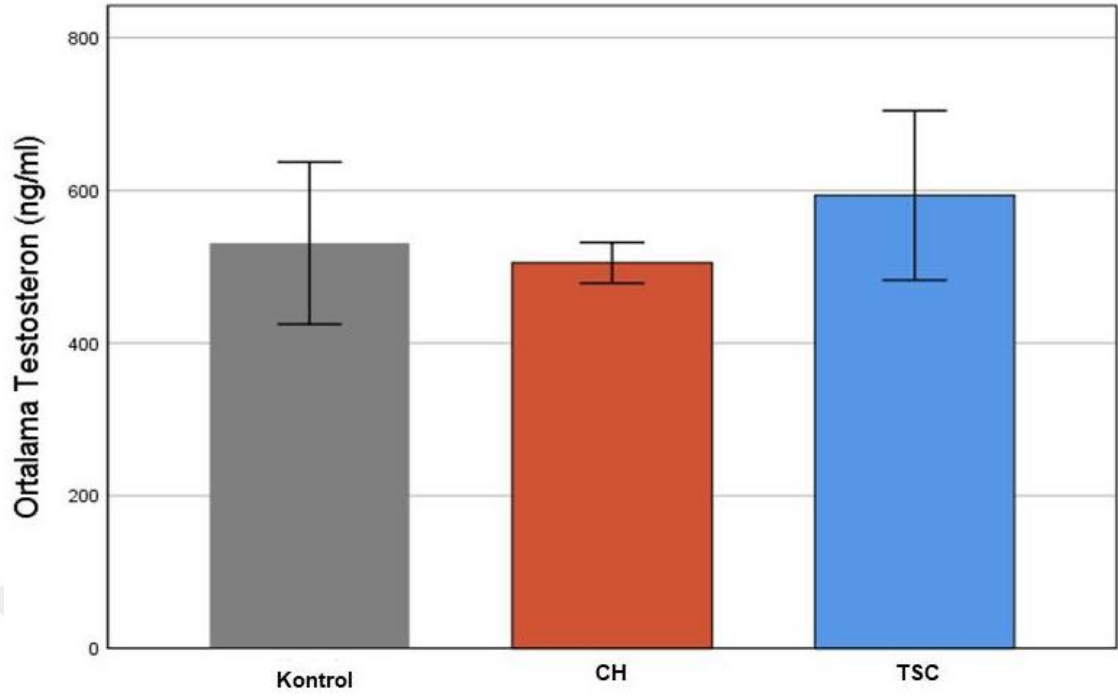
Şekil 4.4.3: Gruplar arasındaki BAX, Kaspas 3 ve BCL-2 ekspresyonlarının H skor analiz sonuçlarının grafik görüntüsü.

4.5. Serum Testosteron Seviyelerinin Karşılaştırılması

Testosteron seviyeleri açısından Kontrol grubu, CH grubu ve TSC grubu, kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0,119$) (Tablo 4.3 ve Şekil 4.3).

Tablo 4.4: Serum Testosteron seviyelerinin karşılaştırılması.

Gruplar	Ortalama \pm SD	Medyan (Minimum-Maksimum)	p değeri
Kontrol (n=6)	530.9 \pm 101.2	547.7 (409.0-683.5)	>0.119
CH Sol (n=6)	505.1 \pm 25.4	509.2 (464.50-540.5)	
TSC Sol (n=6)	593.4 \pm 105.8	586.7(418.0-723.0)	



Şekil 4.5: Grupların serum testosteron seviye ortalamaları.

5. TARTIŞMA

Hava kirliliği, iklim değişiklikleri ve türlerin soylarının tükenmesi, önemli bir küresel sorun olarak bilinse de infertilite, özellikle son zamanlarda küresel bir endişe haline gelmiştir. Birçok genetik faktörün yanı sıra sağlıklı beslenmenin de neden olabildiği bu hastalık, kişinin üreme sistemi ile ilgili tüm konularda fiziksel, psikolojik ve sosyal hayatını olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Wu vd. 2022).

Dünyada, infertiliteli erkek nüfusunun %10-15'ini oluşturan ve toplam erkek nüfusunun %1'lik kısmını oluşturan azospermi, ejakülasyonla atılan semen içerisindeki sperm yokluğudur (Ünal ve Özer 2019). İnfertilitenin bu derece önemli bir sorun olması, araştırmaların bu konu üzerinde odaklanmasına neden olmuştur. Cerrahi ve hormonal tedaviler sık olarak kullanılan yöntemler olsa da son zamanlarda kök hücre alanında yapılan araştırmalar, infertilitenin tedavisi için yeni bir umut kaynağı olmuştur (Fazeli vd. 2018).

Nonobstrüktif azospermide sperm elde etmek için cerrahi yöntemler yaygın olarak tercih edilse de son zamanlarda mikroTESE (microdissection testicular sperm extraction) yöntemi yeni bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Fakat mikroTESE'den önce kullanılan TESE yönteminde testis dokusundan fazla miktarda tübül alındığından bu durum doku kaybına neden olmaktadır. Ayrıca sperm edinme yüzdesi mikroTESE daha yüksektir. TESE'nin dezavantajlarının olması mikroTESE'nin tercih edilmesinin en büyük nedeni olmuştur. Yapılan hem TESE hem de mikroTESE işlemleri sonunda androjen salınımı geçici ya da kalıcı şekilde düşebilir (Ünal ve Özer 2019).

Kanser tedavisinde sıklıkla tercih edilen kemoterapi ajanlar, erkek hastaların germ hücrelerinde gonadal toksisiteye neden olarak geçici, uzun süreli ya da kalıcı infertiliteye ve azospermiye sebebiyet vermektedir. Bu ajanlar, spermatogonyumlara, kan-testis bariyerini geçerek ulaşır ve hem doza hem de zamana bağlı olarak hasara neden olur (Okada ve Fujisawa 2019). Bu toksik etki, bir hastanın çocuk sahip olma

yeteneği üzerinde önemli bir etkiye neden olarak, çocuk sahibi olmak isteyen kanser hastaları için endişe yarATICI bir durum oluşturur (Meistrich 2013). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, genellikle kemoterapötik ilaçlar kullanılarak azospermi modeli oluşturulan deney hayvanlarında, farklı dokulardan elde edilen mezenkimal kök hücreler tedavi amaçlı uygulanmıştır. Araştırmacılar, testis dokusunun patolojik değişimlerini Hematoksilen-Eozin ile boyanmış preparatlarda incelemiştir. Çakıcı ve ark.'ı sıçanlarda busulfan ile oluşturdukları azospermi modelinde adipoz dokudan üretilen mezenkimal kök hücrelerin potansiyel kullanımını göstermişlerdir. Busulfan verilen sıçanlarda, seminifer tübüllerin büyük çoğunluğunun spermatojenik seri hücreleri açısından boş olduğunu tespit etmişlerdir. Bizim tez çalışmamızda, cerrahi testis hasarı uyguladığımız sıçanların bazı seminifer tübüllerinde de lümenlerin boş olduğunu gördük. Çakıcı ve ark.'ı adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre nakledilen gruplara ait testis kesitlerinde, tübüllerin spermatojenik hücrelerle dolu olduklarını fakat bu oranın düşük olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca seminifer tübül lümeninde spermatozoaları da gözlemlemişlerdir (Çakıcı vd. 2013). Biz ise çalışmamızda hasar verdiğimiz testislerde, naklettiğimiz TSC'lerin seminifer tübüllerdeki spermatojenik seri hücrelerin onarımına katkı sağladığını ve lümeninde spermatozoaların var olduğunu tespit ettik. Bu durum Çakıcı ve ark. 'nın çalışmaları ile benzerlik göstermektedir.

Mehrabani ve ark.'ı busulfan ile azospermi modeli oluşturulan sıçanlarda, adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (MKH) nakledilmesinden sonra seminifer tübüllerde germinal hücrelerin miktarını ve onarımını değerlendirmişlerdir. Model grubunda, seminifer tübüllerinin boş olduğu ve spermatogenezin olmadığını göstermişlerdir. Transplante edilen MKH'ler testis dokusunu restore etmiş ve sıçanların seminifer tübüllerinde spermatogenezini indüklemiştir. Tedavi edilen testis kesitlerinde, seminifer tübüllerin spermatogonyum, primer spermatositler, spermatidler ve spermatozoalar ile dolu olduklarını göstermişlerdir (Mehrabani vd. 2015). Tez çalışmamızda verilen hasar TESE işlemine benzer şekilde minimal ve lokal olduğu için busulfan ile yapılan deney modelinin kan-testis bariyerini geçerek testis dokusunun tamamı üzerindeki olumsuz etkisi ile eş değer olmadığı değerlendirme yapılırken göz önünde bulundurulmuştur. Dolayısıyla çalışmamızda çok az sayıda seminifer tübülde spermatogenezin olmadığını tespit ettik. TSC'ler, hasarlı seminifer tübüllerde spermatojenik seri hücreleri onarmış ve buna bağlı olarak spermatogenezini indüklemiştir.

MKH'ler, farklılaşma potansiyeli olan, kendi kendini yenileyebilen ve morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen, stromal kökenli heterojen hücre popülasyonudur. MKH'lerin hem parakrin/otokrin etkileri hem de farklılaşma kapasitelerinin yüksek

olması, infertilite tedavisinde umut kaynağı olmasının en büyük nedenidir (Qian X. vd. 2020). Son zamanlarda birçok araştırmacı, TSC'leri klinik öncesi çalışmalarda kullanmak için in vitro ortamda, hem insandan hem de farklı tür memelilerden elde ederek çoğaltmayı ve farklılaşma potansiyellerini karakterize etmeye çalışmışlardır (Ghabriel ve Amleh 2018). 2008 yılında, Kim ve ark.'ı fare testis stromal hücrelerinden eksplant yöntemle JK1 olarak adlandırdıkları, CD34 pozitif bir hücre hattı üretmişlerdir. Faz kontrast mikroskop ile yapılan görüntülemelerde bu hücre hattındaki hücrelerin kültür kaplarına yapışık olduğu ve yapılan flow sitometri analizinde CD34'ü eksprese ettikleri bildirilmiştir (Kim vd. 2008). Yaptığımız tez çalışmasında da sıçan testislerinden eksplant yöntemle elde edilen TSC'lerin morfolojik ve fenotipik özellikleri Kim ve ark.'ı tarafından yapılan çalışma verileri ile uyumluluk göstermektedir. Ayrıca yapmış olduğumuz flow sitometri analizde, elde ettiğimiz TSC'lerin hematopoetik kök hücre belirteci olan CD45'i pozitif olarak eksprese etmeleri Kim ve ark.'nın bulgularıyla benzerdi. Bu flow sitometri sonucumuz, testisten elde ettiğimiz hücrelerin mezenkimal kök hücreden ziyade mezenkimal karakterdeki stromal kök hücreler olduğunu düşündürmektedir.

Ahmed ve ark.'ı testiküler stromal kök hücreleri, ilk kez fare testisinden enzimatik yöntemle izole etmişlerdir. Bu hücrelerin morfolojik yapılarının fibroblastlara benzer olduğunu ve yapılan flow sitometri analizinde CD44, CD73 ve CD29 için pozitif, CD45 için negatif ekspresyona sahip olduklarını göstermişlerdir (Ahmed vd. 2017). Tez çalışmamızda elde ettiğimiz testiküler stromal kök hücrelerin Ahmed ve ark.'nın elde ettikleri fibroblast benzeri hücreler gibi olduğu görülmüştür. Yapılan flow sitometri analizinde TSC'lerin CD29'u ekspre etmediği ve CD45' i ise ekspre ederek Ahmed ve ark.'nın verileri ile tam tersi sonuçlar elde ettik. Gonzalez ve ark.'ı yetişkin insan testisinden, mezenkimal kök hücre (MKH) özelliğindeki gonadal kök hücreler (GSC) olarak adlandırılan hücreleri izole etmişlerdir. Enzimatik yöntemle kültürü yapılan GSC'lerin, MKH'ler ile aynı morfolojiye sahip olduklarını ve CD105, CD73, CD166 için ekspresyonun pozitif olduğunun, CD11b, CD19, CD34, CD45 ve HLA-DR için ekspresyonun negatif olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca MKH'lerde ekspre olan CD44, CD90 ve STRO-1'i yüksek seviyede ekspre olduğunu bildirmişlerdir (Gonzalez vd. 2009). Yaptığımız çalışmada TSC'lerin Gonzalez ve ark.'nın elde ettiği GSC'ler ile aynı morfolojiye sahipti. TSC'lerin flow sitometri analizde Gonzalez ve ark.'nın aksine CD45'i ekspre etmiştir. TSC'ler mezenkimal kök hücre belirteçleri olan CD90'ı ekspre ederek Gonzalez ve ark.'nın verileri ile tutarlılık göstermiştir. Çakıcı ve ark.'ı sıçanlarda azospermi tedavisinde adipoz dokudan elde ettikleri mezenkimal kök hücrelerin potansiyel kullanımını göstermişlerdir. Elde ettikleri MKH'lerin iç şeklinde olduklarını

ifade etmişlerdir. Bu sonuç, bizim çalışmamızdaki TSC'lerin morfolojileri ile tutarlılık göstermektedir. Flow sitometri analizinde ise adipoz kaynaklı MKH'lerin CD29, CD54 ve CD90'ı ifade ettiği, ancak CD45 ve CD106'yı ifade etmediğini belirtmişlerdir. Tez çalışmamızın flow sitometri sonucunda TSC'lerin Çakıcı ve ark.'ı ile uyumlu olarak CD54 ve CD90'ı ifade etmiştir. Ancak farklı olarak TSC'lerimizin CD29'u ifade etmeyip CD 45'ise ifade etmiştir (Çakıcı vd. 2013). Çalışmalarda farklı deney hayvanlarının testisinden ve izole edilen testiküler stromal kök hücrelerin ve adipoz dokudan üretilen mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonlarının yapılması sonucunda bu hücrelerin mezenkimal karakterde olduğu belirtilmiştir. Flow sitometri analizlerine baktığımızda bu hücrelerin mezenkimal özellik gösteren testiküler stromal kök hücreler olduğunu tespit ettik. Literatürde testiküler stromal kök hücrelerin karakterizasyonu ve kullanılan belirteçlerle ilgili olarak farklı bilgiler mevcuttur.

Klinikte, 24 saaten uzun süren şiddetli germ hücre hasarı bireylerde kalıcı infertiliteye yol açmaktadır (Mansbach vd. 2004). İnfertil bireylerin, testis biyopsilerinden sonra patolojik infertiliteyi yorumlamak için Modifiye Johnsen skoru kullanılmaktadır. Modifiye Johnsen skorunda, 12 puan tam spermatogenez, 11 puan ise çok sayıda geç spermatid ve az sayıda spermatozoayı temsil eder. Modifiye Johnsen skorunun 10 olması hipospermatogenez gösterirken, 10 puanın altında olması ise infertilite anlamına gelir. Yaptığımız çalışmada CH Sol grubunun Modifiye Johnsen skor ortalaması 10,05 olup TSC uygulaması (TSC Sol) sonrasında skor ortalamasını 11,68'e yükseldiği görüldü. TSC'lerin, cerrahi testis hasarında Modifiye Johnsen skorunu yükselterek hipospermatogenez düzeltmeye katkı sağlayabileceği düşünüldü.

Araştırmacılar, azospermi modelini oluştururken kemoterapötik ajanlar kullanmış ve bu ajanlar, testisteki germ hücrelerine zarar vererek spermatogenezin inhibe etmiştir. Seminifer tübüldeki germ hücreler arasında bu toksik etkiden en fazla etkilenen hücre spermatogonyumlardır. Leydig ve Sertoli hücreleri, toksik etkiden sonra hayatta kalabilen en dirençli hücrelerdir (Shetty ve Meistrich 2005). Toksik etkilerin dışında seminifer tübüllerde, normal şartlarda gerçekleşen spermatogenez aşamasında da hücre ölümü gerçekleşebilmektedir. Bu hücre ölüm mekanizması, programlı hücre ölümü adını alan apoptozistir (Kaczanowski 2016). Apoptozisde, hücreyi ölüme götüren veya bu ölümü baskılayan çeşitli antiapoptotik ve proapoptotik genlerin rol oynamaktadır. Hücreleri apoptoza götüren BAX, Puma, Bad gibi genler proapoptotik etki gösterirken, BCL-2, Bcl-xl ve Mcl-1 genleri ise antiapoptotik etki gösterir (D'Arcy 2019). BCL-2 ailesi apoptozisin regüle edilmesinde kritik rol oynamaktadır. Bu rol bir hücrenin yaşam ile ölüm arasındaki dengeyi oluşturmaktadır. BCL-2'nin aksine BAX

geni ise hücreleri apoptozise götürmektir. BAX, herhangi bir faktör ile indüklendiğinde hücrenin sitoplazmasından, dış mitokondriyal membrana doğru ilerleyerek mitokondriyal geçirgenliğin artmasına neden olur. BCL-2, bu apoptotik sinyal içeren moleküllerin salınımını azaltmak için sitokrom c salınmasına sebep olarak, BAX ile mücadeleye girer (Ouyang vd. 2012). Sitokrom c salınımı, sırasıyla Caspas 9 ve ölüm Caspas'ı adını alan Caspas 3'ü uyarır (Palmer vd. 2000).

Wang ve ark.'ı sıçanlarda kadmiyum kaynaklı testis hasarında kemik iliği kaynaklı MKH'lerin terapötik etkisini incelemişlerdir. Yapılan immünohistokimyasal analizde, BAX ve Caspas 3 antikorlarının ekspresyon düzeyleri model grubunda, tedavi ve kontrol grubuna göre önemli derece arttığını tespit etmişlerdir. BCL-2 antikorunun diğer antikorlara oranla model grubunda ekspresyon düzeyinin düştüğünü, kontrol ve tedavi grubunda ise arttığını bulmuşlardır (Wang Y.-J. vd. 2017). Bulgularımızda BAX, BCL-2 ve Caspas 3 antikorlarının CH grubunda zayıf derecede ekspre olurken, az sayıda orta ve yüksek ekspresyon gösteren germ hücrelerinin olduğunu H skoru ile gösterdik. Kontrol ve TSC grubunda ekspresyonun derecesi genel olarak negatif reaksiyon göstermiş ama bazı tübüllerde az miktarda orta ve yüksek ekspresyon görülmüştür. Wang ve ark.'nın BAX ve Caspas 3 antikorlarının ekspresyon sonuçları, bizim bulgularımız ile uyumluluk gösterirken, BCL-2 ekspresyonumuz ise tam tersi sonuç vermiştir.

Meligy ve ark.'nın yapmış olduğu bir çalışmada, sisplatin ile hasar verilen sıçan testislerinde Caspas 3 ekspresyonunun azaldığını ancak adipoz kaynaklı MKH'ler ile tedavi edilen sıçanlarda bu ekspresyonun anlamlı derecede azaldığını tespit etmişlerdir (Meligy vd. 2019). Latif ve ark.'ı ise kadmiyumun neden olduğu testis hasarı çalışmasında, kemik iliğinden izole edilen MKH'lerin Caspas 3'ün immün ekspresyonunu azalttığını göstermiştir (Abdel Latif vd. 2020). Gültekin yapmış olduğu bir çalışmada sisplatinin, sıçan testislerinde BAX ekspresyonunu arttığını göstermiştir. Bu sonuçlar bizim bulgularımız ile tutarlılık göstermiştir (Gültekin 2013).

İmmünohistokimyasal bulgularımız, CH grubundaki seminifer tübüllerde yer alan spermatojenik seri hücrelerin sitoplazmalarında Caspas 3 ve BAX aktivitelerinin Kontrol ve TSC grubuna göre anlamlı bir artış olduğunu gösterdi. Bu artış spermatogenezin bozulması ile ilişkilendirilebilir (Saraç vd. 2016). Verilen cerrahi hasar, Caspas 3 ve BAX'ın neden olduğu apoptotik yolların aktivasyonunu sağlayarak germ hücreleri ve Leydig hücrelerinin apoptozisi ile sonuçlanmıştır. TSC'lerin apoptozisi azalttığı yapılan H skoru analizi ile gösterilmiştir. BCL-2 ekspresyonunun CH grubunda ekspresyon seviyesinin yüksek olması beklenilenin aksine bir sonuç olmuştur. Verilen cerrahi hasarı 15. 30. ve 45. gün olacak şekilde gruplara ayırıp TSC'lerin etkisini incelemek ve

lezyon sayısını arttırmak BCL-2 ekspresyon düzeyini belirlemek için tekrar değerlendirilebilir.

Spermatogenezde önemli role sahip olan testosteron, testisin interstisyum alanında yer alan Leydig hücreleri tarafından salgılanmaktadır. Yapılan birçok çalışmada verilen testis hasarlarında testosteron seviyelerinin düştüğü gösterilmiştir. Farklı dokulardan izole edilen mezenkimal kök hücrelerle yapılan tedavilerle bu seviyelerin normale döndüğü çalışmalar literatürde bulunmaktadır. Hsiao ve ark.'ı testis torsiyonunda orbital yağdan üretilen mezenkimal kök hücrelerin etkisini incelemiştir (Hsiao vd. 2015). Yapılan ELISA deneyinde, CH grubunda 3. ve 7. günlerde serum testosteron seviyelerinde azalma olduğunu, MKH grubunda ise 3. günde testosteron seviyesinin önemli ölçüde arttığını ancak 7. günde normal seviyelere döndüğünü göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda 15 gün sonunda elde edilen testosteron seviyelerinin CH grubunda, Kontrol grubuna göre çok düşük düzeyde azaldığı görülse de aralarındaki fark anlamlı değildi. Ayrıca TSC grubunun testosteron seviyesi kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak fark bulunmadı. Ancak TSC grubunda testosteron seviyesinin Kontrole göre daha yüksek olmasının, TSC'lerin germ hücrelerinin yanı sıra interstisyel alandaki Leydig hücrelerine de farklılaştığını düşündürmektedir.

Meligy ve ark.'ı adipoz dokudan üretilen mezenkimal kök hücreleri Cisplatin kaynaklı testis hasarında kullanmışlardır. Cisplatinin testosteron seviyesini anlamlı şekilde düşürdüğünü ancak kök hücre verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir fark olmadığını tespit etmişlerdir (Meligy vd. 2019). Bizim çalışmamızda ise testosteron seviyelerinde, TSC grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir fark olmadığı görülmektedir. Qian ve ark.'ı busulfanının neden olduğu testis toksisitesine karşı insan amniyon mezenkimal kök hücrelerini tedavi amaçlı kullanmışlardır. Yapılan çalışmada insan amniyon mezenkimal kök hücrelerinin testosteron seviyesini ilk haftada hafif düzeyde artırırken, dördüncü haftada ise ileri düzeyde artış gözlemlemişlerdir (Qian C. vd. 2020). Bizim çalışmamızda ise 15 gün sonunda testosteron seviyelerinde anlamlı bir farkın olmadığı görülmüştür. Çalışmamızda uygulanan deney modeli klinik ile uyumlu olacak şekilde testislere minimum hasar verecek şekilde gerçekleştirildiğinden gruplar arasındaki farkın anlamlı olmadığını düşünmekteyiz. Planlanacak gelecek çalışmalarda cerrahi hasarın büyüklüğü veya hasar verilen bölge miktarının artırılması, deney grubunda verilen TSC'lerin etkisinin daha net şekilde incelenmesine olanak sağlayacaktır. Ayrıca uygulanacak stromal hücre sayısının ve deney süresinin artırılması da TSC'lerin testis mikroçevresindeki terapötik potansiyelinin değerlendirilmesinde daha etkili olabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ

Cerrahi olarak oluşturulan testis hasarlarında, histolojik kesitlerde, seminifer túbüllerin ve interstisyel alandaki yapıların hasara uğradığı gösterilmiştir. İmmunohistokimyasal tekniklerle gösterilen, dokulardaki BAX ve Caspas 3 ekspresyon düzeylerinin artışı ise cerrahi hasarın apoptozisi indüklediğini doğrulamıştır. Testiküler stromal kök hücre transplantasyonundan sonra yapılan sayımla (Modifiye Johnsen skoru) ve immunohistokimyasal tekniklerle elde edilen bulgular, bu hücrelerin hasarlı dokulardaki iyileşmeyi hızlandığını göstermektedir. İleride bu çalışmanın pre-klinikten kliniğe geçirilmesi, özellikle azospermi tanısı almış hastalarda TESE operasyonu sonrasında dokuların daha hızlı iyileşmesi yönünde yeni bir tedavi seçeneği olarak karşımıza çıkabilir.

7. KAYNAKÇA

- Abdel Latif H., Abdel Khalek R., AbdelGalil W., Abdallah H., Fawzy A., Abdel-Fattah S. Nanocurcumin versus mesenchymal stem cells in ameliorating the deleterious effects in the cadmium-induced testicular injury: A crosstalk between oxidative and apoptotic markers. 2020; **Andrologia**, 52(10), e13760.
- Ahmed M., Ghabriel M., Amleh A. Enrichment, propagation, and characterization of mouse testis-derived mesenchymal stromal cells. **Cellular Reprogramming (Formerly" Cloning and Stem Cells")**, 2017; 19(1), 35-43.
- Arıncı K., Elhan A. Anatomi 1. Cilt ; **Güneş Kitabevi**, Ankara, 1995; s. 388, 58-60.
- Aziz N. The importance of semen analysis in the context of azoospermia. **Clinics**, 2013; 35-38.
- Baker K., Sabanegh Jr E. Obstructive azoospermia: reconstructive techniques and results. **Clinics**, 2013; 68, 61-73.
- Cakıcı C., Buyrukcu B., Duruksu G., Haliloglu A. H., Aksoy A., Isık A., Karaoz E. Recovery of fertility in azoospermia rats after injection of adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells: the sperm generation, **BioMed research international** 2013; 68 Suppl 1(Suppl 1):35-8.
- Clark D. P., Pazdernik N. J. Cloning and Stem Cells. **Biotechnology**, 2016; 565-591.
- Cocuzza M., Alvarenga C., Pagani R. The epidemiology and etiology of azoospermia. **Clinics**, 2013; 68, 15-26.
- D'Arcy M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell biology international**, 2019; 43(6), 582-592.
- Dabaja A. A., Schlegel P. N. Medical treatment of male infertility. **Translational andrology and urology**, 2014; 3(1), 9.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, 2006; 8(4), 315-317.
- Eildermann K., Gromoll J., Behr R. Misleading and reliable markers to differentiate between primate testis-derived multipotent stromal cells and spermatogonia in culture. **Human Reproduction**, 2012; 27(6), 1754-1767.
- Eroschenko V. P., Di Fiore M. S. DiFiore's atlas of histology with functional correlations: **Lippincott Williams & Wilkins**, 2013, s. 477-488
- Fazeli Z., Abedindo A., Omrani M. D., Ghaderian S. M. H. Mesenchymal stem cells (MSCs) therapy for recovery of fertility: a systematic review. **Stem Cell Reviews and Reports**, 2018; 14(1), 1-12.
- Fuchs E., Chen T. A matter of life and death: self-renewal in stem cells. **EMBO reports** 2013; 14(1), 39-48.
- Gartner L. P., Hiatt J. L. Color atlas and text of histology: **Lippincott Williams & Wilkins**, 2012, s. 376-380
- Ghabriel M., Amleh A. The testis: an accessible Mesenchymal Stem Cells source, **Advances in Modern Oncology Research**, 2018; Volume 04, Issue 06
- Girlovanu M., Susman S., Soritau O., Rus-Ciucă D., Melincovici C., Constantin A.-M., Miha C. M. Stem cells-biological update and cell therapy progress. **Clujul medical**, 2015; 88(3), 265.
- Gonzalez R., Griparic L., Vargas V., Burgee K., Santacruz P., Anderson R., Patel A. A putative mesenchymal stem cells population isolated from adult human testes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2009; 385(4), 570-575.
- Gültekin B. Sisplatin toksisitesinin sıçan testisinde yarattığı histolojik değişimlere çinkonun etkisinin araştırılması (deneysel çalışma). 2013 **Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Konya, 2013, s. 61-62

- Hale Ö. Kök Hücreler. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2019, 33(3), 271-280.
- Hsiao C.-H., Ji A. T.-Q., Chang C.-C., Cheng C.-J., Lee L.-M., Ho J. H.-C. Local injection of mesenchymal stem cells protects testicular torsion-induced germ cell injury. *Stem Cell Research & Therapy*, 2015; 6(1), 1-12.
- Ilacqua A., Francomano D., Aversa A. The physiology of the testis. *Principles of Endocrinology and Hormone Action, Endocrinology. Switzerland: Springer International Publishing AG*, 2018; 1-38.
- Jiang Y., He X., Lee M.-L. T., Rosner B., Yan J. Wilcoxon rank-based tests for clustered data with R package clusrank. *Journal of Statistical Software*, 2017; Volume 96, Issue 6.
- Johnson K. E. Histology and cell biology. 1991.
- Junqueira L. Carneiro J (Çeviri: Y. Aytekin, S. Solakoğlu). Temel Histoloji, *İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri*, 332-344, 2006; s. 294-305
- Kaczanowski S. Apoptosis: its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. *Physical Biology*, 2016; 13(3), 031001.
- Kadam P., Van Saen D., Goossens E. Can mesenchymal stem cells improve spermatogonial stem cell transplantation efficiency? *Andrology*, 2017; 5(1), 2-9.
- Kim J., Seandel M., Falcatori I., Wen D., Rafii S. CD34+ testicular stromal cells support long-term expansion of embryonic and adult stem and progenitor cells. *Stem cells*, 2008;26(10), 2516-2522.
- Kuran O. *Sistematik anatomi: Filiz Kitabevi*, 1983; s. 521-4
- Mansbach J., Forbes P., Peters C. Testicular torsion and risk factors for orchiectomy. *Journal of Adolescent Health*, 2004; 34(2), 143-144.
- Mehrabani D., Hassanshahi M. A., Tamadon A., Zare S., Keshavarz S., Rahmanifar F., Tanideh N. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous tubules of busulfan-induced azoospermic rats. *Journal of human reproductive sciences*, 2015; 8(2), 103.
- Meistrich M. L. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis in humans. *Fertility and sterility*, 2013; 100(5), 1180-1186.
- Meligy F. Y., Abo Elgheed A. T., Alghareeb S. M. Therapeutic effect of adipose-derived mesenchymal stem cells on Cisplatin induced testicular damage in adult male albino rat. *Ultrastructural Pathology*, 2019; 43(1), 28-55.
- Moore K. L., Persaud T. V. N., Torchia M. G. *Before We are Born E-Book: Essentials of Embryology and Birth Defects with STUDENT CONSULT Online Access: Elsevier Health Sciences*. 2015, s. 175-180
- Okada K., Fujisawa M. Recovery of spermatogenesis following cancer treatment with cytotoxic chemotherapy and radiotherapy. *The world journal of men's health*, 2019; 37(2), 166-174.
- Oldereid N., Angelis P. D., Wiger R., Clausen O. Expression of BCL-2 family proteins and spontaneous apoptosis in normal human testis. *Molecular human reproduction*, 2001; 7(5), 403-408.
- Ouyang L., Shi Z., Zhao S., Wang F. T., Zhou T. T., Liu B., Bao J. K. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell proliferation*, 2012; 45(6), 487-498.
- Ovalle W. K., Nahirney P. C. *Netter's Essential Histology: With Student Consult Access: Elsevier Health Sciences*. 2013; s. 377-390
- P De Miguel M., Fuentes-Julian S., Blazquez-Martinez A., Y Pascual C., A Aller M., Arias J., Arnalich-Montiel F. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Current molecular medicine*, 2012; 12(5), 574-591.
- Palmer A. M., Greengrass P. M., Cavalla D. The role of mitochondria in apoptosis. *Drug News & Perspectives*, 2000; 13(6), 378-384.

- Partin A. W., Wein A. J., Kavoussi L. R., Peters C. A., Dmochowski R. R. *Campbell Walsh Wein Urology, E-Book: Elsevier Health Sciences*. 2020; s. 1475.
- Potter S. J., DeFalco T. Role of the testis interstitial compartment in spermatogonial stem cell function. *Reproduction (Cambridge, England)*, 2017; 153(4), R151.
- 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 research & therapy*, 2020; 11(1), 1-12.
- Qian X.-X., Liu Y., Wang H., Qi N.-M. Mesenchymal stem cells for the treatment of male infertility. *Zhonghua nan ke xue= National Journal of Andrology*, 2020; 26(6), 564-569.
- Rastegar F., Shenaq D., Huang J., Zhang W., Zhang B.-Q., He B.-C., Shi Q. Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. *World journal of stem cells*, 2010; 2(4), 67.
- Ross M. H., Pawlina W. Histology a text and atlas 6th edition. *Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business*. 2011; s. 784-802.
- Sadler T. Langman'S Medikal Embriyoloji. (Çev. Ed. Başaklar C.), 7. Baskı, *Ankara Palme Yayıncılık*, 1996; s. 246-249.
- Saral S., Ozcelik E., Cetin A., Saral O., Basak N., Aydın M., Ciftci O. Protective role of diospyros lotus on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Andrologia*, 2016; 48(3), 308-317.
- Shetty G., Meistrich M. L. Hormonal approaches to preservation and restoration of male fertility after cancer treatment. *JNCI Monographs*, 2005; (34), 36-39.
- Snell R. S. *Snell's Clinical Anatomy: Brown and Company*, 3rd ed. Boston, 2008; s. 168-75
- Sofikitis N., Giotitsas N., Tsounapi P., Baltogiannis D., Giannakis D., Pardalidis N. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 109(3-5), 2008; 323-330.
- Tekeli S., NAGHAVÍ E. A., Gökçe B., Gözde S., Yiğittürk G., Çavuşoğlu T., Uyanıkgil Y. Kök hücreler; mezenkimal kök hücreler ve güncel klinik uygulamaları. *İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Transplantasyon Dergisi*, 2016; 1(2), 72-83.
- Ural A. U. Kök hücreler. 2006; *TOTBİD Dergisi*, 5, 3-4.
- Ünal M. S., Özer M. C. Nonobstrüktif Azospermi Olgularında Yeni Yaklaşımlar. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 2019; 26(1), 111-116.
- Wang M., Yuan Q., Xie L. Mesenchymal stem cell-based immunomodulation: properties and clinical application. *Stem cells international*, 2018; 14:3057624
- Wang Y.-J., Yan J., Zou X.-L., Guo K.-J., Zhao Y., Meng C.-Y., Guo L. Bone marrow mesenchymal stem cells repair cadmium-induced rat testis injury by inhibiting mitochondrial apoptosis. *Chemico-Biological Interactions*, 2017; 271, 39-47.
- Watt F. M., Driskell R. R. The therapeutic potential of stem cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2010; 365(1537), 155-163.
- Weinbauer G. F., Luetjens C. M., Simoni M., Nieschlag E. Physiology of testicular function. *In Andrology*, 2010; s. 11-59
- Wosnitzer M., Goldstein M., Hardy M. Review of Azoospermia. *Spermatogenesis*, 2014; 4:e28218.
- Wu J.-X., Xia T., She L.-P., Lin S., Luo X.-M. Stem Cell Therapies for Human Infertility: Advantages and Challenges. *Cell Transplantation*, 2022; 31, 09636897221083252.
- Yoshida A., Miura K., Shirai M. Evaluation of seminiferous tubule scores obtained through testicular biopsy examinations of nonobstructive azoospermic men. *Fertility and sterility*, 1997; 68(3), 514-518.

- Zahkook S., Atwa A., Shahat M., Mansour A. M., Bakry S. Mesenchymal stem cells restore fertility in induced azoospermic rats following chemotherapy administration. *J Reprod Infertil*, 2014; 5(2), 50-57.
- Zhao Q., Wang X.-Y., Yu X.-X., Zhai Y.-X., He X., Wu S., Shi Y.-A. Expression of human telomerase reverse transcriptase mediates the senescence of mesenchymal stem cells through the PI3K/AKT signaling pathway. *International journal of molecular medicine*, 2015;36(3), 857-864.



9. EKLER

Evrak Tarih ve Sayısı: 04.02.2021-E.14276



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Etik Kurulu

Sayı : E-60758568-020-14276
Konu : Başvurunuz Hk.

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Murat Serkant ÜNAL

İlgi : 22/01/2021 tarihli dilekçeniz. *10.20.1.171*
2564

1.04.2021
"Sıçanlarda Cerrahi Olarak Oluşturulan Testis Hasarlarında Testis Kaynaklı Stromal Kök Hücrelerinin Testis Dokusuna Etkisi" konulu çalışmanız (PAUHDEK-2021/03) 03.02.2021 tarih ve 2021/01 sayılı toplantımızda görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu çalışmanın **Hayvan Deneyleri Etiği** açısından uygun olduğuna ve **21 adet sıçan kullanılarak yapılmasına** oy birliği ile karar verildi.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Gülçin METE
Başkan

