



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AZOSPERMİ OLUŞTURULAN FARELERDE TESTİS
HASARININ SERUM MİKRORNA DÜZEYİ İLE
BELİRLENMESİ

SERDAĞ DEMİRÖREN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ

DANIŞMAN
PROF. DR. M. KEMAL ÖZBİLGİN

MANİSA
2019



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SERDAĞ DEMİRÖREN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Prof. Dr. Kemal ÖZBİLGİN

(Tez Danışmanı)

Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER

(Jüri Üyesi)

Prof. Dr. Bekir Uğur ERGÜR

(Jüri Üyesi)

MANİSA 2019



T.C
YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
ULUSAL TEZ MERKEZİ

TEZ VERİ GİRİŞ FORMU

Referans No	10275747
Yazar Adı / Soyadı	SERDAĞ DEMİRÖREN
T.C.Kimlik No	13547181392
Telefon	5362498762
E-Posta	ser.demiroren@gmail.com
Tezin Dili	Türkçe
Tezin Özgün Adı	Azospermi Oluşturulan Farelerde Testis Hasarının Serum Mikrorna Düzeyi İle Belirlenmesi
Tezin Tercümesi	Determination of Testicular Injury in Mouse with Azospermia via Serum mirna Level
Konu	Histoloji ve Embriyoloji = Histology and Embryology
Üniversite	Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Enstitü / Hastane	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Bilim Dalı	
Tez Türü	Yüksek Lisans
Yılı	2019
Sayfa	167
Tez Danışmanları	PROF. DR. MAHMUT KEMAL ÖZBİLGİN
Dizin Terimleri	
Önerilen Dizin Terimleri	Siklofosamid, testis, GDNF, Okludin, TGF-β3, miR34b/c

22.08.2019

İmza: 

**AZOSPERMİ OLUŞTURULAN FARELERDE TESTİS HASARININ SERUM
MİKRORNA DÜZEYİ İLE BELİRLENMESİ**

Öğrenci: Serdağ DEMİRÖREN

Danışman: Prof. Dr. Kemal ÖZBİLGİN

Bu tez çalışması 20/08/2019 tarihinde jürimiz tarafından “Histoloji ve Embriyoloji Programı” nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Kemal ÖZBİLGİN

Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye :

Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER

Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye:

Prof. Dr. Bekir Uğur ERGÜR

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Bu tez, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından başarılı bulunmuştur. 22/08/2019

Prof. Dr. Ömer TETİK
Enstitü Müdürü

BEYAN

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

Serdag DEMİROREN

İMZA

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez projemi destekleyen Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve Tıp Fakültesi Dekanlığı'na;

Yüksek lisans eğitim süresince sabır ve hoşgörüsü, bilimsel desteğini esirgemeyen, tecrübelerinden yararlandığım tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Kemal ÖZBİLGİN'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitim sürecinde bilgi ve tecrübelerini bizlerle içtenlikle paylaşan Prof. Dr. Seda VATANSEVER, Prof. Dr. İbrahim TUĞLU, Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni saygı ve sevgiyle karşılayan, desteklerini esirgemeyen Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D.'deki, Tıbbi Biyoloji, Genetik, Fizyoloji'deki tüm asistan arkadaşlarıma hep yanımda oldukları için teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans eğitim sürecinde her zaman bilgisi, görgüsü, düşünceleri ve ahlakıyla yanımda olan ve hayatıma dost olarak katılan Uzman Dr. Pınar KILIÇASLAN SÖNMEZ'e teşekkürler.

Yüksek lisans eğitimini almam için idari süreçte bana destek olan Celal Bayar Üniversitesi İşletme Fakültesi Sekreteri Hilmi MECEK'e, çalışma arkadaşım Özkay ÖZSOY'a, Saruhanlı Anadolu Lisesi Müdürü Ömer Faruk KARAKAYIŞ'a, İbrahim ÇIRPAN'a, sabırla bana destek olan ve benim hayatımı kolaylaştıran öğretmen arkadaşlarıma, benim hep yanımda olan 12/B sınıfı ve tüm öğrencilerime teşekkür ederim.

Hayatımın her anında maddi manevi desteğini benden esirgemeyen anneme, kendi çocukluğunu unutup kocaman kalbiyle bana destek olan elimi tutan kızıma, hayatıma dokunuşlarıyla etki eden güveni ve sevgisiyle yanımda olan dostum Naz'a, farklı bakış açısı ve düşünceleriyle beni hep rahatlatan Pınar'a sonsuz teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	vi
ŞEKİL DİZİNİ	viii
RESİM DİZİNİ	ix
TABLO DİZİNİ.....	x
1.ÖZET.....	1
2.SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	8
4.1. TESTİSİN YAPISI.....	8
4.1.1. Testis Embriyolojisi	8
4.1.2. Testis Anatomisi	12
4.1.3. Testis Histolojisi	14
4.1.3.1. Spermatogenik hücreler	16
4.1.3.2. İnterstisiyel alan	22
4.1.3.3. Leydig hücreleri	23
4.1.3.4. Spermatogenezi etkileyen faktörler	24
4.1.3.5. Testis içi genital kanallar	25
4.1.3.6. Genital boşaltım kanalları.....	26
4.1.3.7. Yardımcı genital bezler	27
4.1.3.8. Sertoli hücreleri.....	29
4.1.3.9. Kan testis bariyeri	30
4.2. GDNF	32
4.3. OKLUDİN.....	39
4.4.TGF- β 3	42
4.5. MİKRORNA.....	48
4.5.1. miR 34- Ailesi:	51
4.6. SİKLOFOSFAMİD.....	56
4.7. TESTİS HASTALIKLARI.....	60

4.7.1. Azospermia	60
5. GEREÇ VE YÖNTEM	62
5.1. HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME	62
5.1.1. Doku Örneklerinin Alınması ve Parafin Doku Takibi	62
5.1.2. Histokimyasal Boyama	63
5.1.3. Johnsen Skoru	65
5.1.4. İndirekt İmmünohistokimya Boyaması	66
5.1.4. Tunel Analizi	69
5.2. PCR ÇALIŞMASI.....	72
3.2.1. Testis Doku Örneklerinin Toplanması.....	72
5.2.2. Kan Örneklerinin Toplanması.....	72
5.2.3. Testis Doku Örneklerinin mikroRNA İzolasyonu	73
5.2.4. Kan Plazmasından mikroRNA İzolasyonu.....	74
5.2.5. cDNA Sentezi	76
5.2.6. Kantitatif Real-Time PCR ile Hedeflenen mikroRNA İfadelerinin Belirlenmesi	77
5.3. İSTATİSTİK.....	78
6. BULGULAR.....	80
6.1. HİSTOKİMYASAL BULGULAR	80
6.1.1. Johnsen Skoru	83
6.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR	84
6.2.1. GDNF İmmünoreaktivitesi.....	84
6.2.2. Okludin İmmünoreaktivitesi.....	86
6.2.3. TGF- β 3 İmmünoreaktivitesi	88
6.3. TUNEL BULGULARI.....	89
6.4. PCR BULGULARI	92
6.4.1. Doku İncelemesi	92
6.4.2. Plazma İncelemesi	95
7. TARTIŞMA	98
7. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	109
8. KAYNAKLAR	111
9. EKLER.....	150
10. ÖZGEÇMİŞ.....	150

KISALTMALAR

ABP	Androjen Bağlayıcı Protein
AJ	Tutucu Bağlantı
ALDH	Aldehid Dehidrogenaz
AMH	Anti Müllerian Hormon
ARTN	Artemin
ATP	Adenozintrifosfat
BMP	Kemik Morfojenik Proteini
BTB	Kan Testis Bariyeri
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
BTB	Kan Testis Bariyeri
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
CP	Siklofosamid
CSF1	Kolon Uyarıcı Faktör 1
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Deoksiribonükleik asit
E2f	E2 Faktörü
ECM	Ekstraselüler Matriks
FGF2	Fibroblast Büyüme Faktörü
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
GA	Germ Hücre Arestı
GDNF	Glial Hücre Hattı Kaynaklı Nörotropik Faktör
GFRA	Familya Alfa Reseptörleri
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
GPI	Glikosil fosfatidilinositol
GTPaz	Guanozintrifosfataz
hCG	Koryonik Gonadotropin Hormonu
IGF-1	İnsülin benzeri Büyüme Faktör
IFN	Interferon
IL1	Interlokin 1
JAM	Birleştirici Yapışma Molekülü

KİTL	Tirozin Kinaz Reseptörü için Ligand)
KO	Koşullu Nakavt
Lh	Leydig Hücresi
LH	Lüteinleştirici Hormon
LIF	Lösemi İnhibe Edici Faktör
MA	Karışık Atrofi
MAN2A2	Mannosidaz Alfa Sınıfı 2A Üyesi 2
MAPK	Mitojen ile Aktive olmuş Protein Kinaz
MİRNA	MikroRNA
NTN	Neurturin
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu
PGH	Primordiyal Germ Hücresi
PM	Fosforamid Hardalı
PM	Peritübüler Myoid
PModS	Peritübüler Faktör
PSPN	Persephin
RNA	Ribonükleik asit
SCO	Sertoli Cell Only Sendromu
SF1	Steroidogenezis Faktörü 1
SOD-	Süper Oksit Dismutase
SRY	Sex-Determining Region of Y chromosom
SSC	Spermatogonyal Kök Hücre
TGFB3	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta 3
TH	Testis Hipertermisi
TJ	Sıkı Bağlantı
TNF-α	Tümör Nekroz Faktörü
TNFSF10	Tümör Nekrozis Faktör
TRAIL	Tümör Nekroz Faktör İlişkili Apoptoz İndükleyen Ligand
TRF	Transferrin
TUNEL	Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling
Ubc9	Ubikitin
WT1	Wilms Tümör 1 Proteini
ZO	Zonula Okludens

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Primordiyal germ hücrelerinin göçü (Sadler 2017)	8
Şekil 2. Erkte genital sistemin anatomik görüntüsü (Gartner 2007).....	12
Şekil 3. Testis histolojik kesitleri.....	15
Şekil 4. Spermatogenik hücreler (Ross ve Pawlina 2018).....	17
Şekil 5. Spermiyogenez (Gartner 2007).	19
Şekil 6. Sıçanda testisin yapısı ve seminifer epitel döngüsü (Russell ve ark. 1990). 22	
Şekil 7. Erkek üreme sistemi endokrin düzenleme(Yılmaz ve Gökdal 2010).....	25
Şekil 8. Siklofosfamid moleküler yapısı ((Jones ve ark.1996)	56
Şekil 9. Siklofosfamid kimyasal mekanizması (Beale ve Block 2011).	58
Şekil 10. Kontrol grubu doku mikroRNA'ların amplifikasyon grafiği.....	92
Şekil 11. Sham grubu doku miRNA'ların amplifikasyon grafiği.....	93
Şekil 12. Siklofosfamid grubu doku mikroRNA'ların amplifikasyon grafiği.....	94
Şekil 13. mir-34b-3p ifadesi	94
Şekil 14. mir-34c-5p ifadesi.....	95
Şekil 15. Kontrol grubu serum mikroRNA'ların amplifikasyon grafiği	96
Şekil 16. Kontrol pool serum mikroRNA amplifikasyon eğrisi	97
Şekil 17. Deney grubu pool serum mikroRNA amplifikasyon eğrisi.....	97

RESİM DİZİNİ

Resim 1. Hematoksilen Eosin ile boyanmış kontrol grubuna ait fare testis dokuları	81
Resim 2. Hematoksilen Eozin ile boyanmış sham grubuna ait fare testis dokuları...	82
Resim 3. Hematoksilen Eozin ile boyanmış deney grubuna ait fare testis dokuları..	83
Resim 4. GDNF İmmunoreaktivitesi	85
Resim 5. Okludin İmmunoreaktivitesi	87
Resim 6. TGF- β 3 İmmunoreaktivitesi	88
Resim 7. Kontrol grubu Tunel pozitif hücreler	90
Resim 8. Sham grubu Tunel pozitif hücreler	90
Resim 9. Siklofosfamid grubu Tunel pozitif hücreler	91

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Testis Takip Protokolü	63
Tablo 2. Histokimyasal Boyama Protokolü	64
Tablo 3. Johnsen Skoru	65
Tablo 4. İmmunohistokimya boyama protokolü	68
Tablo 5. Tunel Protokolü.....	70
Tablo 6. Ters transkripsiyon işlem gerçekleşme koşulları	76
Tablo 7. mikroRNA'ların assay tablosu.....	77
Tablo 8. qPCR çalışma koşulları	78
Tablo 9. Johnsen Skoru istatistik tablosu	84
Tablo 10. H-skor istatistik değerlendirme tablosu	89
Tablo 11. Tunel sonucu istatistik değerlendirmesi.....	91

Tezin Başlığı: Azospermi Oluşturulan Farelerde Testis Hasarının Serum MikroRNA Düzeyi İle Belirlenmesi

Öğrencinin Adı: Serdağ DEMİRÖREN

Danışmanı: Prof. Dr. Kemal ÖZBİLGİN

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji AD

1.ÖZET

AMAÇ: Siklofosfamid (CP) alkilleyici, kemoterapötik ajandır. Kanser tedavilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır ve birçok organ üzerinde özellikle gonadlar üzerinde zararlı etkileri bulunmaktadır. Bu çalışmada, farelerde CP uygulaması sonrasında ortaya çıkan testis hasarının, GDNF, Okludin ve TGF- β 3 primer antikorları ile immunohistokimyasal teknik kullanılıp belirlenerek, kan ve doku örneklerindeki mir-34b ve mir-34c arasındaki ilişkinin tespit edilmesi amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM: Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarları'ndan alınan sağlıklı 2 aylık Balb/c erkek fareler (n:18) üç gruba ayrıldı. Kontrol grubuna hiçbir işlem uygulanmadı. Deney grubuna 5 gün boyunca intraperitoneal, günde bir kez 100 mg/ kg CP, sham grubuna ise aynı miktarda serum fizyolojik enjekte edildi. Son enjeksiyondan 24 saat sonra hayvanlar sakrifiye edilerek, testis dokuları ve kan örnekleri alındı. Dokular ve kan örnekleri immunohistokimyasal ve RT-PCR incelemeleri için takip edildi.

BULGULAR: Testis dokularının immunohistokimyasal incelenmesinde, kontrol grubu ve sham grubu ile karşılaştırıldığında, CP verilen grupta spermatogenik germ hücre sayısında, GDNF ve Okludin ekspresyonlarında azalma; TGF- β 3'ekspresyonunda artış gözlemlendi. RT-PCR tekniği ile mir-34b ve mir-34c ekspresyonları incelendiğinde, doku örneklerinde CP verilen grupta belirgin azalma tespit edilirken, plazma örneklerinde yeterli ekspresyon gözlenmedi.

SONUÇLAR: Bu çalışmada, CP'nin neden olduğu testis hasarında GDNF, Okludin ve TGF- β 3 ekspresyonlarının önemli rol oynadığı, doku örneklerinde mir-34b ve mir-34c ekspresyonlarında ortaya çıkan azalmanın, testis hasarının belirlenmesinde önemli bir belirteç olabileceği, ancak plazmada tespit edilebilmesi için daha ileri tetkiklere ihtiyaç olduğu sonucuna varıldı.

ANAHTAR KELİMELELER: Siklofosfamid, testis, GDNF, Okludin, TGF- β 3, mir-34b/c

Title: Determination of Testicular Injury in Mouse with Azospermia via Serum mikroRNA Level-----

Student's Name: Serdağ DEMİRÖREN

Supervisor: Prof. Dr. Kemal ÖZBİLGİN

Department: Department of Histology and Embryology.

2.SUMMARY

Aim: Cyclophosphamide (CP) is an alkylating, chemotherapeutic agent commonly used in cancer treatments and has a detrimental effect on many organs, especially gonads. In this study, we aimed to evaluate the effects of CP-induced testicular toxicity using GDNF, Occludin and TGF- β 3 primary antibodies by immunohistochemical technique, and mir-34b and mir-34c expression by RT-PCR technique in blood and tissue samples.

Materials and Methods: Eight weeks Balb/c old male rats (n:18) from Manisa Celal Bayar University Laboratory of Experimental Animals Research and Application Center were divided into three groups. No treatment was applied to the mice in the control group. Mice in the experimental group were injected intraperitoneally with 100 mg/kg CP once daily for 5 days, and in the sham group the same amount of saline was injected. 24 hours after the last injection, the animals were sacrificed, and testicular tissues and blood samples were removed. Tissues and blood samples were analyzed by immunohistochemical and RT-PCR methods.

Results: Immunohistochemical analysis of testicular tissues showed a decrease in both spermatogenic germ cell count and GDNF and Occludin expressions, and an increase in TGF- β 3 expression in the CP group compared to the control and sham group. When the expression of mir-34b and mir-34c were examined by RT-PCR technique, significant decrease was observed in tissue samples in the CP-treated group, but sufficient expression was not observed in plasma samples of the all groups.

Conclusion: In this study, it was concluded that the expression of GDNF, Occludin and TGF- β 3 plays an important role in testicular injury caused by CP, and the decrease in the expression of mir-34b and mir-34c in tissue samples may be an important marker for the detection of testicular damage, however, further investigations are needed to detect them in plasma.

Keywords: Cyclophosphamide, testes, GDNF, Occludin, TGF- β 3, mir-34b/c

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Testislerin temel görevi, spermatozoa üretilmesi ve erkeğe özgü karakterlerin ortaya çıkmasını sağlayan hormonal düzenlemenin sağlanmasıdır. Testislerde bulunan Sertoli ve Leydig hücreleri; sperm üretimini düzenleyici fonksiyonu yerine getirmektedir. Leydig hücreleri spermatogenezi, testesteron üreterek desteklerken; seminifer tübüllerinde bulunan Sertoli hücreleri, spermatogenez sırasında gelişim, proliferasyon ve olgunlaşma olaylarında yardımcı olmaktadır (Tripathi ve ark. 2008).

Kemoterapi uygulamaları, kanser hücrelerini ortadan kaldırmak amacı ile kullanılırken, somatik hücreleri de etkilemektedir. Kemoterapi uygulamalarından sonra testiste, germ hücreleri bölünme döngüsünün çeşitli aşamalarında etkilenmekte ve ortaya çıkan DNA hasarı nedeniyle hücresel kayıplar ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda kanser tedavilerinde başarı oranlarının artması ile yaşam sürelerinin uzamış olması, özellikle çocukluk çağında uygulanan kemoterapi sonrasında, erişkin dönemde gonadal toksisiteye bağlı infertilite görülmeye başlanmasıyla sonuçlanmaktadır (Zhu ve ark. 2016).

Siklofosfamid (CP) yaygın olarak kullanılan kemoterapötik alkilleyici bir ilaçtır. Fosforamid hardalı (PM) en aktif olanıdır ve karaciğerde metabolize olmaktadır. Bu molekül, DNA replikasyonunu önleyen bir alkil molekülünü DNA'ya bağlayan terapötik aktiviteden sorumludur. Bu ilaç ayrıca glomerulonefrit gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde ve transplantasyon sonrası organ reddinin kontrolünde de yaygın olarak kullanılmaktadır (Tripathi ve ark. 2008). CP uygulaması hastaların sperm sayısında azalmaya neden olabilmektedir.

Gonadal hasarın derecesi, alınan alkilleyici madde dozu ile ilişkilidir yüksek doz kullanımı sonucunda kalıcı azospermi görülebilmektedir. CP uygulanan erkeklerde, testiküler toksisiteye bağlı olarak azosperminin sık olarak ortaya çıktığı ve bu durumun infertiliteye neden olduğu bilinmektedir (Zhu ve ark. 2016). Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar; CP'nin anormal sperm üretiminde artışa; sperm konsantrasyonunda ve motilitesinde, testosteron seviyesinde ve testiküler antioksidan kapasitesinde, testis ağırlığında azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca, CP etkisi ile germinal epitel kalınlığında, seminifer tübül çapında ve Leydig hücre sayısında anlamlı azalma gözlenmektedir. Bu zararlara neden olduğu mekanizma net olarak bilinmemekle birlikte, bazı çalışmalarda dokuların redoks dengesini bozabileceğini bunun da biyokimyasal ve fizyolojik rahatsızlıkların oksidatif stresten kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Toksik maddeler ve farmasötik bileşikler, testisin farklı hücre tiplerini (Germ, Leydig ve Sertoli hücreleri) hedef alarak ve hipotalamus -hipofiz uyarımı yoluyla gonadal hormon seviyelerini değiştirerek erkek üreme sistemini olumsuz yönde etkilemektedir. Testisteki hasardan sperm parametreleri de etkilenecek sperm sağlığı ve/veya işlevinde bir azalmayla azospermiye neden olmaktadır (Drumond ve ark. 2011).

Seminifer tübül epiteli epitelyumu, özellikle kanserin tedavisinde kullanılan kemoterapi ve radyoterapinin neden olduğu toksik maddelerin neden olduğu hasara çok duyarlıdır. CP tedavisi oksidatif strese bağlı olarak testislerde biyokimyasal ve fizyolojik hasara neden olmaktadır. Böylece, spermatogenez sırasında germinal döngünün spesifik aşamalarında CP'nin apoptozda bir artışa neden olduğu bildirilmiştir. CP'nin flagellum üzerindeki toksik etkisine bağlı olarak sperm hareketliliğinin azalmasına da neden olmaktadır (Ghosh ve ark. 2002; Mythili ve ark. 2004).

Spermatojenik hasar ve Sertoli hücrelerinin fonksiyonel durumunun değerlendirilmesinde, Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta 3(TGF- β 3), Glial Hücre Hattı Kaynaklı Nörotrofik Faktör (GDNF) ve Okludin proteinlerinin ekspresyonlarının incelenmesi daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir.

GDNF ise farklılaşmamış spermatogonyumun kendini yenilemesine ve farklılaşmasına aracılık ettiği bilinen ilk moleküldür. Sertoli hücreleri tarafından doğumdan sonra salgılanan, Sertoli hücreleri ve spermatogonyum arasındaki uyarı mekanizmasını kolaylaştıran önemli bir büyüme faktörü olarak görev yapmaktadır (Wang ve ark. 2016).

Okludin, Sertoli hücrelerinin oluşturduğu sıkı bağlantı kompleksinde (TJ) yer alan bir plazma membran proteinidir. TGF- β 3 ise, Sertoli hücresi TJ kinetiğinin önemli bir düzenleyici faktörüdür. TGF- β 'nın hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptozunu kontrol ettiği, aynı zamanda hücre-hücre ve hücre-hücre dışı matriks etkileşimlerinde de etkili olduğu bilinmektedir (Cao ve ark. 2016).

Memeli spermatogenezinde mikroRNA'lar, germ hücrelerinin gelişimi ve doğurganlığın kontrolünde çok önemli fonksiyon göstermektedir. mikroRNA'ların, proliferasyonda, olgunlaşmada, apoptozda, kan-testis bariyerinin ve seminifer epitel döngüsünün düzenlenmesinde önemli fonksiyonları olduğu bilinmektedir. MikroRNA'lar, RNA Polimeraz II ve III, Drosha ve Dicer tarafından üretilen, 19-23 nükleotit uzunluğunda, küçük noncoding bir RNA türüdür. Hedef hücrelerde, mikroRNA'lar, genlerin ekspresyonunu baskılayan ve bu nedenle metabolik hücre fonksiyonunu kontrol eden çeşitli mesajcı RNA (mRNA) moleküllerine bağlanır. mikroRNA'lar ilk önce pre-mikroRNA'lar elde etmek için işlenen ve daha sonra olgun mikroRNA'lar haline gelmek üzere işlenen pri-mikroRNA'lar olarak kopyalanır. mikroRNA'ların ifadeleri, doku ve gelişim aşamalarına özgüdür (Bartel 2004; Ha ve ark. 2014). İnfertilite fenotipleri ile ilişkili mikroRNA'nın spermatogenez, döngüsünün farklı aşamalarındaki ekspresyonu, mikroRNA'ların supresyonu yoluyla bir dizi gen tarafından düzenlenir (Correa ve ark. 2016; Márton ve ark. 2019).

Çoğunlukla farelerde ve domuz gibi diğer hayvan modellerinde yapılan birkaç çalışma, mikroRNA'ların spermatogenezin gelişiminde ve/veya düzenlenmesinde rol oynadığını ve bunların ifadelerinin değiştirilmesinin üreme anormalliklerine neden olduğunu açıkça göstermektedir.

mikroRNA'ların spermatogenezdeki çeşitli hücrel süreçlerin transkripsiyonel kontrolünde iyi bilinen önemi nedeniyle, deregüle edilen mikroRNA'ların erkek infertilite teşhisi için biyobelirteçler olarak kullanılabileceği ileri sürülmektedir (Marcela ve ark. 2017). Yapılan çalışmalar; CP etkisi ile oluşan testis dokusundaki hasarın hücrelere özgü mikroRNA ekspresyonlarının belirlenmesi ile mikroRNA'ların spermatogenezdeki çeşitli hücrel süreçlerin transkripsiyonel kontrolünde iyi bilinen önemi nedeniyle, deregüle edilen mikroRNA'ların erkek infertilite teşhisi için biyobelirteçler olarak kullanılabileceği önerilmektedir.

İnfertil azospermi vakalarında testis biyopsisi, infertilite nedeninin tespit edilebilmesi için kullanılan tek ve invaziv bir tekniktir. mikroRNAlar oldukça küçük moleküller olup, sadece hücre içinde değil farklı biyolojik sıvılarda da bulunmaktadır ve birçok hastalık için noninvaziv biyobelirteç olarak kullanılabileceği ileri sürülmektedir. Spermatogenezde rol oynayan çok sayıda mikroRNA tanımlanmış olmasına rağmen kan örneklerinde fikir birliğine varılmış bir mikroRNA bulunmamaktadır (Sato ve ark. 2019).

mikroRNA-34 ailesi kana geçebilen bir molekül olup, spermatogenezde rol oynadığı bilinmektedir. Bununla beraber, mikroRNA34'ün infertil vakalarda serumda varlığı ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Kemoterapi uygulaması sonrası mikroRNA34 ailesinde ortaya çıkabilecek değişikliklerin saptanması ve infertilitenin noninvaziv yöntemle tespit edilebilmesi, bu çalışmanın özgün değerini oluşturmaktadır. Ayrıca kemoterapi sonrası infertilite nedeninin bilinmesi; bundan sonraki kemoterapi tedavilerinin izlenmesinde, infertiliteden korunmada ve infertilitenin tedavi edilebilmesinde de temel bilgi sağlayacaktır (Abu-Halima ve ark. 2014).

Bu çalışmada amaç, mikroRNA ekspresyonlarının noninvaziv olarak spermatogenez ve fertilite durum değerlendirmesi için kullanılabilirliğinin araştırılmasıdır. Kemoterapi uygulaması sonrasında ortaya çıkan azospermi teşhisini doğrulamak için testiküler biyopsi dışında bir yöntem bulunmamaktadır. Bununla beraber son yıllarda mikroRNA ekspresyon profilinin değişmesi, tanı amaçlı yeni biyobelirteçler olarak kullanılabileceğine ait yayınlar da bulunmaktadır.

MikroRNA'ların spermatogenezdeki çeşitli hücrel süreçlerin transkripsiyonel kontrolünde önemli rol oynaması nedeniyle, deregüle edilen mikroRNA'ların erkek infertilite teşhisi için biyobelirteçler olarak kullanılabileceği ileri sürülmektedir. Ayrıca, mikroRNA'ların ekspresyonlarının daha iyi anlaşılması, gelecekteki erkek infertilitesindeki terapötik müdahaleler için de çok önemlidir.

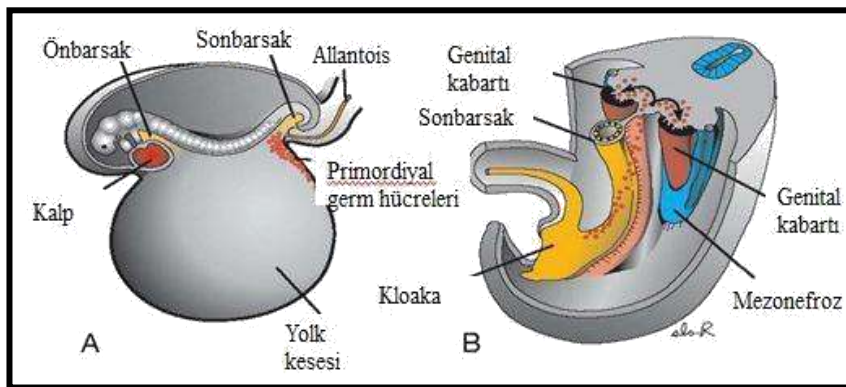


4. GENEL BİLGİLER

4.1. TESTİSİN YAPISI

4.1.1. Testis Embriyolojisi

Primordiyal germ hücrelerinin (PGH), epiblasttan köken alarak, primitif çizgi boyunca ilerlediği bilinmektedir. 3.haftada, vitellus kesesinin allontoise yakın olan kısmındaki hücrelerin arasına yerleşen bu hücreler 4.haftada ise ameboid hareketler yaparak son bağırsağın mezenter kısmından dorsal eksene doğru ilerlemektedir.5. haftada ise primordiyal germ hücreleri, mezonefrozun medial kısmındaki mezotel ve onun alt kısmındaki mezenşim hücrelerinin çoğalması sonucunda kalınlaşma şeklinde gelişen gonadal kabartıya ulaşmaktadır. Bu hücrelerin gonadal kabartıya ulaşmasından önce ve ulaşması sırasında kabartının epitel tabakası altında bulunan mezenşim hücrelerinin arasına girip çoğalarak düzensiz şekilli kordon oluşumu (primitif cinsiyet kordonları) sağlanmaktadır (Sadler 2017)



Şekil 1. Primordiyal germ hücrelerinin göçü (Sadler 2017)

Bu kordonlar hem erkek hem de dişi embriyolarında yüzey epiteli ile bağlı olup 7. haftaya kadar erkek veya dişi gonadların ayırt edilememesinden dolayı bu evreye farklanmamış gonad evresi adı verilmiştir. Ayrıca bu hücrelerin migrasyonu Stella, Fragilis ve (Kemik Morfojenik Proteini) BMP-4 genleri ile düzenlenmektedir. Gonadların gelişiminde köken aldığı kaynaklar; posterior kısmının abdominal duvarını döşeyen mezotel tabakası, bu tabakanın altındaki mezenşim hücreleri ve primordiyal germ hücreleri olarak bilinmektedir. Farklanmamış gonadlarda gelişim olayları sırasıyla dışta korteks içte medulla olacak şekildedir. Testis gelişiminde gonadların medulla kısmının gelişmesiyle farklanma gerçekleşir, korteks kısmında ise gerileme ve dejenerasyon gözlenir (Moore 2009).

Erkek embriyolarda XY kromozomu bulunur ve cinsiyeti belirleyen Y kromozomunun kısa kolu üstünde **SRY** geni bulunur. Bu gen ve Sox9 genleri gonadal kabartı oluşması için testisten kemotaktik faktör olarak işlevi olan FGF9'un salınmasını başlatmaktadır. SRY geni ve testis belirleyici faktörün (TBF) etkisi sonucunda primitif cinsiyet kordonlarının sayısı artar, Sox9 ve FGF9 genlerinin etkisiyle de seminiferöz kordonlarının oluşumu sağlanır (Moore 2009).

TBF faktörü etkisiyle gonadal kordonlar da seminiferöz kordonlara farklandıktan sonra bu kordonların yüzey epiteli ile kurduğu bağlantı, fibröz kapsül yapısındaki kalın tabaka olarak bilinen, Tunika albuginea geliştikten sonra ortadan kalkmaktadır. Bu kordonlar, tübüllere, tubuli rektiye ve rete testise farklanmaktadırlar. Testis genişlemeye bağlı olarak mezonefroza ayrılır ve kendine ait bulunan mezenter yapısına(mezoörşiyuma) asılı hale gelmektedir (Sadler 2017)

Seminifer tübüller, puberte dönemine gelinceye kadar solid halde olur, daha sonra lümen gelişimi başlamaktadır. Tübüllerin duvarında bulunan Sertoli hücreleri, destek hücresi olarak bilinir ve bu hücreler testisin yüzey epitelinden gelişmektedir. Tübül duvarında bulunan diğer hücreler spermatogenik hücrelerdir, bu hücreler ise primordiyal germ hücrelerinden farklanmaktadırlar (Ilona ve ark. 2010).

Fetal testis incelendiğinde, tübüllerdeki hücre yoğunluğunu Sertoli hücreleri oluşturmaktadır. Fetal dönemdeki gelişme süresince, testiste yüzey epitelinin düzleşmesi sonucunda yetişkin dönemdeki testisin dış yüzey mezoteli oluşur.

Seminifer tübüller, düz şekilli olan tübülü rektiyle ve a  şeklinde olan rete testisle ilerlerken, sayıları ortalama 15-20 adet olan,ince mezonefrik tübül  zellikindeki duktus efferentes yardımıyla mezonefrik kanaldan geli mi  olan duktus epididimisle bağlantı kurmaktadır (Ilona ve ark. 2010).

Bu tübüller birbirinden ge  ek ba  dokusu, fibroblast hücreleri, kollajen liflerin ve leydig hücrelerinin de bulunduğu interstisyel ba  dokusuyla ayrılmışlardır. 8. hafta ile birlikte Leydig hücreleri, hormon (androjenik hormonlardan testosteron, androstenedion) salgılamaya ba lamaktadır. Salgılanan bu hormonlar hem mezonefrik kanalların hem de dış genital organlarının mask lin olarak farklanmasını uyarmaktadır. İnsanda salgılanan koryonik gonadotropin hormonu (hCG) testosteron üretimini stimule etmekle görevlidir. Bu hormonun kandaki değeri 8-12 hafta arasındaki embriyonik dönemde en yüksek değerine ulaşmaktadır (Ilona ve ark. 2010). Bu hormonlara ek olarak fetal testislerde Sertoli hücreleri tarafından puberte dönemine kadar salgılanan, glikoprotein yapıda olan, Anti-müllerian hormon (AMH) Müller kanalından (paramezonefrik kanal) gelişecek uterus ve tuba uterinanın farklanmasını inhibe etmektedir. SRY geni, steroidogenezis faktörü 1 (SF1) sentezini de uyarır. Bu faktör ; Sertoli ve leydig hücrelerinde farklılaşmayı indükler, Sox9 ile birlikte görev alarak AMH'nin konsantrasyonunu artırırken ayrıca leydig hücrelerindeki testosteron sentezinde görev alan genleri uyarmaktadır.Hedef dokularda hücre içine giren testosteron 5  redüktaz enzimi yardımıyla dihidrotestesterona d n  t r ld  nde erkek dış genital organlarında farklıla mayla ilgili reseptörlere ba lanır (Moore 2009).

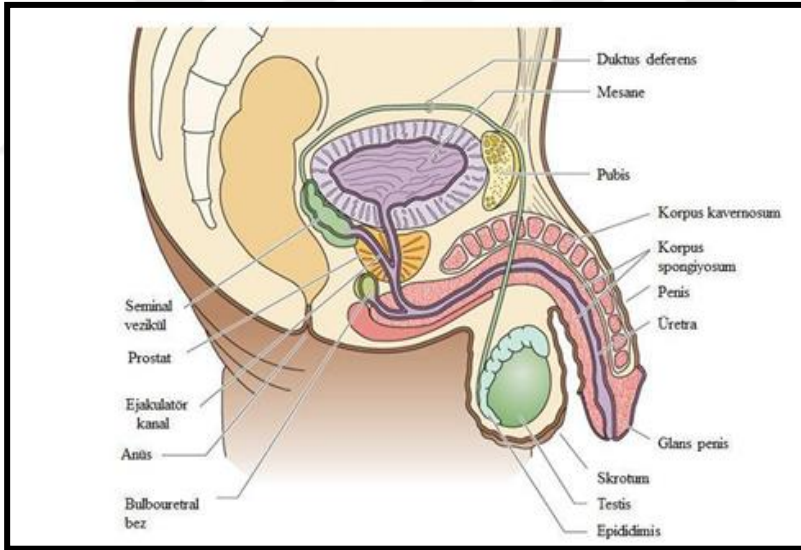
Erkekte genital kanal gelişiminde; mezonefrik kanallar (Wolffian kanallar) ileri farklanmayla paramezonefrik kanallar ise gerilemeyle rol oynar. Mezonefrik kanal gelişiminde proksimal ucu kıvrımlı bir  ekil alarak duktus epididimisi oluşturur. Mezonefrik gelişimde dejenerasyon olduğunda bazı yapılar işlev kazanmaz ve kalıntı olarak devam eder. Bu gelişim sürecinde tüplerden paradidimis oluşmakta kanallardan ise appendiks ve epididimis kalıntı olarak bulunmaktadır. Bu bölümden rete testisin kordonlarıyla bağlantı kurularak duktus efferentisler oluşturulur. Mezonefrik kanallar, duktus epididimisin kuyruk kısmından seminal vezikül tomurcu una kadar olan kısımda kalın bir kas kılıfıyla sarılarak duktus deferens (vas deferens) oluşturulur (Sadler 2017).

Bu kanalların kaudal uçlarının lateral kısmından dış kısma doğru seminal bezler gelişir. Bu bezler ejakulattaki sıvıyı büyük oranda oluşturmaktadır. Ayrıca spermilerin beslenmesi için de sekresyon yapmaktadırlar. Seminal bezlere ait kanallar ve uretra arasındaki mezonefrik kanal, duktus ejakulatoryus olarak gelişir. Uretranın prostatik parçasından oluşan endodermal çıkıntıların mezenşim içine doğru gelişmesi ile prostatin glandüler bez gelişimi gözlenir. Bu bezin epiteli endodermal hücrelerden gelişir, düz kas ve stroma kısmı ise mezenşimalden gelişmektedir. Bulbouretral bezler ise uretranın spongios parçasından çift olarak dışa doğru gelişen hücrelerden oluşmaktadır. Bu bezde de stroma ve düz kas hücreleri mezenşimalden gelişir. 3.- 4. haftada mezenşimin çoğalmasıyla kloaka membranın kraniyal kısmında genital tuberkülü oluşturulur. Bu yapının uzamasıyla fallus oluşur. Kloaka membranının iki yanında da genital şişlik ve uretral katlantılar oluşmaktadır. Katlantılar öne doğru yönelerek üretral oluğun kenarlarını oluşturur. 3.ay'ın sonunda iki üretral katlantının kapanmasıyla penil uretra oluşur. Bunun sonucunda skrotum ve penis gelişimi olur (Moore 2009).

4.1.2. Testis Anatomisi

Erkekte üreme sistemi; dış genital ve iç genital organlar olmak üzere iki kısımdan oluşur. Penis, üretra ve skrotumdan oluşan dış genital organlar, diaphragma ürogenitale ve arkus pubikus'un alt kısmında bulunurlar. İç genital organlar olarak da prostat, vesikulo seminalis ve bulbouretral bezler, testis, duktus epididimis ve duktus deferens görev alır (Şekil 2). Testis, gelişim olaylarında intrauterin dönemde karın boşluğu ve böbreklerin altında bulunan, doğuma yakın olan dönemde karın boşluğundan daha sonra da kanalis inguinalis kısmından aşağıya doğru iner (Moore 2009).

Testisler skrotum içinde asılı olarak yerleşmiş olan bir çift organdır. Skrotumun deri yapısı kıvrımlı olup iç yüzeyi septum skroti yapısı ile ikiye ayrılmaktadır. Skrotum; testis, epididimis ve funikulus spermaticus ile duktus deferens'in bir kısmını da içeren torba şeklindeki yapıdır (Gökmen 2008).



Şekil 2. Erkekte genital sistemin anatomik görüntüsü (Gartner 2007)

Oval şekilleri olan testislerin, uzunluğu yetişkinlerde 4-5 cm, eni 2.5 – 3 cm, ağırlığı 20-30 gramdır. Testisler skrotum içinde vertikal yönde yerleşmemiş olup uzun eksen yukarıdan aşağı doğrultuda ve önden arkaya doğru eğik olarak bulunmaktadır. Sağ testisin konumu sol testise göre daha yukarı pozisyonda yerleşmiştir (Sancak ve Cumhuriyet 2008).

Testiste bulunan iki yüz facies lateralis ve facies medialis olarak; kenarları margo anterior ve margo posterior; iki ucu ise extremitas superior ve extremitas inferior olarak adlandırılmaktadır. Kenar kısımları incelendiğinde; margo anterior epiorchium (peritoneum viscerale'nin uzantısı) ile örtülüdür. Margo posterior'un medial bölümünde korpus epididimis, testise ait damar ve sinirlerle sperm kanallarının da geçtiği mediastinum testis yapısı da bulunmaktadır. Testisin uç kısımları incelendiğinde; Extremitas superior üst kısımda yer alan, kaput epididimise yerleşmiş olan bir kısımdır. Extremitas inferior ise alt kısımda yer alarak kauda epididimis ile örtülü bulunmaktadır (Gökmen 2008).

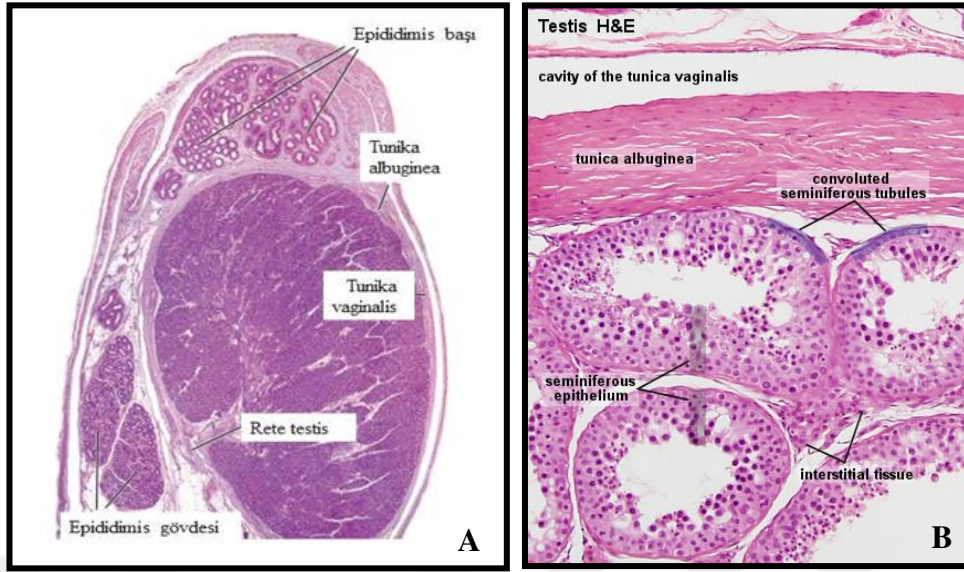
Testislerde, abdominal aorta'nın bir dalı olan testiküler arterler inguinal kanaldan geçtikten sonra skrotuma ulaşarak testis yüzeyinde dallanmaya neden olur. Bu olayla arteriyel kanlanma gerçekleştirilir ve girişimsel işlemlerde vasküler yapıların korunması sağlanmış olur. Arteriyel kanlanmada, diferansiyel ve kremasterik arterler de görev alır. Testislerde venöz drenaj, mediastinumdan çıkarak bağlantı kuran küçük venler yardımıyla gerçekleşir (Tunalı ve Başar 2012).

Testisin posterior kısmından gelen testiküler venler ise plexus pampiniformis olarak duktus deferensin ön kısmından yukarı doğru uzanır ve inguinal kanalı geçtikten sonra abdomene ulaşır. Bu bölgedeki venler de birleştikten sonra testiküler arterin iki tarafında bulunan bir çift testiküler ven oluşur. Bu venlerin de birleşimi ile tek bir testiküler ven oluşturulur. Testiküler ven, sağ tarafta renal venin alt kısmından vena cava inferior'a açılır. Sol tarafta ise sol renal vene açılmaktadır (Tunalı ve Başar 2012).

Testis anjiogenezis olayında temel yapı olarak lenfatiklerin, paraaortik ve interaortokaval lenf nodüllerine drene olması ile gerçekleşir. Testis ve epididim innervasyonunda; renal ve aortik plexuslardan çıkarak gonadal damarlarla gerçekleşebilirken bir başka yol da gonadal afferent ve efferent sinirlerin pelvik plexustan çıkması ile olur. Bazı afferent ve efferent sinirlerin karşı taraf pelvik plexusu ile karışması sonucunda oluşan nöral çapraz yapılar, bir testisteki patolojik olayların karşı tarafta bulunan testisin de fonksiyonlarını etkileyebileceğini açıklamaktadır. Genitofemoral sinirde bulunan genital dallar ise, tunika vajinalis ve skrotumun duyarlılığını sağlamaktadır (Tunalı ve Başar 2012).

4.1.3. Testis Histolojisi

Testisler, karın boşluğunda retroperitoneal olarak gelişen, skrotumda spermatik kordonların uçlarında asılı bir şekilde bulunurlar. Skrotumda bulunan testisler oval görünümlüdür. Ortalama 15 gr. ağırlığındadır. Dıştan içe doğru üç tabakalı kalın bir kapsül ile kuşatılmıştır. Dıştan içe doğru Tunika vajinalis , ortada tunika albuginea, en içte ise tunika vasküloza, bulunur. Tunika vajinalis tek katlı mezotelyal hücrelerden oluştuğu için kesitlerde gözlenmez (Şekil 3-A). Testisin önde ve yan yüzeylerinde bulunan kapalı seröz kesesinin tabakaları; peritondan köken alan visseral tabaka bazal laminanın üzerine oturmuş yüzeyde skrotum üzerinde pariyetal tabakayı oluşturur. Bu iki tabaka arasında bulunan seröz boşluk testisin serbest olarak hareket etmesini sağlar (William K 2009).



Şekil 3. Testis histolojik kesitleri

A-(Ross ve Pawlina 2018) **B-** (www.lab.anhb.uwa.edu.au- Erişim Tarihi:30.07.2019)

Kapsülde belirgin olarak en kalın tabaka, tunika albugineadır. Bazal laminayla tunika vaginalisten ayrılan, yapısında yoğun olarak fibroelastik bir bağ dokusu bulunan bu tabakanın, testisin arka yüzünde kalınlaşmasına bağlı olarak mediastinum testisi oluşturduğu bilinmektedir. Kapsül yapısından testisin içine doğru uzanan tunika albuginea bağ dokusu uzantılarıyla testisi ortalama 250 lobüle ayırır. Lobüllerin içinde, toplamda uzunluğu 280-400 m. olup 600-1200 tane seminifer tübül bulunmaktadır (Şekil 3-B).

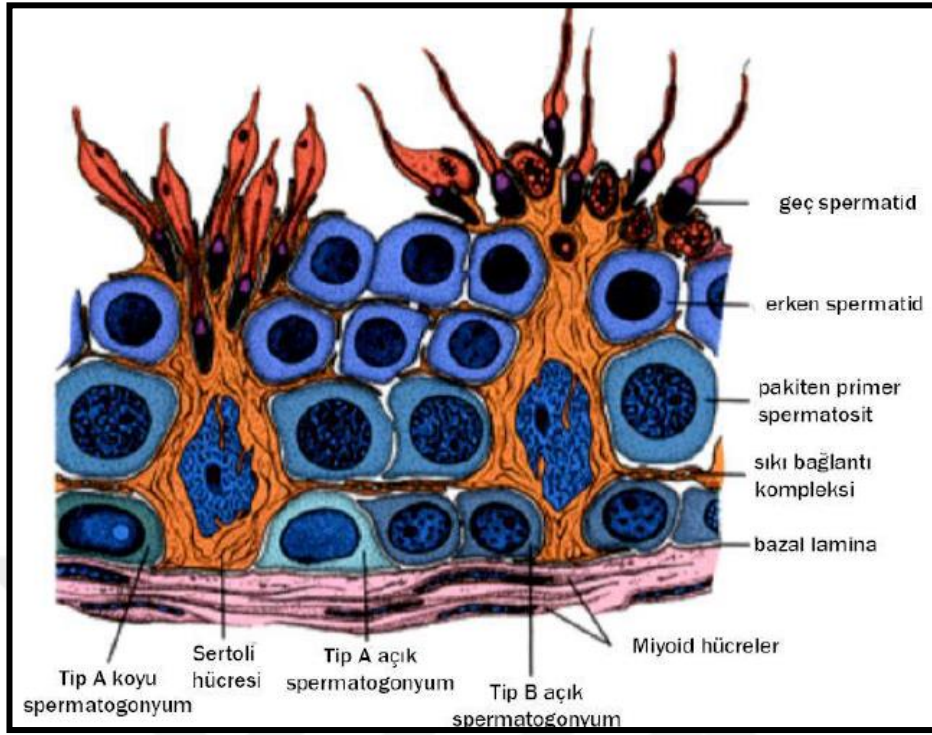
Her testis lobülünde kan ve lenf damarları, sinirler ve interstisyel hücrelerin (Leydig hücreleri), bulunduğu gevşek bağ dokusu bulunmaktadır. Testisin posterior yüzeyinde düz kas hücreleri yoğunlukta bulunur. En içte bulunan Tunika vajinalis , kan damarlarından zengin yapısında gevşek bağ dokusu bulunan kısımdır.

Seminifer tübüllerde sperm üretimi gerçekleşirken Leydig Hücreleri de testiküler androjen hormonlarını salgılar. Mediastinumda, seminifer tübüllerin tübüli rektiye ve daha sonra rete testise açılması buradan da 12-15 adet duktuli eferentes ile devam ettiği bilinmektedir. Bu kanallar yardımıyla testis sıvısı ve spermier duktus epididimisin proksimal bölümüne aktarılır (William K. 2009).

4.1.3.1. Spermatogenik hücreler

Spermatogenez olayı primitif bir germ hücresi olan spermatogonyumun bölünme, farklılaşma ve olgunlaşma sonucunda germ hücresi olan sperm üretimi sürecini kapsar. Spermatogenik hücrelerin insanda olgunlaşma süresi 64 gün olup, çoğalabilen hücrelerdir. Bu süreç spermatogenez ve spermiyogenez olaylarıyla tamamlanır. Spermatogenez olayında spermatogonyum hücreleri önemli rol oynar. Bu hücreler; bazal laminanın üstünde bulunan, çapları yaklaşık 12 µm, kan-testis bariyerinin dışında yer almaktadırlar.

Morfolojilerine bakıldığında Tip A koyu, Tip A açık ve Tip B olarak 3 çeşittir. Tip A koyu olanlar seminifer tübüllerin epitelinde bulunan kök hücrelerdir. Nükleusu yoğun bazofilik, ince granüler kromatinli bir yapıda ve ovaldir. Puberteyle birlikte mitotik bölünmeler geçirip tip A koyu veya açık spermatogonyumları oluşturur. Tip A açık olanların ise nükleusu soluk boyanmış ve ince granüler kromatinli bir yapıda oval şekildedir. Mitotik bölünmeler sonucunda farklılaşmasıyla Tip B spermatogonyumlar oluşur. Bu hücrelerde ise oval nükleus, merkezi yerleşimli nükleolus bulunmaktadır. Kromatin yapısı hem nükleus hem de nükleolus çevresinde yoğunlaşma göstermektedir (Şekil 4).



Şekil 4. Spermatogenik hücreler (Ross ve Pawlina 2018).

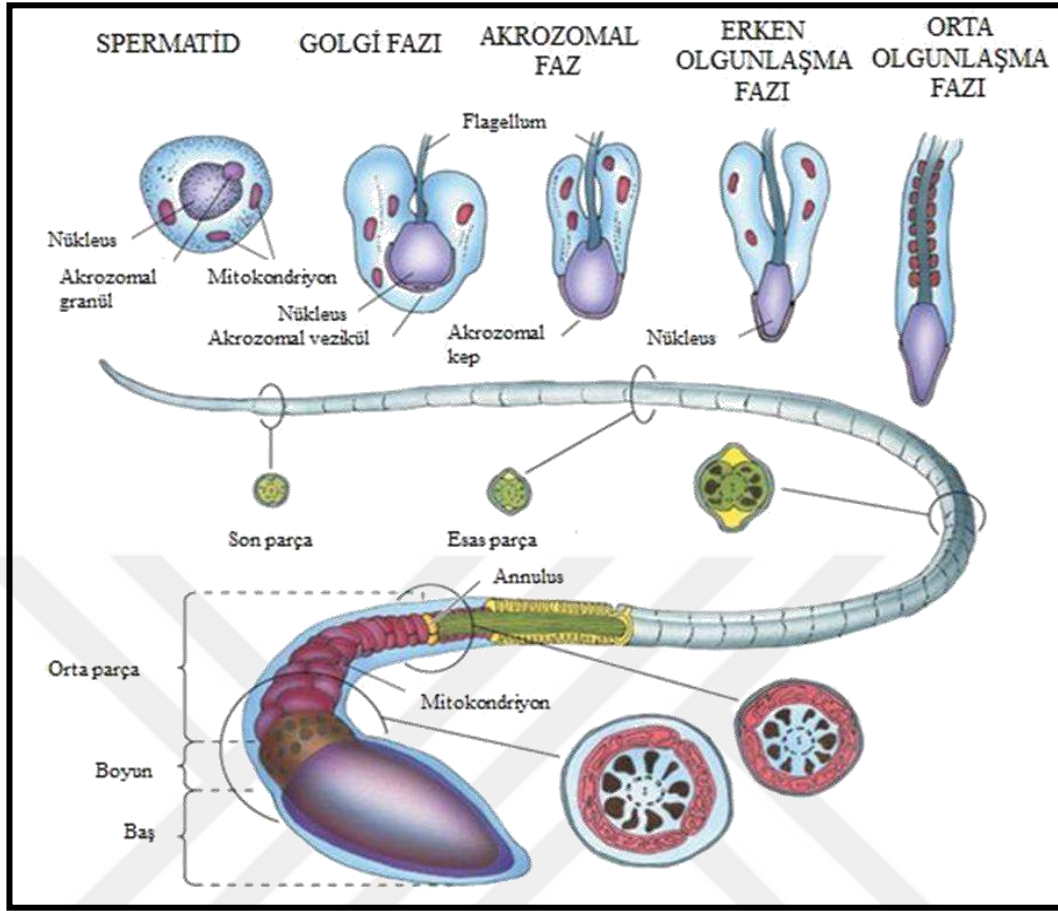
Tip A hücreleri sessiz hücreler olarak bilinir. Bu nedenle de radyasyon ve kemoterapiye karşı dirençlidir. Mitoz bölünme geçiren diğer spermatogonyumlar, mayoz bölünme geçiren spermatositler ve farklılaşmakta olan spermatidler ise bu etkilere karşı çok duyarlıdır (Sadler 2011). Primer spermatositlerde, 46 kromozom (44+XY) ve 4n DNA bulunmaktadır. Tip B spermatogonyumların mitozu sonucunda oluşan primer spermatositler, interfaz evresinden sonra mayoz I'in profaz evresine girerler. Bu evrede; leptotende homolog kromozomların 2 kardeş kromatidden oluştuğu, zigotende homolog kromozomlar arasında sinapsın başladığı sinaptonemal kompleks oluşturduğu, pakitende ise kardeş olmayan kromozomların arasında crossing-over'ın başladığı bilinmektedir. Diploten evresinde crossing-over'ın bitişi gerçekleşirken kromozomların arasında kiyazma ile bağlantılı tetratlar oluşumu gözlenir.

Diakinez evresinde ise kromozomların kısalıp kalınlaştığı, sinaptonemal kompleksin dağıldığı ve bir mikrotübül ipliğinin gelişmeye başladığı gözlenir. Metafaz evresinde ise kromozomların ekvatorial düzlemde toplanması ve daha sonrasında gözlenen anafaz evresinde ise kardeş kromatidlerin rastgele zıt kutuplara çekilmesiyle bölünme tamamlanır. Profaz evresi yaklaşık 22 gün sürdüğü için mikroskop incelemelerinde hücrelerin büyük çoğunluğu bu evrede görülür. Spermatogonik hücreler içinde büyüklüğü en fazla olup nükleuslarındaki sinaptonemal kompleks yapısıyla karakterize olan primer spermatositlerdir. Bu kompleksin oluşumunda Box-20 geni önemli rol oynar.

Mayoz I'den sonra oluşan sekonder spermatositlerde $2n$ DNA ve 23 kromozom ($22+X$ veya $22+Y$) bulunmaktadır. Testislerden alınan kesitlerde, interfazda kısa süre kaldığı ve hızlı bir şekilde mayoz II'ye giren kısa ömürlü hücreler olduğu için sekonder spermatositlerin görülmesi zordur. Bu spermatositlerde kromozomlarda sayının azalmasıyla birlikte her hücrede DNA miktarının azaldığı gözlenmiştir. Spermatositlerde Mayoz I ve II arasında S fazı (DNA sentezi) gözlenmediği için, Mayoz II'den sonra her hücrede bulunan DNA miktarı başlangıç hücresine göre yarıya iner ve haploid (n) hücreler meydana gelmektedir. Spermatositlerin bölünmesi sonucunda haploid kromozom sayısına sahip (23) spermatidler oluşur (Junquera ve Carneiro 2005; Abraham 2012).

Spermiyogenez olayı spermatidlerin erkeğe ait kalıtım materyalinin ovuma aktarılması için sperme dönüşme sürecini kapsar. Bu süreçte hücre bölünmesi olmadan, akrozom oluşumu, nükleusun yoğunlaşma ve uzamasının, flagella gelişimi ve sitoplazmasının çoğunu kaybetmesiyle sperm üretiminin gerçekleşme olayıdır. Spermatidlerin çapı 7-8 μm olup,merkezi yerleşimli nükleusunda yoğun kromatin bölgesi, gelişmiş bir Golgi kompleksi, çok sayıda mitokondriyon, bir çift sentriyol içermektedir. Tübüllerde lümenin yakınında yerleşim gösterirler (Ross ve Pawlina 2018).

Spermatidlerin matür sperm oluşumuna farklılaşması 3 fazda gerçekleşirken (Şekil 5) oluşum sırasında spermatidlerin özel bağlantı grupları ile Sertoli hücre membranına bağlanması gereklidir ve sürecin sonucunda olgun spermier oluşmaktadır (Junquera ve ark.2005).



Şekil 5. Spermiyogenez (Gartner 2007).

Golgi fazında; spermatidlerde nükleus yakınında proakrozomal granüller (PAS-pozitif granüller) içeren belirgin bir Golgi kompleksi bulunur. Biriken bu granüller birleşerek membranla sınırlı olan akrozomal vezikülün içindeki akrozom granüllerini oluşturur. Sentriyollerin göç etmesi ile akrozomun karşısında hücrenin yüzeyine yakın konuma gelmektedirler. Flagellar aksonemin oluşmasıyla sentriyoller nükleusa hareket eder böylelikle aksonemal bileşenleri çevresine sarmış olur (Abraham 2012).

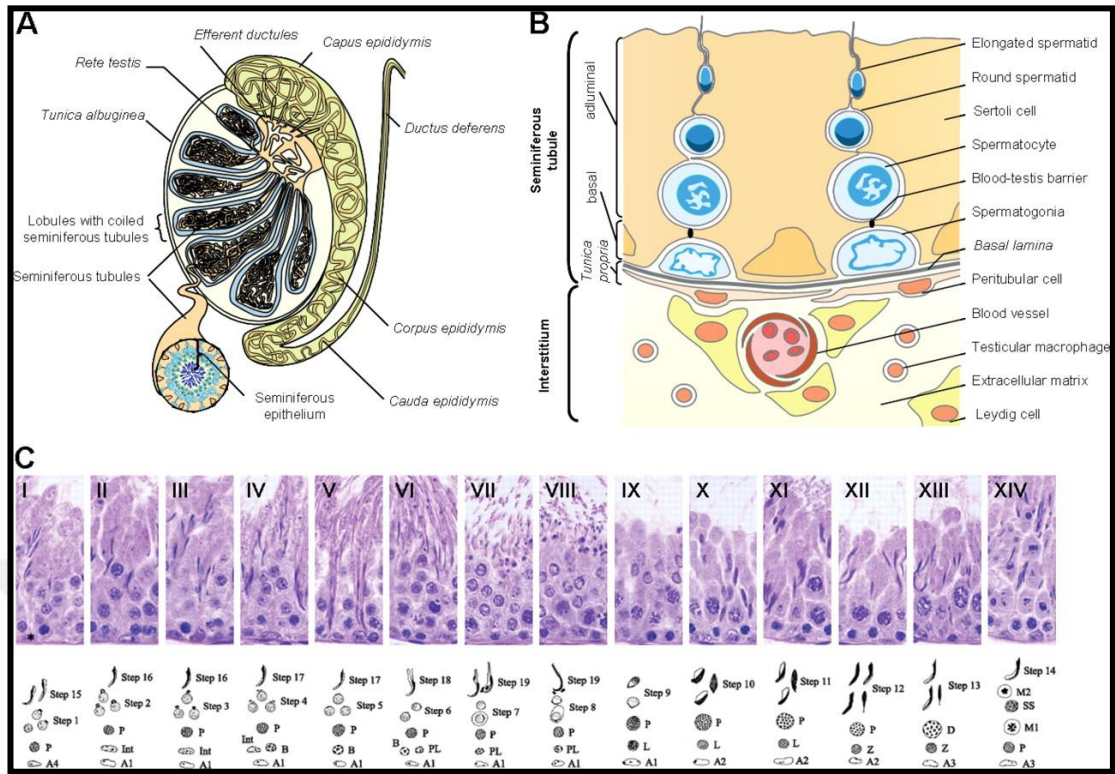
Akrozomal fazda; akrozomal yapı vezikül ve granül şeklinde, yoğunlaşmış olan nükleusun ön kısmını kaplayacak şekilde yayılarak akrozom adını almaktadır. Akrozom kısmında hidrolitik enzimler (hiyalüronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve proteazlar) bulunur. Enzim aktivitesi ile oositlerin çevresindeki korona radyata hücrelerinin birbirinden ayrılmasını sağlar ve zona pellusidayı eritir.

Bu olaylarla bağlantılı olarak akrozom lizozomun özelleşmiş bir çeşidi olarak görev yapar. Spermilerin oositle karşılaştığı zaman akrozomun dışındaki membran spermin plazma zarıyla kaynaşması sonucunda akrozomal enzimler hücre dışına boşalması ile akrozomal reaksiyon gerçekleşir. Bu evrede spermatid tübülün merkezine yönelip aksonem yönüne uzanırken nükleus uzayarak yoğunlaşır, sentriyollerden bir tanesinin gelişmesi ile flagellum oluşturulur. Bu yapı dış kısmında yoğun keratinin içerikli lifler içerirken fibröz kılıfla çevrilmiş bir aksonem (9+2 mikrotübül düzeni), proksimal kısmında ise mitokondriyonların toplanması ile sperm hareketlerine enerji kaynağı oluşturan orta parça oluşturulur. Flagellum hareketinde mikrotübüller, ATP, ATPaz aktivitesine sahip olan bir protein (dynein) görev alır (Ross ve Pawlina 2018).

Matürasyon (Olgunlaşma) fazında; sitoplazma artıkları Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilirken spermier tübülün lümenine salınarak spermiasyon olayı tamamlanmış olur. Spermier duktus epididimise, Sertoli hücreleri ile rete testisin ürettiği testis sıvısı (steroid, protein, iyonlar, androjen bağlayan protein) ile geçer. Olgun bir spermde baş, orta ve kuyruk kısımları gelişmiştir. Baş bölgesi nükleus içerir ve akrozomun plazma membranıyla sarılıdır. İki yapı arasındaki bağlantı proksimal ve distal sentriyol ile sağlanmaktadır. Orta kısım ise spermin baş bölgesinden sarmal şekilde dizilmiş olan mitokondriyal kılıfla kuyruğa kadar uzanmaktadır. Aksonem yapısı kuyruğun merkezinde olup mitokondriyal kılıfla aksonem arasında dokuz lif kılıfı bulunmaktadır. Annulus ise mitokondri sarmalının son kısmının altında halka şeklindedir ve orta parçanın esas olan parçaya dönüştüğü kısımdır.

Esas parça annulustan uzanarak çıkan ve mitokondriyon içermeyen, iki tane uzunlamasına konum almış dairesel fibröz kılıf iskeleti ile yedi tane dış yoğun lif merkezi aksonemden oluşmaktadır. Son parça ise sadece hücre zarıyla sarılmış mikrotübül yapısında gözlenmektedir (Abraham 2012).

Sıçanlarda spermatogenez diğer memelilere göre farklılık gösteren bir olaydır. Seminifer tübüllerde üretilen spermatozoalar, rete testis ve efferent kanallardan geçerek, salınma öncesinde depolanacakları ve olgunlaşacakları epididime geçerler. Son derece vaskülerize olan interstisyel kompartıman temel olarak testosteron üreten Leydig hücreleri, fibroblastlar ve makrofajları içerir. Bir bazal membranla (bazal lamina) sınırlanmış seminifer tübüller, gelişimlerinin çeşitli aşamalarında somatik Sertoli hücreleri ve germ hücrelerini içerir. Boru içerisindeki siyah noktalar, bazal bölmeyi sınırlayan Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantıyı gösterir. Bu bölmede, spermatogonia ve bu şekilde gösterilmemiş olan yeni oluşturulmuş primer spermier bulunur. Adluminal kompartman, olgun spermier ve spermatitler içerir. 14 evrenin histolojik bölümleri ve şematik gösterimleri (I ila XIV arasında numaralandırılmıştır), testis dokusu bölümünden tübüllerde gözlenebilecek tüm germ hücrelerinin birleşmesini göstermektedir. Bu sınıflandırma esas olarak, spermatidlerin akrozomunun daha az farklılaştırılmış adım 1'den yüksek farklılaştırılmış adım 19'a morfogeneze dayanmaktadır. Çeşitli spermatogonia türleri (A1, A2, A3, A4, orta (Int) ve B) ve spermatocytes (preleptoten (PL), leptoten (L), zigoten (Z), pachtenen (P), diploten (D), M1 ve M2) de temsil edilir (Lagarigue ve ark. 2011).



Şekil 6. Sığanda testisin yapısı ve seminifer epitel döngüsü (Russell ve ark. 1990)

A-Memeli testisinin, şematik gösterimi. B, Testis anatomisinin şematik gösterimi. Bu şema ölçeklendirilmemiştir. C- Sığandaki seminifer epitel döngüsü.

4.1.3.2. İnterstisiyel alan

Testislerde seminifer tübüller arasındaki alanlar, Leydig hücreleri, gevşek bağ dokusu elemanlarından fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücrelerinden mast hücreleri ve makrofajlar, sinirler, kan ve lenfatik damarları içeren, interstisiyel alanlardır. Bu bölgede bulunan pencere tipte kapillerler yardımıyla kan proteinleri gibi makromoleküllerin madde alışverişi kolayca gerçekleştirilir. Bu alan lenf damarlarından zengin olduğu için organdan alınan sıvı ile lenf sıvısı benzerlik göstermektedir (Ross ve Pawlina 2018).

4.1.3.3. Leydig hücreleri

Bu hücreler, intertübüler alanda kan damarlarının, lenfatik kanalların ya da sinozoidlerin yakınında bulunmaktadır. Poligonal şekilli, eozinofilik bir sitoplazma içeren, merkezi yerleşimli nükleus, kaba şekilli kromatin granülleri, belirgin nükleolus bulunur. Mitokondriyonlarında tübüler krista, sitoplazmalarında lipid damlacıkları ile iyi gelişmiş düz yüzlü endoplazmik retikulum, lipofuksin granülleri ve Reinke kristalleri bulunmaktadır (William 2009). Bu hücrelerdeki organel ve inklüzyonların görevi genellikle testesteron sentezi ve salgısını düzenlemektir. Bu hormonun öncü maddesi kolesterolden üretilmektedir. Kolesterol ise düz endoplazmik retikulum zarlarında sentezlenen ya da kan dolaşımındaki düşük yoğunlukta lipoprotein moleküllerinden oluşarak lipid damlacıklarında depo edilir. Taşıyıcı proteinler yardımıyla kolesterol mitokondriyonun iç zarına aktarıldıktan sonra mitokondriyonlar, luteinizan hormonu (LH) ile kolesterolü pregnanolona çevirerek mitokondriyon zarından düz endoplazmik retikuluma aktarılaraq enzimler yardımıyla testesterona dönüştürülür (Abraham 2012).

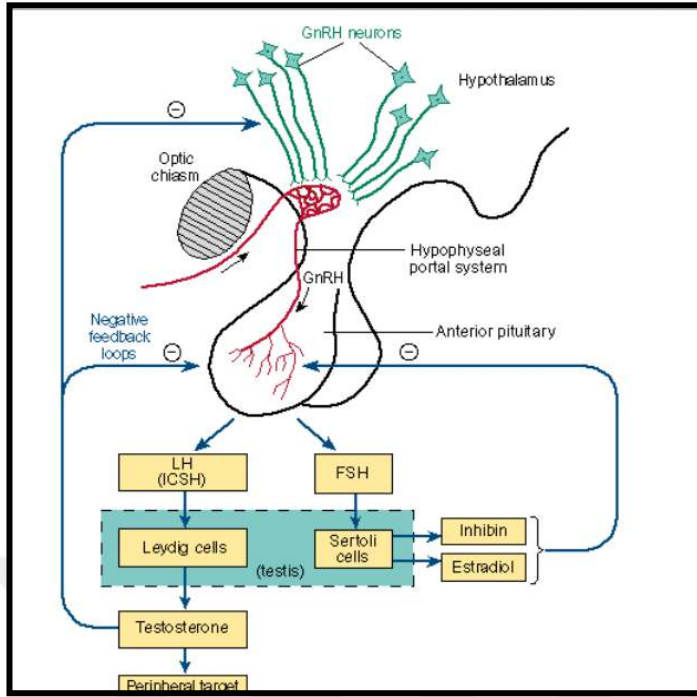
Mikrovilluslar yardımıyla hücre zarından difüze edilerek hücre dışı aralığa salgılanan testesteronun, kan dolaşımındaki steroid bağlayıcı proteinlere bağlanması ile mekanizma tamamlanır.

İnterstisiyel hücrelerin aktiviteleri hormonal uyaranlara bağlıdır. Gebelikte üretilen plasental gonadotropik hormonu, maternal kandan fetusa geçerek androjenik hormon üreten, fetal testiküler interstisiyel hücreleri uyarmaktadır. Erkekde genital organların farklılaşmasında androjenik hormonlar görev alır (Junqueria ve ark.2005).

4.1.3.4. Spermatogenezi etkileyen faktörler

Spermatogenez olayında hipofizden salgılanan Folikül Uyarıcı Hormon (FSH) ve LH hormonları spermatogenetik hücrelerin gelişimi için testosteron üretimini uyarmaktadır. FSH'nin etkisi Sertoli hücrelerinde olup adenilat siklazı uyarması ile Siklik Adenozin Monofosfat(cAMP) düzeyini artırdığı buna bağlı olarak inaktif kolesterol esterazlarının aktive olduğu, lipid damlacıklarından da serbest kolesterolün açığa çıktığı bilinmektedir. Bu kolesterolün de mitokondri ve düz endoplazmik retikulum ile testesterona dönüştüğü bilinmektedir. Testesteron erkek görünümünü sağlama, sekonder seks karakterleri gelişimi, seminal vezikül, prostat, bulbouretral bezlerin işlevlerini gerçekleştirmesi için görevlidir. Spermatogenez ortalama vücut sıcaklığının (37°C) altında gerçekleştiği için, testislerde sıcaklık yaklaşık 35°C, çeşitli mekanizmalar yardımıyla sıcaklık ayarlaması yapılır. Testiküler arterin çevresini venöz ağ (pampiniform pleksus) sarmaktadır. Testislerde sıcaklık ayarının sağlanması, kanın zıt yönde işleyen bir sıcaklık değişimiyle soğutulma mekanizması ile gerçekleştirilir. Başka bir etken de, oluşturulan terin skrotumdan buharlaşması yoluyla ısı kaybının sağlanması ve spermatik kordonda kremaster kaslarının kasılması sonucunda testislerin yüksek sıcaklıkta kalabileceği inguinal kanala çekilmesi yoluyla gerçekleştirilir (Abraham 2012).

Kanda testesteron seviyesi düşük olduğunda FSH, Sertoli hücrelerinden ABP salgılanmasını uyarır. Bu protein testesterona bağlanır ve hormonun bu bölgeden ayrılmasına engel olur daha sonra da testesteronu seminifer tübüllerin lümen kısmına taşır. Östrojene bağlandıktan sonra da spermatogenezi engellemektedir (Şekil 6).



Şekil 7. Erkek üreme sistemi endokrin düzenleme(Yılmaz ve Gökdağ 2010).

4.1.3.5. Testis içi genital kanallar

Testis içindeki kanallar, tubuli rekti, rete testis, duktuli efferentes'ler olarak bilinmektedir. Bu kanalların görevi tübüllerden gelen sıvı ve spermli duktus epididimise taşımaktır. Seminifer tübüllerde kıvrımlı olanlar iki taraftaki uçlardan düz tübüllerle (tubuli rekti) ile rete testise bağlanır. Tübüllerin başlangıç kısmında sadece Sertoli hücreleri bulunmakta spermatogenik hücreler giderek kaybolmaktadır. Bu bölümün histolojik yapısında; epiteli prizmatik, sıkı bağ dokusu yapısında anastomozun bulunduğu kanallar sistemidir. Düz tübüller, Tunika albugineanın kalınlaşması sonucunda oluşmuş mediyastinum, testiste bulunan rete testis kısmına açılır (Junquera ve ark.2005).

Rete testis'in epiteli, tek katlı kübik- alçak prizmatik, kinosilya ya da mikrovillus içermektedir. Düzensiz bir şekilde anastomozlaşmanın görüldüğü kanallar sistemidir. Bazal membran ise mediyastinuma ait olan kan damarları ve bağ dokusuyla çevrilidir.

Epitel dokusunun bazal laminasının dış kısmında sirküler olarak dizilen düz kas hücrelerinin bulunduğu ince bir tabaka vardır. Duktuli efferenteste birleşerek epididimisin duktus epididimis yapısını oluşturmaktadır. Rete testisten 10-20 tane çıkan duktuli efferentes'ler, epididimise doğru hareketi sağlamakla görevli kinosilyalı-kinosilyasız kübik hücrelerden oluşan deniz tarağına benzeyen epitel dokuya sahiptir. Bu epiteldeki kinosilyasız hücreler tübüllerden salgılanan sıvıyı emerken kinosilyalı olanlar ise spermilerin epididimise geçişini sağlayan bir sıvı akımı sağlamaktır (Junquera ve ark. 2005).

4.1.3.6. Genital boşaltım kanalları

Testislerde üretilen sperm hücrelerini penise taşıyan kanallar sisteminde; duktus epididimis, duktus deferens (vas deferens) ve üretra bulunmaktadır. Duktus epididimisin uzunluğu yaklaşık 4-6 m, çapı 400 µm, tek sayıda, kıvrımları fazla olan bir kanaldır. Epiteli kübik bazale yerleşmiş hücrelerden ve yalancı çok katlı prizmatik hücrelerden oluşmaktadır. Hücrelerin yüzeylerinde stereosilyalar bulunmakta epitelde ise bazal ve esas hücreler yer almaktadır. Bazal laminasında; kapiller damardan zengin bağ dokusu bulunurken tek sıra düz kas hücreleri yardımıyla gerçekleşen peristaltik kasılmalarla sperm hücrelerinin kanallar boyunca ilerlemesine yardım etmektedir. Bu kanalın kuyruk kısmında spermier hareket yeteneğı kazanır ve depolanır. Ayrıca bu kanalın gliserofosfokolin ve diğer glikoproteinlerin salgılarıyla spermierin diğı üreme sistemine ulaşincaya kadar olan süreçte kapasitasyonu sağlanmış olur. Bu kısımda luminal sıvıların geri emilimi ile sitoplazmik artıkların fagositozu gerçekleşir (William 2009).

Duktus deferens ise epididimisten düz kanal olarak devam eden, prostatik üretraya açılan, kalın musküler duvarlı, dar bir lümeni olan, mukozasında uzunlamasına kıvrımlar oluşturan, stereosilyalı yalancı çok katlı prizmatik epitelle çevrili bir yapıdır. Bazal laminanın altında fibroelastik yapıda gevşek bağ dokusu bulunur. Bu dokuyu içte ve dışta longitudinal ortada sirküler olmak üzere 3 düz kas tabakası sarar. Bu kanal spermatik kordonun parçasını oluşturarak içinde testiküler arter, pampiniform pleksus ve sinirleri içermektedir.

Prostata girmeden genişleyerek ampullayı oluşturur, bu bölgede epitelde kalınlaşma ve kıvrımlanma gözlenir. Ampullanın son kısmında ise vesikula seminalis'ler duktus deferense katılarak prostata giriş yapar, prostatik üretraya açılır. Bu bölümdeki segment duktus ejakulatoryus adını alır. Bu yapının epiteli basit prizmatik, altındaki bağ dokusu ise kıvrıntılı bir yapı gösterdiği için lümen düzensiz olarak gözlenir. Duktus deferensteki mukoza tabakası ampulla boyunca yani duktus ejakulatoryusun içine kadar devam eder ancak kas tabakası ampulladan sonra sonlanır (Junquera ve ark.2005).

4.1.3.7. Yardımcı genital bezler

Yardımcı genital bezlerin görevi erkekte üremenin gerçekleşmesi için gerekli olan salgıları üretmektir. Bu bezler vezikula seminalis, prostat bezi ve bulboüretral bezler olarak 3 çeşittir.

Vezikula seminalis, 15 cm uzunluğunda iki tane kıvrımlı kanaldan oluşur. Mesanenin arka yüzünde yerleşmiş olan bu dokudan kesit alınarak inceleme yapıldığında aynı kanal farklı yönde gözlenebilir. Histolojisi incelendiğinde epiteli yalancı çok katlı prizmatik, alt kısmında fibroelastik bağ dokusu, içte sirküler dışta longitudinal düz kas tabakası, en dışta ise ince fibroelastik bağ dokusu ile kaplıdır. Bu bezin salgısı; Vitamin C, fruktoz, sitrat, inozitol, prostaglandinler ve çeşitli proteinler gibi spermleri aktive etmeyle görevli maddeleri içeren viskoz ve sarı renkli bir sıvıdır. Prostaglandinlerin görevi servikal mukusla tepkimeye girerek, spermin hareketi için uygun bir ortam oluşturup spermin ovuma ulaşmasında uterus ve fallop tüplerine karşı zıt yönde peristaltik kasılmalarını sağlamaktadır (Ross ve Pawlina 2018).

Bu bezler tarafından üretilen seminal sıvıya aktarılan karbonhidratlar, spermin hareketi için enerji kaynağı oluşturmaktadır. Fruktoz, en fazla bulunan bir monosakkarittir. İnsanda ejakülatın %70'i seminal veziküllerden kaynak alır. Bu veziküllerdeki epitel hücrelerinin boyut ve salgılama sürecinin işlevselliği testosteron düzeylerine bağlıdır (Abraham 2012).

Bezlerin arasında en büyük olan prostat bezidir. Bu bez 30-50 tane dallanmış tübüloalveoler bezden, zengin fibromüsküler stromadan oluşur. Stroma kapsülün kökeni olarak bağ doku ve düz kas hücrelerini içermektedir. Bu bezin kapsül yapısı ise, düzensiz sıkı bağ dokusundan ve düz kas hücrelerinden oluşup damardan zengindir. Septum yapıları kapsülden çıkan bezin içine doğru uzanarak bezi bölümlere ayırır, bu bölümler yetişkin erkekte net olarak gözlenemez. Bu bezlerin kanalları prostatik üretraya açılır. Prostatik bezler üç bölgede periüretral mukozal bezler, periüretral submukozal bezler ve esas bezler olarak düzenlenir. Bezlerin histolojik özelliği; tek katlı ya da çok katlı prizmatik epitel ile döşeli olup lümenleri glikoprotein ve prostatik taşlar (corpora amilacea) içermektedir (Kosova ve Arı 2011).

Hücrelerde golgi kompleksi ve bol miktarda granüllü endoplazmik retikulum bulunmaktadır. Prostat salgısı; bazik özellikte olup su ve sitrik asit, asit fosfataz ve amilaz gibi enzimler, kolesterol, kalsiyum ve çinko gibi mineral maddeler, tamponlayıcı tuzlar, seminaplazmin adı verilen antibiyotik, fosfolipidler, prostaglandinler, β -mikroseminoprotein, fibrinojen ve prostat spesifik antijen (PSA) içerir.

Salgıdaki maddeler incelendiğinde sitrat, osmotik dengenin sağlanmasını gerçekleştirirken çinko, bakteriostatik işlev yaptığı, Prostatik Asit Fosfataz'ın (PAF) ise semendeki görevi net olmamakla birlikte metastatik prostat kanserinde hücrelerin bu enzimi kana salgılamalarından dolayı klinik için önemlidir. Salgının bazik özellikte oluşu ise, ovumun başarılı bir şekilde fertilize olması için önem taşır. Pıhtılaşma enzimi ise seminal vezikülden gelen fibrinojeni etkileyip pıhtı oluşturduğunda serviks ve vajinanın derinlerinde semenin tutunmasına yardım eder ve 15-30 dakika sonra, profibrinolizinden oluşan fibrinolizin yardımıyla pıhtı çözünerek eritilir. Çözünme ile spermilerin yüksek hareketlilik kazandığı gözlenmiştir (Junquera ve ark. 2005).

Bulboüretal bezler ise (Cowper bezleri), 3-5 µm çapında olup üretranın membranöz kısmında proksimale yerleşip bu bölgeye boşaltım yapan bezlerdir. Bezin histolojisi; tek katlı prizmatik epitelden oluşan mukus salgılayan tübüloalveoler bezlerdir. Her bez septumlarla loblara ayrılırken bu kısımlarda iskelet ve düz kas hücreleri bulunmaktadır.

Bu bezin salgısı, kayganlaştırıcı işlevi olan berrak bir mukus şeklindedir, semene ilk karışan salgıdır. Ayrıca asit özellikteki idrarın geçtiği üretrayı alkalileştirerek kayganlaştırır (Junquera ve ark. 2005).

4.1.3.8. Sertoli hücreleri

Testiste önemli fonksiyonlara sahip olan Sertoli hücreleri, seminifer tübüllerin içinde destek hücreleri olarak görev alıp spermatogenik hücreler arasında bulunurlar. Puberteye kadar seminifer tübüllerde en yoğun olarak bulunan hücre tipidir, puberteden sonraki dönemde hücrelerin %10'unu oluşturur. Bu hücreler tübüllerin bazal laminası üstüne tübül boyunca düzgün aralıklarla yerleşmiştir. Hücre sınırları düzensiz, oval nükleusu hücre tabanının üstüne yerleşmiş, soluk boyanan bir yapıdadır. Sertoli hücrelerinde spermatogenik hücrelerden farklı olarak belirgin bir nükleolus bulunmaktadır. Elektron mikroskopuyla yapılan incelemelerde, bu hücrelerin sitoplazmasında serbest ribozomların dağınık halde olduğu, primer ve sekonder lizozomların varlığı, çok gelişmiş düz endoplazmik retikülüm ve az gelişmiş granüler endoplazmik retikülüm, tübüler tipte mitokondriyonlar, lipid damlacıkları bakımından zengin olan hücrelerde gelişmiş Golgi kompleksi gözlenmektedir. Sertoli hücrelerinde nükleusa yakın konumda olan, birçok hayvan türünde gösterilemeyen, protein yapıda **Charcot-Böttcher** adı verilen kristalloid cisimcikler görülebilir (Ross ve Pawlina 2018).

Sertoli hücre fonksiyonları incelendiğinde; gelişen sperm hücrelerinin beslenmesinde, korunması ve desteklenmesinde, spermiyogenez sonucunda oluşan artıkların fagosite edilmesinde, tübüllerin lümenine protein ve iyon içerikli sıvı salgılama ve olgun spermilerin salınımını sağlamada görev alır. Tübül lümeninde görev alan, testesteron konsantrasyonunu arttırıcı özellikte olan, ABP üretimi ve salgılanmasında, İnhibin hormonu salgılayarak hipofiz bezinden FSH salgılanmasını engellemede, Anti Müllerian Hormon (AMH) üretimi ve salgılanmasında görev alır. Bu hormonun görevi üreme organlarının gelişiminde Müller kanallarının gerilemesini sağlamaktır. Testosteronun görevi ise Wolf kanallarından köken alan yapıların gelişmesini sağlamaktır. Sertoli hücrelerinin testis dokusu bütünlüğünün sağlanması ve fertilite için önemli bir görevi de kan testis bariyerini sağlamaktır (Abraham 2012).

4.1.3.9. Kan testis bariyeri

Bu bariyer, seminifer tübüllerin iç kısmıyla kan arasında bulunduğu için testiküler sıvıya kan yoluyla gelen maddelerin az miktarda geçişini sağlamaktadır. Bu bölgede bulunan pencereli kapillerler yardımıyla büyük moleküllerin geçişine izin verilir. Böylelikle spermatogonyumlar kandaki maddelere kolaylıkla ulaşabilir. Sertoli hücreleri, aralarında bulunan bağlantılarla bariyer oluşturup büyük moleküllerin hücreler arasındaki boşluğa taşınmasında engelleyici görev yaparlar. Buna bağlı olarak, spermatogenezin ileri evrelerindeki germ hücrelerinin, kandaki zararlı maddelerden korunması sağlanmış olur (Abraham 2012).

Kan testis bariyerinin bazal kompartmanında spermatogonyumlar, genç spermatositler (leptoten, zigoten evrelerinde) bulunurken, bu kısımda bulunan interstisyel damarlarla spermatogenik hücreler arasında kısmen serbest madde değişimi sağlanmaktadır. Adluminal kompartmanda olgun spermatositler (pakiten evresi), spermatidler ve sperm hücreleri bulunur ve bu kompartman madde alışverişini engeller. Bu kompartmanda bulunan hücrelerin besin ve diğer maddelerden yararlanması Sertoli hücrelerine bağlı olarak gelişim gösterir.

Bariyerin üst kısmında Sertoli hücrelerinin yanında ve üstünde bulunan girintilere spermatosit ve spermatidler yerleşmişlerdir. Spermatidlerde kuyruk gelişiminin başlamasıyla Sertoli hücrelerinin üst kısımlarından çıkan saçaklar şeklinde yapılar gözlenir. Sertoli hücreleri oluklu bağlantı ile birbirlerine bağlanarak hücrelerin kimyasal ve iyonik madde alışverişinin gerçekleşmesini sağlar ve bu yolla hücrelerin iyonik ve kimyasal madde alışverişi sağlanır (Abraham 2012).

Kan-testis bariyeri; kandan germinal epiteline zararlı madde geçişine engel olur ve dolaşım sırasında antijenlerin geçişini önler. Adluminal bölgede bulunan spermatogenik hücrelerin immün sistem etkilerinden korunmasını özellikle mayoz evresinde dış etkilere maruziyetin risk oluşturması nedeniyle oluşan haploid germ hücrelerinin canlının immün sistemi tarafından tanınmamasını sağlayarak yıkımına engel olur. Böylece canlının kendi sperm hücresine karşı otoimmün cevabın oluşması engellenir ve bu durum sayesinde spermatogenik hücreler spesifik olarak korunma sağlar (Ross ve Pawlina 2018).

Sertoli hücreleri, insan ve hayvan türlerinde üreme çağı boyunca bölünmezler. Olumsuz koşullara (enfeksiyon, dengesiz beslenme, X ışınlarına maruziyet gibi) karşı dayanıklılığı ve bu koşullara maruziyet sonucunda sağ kalım oranlarının spermatogenik seri hücrelerine kıyasla çok daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Memeli hayvanlarda spermatozonların salınımı, Sertoli hücresinde apikalin sitoplazmasında bulunan mikrotübül ve mikrofilamentler yardımıyla gerçekleşir (Junquera ve ark. 2005).

Sertoli hücrelerinden salgılanan GDNF spermatogenez olayının düzenlenmesinde, Okludin TJ bariyeri ile savunma olayında, TGF β -3 ise kan testis bariyerinin oluşumuyla düzenleme olaylarında görev alırlar. Bu proteinlerin birbirleriyle olan ilişkileri ekspresyon seviyelerini de etkilemektedir.

4.2. GDNF

Approved symbol	GDNF
Approved name	glial cell derived neurotrophic factor
Locus type	gene with protein product
HGNC ID	HGNC:4232
Alias symbols	ATF1; ATF2; HFB1-GDNF
Alias names	"astrocyte-derived trophic factor " "glial cell line derived neurotrophic factor " "glial derived neurotrophic factor "
Chromosomal location	5p13.2
Gene groups	GDNF family ligands
Curator notes	This locus is encoded by a bicistronic gene.

(http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?hgnc Erişim Tarihi:30.07.2019

Glial hücre hattı kaynaklı nörotropik faktör, neurturin (NTN), persephin (PSPN) ve artemin (ARTN) de içeren büyüme faktörleri ailesine ait bir proteindir. Bu dört protein, transforme büyüme faktörü (TGF-P, TGF β) ile yakından ilgilidir ve RET transmembran reseptör tirozin kinazını GFRA yardımcı reseptörü aracılığıyla aktive ederek biyolojik aktivitelerini sergilerler (Airaksinen ve ark. 2002; He ve ark. 2007).

Bu protein, hücrenin plazma membranına bir glikosil fosfatidilinositol (GPI) bağlantısı ile bağlanan spesifik GDNF-familiya-alfa reseptörlerini (GFRA 1-4) bağlayan bir glikosile edilmiş homodimer yapısındadır (Jing 1996; Baloh ve ark. 1997; Masure ve ark. 2000).

Glial hücre hattı kaynaklı nörotropik faktör olarak bilinen bu protein ilk defa merkezi sinir sistemindeki fonksiyonlarıyla tanımlanmış olup bir sıçan glioma hücre hattının süpernatantından trofik bir faktör olarak saflaştırılmıştır (Lin ve ark. 1993). Yapılan çalışmalarla parakrin yolla bağlantılı olarak çalıştığı tespit edildi. Beyinde glial hücrelerin GDNF üretimi, metabotropik glutamat reseptörlerinin agonistleri tarafından geliştirilmiştir (Battaglia ve ark. 2009; Di Liberto ve ark. 2011).

Bu protein esas olarak nöronların kendileri tarafından üretilir ve pozitif bir geri besleme mekanizmasıyla hareket eder gibi görünmektedir (Trupp ve ark. 1997). GDNF / RET sinyali, hücre sağkalımı, proliferasyon, diferansiyasyon, migrasyon, kemotaksis ve dallanma morfogenezisi gibi işlemleri düzenler (Costantini 2010).

Bir pleiotropik faktör olarak, GDNF, enterik sinir sisteminin oluşumu, sinaptik plastisite, nöral krest hücrelerinin göçü, böbrek oluşumu ve fetal germ hücrelerinin bakımı dahil olmak üzere birçok gelişimsel süreç için esastır (Schuchardt ve ark. 1994; Kramer ve ark. 2007).

Sonuç olarak, küresel GDNF ve RET nakavt fareler doğumdan kısa bir süre sonra ölmektedir. Fetal gelişimdeki rolüne ek olarak, erişkinlerde GDNF, dopaminerjik ve motor nöronların hayatta kalabilmesi için çok önemlidir (Lin ve ark. 1993; Kramer ve ark. 2007).

Parkinson hastalığının hayvan modellerinde dopaminerjik nöronları koruyarak onardığı ve ayrıca in vivo motor nöronlarının kurtarılmasını da sağladığı tespit edilmiştir (Drinkut ve ark. 2016; Ruven ve ark. 2018).

GDNF ayrıca spermatogenezin düzenlenmesinde ve testis mikro çevresinin oluşturulup dengesinin sağlanmasında da görev alır (Meng ve ark. 2001).

Ayrıca dişi üreme sisteminde folikulogenezde görevli olduğu tespit edilmiştir (Dole ve ark. 2008). Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada 4 günlük dişi sıçan yavrularının ovaryumları alınarak GDNF ve büyüme faktörleri kullanımıyla kültüre edilmiş ve değerlendirme yapılmıştır. Dişi üreme sisteminde GDNF, primordial folikül gelişimini sağlarken follikulogenez olayında da hücreler arası bağlantılarda görev almaktadır. Yapılan incelemelerde GDNF ve GFR α 1 primordial folliküllerin sitoplazmasında tespit edilmiştir (Naughton ve ark. 2006).

Bu protein ve reseptörlerine bağlı etki mekanizması spermatogenezin farklı evrelerinde değişiklik göstermektedir (Fouchecourt ve ark. 2006). Bununla ilgili yapılan çalışmalarda, 7–8 günlük sıçanlarda GDNF'nin Sertoli hücrelerinin düzenlenmesi ile ilgili önemli etkisi olduğu tespit edilmiştir. GDNF uygun kültür ortamında spermatogonya A'nın S-fazına girmesine engel olarak spermatogonyanın farklılaşmasına izin vermemektedir (Naughton ve ark. 2006).

Sıçanlarla yapılan başka bir çalışmada 1–90 günlük sıçanlarda GDNF ve reseptörlerinin dönüşümünde görevli olan faktörlerin post-natal gelişim sırasında sıçan testisinde lokalize olduğu tespit edilmiştir. Farelerde ise bu mekanizmanın doğum sonrası testis gelişiminde önemli olduğu ancak embriyolojik dönemde büyüme faktörü ve reseptöre ihtiyaç duyulmadığı saptanmıştır (Yılmaz ve Hakan 2010).

Testiste GDNF, Sertoli hücreler ve peritübüler myoid (PM) hücreler tarafından üretilir (Tadokoro ve ark. 2002; Johnston ve ark. 2011; Chen ve ark. 2016). GDNF'nin çalışma mekanizması incelendiğinde; FSH etkisiyle Sertoli hücrelerinden salgılanma mekanizması GDNF familyasından olan GFR α 1/RET ko-reseptör faktörleri spermatogonyal hücrelerin rejenerasyon ya da diferansiyasyon yönünde aktive edilmesi hücre içindeki faktörler tarafından kontrol edilmektedir (Sariola ve Sarma 2003; Hofmann ve ark. 2008).

Sertoli hücrelerinde GDNF ekspresyonunu indükleyen diğer faktörler, büyüme faktörleri ve fibroblast büyüme faktörü (FGF2), TNF- α ve (İnter Lökin 1) IL1-P, WNT ailesi proteinleri (Yeh ve ark. 2012) ve lösemi inhibe edici faktör (LIF) gibi kemokin ve sitokinlerdir (Kanatsu ve ark. 2007). Bu moleküllerin bazılarını tübüller arasındaki interstisyel boşlukta yer alan testiküler makrofajların salgıladığı düşünülmektedir (Bhushan ve Meinhardt 2017). Bu çalışmalar PM hücrelerinin GDNF üretiminin in vivo olarak yapabileceğini göstermesine rağmen yapılan in vitro çalışmalar diğer faktörlerin de gerekli olabileceğini göstermiştir.

Leydig ve PM hücreleri tarafından üretilen Kolon Uyarıcı Faktör 1 (CSF1) ve FGF2 (Lindsey ve Wilkinson 1996; Lecureuil ve ark. 2002; Ding ve ark. 2011) olduğu gibi GDNF (Shin ve ark. 2006) varlığında, in vitro ortamda SSC'lerin de kendi kendini yenilemeyi geliştirerek, Sertoli hücrelerinde transkriptleri tanımlandı (Sutton ve ark. 1998; Rao ve ark. 2003). Sertoli hücrelerinin nişin oluşturulmasında ve testislerde niş ve SSC sayısının belirlenmesinde önemli bir rol oynadığı kabul edilmektedir (Artavanis ve ark. 1999).

Sıçanlarda PM hücreleri tarafından üretilen androjen uyarımlı bir faktör olan, Sertoli hücre fonksiyonunu modüle eden peritübüler faktör (PModS) olarak adlandırılır, transferrin (TRF), ABP, inhibin (Fischer ve Gessler 2007) ve Sertoli hücreleri tarafından diğer proteinlerin (Loomes ve ark. 2007; Weber ve ark. 2014) üretimini olumlu yönde etkiler.

Ayrıca PM hücrelerinin neuregulin ürettiği, Sertoli hücrelerinin de bu madde için reseptörleri eksprese ettiği ve rekombinant neuregulin'in, TRF ve ABP üretimini Sertoli hücreleri tarafından uyardığı bulunmuştur (Lu ve ark. 2003).

Bu hücreler İnsülin benzeri Büyüme Faktörü (IGF1) ve FGF2 salgıladıklarında Sertoli hücreleri tarafından TRF ve ABP üretimini uyarmaktadır. İn vitro olarak yapılan bu çalışmalarda uyarım mekanizması tespit edilmişken ve SSC'leri in vivo olarak etkileyen tek faktörün ise GDNF olduğu tespit edilmiştir (Lu ve ark. 2003).

Sertoli hücreleri ise bu faktörler için reseptörleri eksprese eder, ancak bu çalışmalar sadece normal gen ekspresyon paternlerine sahip olmayan TM4 Sertoli hücre çizgisi ile in vitro yapılan çalışmalarda gözlenmiştir (Tanwar ve ark. 2010). Testiste GDNF, SSC'nin kendini yenilemesi için önemli olarak tanınmış bir trofik faktördür ve bir erkeğin yaşamı boyunca testiste yeterli bir SSC havuzu sürdürülmesi gerekliliği bulunmaktadır (Meng ve ark. 2000; Naughton ve ark. 2006; Kubota ve ark. 2004). GDNF sinyallemesinin inhibisyonu, SSC'lerin rejenerasyonu için replikasyonu azaltır ve farklılaşmalarını teşvik eder (Parker ve ark. 2014).

Bu duruma bağlı olarak yapılan in vivo çalışmalarda testiste gözlenen GDNF eksikliği, kök hücre rezervinin azalmasına ve infertiliteye yol açmaktadır. GDNF'nin aşırı immunoreaktivite göstermesi ise spermatogonya birikimine neden olup germ hücreli hiperplaziye ve farelerde testis tümörleri oluşumuna neden olmaktadır (Meng ve Lindahl 2000; Meng ve ark. 2001; Naughton ve Jain 2006).

Diğer taraftan yapılan in-vitro çalışmalar da GDNF eklenen kültür ortamındaki SSC'lerin proliferasyonunun arttığını ortaya koymuştur (Kanatsu ve ark.2003; Hofmann 2005).

Sonuç olarak, temelde GDNF'nin yüksek seviyeleri SSC'lerde yenilenmeyi, düşük seviyeleri ise farklılaşmayı uyarmaktadır (Yılmaz ve Hakan 2010) Bu nedenle, GDNF'nin pozitif veya negatif olarak düzenleme mekanizmasını anlamak, germ hücrelerin homeostazını ve doğurganlık sorunlarını anlamak için esastır (Garcia ve Parekh 2017).

Bu değişiklikler SSC ve progenitor spermatogonya kaybına ve giderek olgunlaşmış spermatojenik hücrelerin sıralı tükenmesine neden olup sonunda sadece somatik olan Sertoli hücreleri kalması ile oluşan Sertoli Cell Only (SCO) olarak tanımlanır (Savitt ve ark. 2012).

İnsan ve fare SSC'ler, progenitor spermatogonisi sayısındaki önemli fark bulunmasına rağmen, GDNF'nin insan hücrelerinin düzenlenmesinde önemli bir in-vivo rol oynadığı hipotezini destekleyen kanıtlar vardır. İnsanda SSC'ler ile doğrudan temas halinde olan tek hücre Sertoli hücreleri, GDNF mikroRNA'yı ifade etmekte (Davidoff ve ark. 2001; Ma ve ark. 2013) ve GDNF reseptörünün, GFRA1 ve RET'in alt birimlerini kodlayan transkriptler, prepubertal insan testislerinden izole edilen spermatogonide ve obstrüktif azoospermi ile teşhis edilen hastalardan elde edilen spermatogonide de tespit edilebilir (Izadyar ve ark. 2011; Ma ve ark. 2013).

Bu proteinin üretiminin pozitif veya negatif uyaranlarla düzenlenmesi gerekmektedir. FSH ve sitokinler, Sertoli hücrelerinde (Tadokoro ve ark. 2002; Lamberti ve Vicini 2014) GDNF immunoreaktivitesinin pozitif düzenleyicileri olarak görev yaparken, NOTCH sinyalleme ise bir down-regülasyon mekanizması (Garcia ve ark. 2017) sağlamaktadır.

Hipotalamusta üretilen gonadotropin salgılayan hormon (GnRH), spermatogenezin temel düzenleyicisidir. GnRH'nin pulsatil tarzda üretimi, hipofiz tarafından glikoprotein FSH ve LH'nin salınımını uyarak, spermatogenezini düzenlemek için testis somatik hücrelerinde etkili olur. LH, LIT reseptörünü, testosteron üretimini indükleyen Leydig hücrelerinin yüzeyine bağlar. FSH, Sertoli hücrelerinin yüzeyindeki reseptörüne (FSHR) bağlanır ve bu hücrelerin farelerde doğumdan yaklaşık 15 güne kadar çoğalmasından sorumludur (Vergouwen ve ark.1991; Singh & Handelsman 1996; Baker ve ark.2001).

Hem FSH hem de LH, Sertoli hücre büyümesinin ve farklılaşma faktörlerinin ekspresyonu yoluyla spermatogenez üzerindeki etkilerini gösterir. Fare testisinde Sertoli ve PM'nin GDNF immunoreaktivitesi, gonadotropik hipofiz hormonlarının (LH ve FSH) ve testosteron seviyelerine bağlı olabilir. Ancak bazı çalışmalarda bu durum tam olarak gerçekleşmemektedir (Tadokoro ve ark. 2002; Simon ve ark. 2007; Tanaka ve ark.2016). GDNF immunoreaktivitesinin FSH ile artış göstermesi hormon varlığında kültürlenmiş olgunlaşmamış primer Sertoli hücrelerinin kullanıldığı kısa süreli in vitro çalışmalarla desteklenmiştir (Tadokoro ve ark. 2002; Ding ve ark. 2011; Lamberti ve Vicini 2014).

Bu protein, mikroRNA ekspresyonunda önemli bir azalma ve proliferatif hücrelerde nükleer antijen ekspresyonu ile ölçüldüğü gibi, bu farelerin testislerinde farklılaşmamış spermlerin proliferasyonunun azaldığını da gösterdi.

Bu düşüşün nedeni ilk çalışmalarda FSH'deki azalmaya bağlansa da LH ve testosteron üretimini de baskılayan GnRH antagonistinin, aynı zamanda myoid hücre kaynaklı GDNF immunoreaktivitesini azalttığı bilinmiyordu. Ek olarak, FSHb-nakavt farelerin fertil olmaları (Kumar ve ark. 1997) bu hormonun GDNF üretimini için yönetici olmadığını göstermektedir.

Germ hücre nakil çalışmaları ile elde edilen veriler bu farelerde SSC gelişiminin önemli ölçüde bozulmadığını ortaya koydu (Tanaka ve ark. 2016) ancak FSHb kaybını sadece PM hücreleri tarafından sağlanan GDNF'nin telafi etmesinin mümkün olduğu sonucuna ulaşıldı (Chen ve ark. 2014, 2016).

Kazanç ve fonksiyon kaybı modelleri kullanarak, yapılan incelemelerde Sertoli hücrelerinde NOTCH sinyalinin germ hücre homeostazı için çok önemli olabileceği gösterilmiştir. Fetal gonadda aşırı NOTCH aktivitesi, prenatal germ hücrelerinin kaybına neden olurken, NOTCH sinyali olmayan Sertoli hücrelerinin normal görüldüğü, ancak farklılaşmamış spermatogonya bakımı ve proliferasyonu için GDNF' nin aşırı ifade edildiği gösterilmiştir (Garcia ve ark. 2013;2014).

Bunun tersine, NOTCH1'i aşırı eksprese eden Sertoli hücrelerinde, GDNF (Garcia ve ark. 2014) net bir şekilde down-regüle olmuştur. Bu etkilere muhtemelen mikroRNA seviyesindeki NOTCH aktivasyonu ile ters ilişkili görünen GDNF immunoreaktivitesi seviyelerindeki değişiklikler neden olmaktadır. Ancak yine de, NOTCH sinyal aktivitesi ile GDNF immunoreaktivitesinin inhibisyonu arasında kesin bir bağlantı tam olarak açıklanmamıştır.

Yapılan bir çalışmada Sertoli hücreleri tarafından GDNF üretiminin kanonik NOTCH sinyal yolunun düzenleyici kontrolü altında olduğunu ve NOTCH hedef proteinlerinin HES1 ve HEY1'in GDNF immunoreaktivitesini doğrudan bastırdığına dair kanıt sağlanmıştır (Thomas ve Garcia 2017). Ayrıca, NOTCH ligand JAG1'in, NOTCH sinyallemesinin ana aktivatörü olduğunu ve bu hücrelerin, kök hücre nişindeki NOTCH sinyallemesinin ve GDNF modülasyonunun aktivasyonuna katılmasını sağlayarak, diğer germ hücrelerine kıyasla farklılaşmamış spermilerin eksprese edildiğini göstermiştir.

Bu deneylerin sonuçları, insanda erkek infertilitesinde GDNF'nin potansiyel bir rol oynadığı, Obstrüktif olmayan azospermi teşhisi konan bazı erkeklerin testislerinde, GDNF sinyalizasyonun geçici olarak inhibe edilmesine maruz kalmış farelerdeki gözlemlere benzer SCO histolojik fenotipi gösterdiği tespit edildi. Bu benzerlik SCO testislerinde bulunan insan Sertoli hücrelerinin normal testislerde olduğundan çok daha az GDNF üretildiği varsayımına yol açmıştır (Singh ve ark. 2017).

4.3. OKLUDİN

Approved symbol ?	OCN
Approved name ?	occludin
Locus type ?	gene with protein product
HGNC ID ?	HGNC:8104
Alias symbols ?	PPP1R115
Alias names ?	"tight junction protein occludin TM4 minus " "phosphatase 1, regulatory subunit 115 "
Chromosomal location ?	5q13.2
Gene groups ?	Protein phosphatase 1 regulatory subunits Tetraspan junctional complex superfamily MARVEL domain containing

(http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?hgnc Erişim Tarihi:30.07.2019)

Hücreler arası bağlantılardan birisi olan sıkı bağlantı kompleksi (TJ) molekülleri, okludin ve klaudin olmak üzere iki transmembran proteininden oluşmaktadır. Klaudin ve okludin hücrenin aktin iskeletine Zonula Okludens (ZO) proteinleri ile bağlanmaktadır. ZO proteinlerinin üç tipi bulunmaktadır.

Lateral membranların en apikal kısmında yer alarak hücrelerin apikal yüzeyini bir kemer gibi kesintisiz olarak sarar. Apikal ve bazolateral yüzeyleri birbirinden ayırır. Parasellüler yol ile iyonların ve suda çözünen moleküllerin difüzyonunu düzenleyen proteinöz bir tıkaç oluşturur. Basit epitelyal hücreler ve endotelial hücrelerde iyi geliştirilmiştir ve bariyer (kan-beyin, kan-BOS, kan-testis,hava-kan gibi...) oluşumunda TJ'lerle birlikte görev alır.

Epitel tabaka olgunlaştığında, akışkanlığı kontrol etmek ve akışı durdurmak için iyi gelişmiş TJ'lere sahiptir. TJ'ler, Tutundurucu Bağlantı(AJ)'ya özgü bitişik hücreler arasında oluşur, parasellüler akıma karşı yarı geçirgen engeller oluşturarak korur ve hücre polaritesinin korunmasına katkıda bulunur. Bulunan ilk transmembran TJ proteini olan okludin dahil olmak üzere TJ'lerde (Anderson ve Van 2009) 40'ın üzerinde protein tanımlanmıştır (Furuse ve ark. 1993).

Okludin nakavt farelerin bağırsak geçirgenliğinde herhangi bir artış gözlenmesi de bu hayvanlarda infertilite, beslenme yetersizliği, beyin kalsifikasyonu olmak üzere bariyer disregülasyonu ile uyumlu kompleks fenotiplerin karması ortaya çıkmıştır (Saitou ve ark 2000; Schulzke ve ark. 2005). Bariyer oluşumu ve işlev bozukluğunun çeşitli hastalıklarda (Schmitz ve ark 1999; Morgan ve ark 2014) önemine rağmen, bariyer olgunlaşmasına yol açan olaylar dizisi tam olarak karakterize edilememiştir. Yapılan çalışmalarda normal bariyer olgunlaşması için boyut küçültücü proliferasyon veya hücre dolgusu gerekliliği gösterilmekte ve bu süreçte TJ proteinlerinden okludin rolü önemli olmaktadır. Bazı çalışmalarda da okludin sentrozomlarda bulunması ile fosforilasyona bağımlı bir şekilde büyüme kontrolüne ve hücre döngüsü ilerlemesine (Runkle ve ark. 2005) katkıda bulunurken, epitelyal kanserlerde ise (Gonzalez ve ark. 2007; Runkle ve Mu 2013) değiştiğini ve bir tümör baskılayıcı olarak işlev görebileceği de yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Wang ve Mandell 2005).

Sıkı bağlantılarda bulunan okludin, ~ 60 kDa ağırlığında olup iki yanında sitoplazmik N ve C terminal uçlarını taşıyan integral plazma membran proteindir (Balda ve ark. 1996; Chen ve ark. 1997) TJ'ler, çoklu bütünleyici zar proteinleri olarak bilinir. Okludin, Klaudins, birleşimsel yapışma molekülleri (JAM) ve ZO'lar (Ebnet ve ark. 2004 ; Feldman ve ark. 2005) gibi ilişkili birkaç çevresel protein içerir. (Koval 2006 ; Kaitu'U ve ark. 2007; Tarullive ark. 2008; Hejmej ve ark. 2012) Bu yapılar epitelyal ve endotelyal hücreler arasında yer alan, çoğalma, göç, farklılaşma ve ayrıca immün tepkinin düzenlenmesinde, sinyal iletiminde rol oynayan önemli fonksiyonel protein kompleksleridir (Junhe ve ark. 2018).

Okludin, TJ ile birlikte bariyer ve savunma fonksiyonlarında da görev alır (Furuse ve ark. 1996; McCarthy ve ark. 1996; Tsukita ve ark. 2001; Yu ve ark. 2005) TJ'ler hücreler arasındaki bağlantıyı sağlayıp kan-testis bariyerinin (BTB) oluşumuna katılarak germ hücrelerinin mayozu ve olgunlaşması için özel ve korumalı bir ortam yaratır (Dym ve Fawcett, 1970; Maddocks ve Setchell, 1990; Tsukitave ark. 2001).

Yapılan alışmalar okludin'in çoklu hüresel proteinlerle ilişkili olduğunu ve çeşitli sinyal yolakları ile modüle edilebileceğini ne sürmektedir (Barrios ve ark. 2005; Feldman ve ark. 2005; NusSıan ve ark. 2000; Seth ve ark. 2007).

Bu yolaklar apoptozu, sinyal iletimini, hücre büyümesini, çoğalmasını ve iyileşmedeki diğer kritik faktörleri etkilemektedir. Bu sonuçlar ayrıca Okludin'in yara iyileşmesi sürecinde de önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Okludin, GTPaz sinyallemei için bir başlangıç reseptörü olarak işlev görür ve fosforilasyonun artışıyla, TJ geçirgenliği azalır (Harhaj ve ark. 2004) Ayrıca göç eden hücrelerin n kenarında lokalize olduğunu ve yönlü hücre göçünü düzenlediği de tespit edilmiştir (Dan Du ve ark. 2010).

Siklofosfamid'in Sertoli hücrelerinin protein ekspresyonunu bozarak spermatogenezi bozabileceği sonucuna varılmıştır (Yuanchao ve ark. 2017) Okludin'in sıkı kavşakların önemli bir bileşeni olduğu ve erkek fertilitesinde önemli bir rol oynadığı iyi bilinmektedir. Erkek sıçan testiküler Okludin fonksiyonunun baskılanması in vivo germ hücrelerinin kaybıyla sonuçlanır (Saitou ve ark. 2000; Chung ve ark. 2001). Başka bir çalışmada ise Sertoli hücrelerinde yapılan ısıl işleme TJ ilişkili molekülü Okludin'in anlamlı şekilde azaldığı bildirilmiştir (Chen ve ark. 2008).

Başka bir çalışmada da in vitro ortamda; TJ bariyerinde görev alan Okludin'in, TGF- 3 etkisiyle ekspresyonunun azalmasına bağlı olarak bariyerde bozulma ve Sertoli hücrelerinde tıkanma gözlenebilir (Lui ve ark. 2001).

4.4.TGF-β3

Approved symbol	TGFB3
Approved name	transforming growth factor beta 3
Locus type	gene with protein product
HGNC ID	HGNC:11769
Previous symbols	ARVD1; ARVD
Previous names	" arrhythmogenic right ventricular dysplasia 1 "
	" transforming growth factor, beta 3 "
Alias names	" prepro-transforming growth factor beta-3 "
Chromosomal location	14q24
Gene groups	Transforming growth factor beta family

(http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?hgnc Erişim Tarihi:30.07.2019)

TGF süper ailesi; TGF- β, aktivinler, inhibinler, BMP'ler, AMH, büyüme ve farklılaşma faktörleri (GDF) ve GDNF gibi birkaç peptid hormonundan oluşur (Hu ve ark. 1998; Piek ve ark. 1999; Ducky ve Karsenty 2000; Ingraham ve ark. 2000; Buxton ve ark. 2001; Josso ve ark. 2001).

Testiste TGF molekülü 1, 2 ve 3'ü içeren üç TGF-β tespit edilmiştir. TGF-β (~25 kDa), her biri ~12 kDa'nın iki özdeş alt biriminden oluşan homodimerlerdir (Roberts ve Sporn 1990).

Smad proteinleri ile TGF-β sinyalizasyonunun gerçekleştiği düşünülmektedir. Smad'lar, 42-65 kDa ağırlığında tek zincirli sinyalleme proteinleridir. Memelilerde, farklı biyolojik ve yapısal özelliklerine göre üç kategoriye ayrılacak sekiz Smad tanımlanmıştır: Reseptör-aktif (Smad1, 2, 3, 5 ve 8 gibi R-Smads), ortak-partner Smad (Smad4 gibi Co-Smad) ve inhibe edici Smad'lar (Smad6 ve 7 gibi I Smads) (Heldin ve ark. 1997; Whitman 1998). R-Smads, TGF-β ve aktivin reseptörleri tarafından aktiveleştirilebilir (Eppert ve ark. 1996; Macias ve ark. 1996; Chen ve arkadaşları 1997; Nakao ve ark. 1997; Macias ve ark. 1998; Tamaki ve ark. 1998; Zhang ve ark. 1998; Chen ve Massagué 1999). Smad4, memelilerde bilinen tek Co-Smad'dır.

İn situ hibridizasyon ve immünohistokimya ile yapılan çalışmalar, mayotik germ hücrelerinde Smad2'yi (TGF- β için bir R-Smad) tanımlamış, ancak fare testisinde mayotik germ hücrelerini, Sertoli hücrelerini ve Leydig hücrelerini tanımlamamıştır (Wang ve Zhao 1999).

Yine de testiste spermatogenez sırasında TGF- β Smad protein yolu tarafından hangi hücrel etkilerin düzenlendiği tam olarak bilinmemektedir. Smad aracılı sinyalizasyon yolunun yanı sıra, üç grup mitojen ile aktive olmuş protein kinaz (MAPK), ökaryotik hücrelerde TGF- β tarafından aktive edilebilir. Bunlar arasında c-Jun N terminal kinaz (JNK), p38 MAPK ve hücre dışı sinyal regüle kinazlar 1 ve 2 (ERK1 ve ERK2) bulunmaktadır (Hartsough ve Mulder 1995; Vojtek ve Cooper 1995; Atfi ve ark. 1997; Liberati ve ark. 1999; Zhou ve ark.1999).

Testiste, germ hücre apoptozi, p38 MAP kinaz aktivasyonu yoluyla ısı gibi stresle indüklenebilir (Kojima ve arkadaşları 2001). Yapılan bir çalışma, TGF- β 3'ün, Okludin ve ZO-1'in (Lui ve ark. 2001) ekspresyonunu baskılayarak in vitro ortamda Sertoli hücresi TJ geçirgenlik bariyerinin montajını ve bakımını bozabileceğini göstermiştir. Ayrıca, bu TGF- β 3'ün Sertoli TJ bariyeri üzerindeki etkisine, p38 MAP kinaz yolağı aracılık etmiştir. Bu gözlemler, bu in vitro çalışmalar in vivo olarak çoğaltılabiliyorsa, TGF- β 3 ilavesinin gerçekten de in vivo kan-testis bariyerini (BTB) bozduğunu, testiste sitokin fonksiyonunun bozulmasını etkili bir şekilde engelleyebileceğini göstermektedir. BTB, bazal laminaya yakın seminifer epitelinin bazal bölmesindeki Sertoli hücreleri arasında TJ'ler tarafından oluşturulur, spermatogenez olayının neredeyse tamamını, spermatogonya'nın mitotik aktivitesi ve B tipi spermatogonya'nın preleptoten ve leptoten spermatositlerine dönüşümü gibi olayları sistemik dolaşımdan ayırır (Dym ve Cavicchia 1977, 1978; Setchell 1980; Cheng ve Mruk 2002).

Kan testis bariyeri ayrıca lenfositlerin adluminal bölüme girmesini ve hücre polaritesini kabul etmeyen bir immünolojik engel olarak da işlev görür (Dym ve Fawcett 1970; Setchell 1980; Cheng ve Mruk 2002). Yapılan çalışmalar BTB'yi oluşturan testislerde üç sınıf integral membran proteini tanımlamıştır. Bunlar arasında Okludin,klaudin ve JAM bulunur (Cheng ve Mruk 2002). Okludin ve klaudin, dört transmembran bölgeye sahip proteinlerdir ve TJ işlevselliğini sağlayan TJ fibrillerinin yapı taşlarıdır (Cereiido ve ark. 2000; Tsukita ve Furuse 2000; Cheng ve Mruk 2002).

Birleşik yapışma proteinlerinin homotipik hücre-hücre etkileşimlerini kolaylaştırdığı (Martin ve ark 1998) aynı zamanda inflamatuvar yanıt sırasında TJ'lerde nötrofillerin transepitelyal göçünü de kolaylaştırdığı bildirilmiştir (Ozaki ve ark. 1999).

Kan-testis bariyerinin düzenlenmesinde TNF- α (tümör nekroz faktörü) ve TGF- β 3 önemli rol oynayan sitokinlerdir. Bu sitokinler, sıkı kavşakların ve bazal ektoplazmik farklılaşmaların, yapısal proteinlerin, proteazların, proteaz inhibitörlerinin ve seminifer epitelindeki diğer hücre dışı proteinlerin (kollajen gibi) homeostazını belirler. Bu bağlamda, hem Sertoli hem de germ hücreleri tarafından üretilen bir sitokin olan TNF- α 'nın, (Skinner, 1993) ayrıca proteazların ve proteaz inhibitörlerinin homeostazisini bozmadaki etkileri vasıtasıyla, in vitro olan Sertoli hücre TJ fonksiyonunu da bozabileceğine dikkat etmek önemlidir. TJ bölgesine bitişik Ekstraselüler matriks(ECM)'de, sırasıyla Sertoli hücresi TJ fonksiyonunu düzenleyen integrin / ILK/ SAPK/ JNK sinyal yolunu kullanır (Siu ve ark. 2003).Deneyisel çalışmalarda İnterlokin 1 Beta (IL-1 β) veya TNF- α uygulamasının kan-testis bariyeri bütünlüğünü bozduğu gösterilmiştir (Wong ve ark. 2005).Spermatozoa ilerleyici hareketliliğini de önemli ölçüde azalttığı belgelenmiştir. Kan-testis bariyer fonksiyonunu etkileyen faktörler testiküler hasara ve erkekte infertiliteye neden olabilir. Kan-testis bariyeri, germ hücrelerinin gelişimi ve olgunlaşması için özel bir mikro ortam yaratır. Anatomik yapısına bağlı olarak bu bariyer, sıkı kavşaklar Sertoli hücre değişikliklerine izin vermek için (açılma, kapanma) adapte olarak yeniden yapılanma geçirir. Kavşakların bütünlüğü bozulmadığı için işlevler açısından değişiklik gözlenmez. Bariyer fonksiyonunun ve bütünlüğünün bozulması toksik maddeler etkisiyle testis hasarı ve infertiliteye neden olur (Cheng ve ark. 2012; Mital ve ark. 2011).

Bu protein, TJ fonksiyonunun bozulmasının yanı sıra BTB'yi geçemeyen germ hücrelerinin apoptoza uğramasına ve spermatogenezin bozulmasına yol açtığı bilinmektedir. Eğer TGF- β 3 fonksiyonu engellenirse BTB'deki preleptoten ve leptoten spermatositlerinin girişi gerçekleşmez ve bazalden adluminal bölgeye doğru ilerler, spermatogenez bloke edilmiş olur (Russell 1977). Bu blokaj sonucunda hipotalamus-hipofiz-testiküler bağlantısı bozulmadan erkek doğum kontrolü gerçekleştirilebilir. Ayrıca son çalışmalar, ECM'nin, homeostazı sitokinler tarafından düzenlenmiş olan testiste TJ dinamiğinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir.

Örneğin, kollajen fonksiyonunda bir bozulma ve TNF- α gibi sitokinler tarafından düzenlenen metaloproteazlar ve TIMP'lerin bir değişimi yoluyla ECM'nin homeostazında bir değişiklik, Sertoli hücresi TJ bariyerini etkili bir şekilde bozabilir (Siu ve ark. 2003). TGF- β 3, testiste spermatogenez, Leydig hücre steroidogenesi, Leydig hücre DNA sentezini de modüle ettiği, ECM sentezi ve testis gelişimini içeren çoklu fizyolojik fonksiyonları düzenlemektedir. Bu durum BTB'nin açılma-kapanma olaylarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Buna bağlı olarak spermatositlerin, BTB boyunca, seminifer epitel döngüsünün evrelerinde geçişini düzenler (Yee Lui ve ark. 2003).

Bu protein, Sertoli-germ hücre etkileşimleri ile spermatogenik hücre farklılaşmasında rol oynar. Özellikle ergenlik döneminde spermiogenezis ve spermiyasyonun başlangıcında görev alır (Mullaney ve Skinner 1993).

Çalışmalar TGF- β 3'ün Sertoli hücresi TJ dinamiğinin önemli bir düzenleyicisi olduğunu göstermesine rağmen, bu çalışmalar büyük ölçüde in vitrodur, in vivo olanların ise fizyolojik önemi korunmaya devam etmektedir (Yee Lui ve ark. 2003).

Testislerdeki TJ'ler, testiste ekstraselüler matriksin (ECM) değiştirilmiş bir formu olan bazal membrana en yakın konumlandırılmıştır (Dym 1994). Testislerdeki TJ'ler ve bağlantı kavşakları diğer epitellerden farklıdır. Bu TJ'ler hemen hücre-hücre aktin bazlı adherens kavşakları ve hücre-hücre ara filaman bazlı desmozom benzeri kavşaklar tarafından devam eder (Cheng ve Mruk 2002).

Yine de, diğer epitelyumlarda bulunan TJ'ler, temel zardan uzaktadır (Farquhar ve Palade 1963). BTB'nin seminifer epitelyumu içindeki bu farklı ortamı, germ hücre gelişimi için özel bir mikro çevre yaratır. Yapılan bazı çalışmalar, TJ'lerin birleştirildiği sırada, Sertoli hücre kültürlerinde TGF- β 2 ve - β 3'te önemli bir düşüş olduğunu göstermiştir. Ayrıca, bu kültürlerde rekombinant TGF- β 2 ve TGF- β 3 eklenmesi durumunda, Sertoli hücresi -TJ geçirgenlik bariyerini doza bağlı olarak etki eder ve tersine çevirebilir. İn vitro ortamda yapılan çalışmalarda rekombinant TGF- β 3'ün eklenmesiyle TJ geçirgenlik bariyerini bozabileceği, Sertoli hücre sıkı bağlantılarında bozulma, Sertoli hücrelerinde tıkanmaya neden olabileceği, hedef proteinleri olan ZO-1, okludin ve klaudin-11'in protein seviyelerinde bir düşüş gözlemlendiği tespit edilmiştir (Lui ve ark. 2001, 2003).

Immunoblotting teknikler kullanılarak, TGF- β 3 kaynaklı TJ bozulması, fosfo-p38 MAPK proteini seviyesinde artışa neden olmazken, fosfo-JNK ve fosfo-ERK seviyesini indükler (Lui ve ark. 2003). Bu durum da TGF- β 3'ün p-38 MAP kinaz yolu üzerinden TJ bariyeri üzerindeki inhibitör etkilerine aracılık ettiğini ileri sürmektedir. TGF- β 3, TJ fonksiyonunun bozulmasının yanı sıra BTB'yi geçemeyen germ hücrelerinin apoptoza uğramasına ve spermatogenezin bozulmasına yol açar. Germ hücre apoptozunu düzenleyerek seminifer epitelindeki spermatogonya gibi primordial germ hücre sayısını belirler.

Son gözlemler ayrıca, TGF- β 3'ün, transkripsiyon sonrası ve translasyon sonrası modülasyon yoluyla birleşimsel yapışma molekülü-B ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığını ve kan-testis bariyeri ve apikal ektoplazmik farklılaşmaların bozulmasına yol açtığını göstermiştir (Zhang ve Lui 2014). Benzer şekilde, kan-testis bariyerinin bozulmasına neden olan lipopolisakkarit uygulaması, sıçanlarda sperm sayısında ve spermatozoa motilitesinde belirgin bir azalma ile ilişkilendirilmiştir (Abd-Allah ve ark. 2009).

Yapılan bu çalışmalar sonuç olarak TGF- β 3'ün, seminifer epitelinde önemli bir sitokin olduğunu açıkça göstermekte ve kan testis bariyerinin açılma-kapanma olaylarının düzenlenmesinde rol oynayabilmektedir. Bu da BTB'deki spermatositlerin hareketini düzenler. BTB boyunca bu hücre hareketi olayının spermatogenezin tamamlanması için gereklidir (Kretser ve Kerr 1994; Cheng ve Mruk 2002). TGF- β 'ların testiste TJ dinamiklerini düzenlediği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar, aynı zamanda, TJ dinamiğinin düzenlenmesinde Sertoli hücrelerindeki hücre içi fosfoprotein içeriğini belirleyen fosfataz ve kinazların rolünü de içerdiğini belirtmektedir (Li ve ark. 2000; Cheng ve Mruk 2002).

Testislerde bulunan hücrelerin ürettiği ve gerçekleştirdikleri olaylar ile hücreler arası bağlantıyı sağlayan görevli proteinler (GDNF, Okludin, TGF- β 3) bulunmaktadır. Bunun yanı sıra non-coding olarak görev yapan mikroRNA ekspresyonu gelişim aşamasına bağlı olarak değişim göstermektedir. mikroRNA ekspresyonu testisteki hücre tiplerine bağlı olarak değişiklik gösterir. mikroRNA'ların spermatogenez bozukluğunda up-regüle olarak düzenlendiği gözlenmiştir.

4.5. MİKRORNA

Gen ekspresyonu düzenlenmesi, proliferasyon, diferansiyasyon, hücre döngüsü düzenlemeleri, apoptoz, tümör oluşumu, hormonların sekresyonu ve metabolizma faaliyetlerinde temel görev alan, protein kodlamasında görev almayan ~ 22 nükleotitten oluşan küçük RNA molekülleri olarak bilinirler (Bassett ve ark. 2014).

Transkripsiyon mekanizmasıyla farklı olaylar üzerinde de modüle edici etkisi vardır. Hedef mRNA'nın 3' ucuna (3'UTR) bağlanarak translasyonu inhibe ederken mRNA bozunumunda da indükleyici gen ekspresyonunda post-transkripsiyon düzenleyicileri olarak görev alırlar (Wang ve ark. 2016).

MikroRNA'lar ilk olarak 1990'lı yıllarda *Caenorhabditis elegans* (yuvarlak solucan türü) 'da keşfedilmiştir (Lee ve ark. 1993). Ancak biyolojik işlevlerinin incelenerek anlaşılabilmesi solucanlarda, sineklerde ve memelilerde bir dizi endojen mikroRNA bulunana kadar gerçekleşmemiştir. Yapılan çalışmalarda, mikroRNA'ların kök hücre farklılaşması, (Tay ve ark. 2008) sinyal iletimi, (Ma'ayan ve ark. 2005) gelişimsel düzenleme (Boehm M ve ark. 2005) ve hastalıklarda (Hebert ve ark. 2008; Volinia S 2006) dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde önemli düzenleyici rollere sahip oldukları tespit edilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda mikroRNA'ların farklı hedef genleri düzenleyebildiği, 2.000'den fazla mikroRNA'nın insanda görev aldığı miRBase v19.0'da kayıtlı olduğu tespit edilmiştir. mikroRNA'ların işlevleri ve hedeflediği genler bazı hücre ve dokularda net olarak bilinmemekle birlikte gelişim aşamalarına özgü spesifik mikroRNA'ların da olduğu bilinmektedir (Kuwabara ve ark. 2011). MikroRNA'lar, translasyonu inhibe etmek ve bozulmayı indüklemek için mesajcı RNA (mRNA) ile eşleştirilerek gen ifadesini düzenler. mikroRNA'lar ilk önce pre-mikroRNA'lar elde etmek için ve daha sonra olgun mikroRNA'lar haline gelmek için oluşturulan pri-mikroRNA'lar olarak kopyalanır (Ha ve ark. 2014).

MikroRNA biyosentezi ve DICER1 mutasyonları mikroRNA'ların, proliferasyonun, olgunlaşmanın, kan-testis bariyerinin ve seminifer epitel döngüsünün aşamalarının kontrolü de dahil olmak üzere Sertoli hücrelerin'de birçok önemli fonksiyon geliştirdiği gösterilmiştir (Panneerdoss ve ark. 2012; O'Shaughnessy 2014; Dabaja ve ark. 2015; Yao ve ark. 2016).

MikroRNA'lar, RNA Polimeraz II ve III, Drosha ve Dicer tarafından üretilen, 19-23 nükleotit uzunluğunda, küçük kodlayıcı olmayan bir RNA türüdür. Spesifik hedef hücrelerde, mikroRNA'lar, hedef genlerin ekspresyonunu baskılayan ve bu nedenle metabolik hücre fonksiyonunu kontrol eden çeşitli mRNA moleküllerine bağlanır. Dahası, mikroRNA'ların ifadeleri, doku ve gelişim aşamalarına özgüdür. Memeli spermatogenezinde mikroRNA'lar, germ hücrelerinin gelişimi ve doğurganlığının kontrolünde çok önemlidir. Bu bağlamda, farklı DICER1 koşullu nakavt fareleri modelleri, germ hücre gelişiminin spesifik aşamalarında, transkripsiyonel adımları düzenleyen mikroRNA'ların önemini ortaya çıkarmıştır. DICER1, prospermatogonya veya spermatogonyada engellendiğinde, spermatogenezin üç fazı boyunca ciddi başarısızlıklar gözlenmiştir (Bartel 2004; Ha ve Kim 2014).

Ayrıca, farelerde Dicer1'in Sertoli hücreleri'nden koşullu silinmesi, spermatogenezin parçalanması, seminifer epitelinin çok tabakalı yapısının kaybı, apoptozun yüksek insidansı ve seminifer tübül sayısının azalması da gözlenmiştir. Ayrıca, Dicer'in Sertoli hücreleri'nden ablasyonu, GDNF, KIT tirozin kinaz reseptörü için ligand (KITL), Mannosidaz alfa sınıfı 2A üyesi 2 (MAN2A2) ve (Wilms tümör 1 proteini) WT1 gibi spermatogenezde önemli rolleri olan genlerin down-regülasyonu ile sonuçlanmıştır (Papaioannou ve ark. 2009). Bunun yanı sıra, Sertoli hücre-Dicer geninden yoksun olan testislerde ayrıca SOD-1 proteininin aşırı sentezlenmesi (Cu / An-süperoksit dismutaz) ve sonuç olarak oksidatif hasarların artması, yoğun apoptoz ve testiküler dejenerasyona neden oldu. Bazı kanıtlar ise testiküler SC tümörlerinin DICER'de hotspot mutasyonlarına sahip olmadığını göstermektedir (Papaioannou ve ark.2011).

İnfertilite fenotipleri ile ilişkili spermatogenez olayında mikroRNA, döngünün farklı aşamalarındaki ekspresyonu, mikroRNA'ların supresyonu yoluyla koordine edilen bir dizi benzersiz gen tarafından düzenlenir.

Çoğunlukla farelerde ve domuz gibi diğer hayvan modellerinde yapılan birkaç çalışma, mikroRNA'ların spermatogenezin gelişiminde, düzenlenmesinde görev aldığını ve bunların ifadelerinin değiştirilmesinin üreme anormalliklerine neden olacağını açıkça göstermektedir. (Papaioannou ve Nef 2010; Ro ve ark. 2007; Yan ve ark. 2009; Luo ve ark. 2010; Korhonen ve ark. 2011; Smorag ve ark. 2012; Kotaja 2014; Mukherjee ve ark. 2014). Kanda çeşitli mikroRNA'lar bulunur. Bu durum mikroRNA'ların organlardan veya dokulardan yapısal olarak salındıklarını gösterir. Organ veya dokular ilaçlar tarafından zarar gördükten sonra, organa özgü mikroRNA'lar hepatotoksisite durumunda olduğu gibi plazmada artabilir (Lewis ve ark. 2011). Bununla birlikte, bu çalışmanın sonuçları, küçük miktarlarda sızan mikroRNA'lar nedeniyle hasar görmüş testislerden mikroRNA'ların sızıntısının meydana gelmediğini veya dolaşım seviyeleri üzerinde çok az etkisi olduğunu göstermiştir, bir molekülün germinal epitelden kana sızıp sızmadığını belirlemede kan-testis bariyer bütünlüğünün önemli bir faktör olduğunu öne sürdü (Elkin ve ark. 2010). Bir mikroRNA'nın moleküler ağırlığı, 15 kDa'dan (yaklaşık 5 ila 8 kDa) daha azdır. Bununla birlikte dolaşımdaki mikroRNA'lar bir eksozom içinde paketlenir veya proteinlere bağlanır (Zhang ve ark. 2015). Bu nedenle, kan testis bariyeri, bu Testis Hipertermisi (TH) modelinde mikroRNA'ların dolaşıma sızmasını engelleyecektir. TH tedavisinin kan testis bariyerinin bütünlüğünü bozmadığı bildirilmiştir (Turner ve ark. 1996). Alternatif olarak, mikroRNA'ların testislerden sızması, karaciğer, kalp veya gastrointestinal sistem gibi diğer büyük organlara kıyasla boyutları küçük olduğu için dolaşımdaki seviyeler üzerinde çok az etkiye sahip olabilir.

Gen ekspresyonunu transkripsiyonel olarak düzenlemekle görevli protein kodlamayan mikroRNA'ların dengeli bir biçimde plazma ve serumda tespit edilebilmekte (Tsatsanis ve ark. 2015) olup, profil incelemesi yapılarak moleküler teşhis için biyobelirteç olarak görev yapabilme imkanı sunar. Serum, idrar, tükürük ve foliküler sıvı gibi biyolojik sıvılarda (Roth ve ark. 2014) tanımlandığından beri özellikle kanser, üreme sistemi ve infertiliteye neden olan hastalıkların non invaziv yöntemle araştırılmasında ve belirlenmesinde rahatlıkla kullanılabilir. Bu durumda dokuya ya da hücreye özgü mikroRNA'nın incelenmesi ile hasta bireylerin daha kısa zamanda tespiti için kolaylık sağlar (Hanrieder ve ark. 2007).

Diğer kanıtlar ise mir-34 ailesinin spermatogenez ve sperm motilitesinde de önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir (Bouhallier ve ark. 2010; Wu ve ark. 2014).

MikroRNA'lar mir-34 ailesi, başlıca insan onkogen MYC'sini ve BCL-2, E2F ailesi, CDK4, Yin Yang 1 (YY1) ve MET2 gibi onkogeneizde yer alan diğer önemli genleri hedef alan tümör baskılayıcılardan oluşur (Kong ve ark. 2008; Wang ve ark. 2014).

MiR-34 ailesi genellikle tümörlerde down-regüle olur. Bunun tersine, mir-34 seviyelerinin artması, kanser hücresi çoğalmasının baskılanması ve apoptozun indüklenmesiyle sonuçlanır.

MikroRNA'lar genellikle gen ekspresyonunu, transkripsiyonel baskı ve hedef mRNA'nın bozulması ile düzenler. MiR-34a'nın mitokondriyal oksidatif fosforilasyonda rol oynayabileceği ve ATP içeriğini düzenleyebileceği görülmüştür. Dolaşımdaki endotel hücrelerinde, mir-34a'nın aşırı ifadesi, sitokromu hedefleyerek mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu ve ATP üretimini azaltabilir. MiR-34 ailesinin spermatogenez olayındaki rolü in vivo olarak netlik kazanmamıştır. MiR-34a ile yapılan bir çalışmada, mir-34 ailesinin, CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak üretilen mir-34a homozigot nakavt zebra balığı kullanılarak, spermatogenezdeki fonksiyonel rolleri araştırıldı (Guo ve ark. 2017).

miR34a, zebrafish'te gsk3a'yı hedefleyerek sperm motilitesini düzenleyebileceği düşünülerek yapılan bir çalışmada gsk3a -/- farelerinde ATP seviyeleri düşük olduğu için sperm motilite parametreleri arasında bir ilişki olduğu önerilmiştir (Wenjie ve ark. 2017).

mir-34c, SSC'lerin bulunduğu kısımda az miktarda eksprese edilirken spermatosit ve yuvarlak spermatidlerde yüksek oranda eksprese edilir (Bouhallier ve ark. 2010). Primer spermatositlerde mir-34c'nin inhibisyonu, germ hücrelerini testosteron eksikliğine bağlı olarak apoptozdan korur (Liang ve ark. 2012).

Astenozoospermik veya oligoastenozoospermik hastalardan alınan testiste yapılan incelemeler sonucunda mir-34c-5p'nin ekspresyon seviyesi normozoospermik erkeklerdekinden farklıydı (Wang ve ark. 2011). Bu çalışmada, mir-34c-5p'nin down-regülasyonu, Karbon İyon Radyasyonu (CIR) maruziyetinden sonra spermatogenik hücrelerin proliferasyonunu ve indüklenen apoptozu önlemiştir. MiR-34b ve c'nin kodlama DNA dizileri birbirine bitişik olduğu için aynı birincil transkriptinden işlendiği düşünülmektedir (He ve ark. 2007).

MikroRNA-34b/c ifadesi üzerinde etki eden transkripsiyon faktörlerini araştırırken, mir-34b'ye bağlanan proteinleri tanımlamak için, yaklaşık 400 DNA-bağlayıcı proteinin UCSC Genom Tarayıcı (genome.ucsc.edu) ChIP-sq verileri kullanılarak, yapılan çalışmada saptanan proteinler CTCF, Myb, Sp1, FOXO3a, E2F, AP1 ve p53'tür (Li ve ark. 2018).

Yüksek mir-34c ekspresyonunun anti-tümör etkileri ile ilişkili olduğu düşünülerek yapılan çalışmalarda, Akt yolunun kanserlerde sıklıkla aktive edildiği ama tümör supresanın mir-34 ailesinin ekspresyonu üzerindeki etkisi bildirilmemiştir. Akt yolunun tümör baskılayıcı mir-34'ün ekspresyonunda rol oynayabileceği düşünülerek yapılan çalışmada WT-Akt eksprese eden hücrelerde SAE2 artmış mir-34c seviyelerinin düştüğü gözlenmiştir (Roy ve ark. 2012; Di Martino ve ark. 2012), kontrol grubu hücreleri ve mutant Akt-K276R / E278A eksprese eden hücrelerde gözlenmemiştir. Bu veriler Akt SUMOylation'ın mir-34b/c ifadesinde yer aldığını göstermektedir.

MikroRNA-34 ailesi, hücre siklusu, diferansiyasyon ve apoptoz yollarında çalışan c-Myc ve diğer proteinlerin ekspresyonunu baskılamaktadır. Bununla uyumlu olarak, mir-34 çok çeşitli tümör tiplerinde down-regüle olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada, SAE2 veya Ubc9 ekspresyonunun artmış olan mir-34b/c ifadesini baskıladığını ve SAE2 veya Ubc9'un demonte edilmesinin ise mir-34b/c ifadesini arttırdığı saptanmıştır. Bu durum, Akt aracılı FOXO3a fosforilasyonu ve SUMOylation etkisinin mir-34b/c ifadesine özgü olduğunu düşündürmektedir (Li ve ark. 2018).

MikroRNA'lar doğurganlık olayında önemli olarak bilinmektedir. mir-34b/c ve miR-449 moleküllerinin çift inaktivasyonu, sperm üretimi ve motilitesinde azalmaya bağlı olarak erkek infertilitesi ile sonuçlanmaktadır. MikroRNA biyogeneze katılan enzimlerin koşullu delesyonları (Dicer1 veya Dgcr8) primordiyal üreme hücresi gelişimini engelleyebilir ve spermatogenez ve sperm olgunlaşmasında da etkili olabilir (Hayashi K ve ark. 2008; Maatouk ve ark. 2008; Björkgren ve ark. 2014).

MikroRNA'ların spermatogenezdeki çeşitli hücresel süreçlerdeki transkripsiyonel kontrolünde iyi bilinen öneminden dolayı, deregüle edilen mikroRNA'ların erkek infertilitesinde biyobelirteçler olarak kullanılabileceği önerilmektedir. Buna bağlı olarak karışık atrofi (MA) ve spermatosit aşamasında (GA) germ hücre aresti gibi durumlarla teşhis edilen infertil erkeklerde mikroRNA'ların ekspresyon profilleri karşılaştırıldı. Normal spermatogenez grubuna kıyasla, en yüksek ifade edilen mikroRNA'lar arasında hsa-mir-34b, hsa-mir-34c-5p gibi mikroRNA'lar da tespit edildi. Subfertil astenozoospermik, oligozoospermik ve oligoastenozoospermik erkeklerden alınan seminal plazma ve sperm örneklerinde ise mikroRNA'ların çoğunda down-regüle olduğu bildirilmiştir (Tang ve ark. 2016; Noveski ve ark. 2016).

Farelerde testis, mir-34 kümelenmesinin Sertoli ve germ hücrelerinde eksprese olduğu bildirilmiştir. mir-34c'de oluşan fonksiyon kaybı, BCL-2/BAX'da anlamlı bir artışa neden olmuştur. B-hücre lenfoması 2 germ hücre apoptozunu in vivo olarak önlemekte ve mir-34c'nin ise fare testisinde pro-apoptotik bir faktör olarak rol oynayabileceğini göstermektedir (Liang ve ark. 2012).

Farklı olarak mir-449 ve mir-34, apoptozu indükleyen ve farede hücre döngüsü ilerlemesinde teşvik edici olarak görev yapan E2f (E2 faktörü), retinoblastoma yolağında bulunan hedef genleri düzenlemektedir. Farklı testislere ait histopatolojik koşulları gösteren infertil erkeklerde, bu mikroRNA'ların spesifik hedefleri henüz net olarak bilinmese de yapılan analizler, hedef genlerin çoğu apoptoz, hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonda görev aldığını göstermektedir. Bu hedef genler, nonobstrüktif azospermi erkeklerde testiküler dokuda yüksek oranda eksprese edilmektedir (Bao ve ark. 2012).

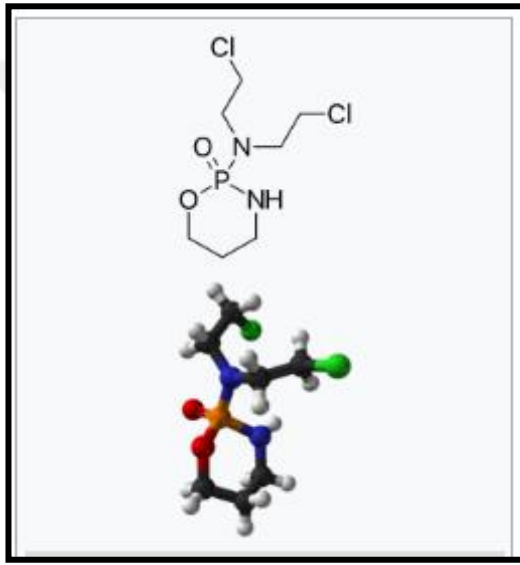
Yapılan çalışmalar, mikroRNA'ların analizi, SCOS testisindeki birkaç deregüle edilmiş gen ile TRAIL (tümör nekroz faktör ilişkili apoptoz indükleyen ligand) yolak sinyali ile ilişkisi olduğunu göstermektedir (Grataroli ve ark. 2004; Falschlehner ve ark. 2007). TRAIL proteini insanda ve kemirgenlerin testislerinde eksprese edilen ve germ hücresi homeostazında, spermatogenezi korumak için görevli olan sinyal molekülüdür. Testiküler disfonksiyonu olanlarda TRAIL yolağının aktivasyonunu göstererek reseptörlerini kodlayan TNFSF10 (tümör nekrozis faktör) geninin ekspresyonu, SCOS hastalarında belirgin şekilde up-regüle olmuştur (Grataroli ve ark. 2002, 2004; Celik ve ark. 2013). mikroRNA'lar, hücre döngüsü proteinlerinin gen regülasyonunda görev alan transkripsiyon faktörlerinin modüle edilmesinde görev alan Sertoli hücre proliferasyonunda da düzenlenme olayında önemli olduğunu göstermiştir. mikroRNA'lar Sertoli hücrelerin'de tanımlanmış olsa bile farklı genleri hedeflemesine rağmen, görevleri benzer olan başka hücre tiplerinde de tanımlanmışlardır.

MikroRNA-34b, mir-34c-5p ve miR-449a germ hücre farklılaşması ve sağkalımında görev alan, spermatogenez için önemli mikroRNA'lardır (Wu ve ark. 2014).

Farelerde Sertoli hücrelerinde üretilen mikroRNA'ların üretiminde bir mikroRNA Dicer koşullu nakavt (KO), infertilite ile sonuçlanmış bu durum da mikroRNA'ların spermatogenez için önemli olduğunu göstermektedir (Papaioannou ve ark. 2009) Farelerde mir-34b/c ve miR-449'un çift KO'sı spermatogenezde bozulma ile sonuçlandı (Wu ve ark. 2014). Bu özellikler ve sonuçlar çalışmalar için mikroRNA'ların testiküler toksisite için biyobelirteçler olarak kullanılmasının temelini oluşturmuş, toksisite mekanizmaları ve insanlarda potansiyel translasyonel biyobelirteçleri araştırmak adına rol oynamıştır.

Bu mikroRNA'lar arasında, mir-34c ve miR-449a'nın farelerde spermatogenezde önemli görevi olduğu bildirilmiştir (Wu ve ark. 2014). mir-34/449 ailesinin, spermatogenez sırasında mayotik hücrelerde testiste eksprese olduğu bildirilmektedir (Smorag ve ark. 2012). Ayrıca miR-449 null erkek farelerde mir-34b/c'nin up-regülasyonu ile normal spermatogenez olayını gösterdiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalar, mir-34c için apoptoz ve hücre proliferasyon süreçlerine dahil olduğu ileri sürülmüştür (Lize ve ark. 2011; Liang ve ark. 2012).

4.6. SİKLOFOSFAMİD



Şekil 8. Siklofosfamid moleküler yapısı ((Jones ve ark.1996)

FORMÜLÜ: $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$

Siklofosfamid (CP) kemoterapötik olarak kullanılan ve bağışıklık sistemini baskılamada görevli bir ilaçtır. Lenfoma, multipl miyelom, lösemi, yumurtalık kanseri, meme kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri, nöroblastom ve sarkoma gibi hastalıklarda tedavi etme amacıyla kullanılır. İmmün supresör olarak, nefrotik sendromda, polianjiti olan granülomatozis ve diğer durumlarda organ nakli sonrasında da kullanılır. Oral veya damar yoluyla enjeksiyon ile alınır (Pagnoux 2016).

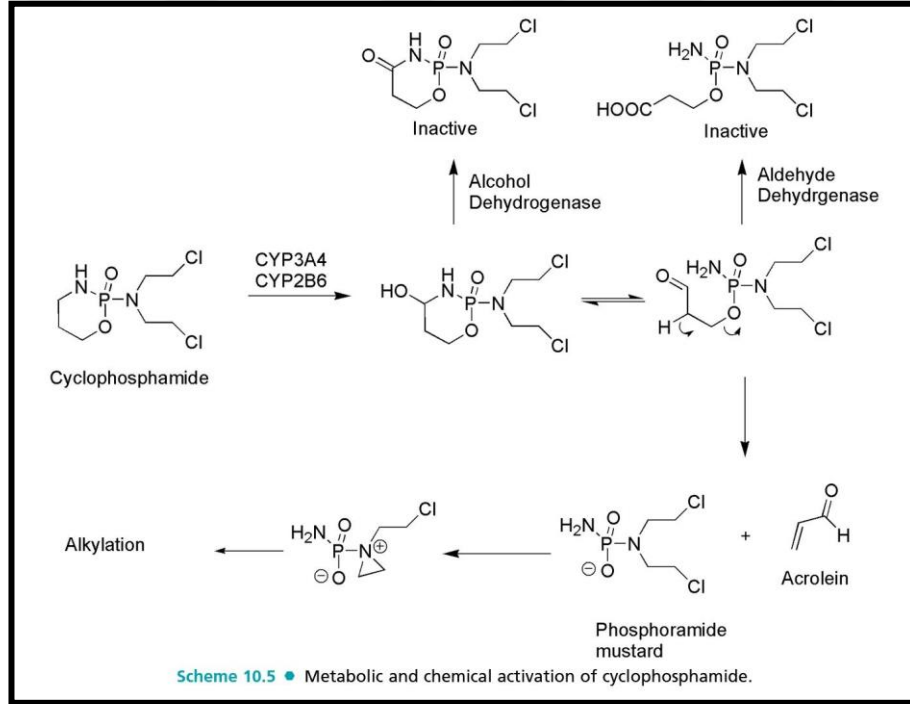
Kanser kontrolsüz hücre bölünmesi olarak bilinir. Normal hücrelerde benzer olan hücrelerin birbirine teması ile bölünme inhibe edilerek durdurulur. Kanserde hücreler bu yeteneğini kaybeder ve hücre bölünmesi kontrol mekanizmasında sorun yaşanır. Kemoterapi tedavisinin kanser hücrelerinde etkili olma mekanizması kanser hücrelerinin bölünme yeteneğini durdurarak gerçekleşir. Siklofosfamid alkilleyici ajan olarak görev yapar ve hücrenin dinlenme aşaması en aktif olduğu dönemde DNA replikasyonu ve RNA oluşumunu interfere ederek hücrenin apoptoza gitmesine de neden olabilirler.

Kemoterapi hızlı bölünen tüm hücreleri öldürür. Buna bağlı olarak kullanım sırasında yan etkileri arasında düşük akyuvar sayısı, iştah kaybı, kusma, saç dökülmesi ve mesane kanamaları, olası kanser riski, infertilite, alerjik reaksiyonlar ve pulmoner fibrozis bulunur. Siklofosfamid kadınlarda erken menopoza riskini, erkeklerde ve kadınlarda infertilite riskini önemli oranda artırır. Kadınlarda leuporelin kullanımı, erken menopoza ve infertilite risklerini azaltabilir (Periti ve ark. 2002).

Siklofosfamid, adaptif immünoterapide yararlı immünomodülatör etkilere neden olur. Bu mekanizmada; Genç T düzenleyici hücrelerin (CD4 + CD25 + T hücrelerinin) yok edilmesi, Tip I IFN'ler gibi T hücresi büyüme faktörlerinin uyarılması, immünolojik bir niş alanının oluşturulmasıyla, uyarıcı olarak transfer edilen tümör reaktif efektör T hücrelerinin güçlendirilerek aşılması gerçekleşir. Bu nedenle, alıcı konakçıların (donör T hücreleri için) ön koşullandırılması, genç konaklarda bağışıklığın artırılması ve uyarıcı T hücresi immünoterapi rejimlerinin yanı sıra, aktif aşılama stratejileri ile objektif antitümör bağışıklığının uyarılması için kullanılmıştır (Sistigu ve ark. 2011). Yapılan çalışmalar siklofosfamidin, kromozomal sapmaları, kardeş kromatid değişimini ve insan hücrelerinde in vitro DNA hasarını indüklediğini belirtir. İn vitro çalışmalarda ise kemirgen hücrelerinde morfolojik transformasyon, kromozomal sapmalar, kardeş kromatid değişimi, mutasyon ve programlanmamış DNA sentezini indüklemiştir. Siklofosfamidin farelerde böbrek, karaciğer ve akciğer DNA'sına bağlandığı tespit edildi.

İn vivo çalışmalarda ise baskın ölümcül, kromozomal sapmalar, mikronükleus, kardeş kromatid değişimi, mutasyonlar ve DNA hasarını indüklemiştir. *Drosophila*'da, bu anaploid, kalıtsal translokasyonları, somatik ve cinsiyete bağlı resesif öldürücü mutasyonlar neden olmuştur. Siklofosfamid uygulanan hastalarda, artmış kromozomal anormallik insidansı ve periferik lenfositlerde ve kemik iliğinde kardeş kromatid değişimi gözlemlendi (IARC, 1987).

Siklofosfamidin ana etkisi metabolit fosforamid hardalıdır. Bu metabolit, sadece düşük ALDH (Aldehid Dehidrogenaz) seviyesine sahip hücrelerde oluşur. Fosforamid hardalı, DNA guanin N-7 pozisyonlarında DNA zincirleri arasında ve içinde DNA çapraz bağları oluşturur. Bu durum geri dönüşümsüzdür ve apoptozise neden olmaktadır (Hall ve Tilby 1992).



Şekil 9. Siklofosfamid kimyasal mekanizması (Beale ve Block 2011).

Apoptoz, kromatin yoğunlaşması, parçalanması ve hücre parçalanması ile karakterize aktif bir hücre ölüm sürecidir (Kerr ve ark. 1972).

Siklofosfamid hızlı bölünen hücrelerde etkili olduğu için erkeklerde testis ya da germ hücrelerine etki ederek kalıcı hasara neden olabilir. CP uygulanan farelerde; testiste morfolojik, histolojik farklılıklar gözlenmiştir. Seminifer tübüllerin epitelinde dökülmelerin olduğu, epitel kalınlığında azalma, tübül çapı ve büyüklüğünün azalması gözlenen morfolojik değişikliklerdendir.

Doza bağlı olarak Sertoli hücrelerinin zarar görmesi, sperm motilitesi ya da spermlerin yapısal özelliklerinde de farklılıklar oluşabilir. Spermatogenik seride hücre maturasyonu sırasında arest durumunun gözlenmesi ise germ hücre sayısının azalmasına neden olarak hücrelerin apoptoza gittiği gözlenmiştir.

İmmunohistokimyasal incelemelerde ise GDNF, okludin ve TGF- β 3 antikorları ile oluşturulan tepkiler incelendiğinde; CP'nin oluşturduğu hasara bağlı olarak; GDNF ve Okludin eksprese edilmesinin azaldığı TGF- β 3'ün ise artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Bu moleküllerin kan testis bariyerinde bulunup hücreler arası bağlantı molekülleri olduğu bilinmesine bağlı olarak CP, testisleri fizyolojik olarak da etkilemektedir. Bariyer fonksiyonunun ve bütünlüğünün bozulması toksik maddeler etkisiyle testis hasarı ve infertiliteye neden olur. qPCR çalışmalarında; doku örnekleri ile yapılan çalışmalarda mikroRNA ifadelerinin değişiklik gösterdiği mir 34-b ve mir34-c'nin sağlıklı dokulara göre ekspresyonunda anlamlı azalmalar olduğu gözlenmiştir.

Kemoterapötik ilaçlara ve radyasyona karşı hassasiyeti yüksek olan hücreler farklılaşan spermatogonya hücreleridir. Bu hücrelerin ölümü spermatogenik seride hücrelerin sayısında ve olgunlaşmasında azalmaya bağlı olarak azospermi ve infertiliteye neden olabilir.

4.7. TESTİS HASTALIKLARI

4.7.1. Azospermia

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ve radyoterapi, erkek hastalarda uzun süreli veya kalıcı gonadal toksisiteye neden olabilir. Bu durumda germinal epitel hasarı, Leydig hücrelerinde fonksiyon bozuklukları, kan testis bariyerinin zedelenmesi, maturasyonda arest durumu ve sperm fonksiyonunun özelliklerinde olumsuz etkilenme gözlenebilir.

Spermelerde motilite kaybı, morfolojik anormallikler, baş ve kuyruğun yapısı, sayı değişimi gözlenebilir (Meistrich ve ark. 1992; Gandini ve ark. 2006). Düşük dozda alınan kemoterapik ajanların bile farklılaşan spermleri öldürmesi nedeniyle, tedaviden sonra da sperm sayısında azalma gözlenebilir.

Sperm üretiminin geri kazanılması, spermatogonyal kök hücrelerin hayatta kalmasına ve farklılaşma yeteneklerine bağlıdır. İndüklenen azosperminin süresi ve kalıcılığı sitotoksik ajanın ve dozun yapısıyla ilişkilidir (Meistrich ve ark. 2005). Testis hasarının tespiti için mikroRNA'ların ekspresyon analizi, teşhis ve prognostik amaçlar için kullanılmaktadır.

Semen örneklerinin toplanmasının basit ve tekrarlanabilir olması nedeniyle, seminal plazmada kolaylıkla test edilebilen biyobelirteçlerin tanımlanması, spermatojenik yetmezliğin tanısında önemli bir rol oynar. mikroRNA'lar, erken dönem erkek germ hücre proliferasyonu ve fonksiyonel sperm oluşturmak için gereklidir (Hayashi ve ark. 2008; Maatouk ve ark. 2008). MikroRNA'ların ekspresyon seviyeleri, primordial germ hücrelerinde ve germ hattı kök hücrelerinde somatik hücrelerdeki seviyelerle karşılaştırıldığında yüksektir (Buchold ve ark. 2010) ve birkaç mikroRNA'nın ekspresyonu gelişim aşamasına bağlı gibi görünmektedir.

Yüksek konsantrasyonlarda mikroRNA, sperm RNA'sından daha kolay izole edilir ve özellikle azospermi hastalarında, kalıtsal germline mutasyonlarını taramak için iyi bir yöntem olabilir. mikroRNA ayrıca spermatojenik yetmezlikte bir biyobelirteç olarak da testiküler biyopsi ile ilişkili olası dezavantajların üstesinden gelebilir (Meistrich ve ark. 2009).



5. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma için Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarlarından alınan 18 adet genç erişkin Balb/c erkek fareler, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi hayvan deneyleri yerel etik kurulu kararıyla kullanıldı. Fareler 3 gün boyunca adaptasyon için herhangi bir sağlık problemi belirtisine karşı bekletildi. Çalışma boyunca hayvanlar stabil koşullar olan 22 °C sıcaklık, %30-70 nem, aydınlık/karanlık döngüsü 12/12 saat tutuldu. Kuru pelletler ve çeşme suyu ile serbest beslenmeleri sağlandı.

5.1. HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME

Sağlıklı fareler rastgele 3 gruba ayrılarak (n:18) deney grubuna 5 gün boyunca günde bir kez 100 mg/kg CP intraperitoneal olarak enjekte edildi. Sham grubu farelerine ise aynı dozda günde bir kez serum fizyolojik enjekte edildi. Kontrol grubuna ait farelere ise hiçbir işlem uygulanmayarak normal koşullarda yaşaması sağlandı. Tüm gruplara ait fareler, son enjeksiyondan 24 saat sonra genel anestezi altında 10 mg/kg ksilazin ve 75 mg/kg Ketamin ile ötenazileri yapıldıktan sonra testis ve kan örnekleri alındı.

5.1.1. Doku Örneklerinin Alınması ve Parafin Doku Takibi

Histokimyasal ve immünohistokimyasal yollarla yapılacak değerlendirmeler için alınan testis dokuları bütün halde Bouin solüsyonuna alınarak 48 saat fikse edildi. Fiksatif miktarı, dokuların 10 katı olacak şekilde ayarlanarak uygulaması yapıldı. Fiksasyon sonrasında, doku örnekleri %70 alkol ile sarı renk kayboluncaya kadar yıkandı ve daha sonra derecesi giderek artan etil alkol serileri ile dehidratasyon uygulaması yapıldı.

İki kez ksilen değişimi ile şeffaflaştırma işlemi yapıp, parafinle muamele edildikten sonra gömüldü (**Tablo 1**).

Tablo 1. Testis Takip Protokolü

A.TESPİT

BOUİN SOLÜSYONU 48 SAAT

%70 ALKOL ile sarı renk kayboluncaya kadar yıkama

B. DEHİDRATASYON

1 GECE

%70 ALKOL

%70 ALKOL 1 SAAT

%70 ALKOL 1 SAAT

%70 ALKOL 1 SAAT

%80 ALKOL 1 SAAT

%100 ABSOLÜ ALKOL 1 SAAT

%100 ABSOLÜ ALKOL 1 SAAT

ALKOL- KSİLEN(1:1) 2 SAAT

C.ŞEFFAFLAŞTIRMA

KSİLEN 1 GECE

KSİLEN 1 SAAT

D.İNFİLTRASYON

KSİLEN - PARAFİN(1:1) 1SAAT

PARAFİN 3 SAAT

PARAFİN 1 GECE

E.GÖMME PARAFİN

5.1.2. Histokimyasal Boyama

Elde edilen parafin bloklardan Rotary mikrotom (RM 2135, Leica) aracılığı ile 5µm kalınlığında alınan kesitler polilizin ile kaplı lamlara aktarılarak Hematoksilen-Eosin boyaması ile boyandı Kesitler 1 gece 60°C'lik etüvde bırakılarak deparafinizasyon işlemi yapıldı. Daha sonra kimyasal deparafinizasyon 30'ar dakika iki değişim ksilene tabi tutularak uygulandı.

Ardından rehidratasyon işlemi için derecesi %95'den %60'a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akar su altında yıkandı. Kesitlerin 5 dakika Hematoksilen solüsyonu ile boyanmasının ardından, fazla boyanın dokudan uzaklaştırılması için 5 dakika akar suda yıkandı.

Kesitler diferansiyasyon işlemi için asit-alkol solüsyonunda 1-2 saniye tutuldu. Daha sonra 2 dakika Eozin solüsyonu ile boyandı.

Aynı şekilde 5 dakika akar su altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilende tutuldu. Entellan kullanılarak lamelle kapatıldı (Tablo 2).

Tablo 2. Histokimyasal Boyama Protokolü

İŞLEM	KULLANILAN MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	56 °C Etüvde	1 Gece
	Ksilen	1 Saat
Rehidratasyon	%96'lık Etil Alkol	2 Dakika
	%80'lik Etil Alkol	2 Dakika
	%70'lik Etil Alkol	2 Dakika
	%60'lık Etil Alkol	2 Dakika
Yıkama	Akar su	5 Dakika
Boyama	Hematoksilen	3 Dakika
Yıkama	Akar su	5 Dakika
Diferansiyasyon	Asit-alkol	1 saniye
Yıkama	Akar su	5 Dakika
Boyama	Eozin	2 Dakika
Yıkama	Akar su	5 Dakika
Dehidratasyon	%80'lik Etil Alkol	1 Dakika
	%96'lık Etil Alkol	1 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	1 Saat
Kapama	Entellan	

Işık mikroskobunda (Olympus X-40) incelenerek gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildi, fotoğraf çekimi yapıldı.

H&E boyaması sonrasında elde edilen kesitler modifiye Johnsen testis biyopsisi skorlama yöntemine göre değerlendirildi ve skorlandı.(**Tablo 3**)

5.1.3. Johnsen Skoru

Kontrol, sham ve siklofosfamid uygulaması yapılan hayvan gruplarından (3 grup, n:6 her biri) elde edilen testis kesitlerinde Hematoksilen&Eosin ile boyalı preparatlar üzerinde her birinden rastgele seçilen 10 alan üzerinden 100 hücre üzerinde değerlendirme yaparak skorlama yöntemi ile değerlendirme **Johnsen Skorlaması**'na göre yapıldı.

Tablo 3. Johnsen Skoru

Skor 10	Tübüllerde tam spermatogenezis ile birlikte çok sayıda spermatozoon vardır. Tübül epiteli düzenli bir kalınlıkta organize olmuştur ve tübül lümeni açıktır.
Skor 9	Bir çok spermatozoon vardır ancak, tübüler epitel iyi organize olmamıştır ve lümende tıkanıklık vardır.
Skor 8	Kesitlerde az sayıda spermatozoon (< 5-10) vardır.
Skor 7	Kesitlerde hiç spermatozoon yoktur ama çok sayıda spermatid gözlenir.
Skor 6	Kesitlerde hiç spermatozoon yoktur ve az sayıda (< 5-10) spermatid gözlenir.
Skor 5	Kesitlerde hiç spermatozoon ve spermatid yoktur ancak çok sayıda spermatosit vardır.
Skor 4	Kesitlerde hiç spermatozoon ve spermatid yoktur ve az sayıda spermatosit vardır
Skor 3	Görülebilir tek germ hücresi spermatogoniumlardır.
Skor 2	Tübüllerde hiç germ hücresi yoktur, yalnızca Sertoli hücreleri görülebilir.
Skor 1	Tübüllerde hiç hücre görülmez

(Ning Qu ve ark. 2019)

Bu değerlendirmede; Seminifer tübül yapısı, tübüllerin apısı, lümenin değerlendirilmesi (lümendeki hücre çeşidi ve sayıları) , germinal epitelin yüksekliği, spermatogenik hücrelerin oluşum düzeni, hücre eşitleri ve sayılarına göre yapılan bu değerlendirmede her bir kesitte 10 tübül değerlendirilerek yapılan işlemde 1’den 10’a kadar sayısal değer verilerek skorlanmıştır. Işık mikroskopunda (Olympus X-40) incelenerek gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildi, fotoğraf çekimi yapıldı (**Resim 1-2-3**).

5.1.4. İndirekt İmmünohistokimya Boyaması

Alınan kesitlere immunohistokimyasal boyama uygulaması Avidin-Biyotin Peroksidaz Yöntemi uygulandı. Uygulama için bir gece 60 °C ’lik etüvde tutulduktan sonra, 30’ar dakika iki sefer değişim yapılarak ksilen ile deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildi ve %95’ten %60’a doğru azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon yapılarak distile suda 5 dakika bekletildi. Tripsin(TSS155, ScyTek-%0,5’lik) solüsyonu içinde 37 °C etüvde 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3’lk H₂O₂ (1.08597.2500, Merck) uygulandı. 3 defa 5’er dakika fosfat tampon solüsyonu (PBS- 00-3002, Invitrogen) ile yıkanan kesitler bloklama amacıyla 1 saat bloklama solüsyonu ile muamele edildi. Bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikrlar Okludin (bs-1495R, Bioussa) , GDNF (bs-1024R, Bioussa), TGFβ-3(bs-4538R, Bioussa) ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikru ile 30’ar dakika boyandı. Yine üç defa 5’er dakika tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB(ACK125, SkyTek) ile 5 dk boyandı. Mayers Hematoksilen HMM999, ScyTek) ile boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler entellan(107961.0500, Merck) ile kapatıldı (**Tablo 4**).

H-skor ölçümü, gruplardaki hayvanlardan alınan doku kesitlerinden elde edilen preparatlar üzerinde rastgele seçilen 10 alanda sayılan 100 hücre üzerinde değerlendirme yapıldı. Boyanmanın şiddetine göre olarak 0-boyanma yok, 1-az boyanma, 2- orta boyanma, 3-çok boyanma olarak skorlandı.Bu sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi ve **tablo10**'da gösterildi.



Tablo 4. İmmunohistokimya boyama protokolü

İŞLEM	KULLANILAN MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 Gece
	Ksilen	1 Saat
	Ksilen	1 Saat
Rehidratasyon	%96'lık Etil Alkol	2 Dakika
	%80'lik Etil Alkol	2 Dakika
	%70'lik Etil Alkol	2 Dakika
	%60'lık Etil Alkol	2 Dakika
Yıkama	Distile su	10 Dakika
	Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)	3x5 Dakika
Permeabilizasyon	%0,5'lik Tripsin Solüsyonu	37°C de 10 dakika
Yıkama	Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)	3x5 Dakika
Endojen İnhibasyonu	Peroksidaz %3'lük Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	5 Dakika
Yıkama	Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)	3x5 Dakika
İnkübasyon	Bloklama Solüsyonu	1 saat
Yıkama	Primer Antikor	18 saat +4°C'de
	Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)	3x5 Dakika
	Sekonder Antikor (Biotinle işaretlenmiş hidrojen peroksidaz)	30 Dakika
Yıkama	Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)	3x5 Dakika
	Streptavidin	30 Dakika
İmmünoreaktivite Artalan Boyama	Diaminobenzidine (DAB) Mayer's hematoksilen	5 Dakika
Dehidratasyon	%80'lik Etil Alkol	1 Dakika
	%96'lık Etil Alkol	1 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	1 Saat
Kapama	Entellan	

5.1.4. Tunel Analizi

Apoptotik hücre ölümünün belirlenmesinde Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL-Millipore LOT: 2869035) boyama yöntemi kullanıldı. Alınan 5 µm'lik seri kesitler, deparafinizasyon için 1 gece 60°C etüvde bekletildikten sonra iki kez ksilen ile muamele edildi. Rehidratasyon için, azalan etil alkol serilerinden (%96-80-70-60) geçirildi. Ardından distile su ile 10 dakika yıkandı.

Fosfat tampon solüsyonu (PBS- 00-3002, Invitrogen) ile üç defa 5'er dakika yıkandıktan sonra 1/500 oranında PBS ile dilüe edilen 20µg/ml Proteinaz-K 37°C'de 15 dakika uygulandı. PBS ile 5'er dakika üç kez yıkamayı takiben 5 dakika %3'lük hidrojen peroksit(1.08597.2500, Merck) uygulamasından sonra yeniden 5'er dakika 3 kez PBS ile oda ısısında yıkandı. Örnekler 5 dakika Equilibration buffer ile oda ısısında tutulduktan sonra TdT-enzimi ile nemli atmosferik ortamda 37°C'de 60 dakika plastik lameller kesitleri kapatacak şekilde bekletildi. Sürenin ardından Stop Wash Buffer ile 10 dakika bekletildikten sonra Antidioksinin Peroksidaz Konjugatı ile 30 dakika muamele edilen örnekler 5'er dakika üç kez PBS ile yıkandı. Ardından DAB (Diaminobenzidin ACK125, SkyTek) ile boyama yapılarak, birkaç kez distile su ile yıkandı. Artalan boyaması Mayer's Hematoksilen (HMM999, ScyTek) ile yapıldı (**Tablo 5**).

Gruplardaki hayvanların testis dokularından alınan kesitlerden oluşturulan preperatlar üzerinde rastgele seçilen 10 alanda 100 hücre üzerinde değerlendirme yaparak TUNEL pozitif hücreler saptandı ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

Tablo 5. Tunel Protokolü

İŞLEM	KULLANILAN MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 Gece
	Ksilen	1 Saat
	Ksilen	1 Saat
Rehidratasyon	%96'lık Etil Alkol	2 Dakika
	%80'lık Etil Alkol	2 Dakika
	%70'lik Etil Alkol	2 Dakika
	%60'lık Etil Alkol	2 Dakika
Yıkama	Distile su	10 Dakika
	Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)	3x5 Dakika
Permeabilizasyon	Proteinaz-K	37°C'de 15 dakika
Yıkama	Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)	3x5 Dakika
Endojen İnhibasyonu	Peroksidaz %3'lük Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	5 Dakika
Yıkama	Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)	3x5 Dakika
	Equilibration buffer	5 Dakika
İnkübasyon	TdT-enzimi	60 dakika 37°C'de
Yıkama	Stop Wash Buffer	10 Dakika
	Antidioksigenin Peroksidaz Konjugatı	30 Dakika
Yıkama	Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)	3x5 Dakika
	Streptavidin	30 Dakika
İmmünoreaktivite	Diaminobenzidine (DAB)	5 Dakika
Artalan Boyama	Mayer's hematoksilen	
Dehidratasyon	%80'lik Etil Alkol	1 Dakika

	%96'lık Etil Alkol	1 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	1 Saat
Kapama	Entellan	



5.2. PCR ÇALIŞMASI

3.2.1. Testis Doku Örneklerinin Toplanması

Çalışmada 18 adet erişkin Balb/c erkek fareler kullanıldı. Rastgele 3 gruba ayrılan (n=18) farelerden ilk grup kontrol grubu olarak belirlendi ve herhangi bir işlem uygulanmadı. Deney grubu farelerine 5 gün boyunca günde 1 kez olmak üzere 100 mg/kg CP intraperitoneal olarak enjekte edildi. Sham grubu farelerine ise aynı dozda günde bir kez serum fizyolojik enjekte edildi.

5.gün sonunda genel anestezi altında 10 mg/kg ksilazin ve 75 mg/kg Ketamin ile ötenazileri yapıldıktan sonra sakrifiye edildi. Hayvanlardan alınan sağ testisler doku incelemeleri için, sol testisler ise PCR çalışması için kullanıldı. Testis doku örnekleri 1,5 ml'lik eppendorf tüplerin içine alındı. Üzerine 1 ml. steril Ca ve Mg içermeyen PBS eklendi. 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi yapılarak yıkama işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem 2 defa tekrar edildi. Tüplerin üst kısmında oluşan süpernatant kısmı atıldıktan sonra doku örnekleri RNA izolasyonu yapılincaya kadar -80 °C'de saklandı.

5.2.2. Kan Örneklerinin Toplanması

Çalışmada kullanılacak hayvanları ksilazin ve ketamin ile ötenazileri yapıldıktan sonra 800 µl-1 ml arasında kan, 1ml'lik enjektör ile kalbe girilerek K2EDTA'lı tüp içine alındı. Tüpler önce 2000 rpm.de 5 dakika santrifüj işlemine tutuldu. Tüpün üst kısmındaki plazma mikropipet ile alınarak steril 1,5 ml'lik eppendorf tüplerin içine alındı. Bu tüpler 3000 x g.de 7 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı alındı. Süpernatant yeni bir eppendorf tüpe alındıktan sonra RNA izolasyonu yapılincaya kadar -80 °C'de saklandı.

5.2.3. Testis Doku Örneklerinin mikroRNA İzolasyonu

Bu çalışmada önceden elde ettiğimiz doku örnekleri -80°C 'den alarak buz üzerine yerleştirildi ve mikroRNA İzolasyonu Invitrogen mirVana mikroRNA izolasyon kiti (Kat no-AM1560) kullanılarak gerçekleştirildi.

a) HOMOJENİZASYON:

Buz üzerindeki 25-30 mg doku üzerine 500 μl Lysis/Binding solüsyonu eklendi ve doku steril bistüri ile mekanik olarak parçalandı.

b) ORGANİK EKSTRAKSİYON:

Hücre veya doku lizatına (veya homojenat) 1/10 hacimde mikroRNA Homojenat Additive solüsyonu eklenerek tüpün birkaç kez vortekslenmesi sonucunda karıştırma işlemi gerçekleştirildi (500 μl -50 μl olacak şekilde hazırlandı). Karışım buz üzerinde 10 dakika bekletildi. mikroRNA Homojenat Additive solüsyonu eklenmeden önce Lizat hacmine eşit miktarda kloroform eklendi ve tüp karıştırma işlemi için 30-60 saniye vortekslendi.

Oda ısısında 10000 x rpm'de 5dk santrifüj edilerek organik ve aköz (sıvı) fazın birbirinden ayrılması sağlandı. 1.5 ml'lik eppendorf tüpündeki üstteki aköz faz mikropipet ile dikkatlice toplanarak steril yeni bir eppendorf tüpüne aktarıldı.

c) KÜÇÜK RNA ZENGİNLEŞTİRME PROSEDÜRÜ:

Tüpteki aköz fazın üzerine 1/3 oranında %100 etanol eklendi ve vorteks ile iyice karışması sağlandı.

Toplama tüpünün içerisine yerleştirilen filtreli kartuşun üzerine 700 uL lizat/etanol karışımı eklendi ve 10000 x rpm'de 15 sn santrifüj edildi. Tüm filtrat steril yeni bir eppendorf tüpüne aktarıldı ve belirlenen miktarın 2/3 hacmi kadar %100 etanol eklendi (600 uL üzerine 200 uL etanol).

d) YIKAMA VE ELÜSYON:

Filtre Kartuşuna 700 µl mikroRNA Yıkama Solüsyonu 1 (etanol ile karıştırılmış çalışma solüsyonu) uygulandı ve 10.000 x rpm’de ~ 5–10 saniye santrifüjlendi.

Yıkama Solüsyonu (500 µl) 2/3 (etanol ile karıştırılmış çalışma solüsyonu) uygulandı ve önceki adımdaki gibi Filtre Kartuşundan geçirildi (Bu işlem 2 kez tekrarlandı).

Süzüntüyü son yıkamadan attıktan sonra, aynı toplama tüpündeki filtre kartuşu değiştirildi ve artık sıvıyı filtreden çıkarmak için 10.000 x rpm’de 1 dakika santrifüj yapıldı.

Filtre Kartuşunu 1,5 ml.’lik steril eppendorf tüpünün üstüne yerleştirerek üzerine 50 µL önceden ısıtılmış (95 °C) Elüsyon Solüsyonu veya nükleaz içermeyen su eklendi ve 12.000 x rpm’de ~ 20-30 saniye santrifüj yapıldı. Böylelikle tüpün altındaki mikroRNA’lar toplandı ve -80 °C’ye kaldırıldı.

5.2.4. Kan Plazmasından mikroRNA İzolasyonu

Bu çalışmada hazırlanan plazma örneklerinin mikroRNA izolasyonu Qiagen (Kat no-74106) kullanılarak gerçekleştirildi. Kontrol grubu ve CP grubuna ait serum örnekleri 15 µl’lik hacimde hazırlandı. İlk olarak 2µl’lik cDNA’lardan elde edilen mir16-5p, miR34-b-3p ve mir34-c-5p örnekleri çalışıldı, anlamlı ekspresyon gözlenmedi. mikroRNA miktarı yetersiz olabileceği düşünüldü ve miR34-b’den 5µl cDNA alınarak çalışma tekrarlandı.

Bu çalışmanın aşamaları aşağıdaki gibi sıralanmaktadır.

- Serum ve plazma örnekleri hazırlandı.
- Mikrosantrifüj tüpüne (2ml lik) 200 mikrolitre serum veya plazma transfer edildi.
- Buffer(tampon) RPL(60 mikrolitre) ekleyerek tüpün kapakları kapatıldı ve 5 dakikadan uzun süre vortexlendi. Oda sıcaklığında 3 dakika bekletildi.
- RPP Buffer(20 mikrolitre) eklendi, 20 saniyeden daha uzun bir süre vortexlendi ve 3dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Çökelti oluşturmak için oda sıcaklığında $12.000 \times \text{rpm}$ de 3 dakika santrifüj yapıldı.
- Süpernatant (200 mililitre Plasma\Serum için 230 mikrolitre) yeni mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi ve 1 birim isopropanol eklenerek vortexlendi.
- Tüm örnek Rneasy UCP Min Elute columna eklendi, 15sn $8000 \times \text{rpm}$ ’ de santrifüjlenerek ve akıtılan kısım çöpe atıldı.
- Rneasy MinElute spin kolonuna 700 mikrolitre Buffer RWT pipetle çekildi ve 15 sn $8000 \times \text{rpm}$ ’ de santrifüjlendi ve akıtılan kısım çöpe atıldı.
- Rneasy MinElute spin kolonuna 500 mikrolitre Buffer RPE pipetle çekildi ve 15sn $8000 \times \text{rpm}$ ’ de santrifüjlendi ve akıtılan kısım çöpe atıldı.
- Rneasy MinElute spin kolonuna 500 mikrolitre %80 ethanol eklendi ve $\geq 8000 \times \text{rpm}$ ’ de 2 dakika boyunca spin kolonu membranını yıkamak için santrifüjlendi ve akıtılan kısım çöpe atıldı.
- Rneasy UCP MinElute spin kolonunu 2 mikrolitrelik yeni toplama tüpüne alındı ve 5 dakika membranı kurutmak için santrifüjlendi ve akıtılan kısım, toplama tüpü atıldı.
- Rneasy UCP MinElute spin kolonunu 1.5 mikrolitrelik yeni toplama tüpüne alınarak 20 mikrolitre Rnase-free water direk olarak spin kolonu membranına eklendi.
- 1 dakika boyunca inkübe edildi.Kapağın kapatılmasıyla birlikte 1 dakika boyunca tam hızda santrifüjleme yapılarak RNA uzaklaştırıldı.

5.2.5. cDNA Sentezi

cDNA sentezi Taqman™ microRNA Ters Transkripsiyon Kiti (Katalog No: 4366596) kullanılarak yapıldı.

Testislerden alınan her bir örnek ve mikroRNA için 15 µl master mix reaksiyon hacmi belirlendi. 0.15 µl 100 mM dNTPs, 50U / µl 1 µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 1.5 µl 10X Reverse Transcriptase Buffer, RNase inhibitor 20U / µl 0.19 µl, 4.35 µl Nuclease-free water, 3 µl 5X RT primer ve 5 µl RNA'dan oluşan karışım hazırlandı.

Reverse Transkripsiyon işlemi aşağıdaki tabloda belirtilen zaman ve sıcaklıklara uygun olarak yapıldı (**Tablo 6**). Elde edilen cDNA'lar çalışma yapılıncaya kadar -80 °C'ye kaldırıldı.

Tablo 6. Ters transkripsiyon işlem gerçekleşme koşulları

AŞAMA	1	2	3	4
SICAKLIK	16°C	42 °C	85 °C	4 °C
ZAMAN	30 dk.	30 dk.	5 dk.	∞

Bu çalışmada kullanılan mikroRNA'ların; kromozom lokasyonları ve mikroRNA'ların sıraları tabloda gösterilmiştir (**Tablo7**).

Tablo 7. mikroRNA'ların assay tablosu

mikroRNA	Assay Adı	NCBI chromozom	Location	microRNA sequence
mikroRNA 16-5p	000391	Chr.13:50048973 - 50049061 [-]		5'-UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG-3'
mikroRNA 192-5p	000491	Chr.11: 64891137 - 64891246 [-]		5'-CUGACCUAUGAAUUGACAGCC-3'
mikroRNA34- b-3p	002618	Chr.9: 51103562 - 51103645 [-]		5'-AAUCACUAAUCCACUGCCAUC-3'
mikroRNA 34-c-5p	000428	Chr.11:111513439 - 111513515 [+]		5'-AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC-3'

5.2.6. Kantitatif Real-Time PCR ile Hedeflenen mikroRNA İfadelerinin Belirlenmesi

qPCR reaksiyonları;

1 µl TaqMan® Small RNA Assay (20X), 10 µl TaqMan® Universal PCR Master Mix II (Kat no: 4440042) (2X), 2 µl cDNA ve 7 µl d H₂O'dan oluşan toplam 20 µl hacim içinde yapıldı. Karışım 96 gözlü platelerde 40 döngü olacak şekilde gerçekleştirildi. qPCR işlemi her numune için üç tekrarlı olarak çalışıldı. Her numune için negatif bir kontrol (dH₂O) eklendi. Endojen kontrol mikroRNA'sı olarak; testis doku örnekleri için miR 192, serum için ise mikroRNA 16 örneklerdeki sabit ifadeleri nedeniyle mikroRNA ekspresyonlarının normalizasyonu için kullanıldı. Serumdaki mikroRNA'ların relative ifadeleri endojen mikroRNA'lara göre $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi ile tespit edildi (**Tablo 8**).

Tablo 8. qPCR çalışma koşulları

AŞAMA	1.DENATÜRASYON	2.DENATÜRASYON	DENATÜRASYON	PRİMER BAĞLAMA/ ZİNCİR UZAMA
SICAKLIK	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
ZAMAN	2 dk.	10 dk.	15 sn	1 dk.

40 DÖNGÜ

5.3. İSTATİSTİK

Kontrol, sham ve siklofosfamid gruplarına ait hayvanlardan (3 grup, n:6) elde edilen testis kesitlerinde; Siklofosfamid etkisiyle oluşan testis hasarı testiste bulunan hücrelerin sayısı, seminifer tübüllerin yapısı, kan testis bariyeri primer antikorlar kullanılarak indirek immünohistokimyasal yöntemle değerlendirildi. Gruplardan elde edilen sonuçlar da antikorlarla boyanma derecesine göre H-skor ile değerlendirildi.

Elde edilen değerler istatistiksel olarak Mann-Whitney U ve Cruscal Wallis testi yapılarak karşılaştırıldı, gruplardan elde edilen ortalama değerler, standart sapmalar ve istatistiksel sonuçlar tablo şeklinde gösterildi (**Tablo 10**).

Kontrol, sham ve siklofosfamid uygulaması yapılan hayvan gruplarından (3 grup, n:6 herbiri) elde edilen testis kesitlerinde Hematoksilen&Eosin ile boyalı preperatların değerlendirilmesi **Johnsen skorlamasına** göre yapıldı. Johnsen skorlaması sonucunda elde edilen veriler, SPSS programı kullanılarak Mann-Whitney U ve Cruscal Wallis istatistiksel testleri kullanılıp karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. İstatistiksel olarak elde edilen p değerinin gruplar arası yapılan karşılaştırması **Tablo 9**'da belirtilmiştir. P değeri <0,05 olan değerler için anlamlı farklılık olarak kabul edildi.

Çalışmamızda kontrol, sham ve siklofosfamid grubu farelerin testislerinden alınan kesitlerde Tunel uygulaması yapıldığında, hücre sayımı yapılarak elde edilen veriler Cruskal Wallis ve Mann Whitney U yöntemleriyle istatistik yapıldı. Standart sapma ölçümleri bulunarak p değeri $<0,05$ olan değerler için anlamlı fark gözlemlendi (**Tablo 11**).

Doku ve serum örnekleri ile yapılan qPCR çalışmasının sonuçlarının istatistiksel analizi için GraphPad Prism 7.0 programı kullanıldı. Öncelikle normallik testi yapılarak grupların değer dağılımlarının normal olup olmadığı belirlendi. Bunun için Shapiro-Wilk testi uygulandı.

Değerler normal dağılım sergilediğinden istatistiksel analizlerde parametrik bir test olan One way ANOVA testi ile grupların ortalama değerleri ve standart sapmaları belirlenerek gruplar arasında anlamlı farklılığın olduğu tespit edildi. $P<0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (**Şekil 11-12**) Serum örnekleri ile yapılan qPCR çalışmasının sonucunda anlamlı farklılık gözlemlenmedi.

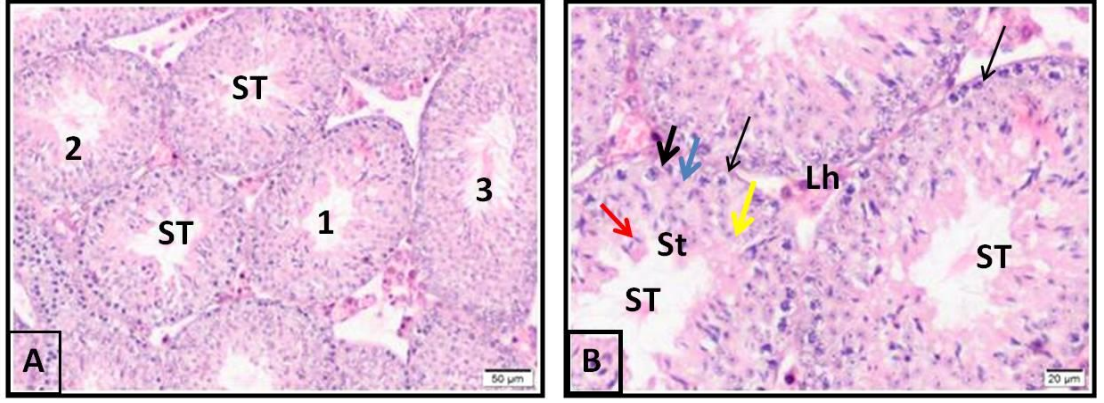
6. BULGULAR

6.1. HİSTOKİMYASAL BULGULAR

Kontrol grubu incelemelerinde; testisin en dışında bulunan sıkı bağ dokusu yapısındaki tunika albuginea'nın kapsülden testise doğru uzanan testis lobüllerinin septalarla ayrılmış olduğu gözlemlendi. Lobüllerin içinde bulunan seminifer tübüller ve tübüller arasına yerleşmiş olan kan ve lenf damarları içeren gevşek bağ dokusu yapısındaki interstisiyel alanlar izlendi.

Seminifer tübüllerde spermatogenez aşamasının farklı aşamalarında bulunan hücreler gözlemlendi. Tübül duvarında bazal membran üzerinde koyu ve açık yuvarlak çekirdekli spermatogonyumların varlığı tespit edildi. Tübülün en büyük hücresi olan primer spermatositlerin kromatini yayılmış şekilde spermatogoniumların üzerinde yer aldığı gözlemlendi. Lümeneye yakın konumda yerleşmiş küçük spermatitler izlendi. Tübüllerin çevresindeki myoid hücrelerin yassı ve uzun yapıdaki nükleusları bulunmaktaydı.

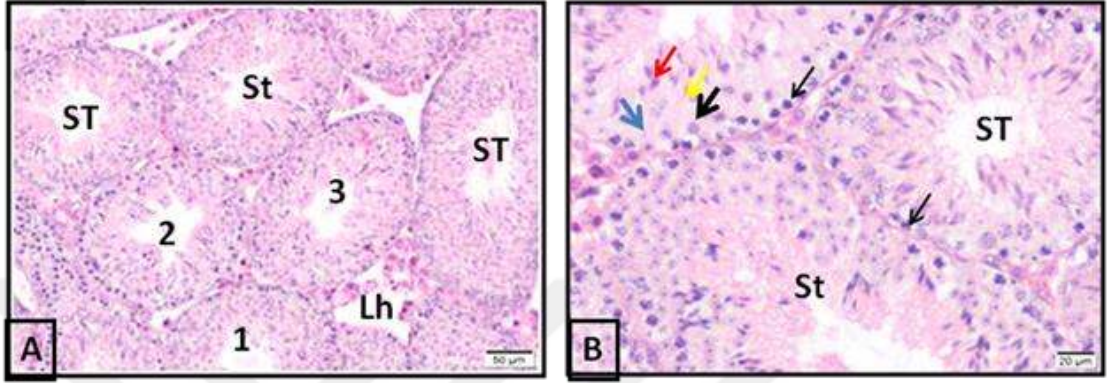
Tübüllerin merkezinde ise olgunlaşmış spermier izlendi. Spermatogenik hücreler arasında bazal membrandan lümeneye doğru uzanan Sertoli hücreleri gözlemlendi. İnterstisiyel alanda bulunan Leydig hücreleri'nin düzensiz poligonal biçimli olduğu, sitoplazmalarının asidofilik olduğu gözlemlendi. Bu hücrelerin büyük ve eksantrik nükleusu ve 1-2 nükleolus içerdiği izlendi (**Resim 1:A-B**).



Resim 1. Hematoksilen Eosin ile boyanmış kontrol grubuna ait fare testis dokuları

A. Testis doku örneklerinde çok sayıda seminiferöz tübüller (ST) görülmektedir (200X). **B.** Seminiferöz tübüllerin (ST), Sertoli hücreleri (mavi ok), spermatogonumlar (siyah ince ok), primer spermatositler (siyah kalın ok), sekonder spermatosit (sarı ok) ve spermatitler (kırmızı ok), interstisiyel alanlarda ise Leydig hücreleri (Lh) görülmektedir (400X). **Johnsen Skoru:** 1.tübülde **8**, 2.tübülde **9**, 3.tübülde **9** olarak tespit edildi.

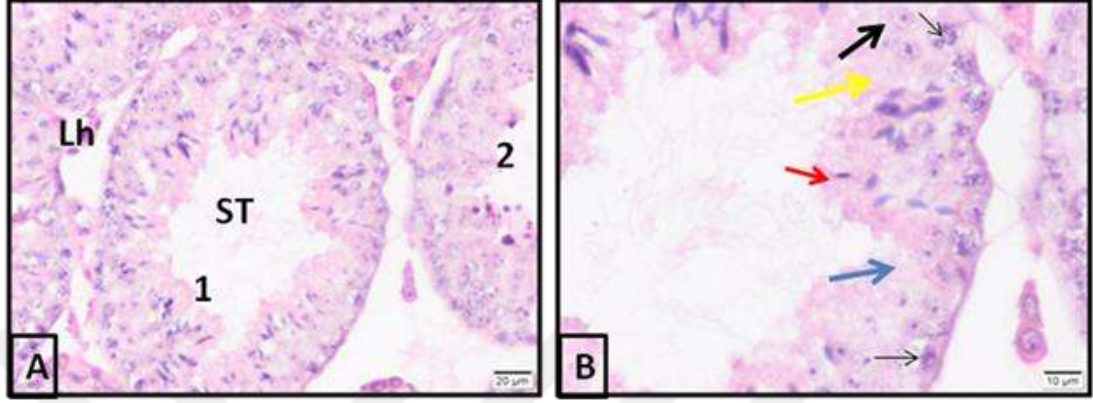
Sham grubu incelemelerinde; testisin histolojik yapısı incelendiğinde bağ dokusu içeren tabakalar, seminifer tübüller ve interstisiyel alanın da histolojik yapıları normal olarak izlendi. Seminifer tübüllerde Sertoli hücreleri, spermatogonyum ve spermatositler, tübül merkezinde spermlerin varlığı gözlemlendi. Hücrelerin sayıları, büyüklükleri ve nükleus sayıları normal olarak izlendi (Resim 2: A-B).



Resim 2. Hematoksilen Eozin ile boyanmış sham grubuna ait fare testis dokuları

A. Testis doku örneklerinde çok sayıda seminiferöz tübüller (ST) görülmektedir (200X). **B.** Seminiferöz tübüllerin (ST), Sertoli hücreleri (mavi ok), spermatogonyumlar (siyah ince ok), primer spermatositler (siyah kalın ok), sekonder spermatosit (sarı ok) ve spermatitler (kırmızı ok), interstisiyel alanlarda ise Leydig hücreleri (Lh) görülmektedir (400X). **Johnsen Skoru:** 1.tübülde **9**, 2.tübülde **8**, 3.tübülde **9** olarak tespit edildi.

Deney (CP) grubunun Hematoksilen Eozin ile boyanmış preparatlarının incelenmesinde; seminifer tübüllerde çap, büyüklük ve sayıda azalma, düzensizleşme, seminifer epitel tabakalarında azalma, tübüllerde atrofi gözlenmektedir. Sertoli hücrelerinde nekroz, dejenerasyon, deskuamasyon (epitelde dökülme), interstisyel alanda ödem gözlenmektedir (**Resim 3: A-B**).



Resim 3. Hematoksilen Eozin ile boyanmış deney grubuna ait fare testis dokuları
A. Testis doku örneklerinde seminiferöz tübüller (ST) görülmektedir (200X). **B.** Seminiferöz tübüllerin (ST), Sertoli hücreleri (mavi ok), spermatogonumlar (siyah ince ok), primer spermatositler (siyah kalın ok), sekonder spermatosit (sarı ok) ve spermatitler (kırmızı ok), interstisyel alanlarda ise Leydig hücreleri (Lh) görülmektedir (400X). **Johnsen Skoru:** 1.tübülde **7**, 2.tübülde **6** olarak tespit edildi.

6.1.1. Johnsen Skoru

Kontrol ve sham grubundan elde edilen testis örnekleri ile yapılan skorlamanın ($10,00 \pm 0,8$ - $9,00 \pm 0,7$) anlamlı olmadığı, kontrol ve siklofosamid grubunun sonuçlarının ise ($10,00 \pm 0,8$ - $7,50 \pm 0,8$) anlamlı olduğu sonucuna ulaşıldı.

Grupların ortalamaları ile standart sapma değerleri **Tablo 9**'da gösterilmiştir.

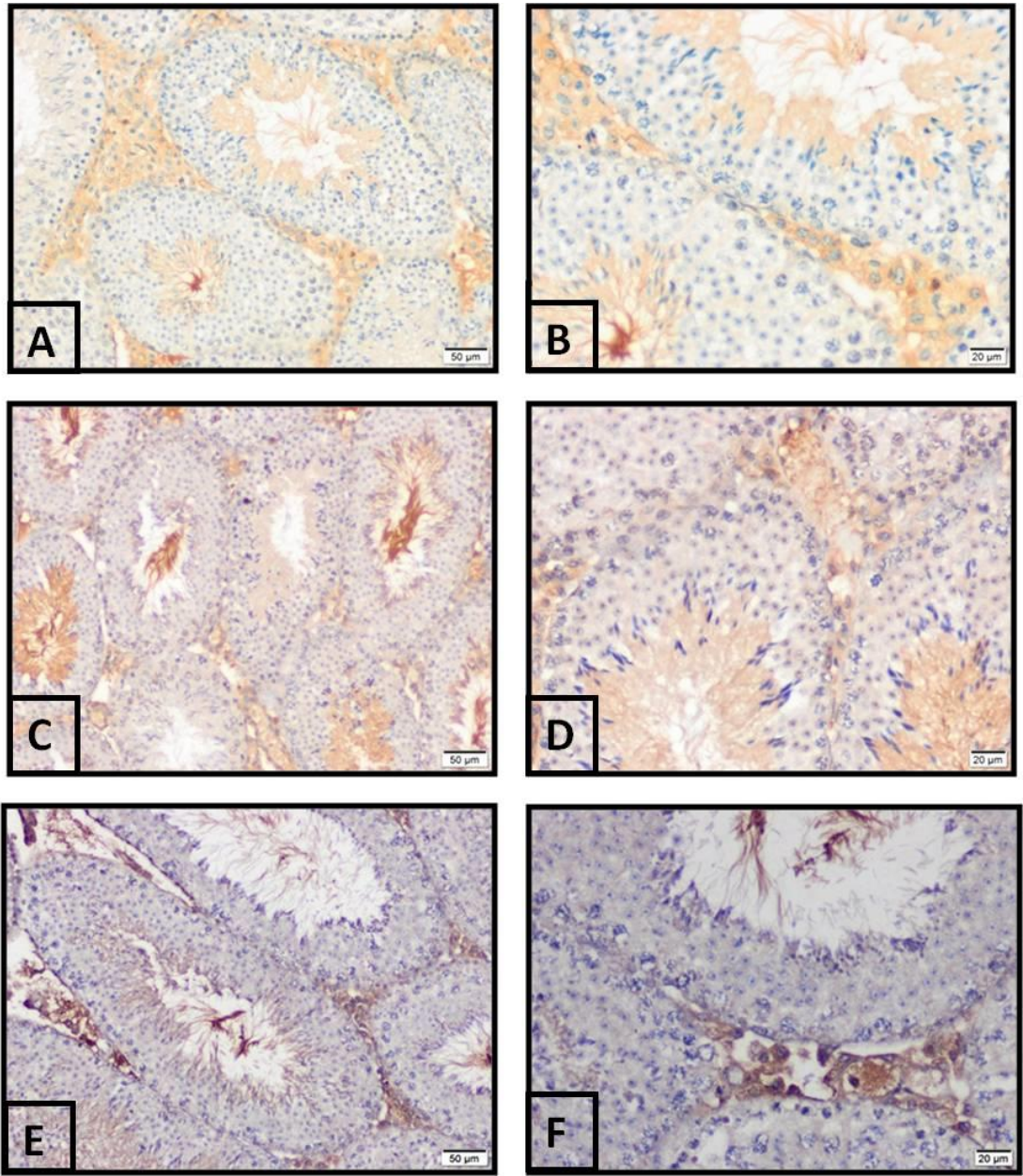
Tablo 9. Johnsen Skoru istatistik tablosu

GRUP	KONTROL	SHAM	SİKLOFOSFAMİD
JOHNSEN SCORU(ORT ± STD) (p<0.001***)	10,00 ± 0,8	9,00 ± 0,7	7,50 ± 0,8 ***

6.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

6.2.1. GDNF İmmünoreaktivitesi

Kontrol ve sham grubundan elde edilen testis örnekleri ile GDNF primer antikoru kullanılarak yapılan değerlendirmede Seminifer tübüllerin epitelinde bulunan spermatogenik hücreler, Sertoli hücreleri ve Leydig hücrelerinde orta şiddette boyanma gözlenmiştir. GDNF immunoreaktivitesinde, Siklofosfamid grubunda (**170,00 ± 14,8**) Kontrol ve Sham grubuna (**221,00 ± 8,5- 220,50 ± 7,7**) göre anlamlı düzeyde azalma tespit edildi (**Resim 4**).



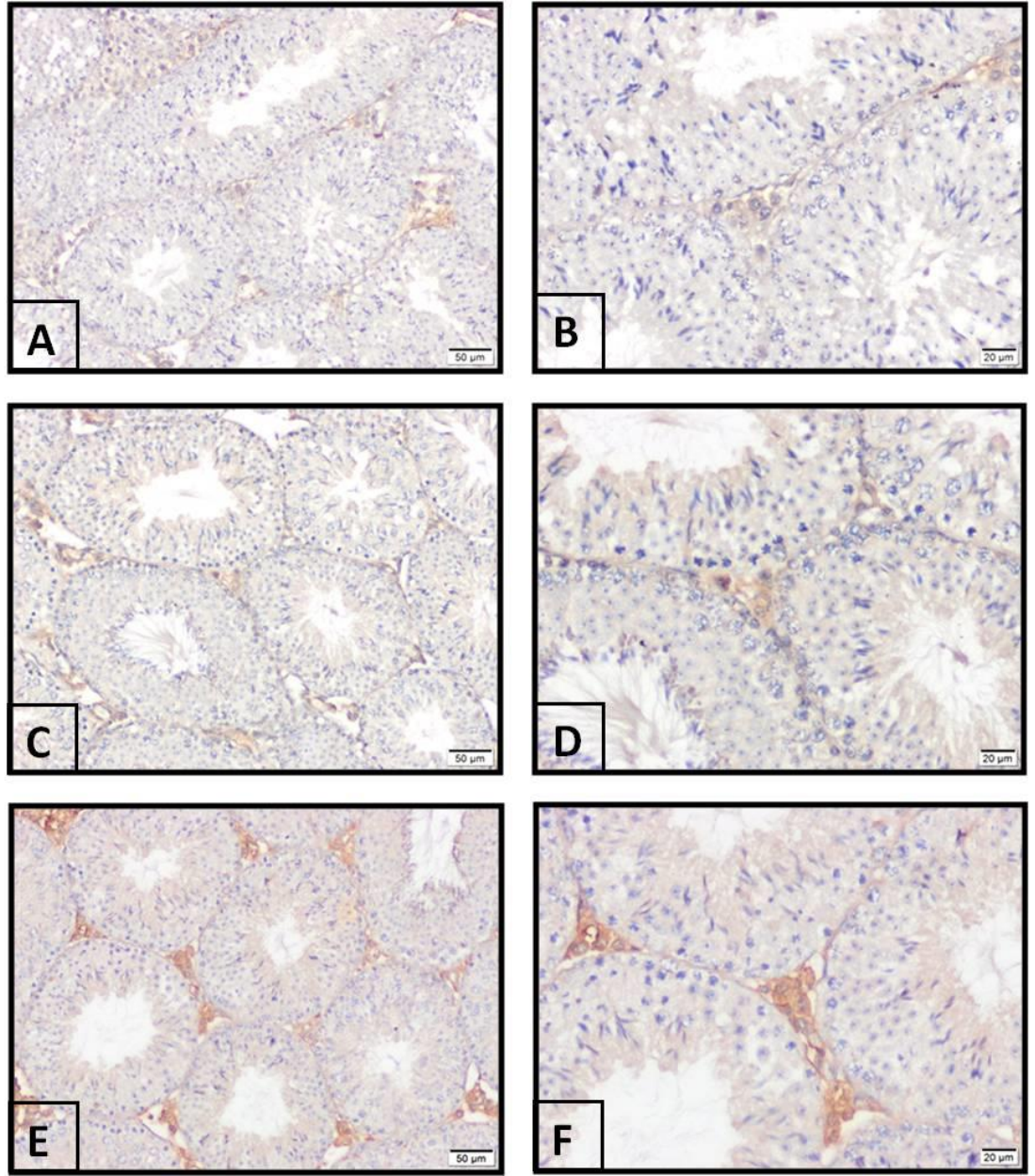
Resim 4. GDNF İmmunoreaktivitesi

GDNF immünoaktivitesi; kontrol grubunda (A, B) ve sham grubunda (C, D) fazla olduğu deney grubunda (E, F) ise azalmış olduğu gözlenmektedir. (Ölçek .A, C, E 200X, B, D, F 400X)

6.2.2. Okludin İmmünoreaktivitesi

Kontrol ve sham grubundan elde edilen testis örnekleri ile okludin primer antikoru kullanılarak yapılan değerlendirmede Sertoli hücreleri sitoplazmasında sıkı bağlantı komplekslerinde orta şiddette boyanma gözlenmiştir. Okludin immunoreaktivitesinde Kontrol ve sham grubunda bulunan farelerde (**223,00 ± 20,5-212,00 ± 15,9**) edildiği ancak siklofosfamid uygulanmış farelerde (**187,50 ± 23,26**) kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı tespit edildi (**Resim 5**).



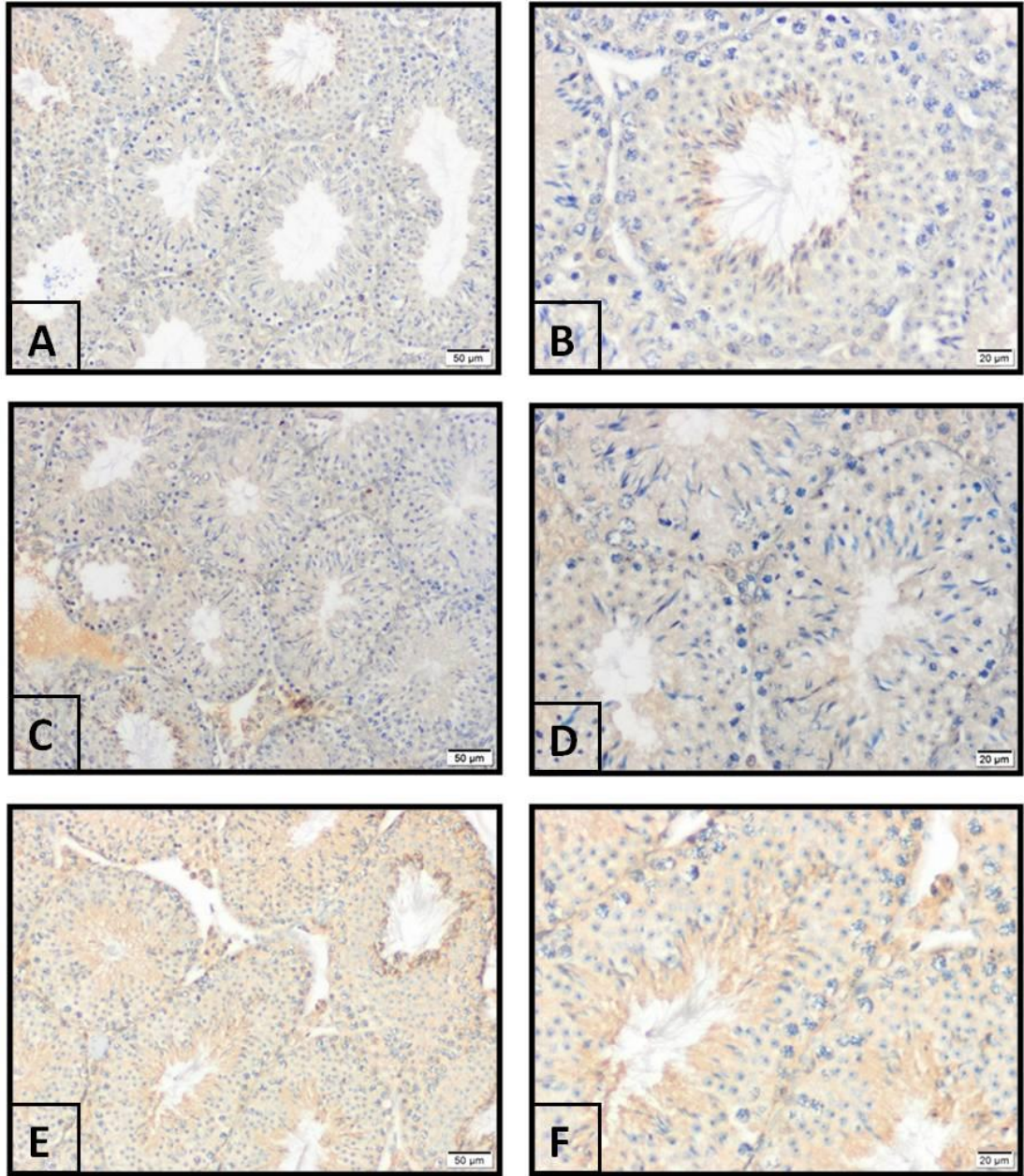


Resim 5. Okludin İmmunoreaktivitesi

Okludin immunoreaktivitesi; kontrol grubunda(A,B) ve sham grubunda (C,D) fazla deney grubunda (E, F) ise az olduğu gözlenmektedir.(Ölçek: A, C, E 200X, B, D, F 400X)

6.2.3. TGF-β3 İmmünoreaktivitesi

Kontrol ve sham grubundan elde edilen testis örnekleri ile TGF-β3 primer antikoru kullanılarak yapılan değerlendirmede özellikle bazal bölgelerde ve spermatidlerde TGF-β3'ün orta düzeyde immunoreaktivite edildiği gözlenmektedir. Tgf-β3 immunoreaktivite, siklofosamid grubunda ($210,50 \pm 27,6$) Kontrol ve sham grubuna ($163.00 \pm 13,8$ - 168.00 ± 10.1) göre anlamlı düzeyde artma tespit edildi (Resim 6).



Resim 6. TGF-β3 İmmünoreaktivitesi

TGF- β 3 immunoreaktivitesinin; kontrol grubunda(**A,B**) ve sham grubunda (**C,D**) az deney grubunda (**E, F**) ise fazla olduğu gözlenmektedir. (Ölçek: A, C, E 200X, B, D, F 400X)

Kontrol, sham ve siklofosfamid gruplarından elde edilen sonuçlarda antikorlarla boyanma derecesine göre değerlendirme yapılarak; immunohistokimyasal boyama sonuçları H-skor ile incelendi.Elde edilen değerler istatistiksel olarak **Tablo 10**'da gösterildi.

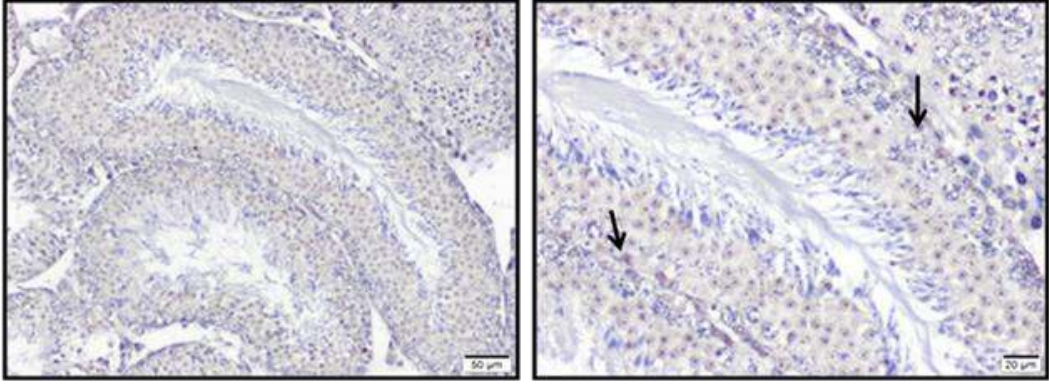
Tablo 10. H-skor istatistik değerlendirme tablosu

GRUP / ANTİKOR	GNF	OKLUDİN	TGF- β 3
KONTROL	221,00 $\pm$ 8,5	223,00 $\pm$ 20,5	163,00 $\pm$ 13,8
SHAM	220,50 $\pm$ 7,7	212,00 $\pm$ 15,9	168,00 $\pm$ 10,1
SİKLOFOSFAMİD	170,00 $\pm$ 14,8***	187,50 $\pm$ 23,2***	210,00 $\pm$ 27,6***

İstatistiksel olarak değerlerin karşılaştırılmasında anlamlı farklılık belirlenmiştir (p<0.001***).

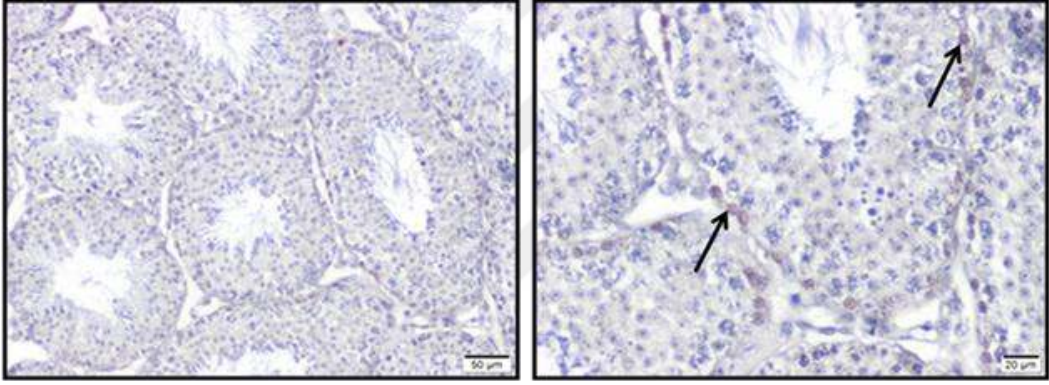
6.3. TUNEL BULGULARI

Çalışmada kontrol, sham ve siklofosfamid grubu farelerin testislerinden alınan kesitlerde Tunel uygulaması yapıldığında; siklofosfamidin mitoz giren hücrelerde DNA sentezini azaltmasına bağlı olarak oluşan hasara bağlı Tunel pozitif hücre sayısında özellikle Siklofosfamid grubunda anlamlı olarak yüksek olması testise ait seminifer tubulus epitelinde bulunan hücrelerde apoptozun arttığına işaret etmektedir. Gruplara ait farklılıklar ışık mikroskopunda (Olympus X-40) incelenerek farklılıklar değerlendirildi **Resim 7-8-9**'da gösterildi.



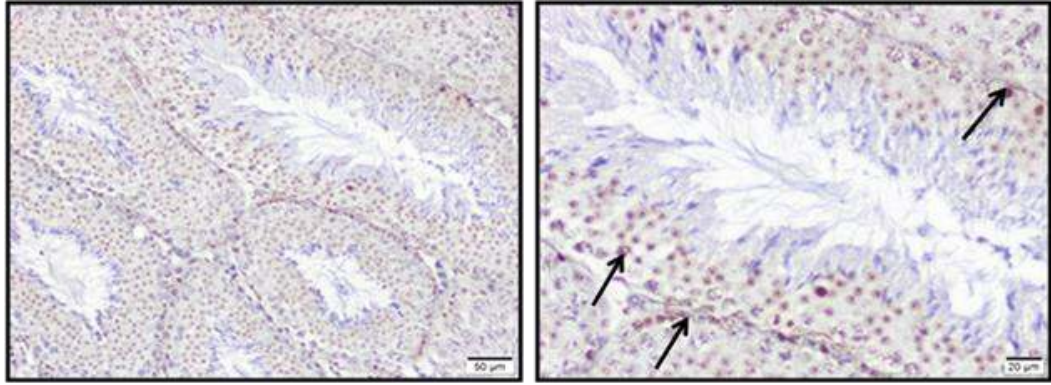
Resim 7. Kontrol grubu Tunel pozitif hücreler

Bu grupta az sayıda Tunel pozitif hücreler (kahverengi) okla gösterilmiştir.
(200X, 400X)



Resim 8. Sham grubu Tunel pozitif hücreler

Bu grupta az sayıda Tunel pozitif hücreler (kahverengi) okla gösterilmiştir.
(200X, 400X)



Resim 9. Siklofosfamid grubu Tunel pozitif hücreler

Bu grupta diğer gruplara göre daha fazla sayıda Tunel pozitif hücreler (kahverengi) okla gösterilmiştir.(200X, 400X)

Kontrol, sham ve siklofosfamid gruplarında farklı hayvan örneklerinden seçilen rastgele alanlarda hücre sayımı yapılarak elde edilen verilerle istatistiksel analiz yapıldı ve standart sapma ölçümleri, p değeri incelendiğinde anlamlı fark gözlemlendi ve **Tablo 11**'de gösterildi.

Tablo 11.Tunel sonucu istatistik değerlendirmesi.

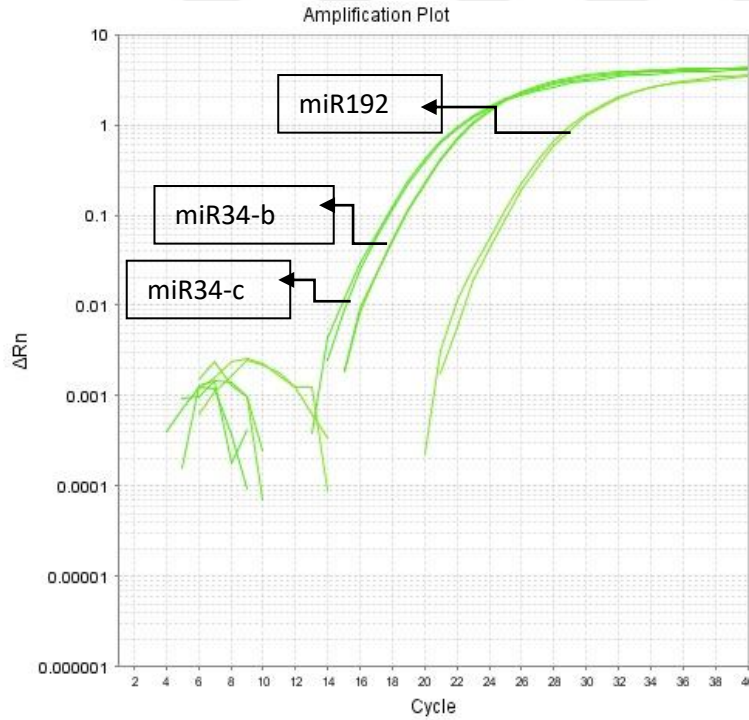
GRUP	KONTROL	SHAM	SİKLOFOSFAMİD
TUNEL	40,00 ±8,7	43,50 ± 8,1	* 65,00 ± 9,6
	**		**

Kruskal Wallis P* <0.001 **Mann Whitney U (1=2)<3

6.4. PCR BULGULARI

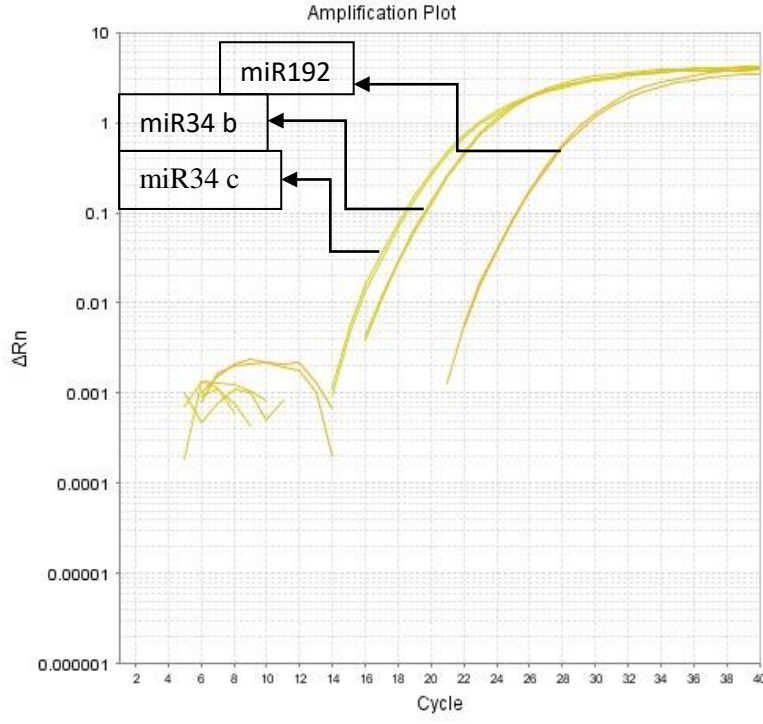
6.4.1. Doku İncelemesi

Tüm doku örneklerinde; miR-192 sabit ifadesinden dolayı endojen kontrol mikroRNA olarak seçildi. mir-34b ifadesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; sham grubunda ($1,049 \pm 0,013$) kat azalmış iken deney grubunda ($1,951 \pm 0,15$) kat azalmıştır ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0,05$) Şekil 13’de gösterildi. mir-34c ifadesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; sham grubunda ($1,044 \pm 0,012$) kat azalmış iken deney grubunda ($1,732 \pm 0,04$) kat azalmıştır ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0,05$). Şekil 14’de gösterildi. Doku incelemelerinde tüm mikroRNA’ların amplifikasyon eğrileri kontrol grubunda Şekil 10’da, sham grubunda Şekil 11’de, deney grubunda Şekil 12’de gösterildi.



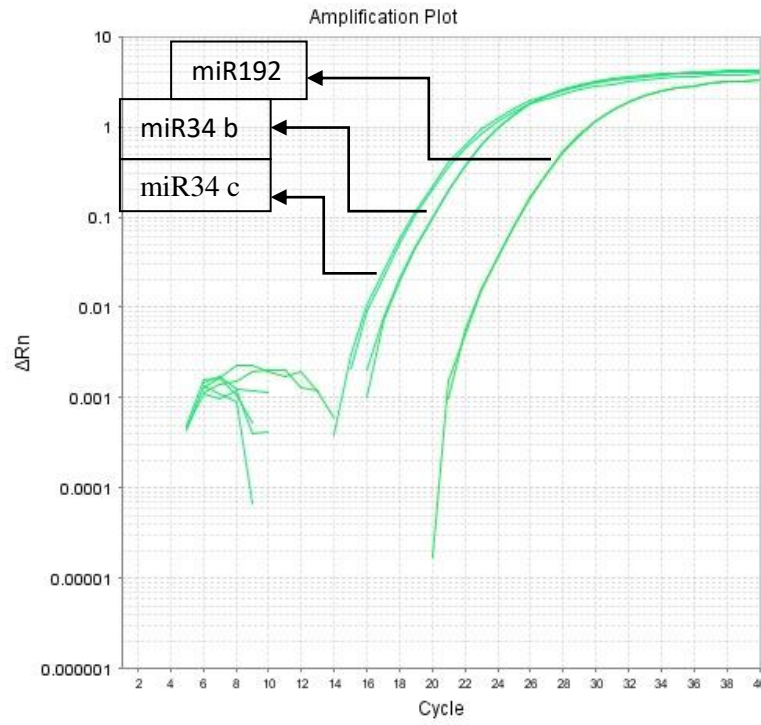
Şekil 10. Kontrol grubu doku mikroRNA'ların amplifikasyon grafiği

CT değerleri ;miR192-5p: 27,76 , mir-34b-3p: 21,8 , mir-34c-5p: 20,11

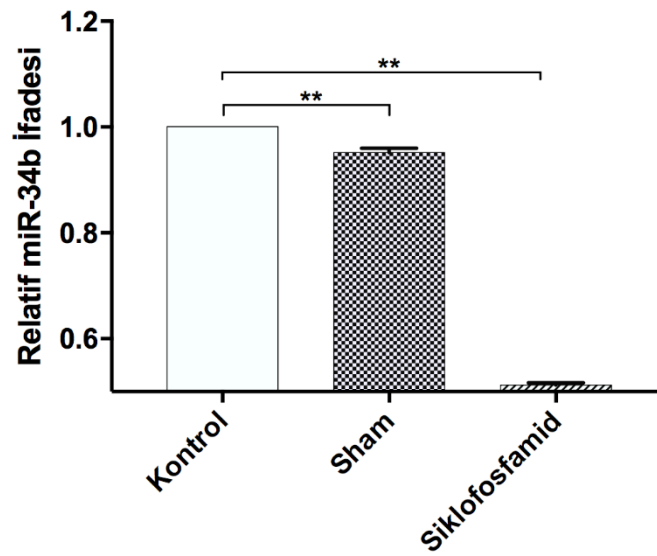


Şekil 11. Sham grubu doku miRNA'ların amplifikasyon grafiği

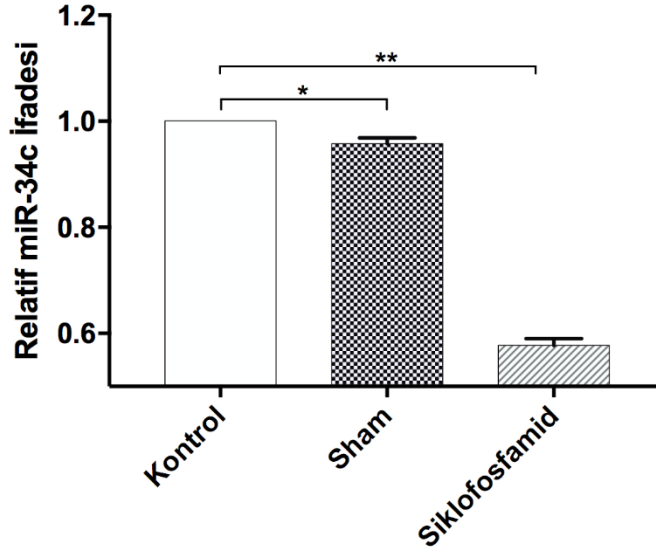
CT değerleri; miR192-5p: 27,90 , mir-34b-3p: 22,01 , mir-34c-5p: 20,31



Şekil 12. Siklofosfamid grubu doku mikroRNA'ların amplifikasyon grafiği
CT değerleri; miR192-5p: 27,97 , mir-34b-3p: 22,98 , mir-34c-5p: 21,11



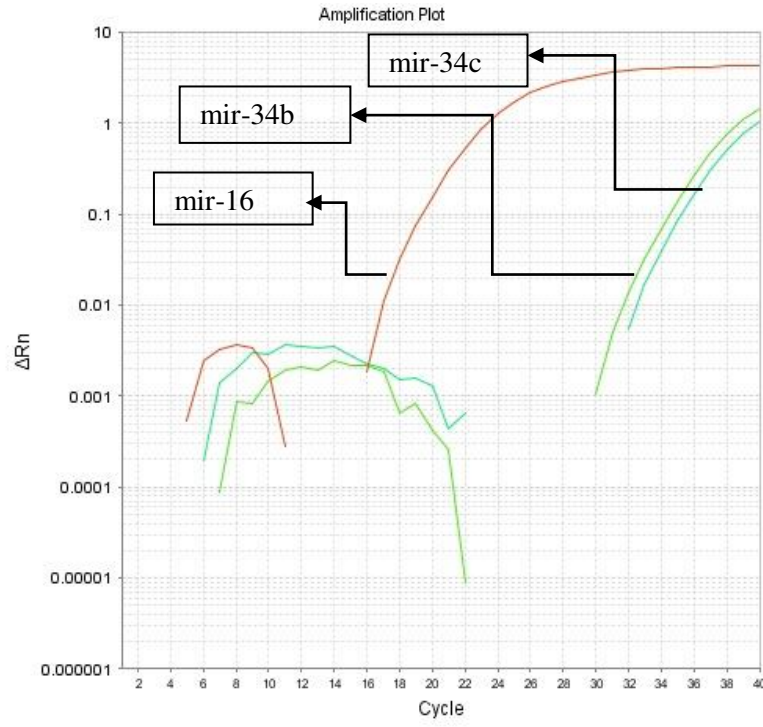
Şekil 13. mir-34b-3p ifadesi



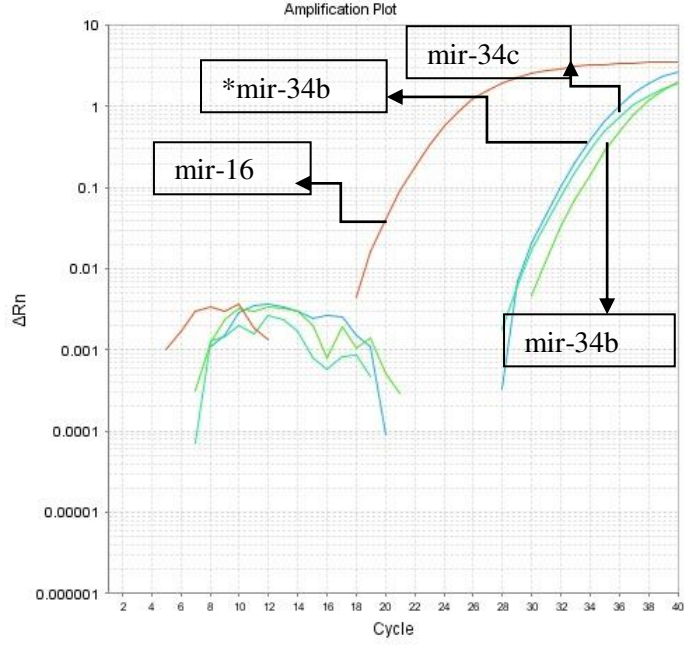
Şekil 14. mir-34c-5p ifadesi

6.4.2. Plazma İncelemesi

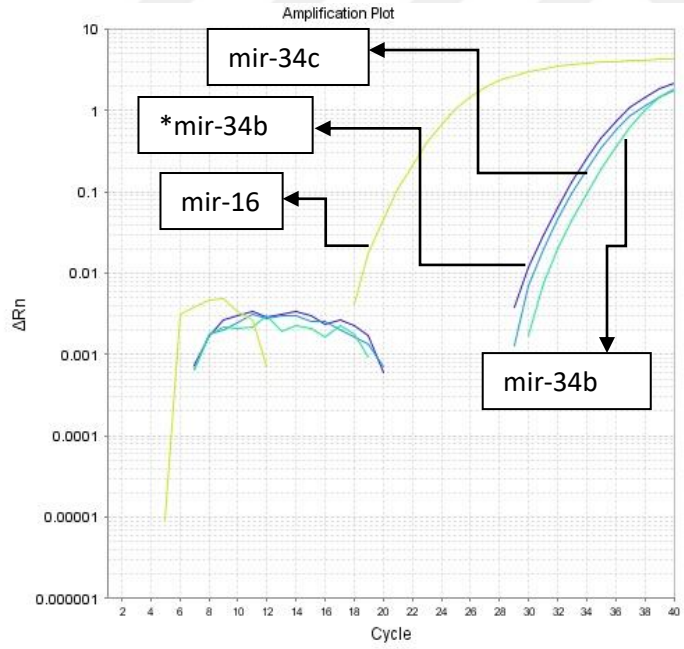
Çalışmamızda kontrol, sham ve siklofosamid uygulanan hayvanlardan alınan kan örneği ile yapılan plazmadaki mikroRNA'ların ifadelerine bakıldığında endojen mikroRNA-16'nın ifadesi tespit edilirken hedeflenen mir-34b ve mir-34c'nin qPCR işlemi sonucunda ifadeleri tespit edilememiştir. Tüm plazma örneklerinde; mir-192 sabit ifadesinden dolayı endojen kontrol mikroRNA olarak seçilmiştir. Plazma örnekleriyle yapılan tüm mikroRNA'ların amplifikasyon eğrisi kontrol grubunda **Şekil 15**'de, kontrol pool serum **Şekil 16**'da, deney grubunda **Şekil 17**'de gösterildi.



Şekil 15. Kontrol grubu serum mikroRNA'ların amplifikasyon grafiği
CT değerleri; mir-16-5p: 21,96- mir-34b-3p: 36,96- mir-34c-5p: 36,96



Şekil 16. Kontrol pool serum mikroRNA amplifikasyon eğrisi
CT değerleri ; mir-16-5p: 21,07- mir-34b-3p: 36,65- mir-34c-5p: 35,33
 *mir-34b-3p:35,07(5µl)



Şekil 17. Deney grubu pool serum mikroRNA amplifikasyon eğrisi
CT değerleri; mir-16-5p: 21,37- mir-34b-3p: 36,78- mir-34c-5p: 35,68*mir-34b-3p:35,41(5µl)

Bu sonuç bize mikroarray, RNA dizileri gibi daha gelişmiş yöntemlerle plazmadan alınan örneklerdeki mikroRNA'ların tespit edilebileceğini düşündürdü.

7. TARTIŞMA

Kemoterapötik ajanların kullanılması sonrasında ortaya çıkan spermatogenez bozuklukları ve fertilité durum değérlendirmesi testis biyopsisi gibi invaziv işlem dışında, noninvaziv bir teknik bulunmamaktadır. Bununla beraber, son yıllarda plazma mikroRNA ekspresyon profilinin değérlendirilmesinin tanı amaçlı yeni biyobelirteçler olarak kullanılabileceğine ait yayınlar da bulunmaktadır. Bu çalışmada CP verilen farelerin testis örnekleri GDNF, Okludin ve TGF- β 3 ekspresyonlarının immunohistokimyasal yöntemler ile incelenmesi sonucu CP'nin testis hasarının belirlenmesi, ayrıca testis doku örneklerinden ve plazma örneklerinden RT-PCR tekniğı ile incelenmesi sonucunda oluşan bu değışikliklerin mir-34b ve mir-34c ekspresyonunun üzerine yansımaları araştırılmıştır.

Spermatogenez aşamalarında önemli rol oynayan GDNF, Sertoli hücrelerinden veya peritübüler miyoid hücrelerinden salgılanmaktadır (Chen ve ark. 2016). Bu çalışmada, kontrol grubuna ait farelerin GDNF primer antikoru ile boyanmış testis doku örneklerine ait preparatlarının incelenmesinde GDNF ekspresyonunun oldukça fazla (**H-score: 221.00 $\pm$ 8.5**) sham grubunun da (**220.50 $\pm$ 7.7**) kontrol grubuna benzer olduğı tespit edildi. Bu ekspresyon, GDNF'nin spermatogenez sırasında özellikle spermatogoniumların sayılarının düzenlenmesinde önemli rol oynadığının bir belirtisi olarak değérlendirildi. GDNF'nin embriyonik dönemde spermatogenez üzerine etkilerinin transgenik farelerde incelendiğı çalışmada, GDNF'nin overeksprese edilmesi durumunda farklılaşmamış spermatogoniumların seminferöz tübüllerde toplanmasını sağladığı; buna karşılık heterozigot knockout yapılan farelerde ise infertiliteye neden olduğı tespit edilmiş ve GDNF'nin SSC'lerin kaderini belirleyen bir molekül olarak tanımlanmıştır (Meng ve ark. 2000).

Bu proteinin puberte döneminde de görev yaptığı, spermatogonyal kök hücrelerin uygun sayıya ulaşmasında, erişkinde ise bu hücrelerin devamlılığının sağlanmasında görev aldığı rapor edilmiştir (Naughton ve ark. 2006). GDNF'nin kültür ortamında SSC'lerin üzerine etkilerinin araştırılmasında da, LIF salgılayan STO hücrelerine, kültür ortamına GDNF ve FGF2 ilave edildiğinde, SSC sayılarının arttığı gösterilmiştir (Kubota 2004).

İnhibe edilmesi durumunda spermatogonyal seriye ait hücrelerde azalma gözlenmesi, GDNF ekspresyonunun, spermatogonyal hücrelerin farklılaşmasında da rol oynadığının bir diğer göstergesi olarak değerlendirilebilir. GDNF'nin inhibe edildiği durumlarda ise spermatogonyal seriye ait As, Apr ve Aa₁ sayısının azalması gözlenmektedir (Savitt ve ark. 2012). Germ hücre üretemeyen C57BL/6 (B6) veya 129 fare üzerinde yapılan çalışmada, GDNF reseptör liganı olan Gfr α 1 verilmesi sonrasında, GDNF sinyalini düzenlediği ve SSC'lerin kendini yenileme fonksiyonunun başladığı gösterilmiştir (Kubota ve ark. 2004).

Nicole Parker ve arkadaşları tarafından 7 gün boyunca GDNF inhibisyonu ile yapılan çalışmalarda, Gfr α 1+ spermatogonya sayısının %74 oranında; Sertoli hücreleri başına düşen yuvarlak spermatit ve pakiten spermatosit sayısında ise %61 ve %53 oranında azalma olduğu bildirilmiştir. GDNF'nin inhibisyonu, sperm sayısında azalmaya da neden olmasından dolayı kontrol grubunda GDNF immunoreaktivitesinin fazla olmasının, spermatogonyal hücrelerin farklılaşması ile de ilişkili olabileceği düşünüldü (Parker ve ark. 2014).

Bu proteinin inhibisyonu, en çok farklılaşan ve çok sayıda bulunan Aa₁ spermatogonyaları etkilediği bildirilmiştir. GDNF eksikliğinin hızla spermatogonyal hücrelerin kaybına neden olması, GDNF'nin SSC'lerden daha çok Aa₁ spermatogonyaları etkilemesine bağlı olduğu ileri sürülmektedir. Bununla beraber, GDNF sinyalinin inhibisyonu SSC kaybına da neden olmaktadır. Bu kayıp SSC'lerin çoğalmayı terk edip, Aa₁ spermatogonyalara farklılaşması ile ilişkilendirilmektedir. GDNF immunoreaktivitesinin testis dokusundaki miktarı, spermatogenik hücrelerin farklılaşmasını farklı biçimde etkilediği de bildirilmiştir. Düşük düzeyde GDNF farklılaşmamış spermatositlerin differansiyasyonunu düzenlerken, yüksek seviyede immunoreaktivite ise spermatogoniumların kendini yenilemesini sağlamaktadır (Meng ve ark. 2000).

Bu protein transkripsiyonu ve dağılımı spermatogenezin evresine bağlı olarak değişmekte, GDNF'nin farklı ekspresyon düzeylerinin spermatogenik hücreler üzerine etkisi farklı olmaktadır. GDNF'nin yoğun olarak bulunduğu bazal bölgede kök hücreler de bulunmaktadır ve replikasyon da bu bölgeden başlamaktadır. GDNF, mRNA ve protein dağılımı XII-1 de maksimal düzeyde olup Evre VII'de nadiren artmaktadır (Daniel ve ark. 2011).

Sıçanlarda As spermatogonya'ların DNA replikasyonu Evre-VII'de minimal iken evre X-XII'de artmakta, Evre-I'de maksimum düzeye ulaşmaktadır. As spermatogonya'ların replikasyonu Evre-II'den sonra azalmaktadır. Bu azalma Sertoli hücrelerindeki GDNF'nin azalması ile paralellik göstermektedir (Huckins ve ark. 1971). Bu çalışmalar değerlendirildiğinde, GDNF'nin embriyonik, puberte ve erişkin dönemde önemli rol oynadığı, erişkin farelerde kontrol grubunda immunoreaktivitenin fazla olmasının spermatogenez hem sayısal, hem de farklılaşma yolu ile desteklediği sonucuna varıldı.

Siklofosfamid uygulamasının testis ağırlığında azalmaya, geçici oligospermiaya neden olduğu, spermatogoniumların DNA sentezini ve spermatitlerde protein sentezini azalttığı böylece infertiliteye neden olduğu bilinmektedir (Jalali ve ark. 2012; Bakhtiary ve ark. 2014). Cao ve arkadaşları yaptıkları çalışmada sperm sayısı ve motilitenin azalmış olduğunu tespit etti. Yapılan bir çalışmada siklofosfamid uygulanan farelerde spermatozoa sayısının normalin (64.622 ± 17.345) yaklaşık yarısı kadar azalttığını (32.279 ± 11.012), viabiliteyi ise kontrol grubunda ($38,763 \pm 4,857$) bulurken siklofosfamid verilen grupta ($23,468 \pm 4,324$) olarak bulmuşlardır. Siklofosfamidin mitoz giren hücrelerde DNA sentezini azaltmasının yanı sıra ROS üretimini arttırarak apoptozu ve diğer hücre ölümlerini arttırmaktadır (Cao ve ark. 2017).

Siklofosfamid verilmiş farelerin testis doku örneklerinin, immunohistokimyasal teknik kullanılarak GDNF primer antikoru ile boyanmış preparatlarının, incelenmesi sonucunda immunoreaktivitenin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı tespit edildi. Uygulama sonrasında GDNF ekspresyonunun azalmış ($170.00 \pm 14,8$) olması, siklofosfamidin spermatogenez üzerine olan negatif etkisinin GDNF azalmasına bağlı olabileceği düşünüldü.

5 günlük siklofosamid uygulamasından sonra GDNF immunoreaktivitesinin belirgin olarak azaldığı tespit edilmiş; GDNF azalması ile SSC'lerin differansiyasyonunu arttırarak ve proliferasyonu azaltarak kök hücre havuzunu azalttığını ve spermatogenezi bozduğunu ileri sürmüşlerdir (Cao ve ark. 2016). Yapılan bir çalışmada CP verilen sıçanların sperm DNA hasar oranının (**44.83 ± 2.98**) kontrol grubuna göre (**15.73 ± 0.64**) belirgin olarak arttığı gösterilmiş, CP nin testis fonksiyonunu oksidatif strese bağlı olarak bozduğunu tespit etmişlerdir. Bir antioksidan olan American ginseng uygulamasının, CP'nin oksidatif zararlı etkisini ortadan kaldırdığını ve testisin histolojik yapısını koruduğunu ileri sürmektedirler. GDNF uygulamasının oligoastenospermi vakalarında sperm sayısının arttırılmasını sağlaması GDNF'nin spermatogenez üzerine etkisinin bir diğer belirtisi olarak değerlendirilebilir. GDNF'nin oligoastenospermi etkilerinin incelendiği çalışmada, Cynomorium songaricum verilmesi ile sperm konsantrasyonunun, sperm motilitesinin ve testesteron seviyesinin arttığı, GDNF'nin farklılaşmamış spermatogonyal hücrelerin proliferasyonunu hızlandırarak spermatogenezi arttırdığı bildirilmiştir (Hosseini ve ark. 2018).

Siklofosamidin testis dokusu üzerine zararlı etkileri sadece spermatogonyal hücrelerini etkilemek değildir. Kemoterapilere dirençli, bölünmeyen ve stabil olarak kabul edilen Sertoli hücreleri ve Leydig hücrelerinin de siklofosamid tedavilerinden etkilendiği ileri sürülmektedir (Drumond ve ark. 2011).

Sertoli, Leydig ve germ hücreleri tarafından sentezlenen TGF- β 3'ün, testiküler gelişimin yanı sıra Leydig hücrelerinin fonksiyonu ve germ hücrelerinin proliferasyonu ve apoptozunu kontrol ettiği bilinmektedir (Mullaney ve Skinner; 1993; Cai et al. 2011; Miles ve ark. 2013; Oldknow ve ark. 2013; Young ve ark. 2015).

TGF- β 3 ekspresyonu gelişimsel açıdan Sıçan testisleri üzerinde incelendiğinde, perinatal ve prepubertal dönemde sadece Sertoli hücrelerinde mevcut olduğu, erişkinlerde Sertoli hücrelerinin yanı sıra spermatosit ve yuvarlak spermatidlerde bulunduğu gösterilmiştir (Lui ve ark. 2003; Mullaney & Skinner 1993).

Yapılan çalışmada kontrol grubunda bulunan farelerde özellikle bazal bölgelerde ve spermatidlerde TGF- β 3'ün orta düzeyde immunoreaktivitesi (**163.00 $\pm$ 13,8**) sham grubunda da, (**168.00 $\pm$ 10.1**) yakın değerlerde immunoreaktivitesi TGF- β 3'ün spermatogenez mekanizmasında önemli rol oynadığı biçiminde değerlendirildi. TGF- β 3, Sertoli-germ hücre etkileşimleri ile spermatogenik hücre farklılaşmasında rol oynadığı, özellikle ergenlik döneminde spermiogenezis ve spermiasyonun başlangıcında görev aldığı rapor edilmiştir (Mullaney ve Skinner, 1993).

Bu proteinin spermatitlerde gözlenmesi spermatit maturasyonunda görev aldığı bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir. TGF- β 3'ün kontrol grubunda orta düzeyde immunoreaktivitesi spermatogonyal hücrelerin sayısının apoptoz ile kontrol edilmesi ile ilgili olabileceğini düşündürdü. Yapılan bir çalışmada her üç TGF- β 3 formunun pubertal erkek germ hücrelerinde doza bağlı olarak apoptoza neden olduğu, TGF- β 1 ve TGF- β 3'ün caspas 3 boyanmasının olmaması nedeni ile kaspaz bağımsız mekanizma ile apoptoza neden olduğunu ileri sürmektedir.

Memeli testisinde spermatogonyal hücreler farklılaşmaya başlamadan önce mitozla çoğaldığı, aşırı hücre proliferasyonunun apoptozla kontrol edildiği ve Sertoli hücrelerinin destekleyebileceği sayı ile sınırlandırıldığı bilinmektedir (Zhang ve ark. 2004; Konrad Lve ark. 2006). Bu çalışmada da TGF- β 3'ün kontrol grubunda fazla immunoreaktivitesinin spermatogonyal hücre sayısını sınırlaması ve spermatit maturasyonunda görev aldığı biçiminde değerlendirildi.

Bu proteinin Sertoli hücreleri ile TJ dinamiklerini kontrol ettiği, kan testis bariyerinin açılıp kapanmasında en önemli sitokin olduğu, okludini azaltarak hücresel bağlantıları azalttığı da bilinmektedir. Bu çalışmada kontrol grubunda TGF- β 3 immunoreaktivitesinin gözlenmesi kan testis bariyerinin geçirgenliği üzerine etkili olduğunun bir göstergesi olarak değerlendirildi. TGF- β 3'ün p38 mitojen-aktif protein (MAP) kinaz yolağı yoluyla Sertoli hücre TJ dinamiklerini in vitro ortamda düzenlemektedir. TGF- β 3'ün spermatogenez'in evresi I-X'de bulunduğu; VII ve VIII aşamalarında sadece spermatosit ve yuvarlak spermatidlerde gözlendiği, elongate spermatidlerde bulunmadığı, ayrıca evre X-XIV arasında gözlenmediği bildirilmiştir. Bu ekspresyon paterni Evre VII'de BTB açılmasını ve leptoten aşamasındaki spermatositin BTB'den geçmesini sağladığı ileri sürülmektedir (Lui ve ark. 2003). Sertoli hücreleri ile yapılan kültür çalışmasında, TJ'lerin birleştirildiği sırada, TGF- β 2 ve TGF- β 3'te önemli bir düşüş olduğunu göstermiştir.

Ayrıca, bu kültürlerde rekombinant TGF- β 2 ve TGF - β 3 eklenmesi durumunda, Sertoli hücresi TJ geçirgenlik bariyerine doza bağılı olarak etki ederek tersine çevirebildiği gösterilmiştir (Lui ve ark. 2001).

Kanser tedavilerinde siklofosfamid uygulamalarının testis dokusunda geçici veya kalıcı hasara yol açtığı, infertiliteye neden olduğu bilinmektedir. Siklofosfamid verilmiş farelerde sperm sayısı ve motilitesinde belirgin azalma olduğu ve bu değişikliklerin testiküler hasara bağılı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Siklofosfamid verilmiş farelerin testis doku örneklerinin, immunohistokimyasal teknik kullanılarak TGF- β 3 primer antikoru ile boyanmış preparatlarının incelenmesi sonucunda immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi. Uygulama sonrasında Tgf- β 3 immunoreaktivitesinin artmış (**210.50 $\pm$ 27,6**) olması, siklofosfamidin etkisinin Tgf- β 3 üzerinden olabileceğini düşündürdü. Tgf- β 3'ün okludin miktarını azaltarak hücrel bağlantıları zayıflattığı göz önüne alındığında, siklofosfamidin testiküler hasar ve infertiliteye sebep olmasının nedenlerinden birinin de TGF- β 3 immunoreaktivitesinin neden olması ileri sürülebilir. Kan-testis bariyeri, germ hücrelerinin gelişimi ve olgunlaşması için özel bir mikro ortam yaratmakta, ancak spermatogenik seriye ait hücrelerin luminal tarafa geçişine izin vermek amacı ile açılıp-kapanmalıdır. Bariyer fonksiyonunun ve bütünlüğünün bozulması sonucunda toksik maddeler spermatogenik hücreleri etkiler. Böylece testis hasarına ve infertiliteye neden olmaktadır (Cheng ve Mruk 2012; Mital ve ark. 2011).

TGF- β 3'ün, TJ fonksiyonunun bozulmasının yanı sıra, kan testis bariyerini geçemeyen germ hücrelerinin apoptoza uğramasına ve spermatogenezin bozulmasına da yol açtığı bilinmektedir. TGF- β 3 fonksiyonu ortadan kaldırıldığı çalışmada, kan testis bariyerindeki preleptoten ve leptoten spermatositlerinin girişi gerçekleşmez, bazalden adluminal bölgeye doğru ilerleme ve spermatogenez bloke edilmiş olur (Russell, 1977).

Siklofosfamid uygulanan hayvanlarda Sertoli hücrelerinde morfolojik ve fonksiyonel hasarlar oluştuğu bunun sonucunda kan testis bariyerinin bozulduğu ve fonksiyonel proteinlerin anormal sentezinin gözlemlendiği gösterilmiştir (Aghaie ve ark. 2015). Bu etkinin kemoterapötiklerin yarattığı oksidatif strese bağlı olduğu ileri sürülmektedir (Ghosh ve ark. 2002).

Yapılan çalışmada kontrol grubunda bulunan farelerde okludin'in (**223.00 ± 20.5**) değerinde sham grubunda ise (**212.00 ± 15.9**) benzer değerde immunoreaktivitesi tespit edildi. Bu immunoreaktivitenin Sertoli hücreleri sitoplazmasında sıkı bağlantı kompleksleri olarak gözlenmesi nedeni ile okludin'in kan testis bariyerinin yapısal elemanı olduğu, germ hücrelerinin mayozu ve olgunlaşması için özel ve korumalı bir ortam yarattığı bildirilmiştir (Dym ve Fawcett 1970; Maddocks ve Setchell 1990; Tsukitave ark. 2001).

Bu çalışmada okludinin seminiferöz tübüllerin bazal bölgelerinde belirgin olarak bulunması, germ hücrelerinin olgunlaşmasında önemli rol oynadığının bir belirtisi olarak değerlendirildi. Okludinin, erken embriyonik dönemde ve post- natal dönemde Sertoli hücreleri arasında kan testis bariyeri oluşması aşamalarında ortaya çıktığı gözlenmiştir. (Hermo L ve ark. ,1999)

Sertoli hücreleri arasında bulunan kan testis bariyeri, otoimmün cevaptan korunmanın yanı sıra, farklılaşmakta olan hücreler için de uygun ortam sağlamaktadır. Sertoli hücreleri tek doz difteri toksini ile ortadan kaldırıldığında, enjeksiyondan 30 gün sonra germ hücreleri kaybolmakta ve birçok tüp asellüler hale gelmektedir. Bir yıl sonra incelendiğinde ise tübüllerin büzüştüğü ve kalsiyum ile dolduğu gösterilmiş, Sertoli hücrelerinin kaybının spermatogenez ve spermatogonyal kök hücrelerin kaybına neden olduğu bildirilmiştir (Rebourcet D ve ark. 2014).

İntratestiküler sentetik okludin uygulamasından 27 gün sonra seminiferöz tübüllerden germ hücrelerinin geri dönüşümlü olarak ortadan kalktığı gösterilmiştir (Chung ve ark. 2001).

Bununla beraber okludin eksik embriyonik kök hücrelerden farklılaşan polarize epitelyal hücrelerde, TJ gelişiminin gözlenmesi nedeni ile diğer proteinler ile okludin arasında birbirini tamamlama fonksiyonu olduğu biçiminde değerlendirilmektedir (Saitou ve ark. 1998).

Siklofosfamid (CP) verilmiş farelerin testis doku örneklerinin, immunohistokimyasal teknik kullanılarak okludin primer antikoru ile boyanmış preparatlarının, incelenmesi sonucunda immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı tespit edildi. Uygulama sonrasında okludin immunoreaktivitesinin azalmış (187.50 ± 23.26) olması, siklofosfamidin, testis Sertoli hücreleri ve testis kan bariyerinde de hasar oluşturduğunun bir belirtisi olarak değerlendirildi.

Siklofosfamidin testis dokusunda okludin üzerine etkilerini inceleyen tek bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada siklofosfamid uygulamasının, Sertoli hücreleri tarafından immunoreaktivite edilen okludinin azaldığını, böylece seminiferöz tübüllerin mikro çevresinin bozulduğunu, L carnitine verilerek bu bozulmanın önüne geçilebileceği ileri sürülmektedir (Cao ve ark. 2016).

Siklofosfamidin sıkı bağlantı kompleksi üzerine etkileri mesane ve intestinal sistemde incelenmiştir. Mesanede yapılan çalışmada CP uygulamasının mesane epitelinde kalınlaşmaya ve ödeme neden olduğu bu değişiklikten okludin seviyesinin sorumlu olduğunu, serumda okludin seviyesinin artmış olduğunu ve bu artışın sıkı bağlantı kompleksinde yapısal bozukluğa bağlı olduğunu bildirmişlerdir ve blebbistatin uygulamasının ise serum düzeyini azalttığını göstermişlerdir (Wróbel ve ark. 2019). İntestinal sistemde yapılan çalışmada oluşturulan sepsis örneklerinde okludin ekspresyonunun düşük olduğunu buna karşılık imipenem ile düşük siklofosfamid uygulamasının okludin immunoreaktivitesinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Guo ve ark. 2018).

Bu çalışmada, kontrol grubu ve sham grubuna ait örneklerin mir-34b ve mir-34c ekspresyonunun PCR tekniği ile incelenmesinde, kontrol grubuna ait değerlerin siklofosfamid grubuna göre 2-3 kat fazla olduğu tespit edildi. Siklofosfamid kullanımından sonra testis dokusunun değerlendirilmesinde mir-34b ve mir-34c ekspresyonunun spermatogenez ve fertilite durum değerlendirmesi için kullanılabileceği düşünüldü. mir-34 ailesinin üyelerinden olan miR34a kardiyak fonksiyonları düzenlerken, mir-34b/c ise spermatogenez ve sperm motilitesi üzerinde de etkili olmaktadır. Mir-34b-/c- farelerin hem erkek, hemde dişide infertil olduğu ve sperm sayısının 60 kat düştüğü gösterilmiştir.

MikroRNA-34b-/c- farelerin spermalarında morfolojilerinin bozuk olduğu ve immatür oldukları gösterilmiştir (Comazzetto ve ark. 2014). Bu tablo oligoastenoteratozoospermi olarak tanımlanmakta ve erkek infertilitesinin ana nedenini oluşturmaktadır. CP verilen grupta spermatogenezin bozulmuş olması mir-34b ve mir-34c'nin azalmış olması ile ilişkili olabileceği ileri sürülebilir. Mir-34b-/c- farelerin seminiferöz tübüllerinde incelemeye neden olduğu, germ hücrelerinin normal görünmesine rağmen pakiten safhasından itibaren sayısının azaldığı gösterilmiştir. Bu farelerde kalan yuvarlak spermatitlerin spermiyogenezin son aşamasına kadar ilerlediği, ancak uzamış spermatitlerin sayısında belirgin azalma olduğu gözlenmiştir.

Buna ek olarak pakiten aşamasındaki ve uzamış spermatitlerde apoptoz insidansının da anlamlı biçimde arttığı gösterilmiştir (Comazzetto S ve ark. 2014). Bununla beraber, mir-34b ve mir-34c'nin testis hasarı üzerine etkileri üzerinde tam bir fikir birliği bulunmamaktadır. mir34-b'nin subfertil ve non-obstrüktif azospermi vakalarında düşük eksprese edildiğini (Abu-Halima ve ark. 2014) ileri süren çalışmaların yanı sıra, streptozisin ile oluşturan diyabetik erkek farelerde ortaya çıkan mir-34b ekspresyonunun artmış olduğunu bildiren yayınlar da bulunmaktadır. mir-34b ve mir-34c'nin bu etkileri göz önüne alındığında spermatogenezde önemli fonksiyon gösterdiği sonucuna varılabilir.

MikroRNA-34c'nin testiste eksprese edilmekte, hedef proteinleri düzenleyerek spermatogeneze katılmaktadır. mir-34c'nin ATF1 aracılığı ile germ hücre apoptozunu arttırdığını ve E2F-pRb yolağı ile testiküler gelişmeyi ve spermatogenezi kontrol ettiği ileri sürülmektedir (Comazzetto ve ark. 2014).

SSC'leri germ hücre kültür çalışmalarında da mir-34c'nin SSC farklılaşmasını arttırdığı gösterilmiştir (Yu M. ve ark. 2014).

Hem kriptorşidizmlı hastaların hemde cerrahi yolla kriptorşidizm oluşturulan farelerin testis örneklerinde mir-34c'nin azaldığını hem western-blot hemde RT-PCR tekniği ile gösterilmiştir (Huang ve ark. 2018). Maymunlarda oluşturulan hipertermi modelinde mir-34c-5p ekspresyonunun azaldığını (Sakurai ve ark. 2016) göstermişler ve her iki çalışma da mir-34c'nin biyolojik belirteç olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Buna karşılık, oligoastenoteratozoospermi ve non-obstrüktiv azospermi infertil erkeklerde mir-34c ekspresyonunun arttığını ileri süren çalışma da bulunmaktadır (Rahbar ve ark. 2017).

Bu çalışmada kontrol ve sham grubunda; hem de CP verilen gruplara ait plazma örneklerinde endojen genlerin ekspresyonunun normal olarak gözlenmesine rağmen, mir-34b/c ifadesinin olmadığı gözlemlendi. Bu durumun, farelerden alınabilen kan örnekleri miktarının azlığına bağlı olarak yeteri kadar mir-34b/c elde edilememiş olması veya mevcut tekniklerin az miktarda bulunan mir-34b/c ekspresyonunu tespit edememesi olabileceğini düşündürdü.

Bununla beraber insanlarda yapılan çalışmalarda, mir-34b/c ekspresyonunun çeşitli hastalıklarda alınan plazma örneklerinde varlığı gösterilmiştir. mir-34'ün ovarian kanserleri vakalarında kan örneklerinde bulunduğu ve teşhis amaçlı bir belirteç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Márton ve ark. 2019; Correa ve ark. 2016). MikroRNA-34c ekspresyonunun da intrahepatik kolanjiokarsinom vakalarının plazma örneklerinde kontrol grubuna göre 4 kat fazla olduğu gösterilmiştir (Correa ve ark. 2016). Buna ilave olarak da 2019 yılında yayınlanan çalışmada, yeni bir teknik olarak sunulan Droplet digital PCR tekniği ile malign plevral mezotelyoma vakalarında mir-34b ve mir-34c ekspresyonu tespit edilmiş ve mir-34b/c metilasyonunun hastalığın progresyonun tahmin edilmesinde bir biyobelirteç olabileceği bildirilmiştir (Sato ve ark. 2019).

Kemoterapi uygulaması sırasında ve sonrasında spermatogenez takip etmenin ve ortaya çıkan azospermi tanısını koymanın, testiküler biyopsi dışında bir yöntemi bulunmamaktadır. Bununla beraber son yıllarda mikroRNA'ların çeşitli hastalıkların teşhis ve tedavilerinin izlenmesi amacı ile kullanılabileceğine ait yayınlar da bulunmaktadır. Bu çalışmada, CP verilen farelerin testis örneklerinin incelenmesinde; GDNF ve okludin ekspresyonlarının azaldığını, TGF- β 3 immunoreaktivitesinin ise arttığını ve böylece testis hasarının ortaya çıkmasından bu moleküllerin sorumlu olduğu tespit edildi. Testis doku örneklerinden yapılan mir-34b/c ekspresyonunun incelemesinde de CP uygulanan grupta ekspresyonun belirgin olarak azaldığı tespit edildi, mir-34b/c ekspresyonunun testis doku hasarının belirlenmesinde bir belirteç olarak kullanılabileceği sonucuna varıldı. Testis doku örneklerinde gözlenen mir-34b/c ekspresyonun farkının kan örneklerine yansımamasının en önemli nedeninin teknik yetersizlikle ilgili olduğu düşünüldü. Bununla beraber, plazmada bulunan mir-34b/c ekspresyonunu mikroRNA izolasyon kitindeki gelişmelere ve Droplet digital PCR tekniği gibi yeni RT-PCR tekniğinin kullanımına bağlı olarak gerçekleşmesinin yakın tarihte mümkün olabileceği ileri sürülebilir.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, kontrol ve sham grubuna ait farelerin GDNF primer antikoru ile boyanmış testis doku örneklerine ait preparatlarının incelenmesi sonucunda GDNF ekspresyonunun oldukça fazla (**H-score: 221.00 ± 8.5 - 220.50 ± 7.7**) olduğu tespit edildi ve GDNF spermatogenezi hem sayısal, hem de farklılaşma yolu ile desteklediği sonucuna varıldı.

Siklofosfamid verilmiş GDNF primer antikoru ile boyanmış prepaSıçanlarının, incelenmesi sonucunda ekspresyonun kontrol ve sham grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı tespit edildi. Uygulama sonrasında GDNF ekspresyonunun azalmış (**170.00 ± 14.8**) olması, siklofosfamidin spermatogenez üzerine negatif etkisinin GDNF azalmasına bağlı olabileceği düşünüldü.

Yaptığımız çalışmada kontrol grubunda ve sham grubunda bulunan farelerde özellikle bazal bölgelerde ve spermatidlerde TGF- $\beta 3$ 'ün orta düzeyde eksprese edilmesi (**H-score: 163.00 ± 13.8 - 168.00 ± 10.1**), TGF- $\beta 3$ 'ün spermatogenez mekanizmasında önemli rol oynadığını, spermatitlerde gözlenmesinin ise spermatit maturasyonunda görev aldığı bir göstergesi olarak değerlendirildi.

Siklofosfamid verilmiş farelerin testis doku örneklerinin, TGF- $\beta 3$ immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı (**210.50 ± 27.6**). tespit edildi ve siklofosfamidin etkisinin Tgf- $\beta 3$ üzerinden olabileceğini düşündürdü. Tgf- $\beta 3$, okludin miktarını azaltarak hücrel bağlantıları zayıflattığı göz önüne alındığında, siklofosfamidin testiküler hasar ve infertiliteye neden olmasının nedenlerinden birinin TGF- $\beta 3$ artışına neden olması ileri sürülebilir.

Yapılan çalışmada kontrol grubunda ve sham grubunda bulunan farelerde okludin primer antikoru ile boyanmış preparatlarının, incelenmesi sonucunda ekspresyonun kontrol ve sham grubunda (**223.00 ± 20.5 - 212.00 ± 15.9**) fazla miktarda ekspresyon olduğu gözlemlendi. Bu durum okludin Sertoli hücrelerindeki kan testis bariyerinin yapısına katıldığına bir göstergesi olarak değerlendirildi.

Siklofosfamid verilmiş farelerin testis doku örneklerinde okludin immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı (**187.50 ± 23,26**) tespit edildi. Uygulama sonrasında okludin immunoreaktivitesinin azalmış olması, siklofosfamidin, testis Sertoli hücreleri ve testis kan bariyerinde de hasar oluşturduğuna bir belirtisi olarak değerlendirildi.

Kontrol grubu ve sham grubuna ait doku örneklerinde mir-34b ve mir-34c ekspresyonunun PCR tekniği ile incelenmesinde, kontrol grubuna ait değerlerin siklofosfamid grubuna göre 2-3 kat fazla olduğu tespit edildi. Siklofosfamid kullanımından sonra testis dokusunun değerlendirilmesinde mir-34b ve mir-34c ekspresyonunun spermatogenez ve fertilite durum değerlendirmesi için kullanılabileceği düşünüldü.

Kontrol ve sham grubu ile CP verilen gruplara ait plazma örneklerinde endojen genlerin ekspresyonun normal olarak gözlenmesine rağmen, mir-34b/c ifadesinin olmadığı gözlemlendi. Bu durumun, farelerden alınabilen kan örnekleri miktarının azlığına bağlı olarak yeteri kadar mir-34b/c elde edilememiş olması veya mevcut tekniklerin az miktarda bulunan mir-34b/c ekspresyonunu tespit edememesi olabileceğini düşündürdü.

Bu çalışmada, CP'nin neden olduğu testis hasarında GDNF, okludin ve TGF-β3 ekspresyonlarının önemli rol oynadığı, doku örneklerinde mir-34b ve mir-34c ekspresyonlarında ortaya çıkan azalmanın, testis hasarının belirlenmesinde önemli bir belirteç olabileceği ancak plazmada tespit edilebilmesi için örnek miktarının artırılması, spesifik kitlerin kullanılmasına ihtiyaç olduğu sonucuna varıldı.

8. KAYNAKLAR

Abraham, J., Abreu, P., Aglietta, M., Ahn, E. J., Allard, D., Allekotte, I., ...& Andringa, S. (2010). Measurement of the depth of maximum of extensive air showers above 10¹⁸ eV. *Physical review letters*, 104(9), 091101.

Abbott, B. P., Abbott, R., Abbott, T. D., Abernathy, M. R., Acernese, F., Ackley, K., ... & Adya, V. B. (2016). Observation of gravitational waves from a binary black hole merger. *Physical review letters*, 116(6), 061102.

Aaboud, M., Aad, G., Abbott, B., Abdallah, J., Abdinov, O., Abeloos, B., ... & Abreu, R. (2017). Electron efficiency measurements with the ATLAS detector using 2012 LHC proton–proton collision data. *The European Physical Journal C*, 77(3), 195.

Abu-Halima, M., Backes, C., Leidinger, P., Keller, A., Lubbad, A. M., Hammadeh, M., & Meese, E. (2014). MicroRNA expression profiles in human testicular tissues of infertile men with different histopathologic patterns. *Fertility and sterility*, 101(1), 78-86.

Aceto, N., Bardia, A., Miyamoto, D. T., Donaldson, M. C., Wittner, B. S., Spencer, J. A., ... & Brannigan, B. W. (2014). Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*, 158(5), 1110-1122.

Aghanim, N., Akrami, Y., Ashdown, M., Aumont, J., Baccigalupi, C., Ballardini, M., ... & Battye, R. (2018). Planck 2018 results. VI. Cosmological parameters. *arXiv preprint arXiv:1807.06209*.

Agostini, M., & Knight, R. A. (2014). mir-34: from bench to bedside. *Oncotarget*, 5(4), 872.

Ahmed, M. B., Zhou, J. L., Ngo, H. H., Guo, W., Thomaidis, N. S., & Xu, J. (2017). Progress in the biological and chemical treatment technologies for emerging contaminant removal from wastewater: a critical review. *Journal of hazardous materials*, 323, 274-298.

Airaksinen, M. S., & Saarma, M. (2002). The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(5), 383.

Amsterdam, E. A., Wenger, N. K., Brindis, R. G., Casey, D. E., Ganiats, T. G., Holmes, D. R., ... & Levine, G. N. (2014). 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*, 64(24), e139-e228.

Anderson, J. M., & Van Itallie, C. M. (2009). Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(2), a002584.

Arafa, H. M. M., Aly, H. A. A., Abd-Ellah, M. F., & El-Refaey, H. M. (2009). Hesperidin attenuates benzo [a] pyrene-induced testicular toxicity in Sığans via regulation of oxidant/antioxidant balance. *Toxicology and industrial health*, 25(6), 417-427.

Argani, P., Lal, P., Hutchinson, B., Lui, M. Y., Reuter, V. E., & Ladanyi, M. (2003). Aberrant nuclear immunoreactivity for TFE3 in neoplasms with TFE3 gene fusions: a sensitive and specific immunohistochemical assay. *The American journal of surgical pathology*, 27(6), 750-761.

Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., & Lake, R. J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, 284(5415), 770-776.

Atfi, A., Djelloul, S., Chastre, E., Davis, R., & Gespach, C. (1997). Evidence for a role of Rho-like GTPases and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) in transforming growth factor β -mediated signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 272(3), 1429-1432.

Baker, J. T., Leskovar, D. I., Reddy, V. R., & Dainello, F. J. (2001). A simple phenological model of muskmelon development. *Annals of Botany*, 87(5), 615-621.

Bakhtiary, Z., Shahrooz, R., Ahmadi, A., & Zarei, L. (2014). Evaluation of antioxidant effects of crocin on sperm quality in cyclophosphamide treated adult mice. In *Veterinary research forum: an international quarterly journal* (Vol. 5, No. 3, p. 213). Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Balázs, M., Rassoul-Agha, F., & Seppäläinen, T. (2019). Large deviations and wandering exponent for random walk in a dynamic beta environment. *The Annals of Probability*, 47(4), 2186-2229.

Balda, M. S., Whitney, J. A., Flores, C., González, S., Cereijido, M., & Matter, K. (1996). Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *The Journal of cell biology*, 134(4), 1031-1049.

Baloh, R. H., Tansey, M. G., Golden, J. P., Creedon, D. J., Heuckeroth, R. O., Keck, C. L., ... & Milbrandt, J. (1997). TrnR2, a novel receptor that mediates neurturin and GDNF signaling through Ret. *Neuron*, 18(5), 793-802.

Bandurin, D. A., Tyurnina, A. V., Geliang, L. Y., Mishchenko, A., Zólyomi, V., Morozov, S. V., ... & Kovalyuk, Z. D. (2017). High electron mobility, quantum Hall effect and anomalous optical response in atomically thin InSe. *Nature nanotechnology*, 12(3), 223.

Bao, J., Tang, B., & Chen, X. (1999). Copolymerization of epoxy and cyanate [J]. *Acta Polymerica Sinica*, 2.

Barrios-Rodiles, M., Brown, K. R., Ozdamar, B., Bose, R., Liu, Z., Donovan, R. S., ... & Luga, V. (2005). High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science*, 307(5715), 1621-1625.

Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*, 116(2), 281-297.

Bassett, A. R., Akhtar, A., Barlow, D. P., Bird, A. P., Brockdorff, N., Duboule, D., ... & Higgs, D. R. (2014). Science forum: considerations when investigating lncRNA function in vivo. *elife*, 3, e03058.

Battaglia, G., Molinaro, G., Riozzi, B., Storto, M., Busceti, C. L., Spinsanti, P., ... & Corsi, M. (2009). Activation of mGlu3 receptors stimulates the production of GDNF in striatal neurons. *PLoS One*, 4(8), e6591.

Beale, J. M., & Block, J. H. (Eds.). (2011). Wilson and Gisvold's Textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry.

Bergmann, M., Brohmann, B., Hoffmann, E., Loibl, M. C., Rehaag, R., Schramm, E., & Voß, J. P. (2005). Quality criteria of transdisciplinary research. *A guide for the formative evaluation of research projects. ISOE-Studientexte*, 13.

Berhe, T. A., Su, W. N., Chen, C. H., Pan, C. J., Cheng, J. H., Chen, H. M., ... & Hwang, B. J. (2016). Organometal halide perovskite solar cells: degradation and stability. *Energy & Environmental Science*, 9(2), 323-356.

Bhushan, S., & Meinhardt, A. (2017). The macrophages in testis function. *Journal of reproductive immunology*, 119, 107-112.

Björkgren, I., Gylling, H., Turunen, H., Huhtaniemi, I., Strauss, L., Poutanen, M., & Sipilä, P. (2014). Imbalanced lipid homeostasis in the conditional Dicer1 knockout mouse epididymis causes instability of the sperm membrane. *The FASEB Journal*, 29(2), 433-442.

Boehm, M., & Slack, F. (2005). A developmental timing microRNA and its target regulate life span in *C. elegans*. *Science*, 310(5756), 1954-1957.

Bouhallier, F., Allioli, N., Lavial, F., Chalmel, F., Perrard, M. H., Durand, P., ... & Rouault, J. P. (2010). Role of mir-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis. *Rna*, 16(4), 720-731.

Cai, L., & Tu, B. P. (2011, January). On acetyl-CoA as a gauge of cellular metabolic state. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 76, pp. 195-202). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Cereiido, M., Shoshani, L., & Contreras, R. G. (2000). Molecular Physiology and Pathophysiology of Tight Junctions I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 279(3), G477-G482.

Chan, K. K., Oza, A. M., & Siu, L. L. (2003). The statins as anticancer agents. *Clinical cancer research*, 9(1), 10-19.

Chen, H., Shao, M., & Li, Y. (2008). The characteristics of soil water cycle and water balance on steep grassland under natural and simulated rainfall conditions in the Loess Plateau of China. *Journal of hydrology*, 360(1-4), 242-251.

Chen, W., Zheng, R., Baade, P. D., Zhang, S., Zeng, H., Bray, F., ... & He, J. (2016). Cancer statistics in China, 2015. *CA: a cancer journal for clinicians*, 66(2), 115-132.

Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2002). Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiological reviews*, 82(4), 825-874.

Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2012). The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological reviews*, 64(1), 16-64.

Cik, M., Masure, S., Lesage, A. S., Van der Linden, I., Van Gompel, P., Pangalos, M. N., ... & Leysen, J. E. (2000). Binding of GDNF and neurturin to human GDNF family receptor α 1 and 2 influence of cRET and cooperative interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 275(36), 27505-27512.

Collie, K. J., Sarder, M. J., Sotiriades, A. D., Dehn, J. J., Jenison, L., & Sato, H. (2019). *U.S. Patent Application No. 10/167,789*.

Comazzetto, S., Di Giacomo, M., Rasmussen, K. D., Much, C., Azzi, C., Perlas, E., ... & O'Carroll, D. (2014). Oligoasthenoteratozoospermia and infertility in mice deficient for mir-34b/c and miR-449 loci. *PLoS genetics*, *10*(10), e1004597.

Contino, R., Curtin, D., Katz, A., Mangano, M. L., Panico, G., Ramsey-Musolf, M. J., ... & Behr, J. K. (2016). Physics at a 100 TeV pp collider: Higgs and EW symmetry breaking studies. *arXiv preprint arXiv:1606.09408*.

Correa-Gallego, C., Maddalo, D., Doussot, A., Kemeny, N., Kingham, T. P., Allen, P. J., ... & Jarnagin, W. R. (2016). Circulating plasma levels of microRNA-21 and microRNA-221 are potential diagnostic markers for primary intrahepatic cholang

Costantini, F., & Kopan, R. (2010). Patterning a complex organ: branching morphogenesis and nephron segmentation in kidney development. *Developmental cell*, *18*(5), 698-712.

Cyr, D. G., Hermo, L., Egenberger, N., Mertineit, C., Trasler, J. M., & Laird, D. W. (1999). Cellular immunolocalization of Okludin during embryonic and postnatal development of the mouse testis and epididymis. *Endocrinology*, *140*(8), 3815-3825.

Davidoff, F., DeAngelis, C. D., Drazen, J. M., Hoey, J., Højgaard, L., Horton, R., ... & Sox, H. C. (2001). Sponsorship, authorship, and accountability. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, *127*(10), 1178-1180.

De Kretser, D. M., & Kerr, J. B. (1994). The physiology of Reproduction. *Knobil, E*, 837-932.

Deo, K., Ang, D., Gordon, C., & Aldrich-Wright, J. (2016). Transition metal intercalators as anticancer agents—Recent advances. *International journal of molecular sciences*, 17(11), 1818.

Derynck, R., Zhang, Y., & Feng, X. H. (1998). Transcriptional activators of TGF- β responses: Smads. *Cell*, 95(6), 737-740.

Di Liberto, V., Mudò, G., & Belluardo, N. (2011). mGluR2/3 agonist LY379268, by enhancing the production of GDNF, induces a time-related phosphorylation of RET receptor and intracellular signaling Erk1/2 in mouse striatum. *Neuropharmacology*, 61(4), 638-645.

Di Martino, M. T., Leone, E., Amodio, N., Foresta, U., Lionetti, M., Pitari, M. R., ... & Tomaino, V. (2012). Synthetic mir-34a mimics as a novel therapeutic agent for multiple myeloma: in vitro and in vivo evidence. *Clinical cancer research*, 18(22), 6260-6270.

Ding, D., & Gebel, K. (2012). Built environment, physical activity, and obesity: what have we learned from reviewing the literature?. *Health & place*, 18(1), 100-105.

Ding, L. J., Yan, G. J., Ge, Q. Y., Yu, F., Zhao, X., Diao, Z. Y., ... & Hu, Y. L. (2011). FSH acts on the proliferation of type A spermatogonia via Nur77 that increases GDNF expression in the Sertoli cells. *FEBS letters*, 585(15), 2437-2444.

Doxaki, C., Kampranis, S. C., Eliopoulos, A. G., Spilianakis, C., & Tsatsanis, C. (2015). Coordinated regulation of miR-155 and miR-146a genes during induction of endotoxin tolerance in macrophages. *The Journal of Immunology*, 195(12), 5750-5761.

Drinkut, A., Tillack, K., Meka, D. P., Schulz, J. B., Kügler, S., & Kramer, E. R. (2016). Ret is essential to mediate GDNF's neuroprotective and neuroregenerative effect in a Parkinson disease mouse model. *Cell death & disease*, 7(9), e2359.

Drumond, A. L., Meistrich, M. L., & Chiarini-Garcia, H. (2011). Spermatogonial morphology and kinetics during testis development in mice: a high-resolution light microscopy approach. *Reproduction (Cambridge, England)*, 142(1), 145-155.

Ducy, P., Schinke, T., & Karsenty, G. (2000). The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*, 289(5484), 1501-1504.

Dym, M. (1994). Spermatogonial stem cells of the testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(24), 11287.

Dym, M., & Carlos Cavicchia, J. (1978). Functional morphology of the testis. *Biology of Reproduction*, 18(1), 1-15.

Dym, M., & Fawcett, D. W. (1970). The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biology of reproduction*, 3(3), 308-326.

Eaton, S. L., Roche, S. L., Hurtado, M. L., Oldknow, K. J., Farquharson, C., Gillingwater, T. H., & Wishart, T. M. (2013). Total protein analysis as a reliable loading control for quantitative fluorescent Western blotting. *PloS one*, 8(8), e72457.

Elkin, E. B., Atoria, C. L., Leoce, N., Bach, P. B., & Schrag, D. (2013). Changes in the availability of screening mammography, 2000–2010. *Cancer*, 119(21), 3847-3853.

Endo, A., Hayashi, R., & Iwasaki, T. (2008). *U.S. Patent No. 7,411,209*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Eppert, K., Scherer, S. W., Ozcelik, H., Pirone, R., Hoodless, P., Kim, H., ... & Thomsen, G. H. (1996). MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGF β -regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell*, 86(4), 543-552.

Falschlehner, C., Emmerich, C. H., Gerlach, B., & Walczak, H. (2007). TRAIL signalling: decisions between life and death. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(7-8), 1462-1475.

Farquhar, M. G., & Palade, G. E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *The Journal of cell biology*, 17(2), 375-412.

Fischer, A., & Gessler, M. (2007). Delta-Notch—and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nucleic acids research*, 35(14), 4583-4596.

Flicek, P., Amode, M. R., Barrell, D., Beal, K., Billis, K., Brent, S., ... & Gil, L. (2013). Ensembl 2014. *Nucleic acids research*, 42(D1), D749-D755.

Fouchécourt, S., Godet, M., Sabido, O., & Durand, P. (2006). Glial cell-line-derived neurotropic factor and its receptors are expressed by germinal and somatic cells of the rat testis. *Journal of endocrinology*, 190(1), 59-71.

Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., & Tsukita, S. (1993). Okcludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *The Journal of cell biology*, 123(6), 1777-1788.

Galon, J., Mlecnik, B., Bindea, G., Angell, H. K., Berger, A., Lagorce, C., ... & Nagtegaal, I. D. (2014). Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *The Journal of pathology*, 232(2), 199-209.

Gandini, L., Lombardo, F., Lenzi, A., Spano, M., & Dondero, F. (2006). Cryopreservation and sperm DNA integrity. *Cell and tissue banking*, 7(2), 91-98.

Garcia, T. X., Costa, G. M., França, L. R., & Hofmann, M. C. (2014). Sub-acute intravenous administration of silver nanoparticles in male mice alters Leydig cell function and testosterone levels. *Reproductive Toxicology*, 45, 59-70.

Garcia, T. X., Farmaha, J. K., Kow, S., & Hofmann, M. C. (2014). RBPJ in mouse Sertoli cells is required for proper regulation of the testis stem cell niche. *Development*, 141(23), 4468-4478.

Garcia, T. X., Parekh, P., Gandhi, P., Sinha, K., & Hofmann, M. C. (2017). The NOTCH Ligand JAG1 regulates GDNF expression in Sertoli cells. *Stem cells and development*, 26(8), 585-598.

Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2006). *Color textbook of histology e-book*. Elsevier Health Sciences.

Gebremedhn, S., Salilew-Wondim, D., Hoelker, M., Rings, F., Neuhoff, C., Tholen, E., ... & Tesfaye, D. (2016). MicroRNA-183-96-182 cluster regulates bovine granulosa cell proliferation and cell cycle transition by coordinately targeting FOXO1. *Biology of reproduction*, 94(6), 127-1.

Giannakis, M., Mu, X. J., Shukla, S. A., Qian, Z. R., Cohen, O., Nishihara, R., ... & Sukawa, Y. (2016). Genomic correlates of immune-cell infiltrates in colorectal carcinoma. *Cell reports*, 15(4), 857-865.

Giordano, V., Gangale, F., Fulli, G., Jiménez, M. S., Onyeji, I., Colta, A., ... & Maschio, I. (2011). Smart Grid projects in Europe: lessons learned and current developments. *JRC Reference Reports, Publications Office of the European Union*.

Gliki, G., Ebnet, K., Aurrand-Lions, M., Imhof, B. A., & Adams, R. H. (2004). Spermatid differentiation requires the assembly of a cell polarity complex downstream of junctional adhesion molecule-C. *Nature*, 431(7006), 320.

GSiçanaroli, R., Vindrieux, D., Gougeon, A., & Benahmed, M. (2002). Expression of tumor necrosis factor- α -related apoptoz-inducing ligand and its receptors in rat testis during development. *Biology of reproduction*, 66(6), 1707-1715.

GSiçanaroli, R., Vindrieux, D., Selva, J., Felsenheld, C., Ruffion, A., Decaussin, M., & Benahmed, M. (2004). Characterization of tumour necrosis factor- α related apoptosis inducing ligand and its receptors in the adult human testis. *Molecular human reproduction*, 10(2), 123-128.

Gregory, S. G., Schmidt, S., Seth, P., Oksenberg, J. R., Hart, J., Prokop, A., ... & Lincoln, R. (2007). Interleukin 7 receptor α chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nature genetics*, 39(9), 1083.

Grimm, D., Streetz, K. L., Jopling, C. L., Storm, T. A., Pandey, K., Davis, C. R., ... & Kay, M. A. (2006). Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*, 441(7092), 537.

Gure, A. O., Türeci, Ö., Sahin, U., Tsang, S., Scanlan, M. J., Jäger, E., ... & Chen, Y. T. (1997). SSX: a multigene family with several members transcribed in normal testis and human cancer. *International journal of cancer*, 72(6), 965-971.

Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(8), 509.

Hajiahmadi, S., Panjehpour, M., Aghaei, M., & Shabani, M. (2015). Activation of A2b adenosine receptor regulates ovarian cancer cell growth: involvement of Bax/Bcl-2 and caspase-3. *Biochemistry and Cell Biology*, 93(4), 321-329.

Halat, M. (2018). *Sıçanlarda metotreksat kaynaklı testis hasarı üzerine mezenkimal kök hücrenin histopatolojik etkisi* (Master's thesis, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü).

Hall, A. G., & Tilby, M. J. (1992). Mechanisms of action of, and modes of resistance to, alkylating agents used in the treatment of haematological malignancies. *Blood reviews*, 6(3), 163-173.

Hanrieder, J., Nyakas, A., Naessén, T., & Bergquist, J. (2007). Proteomic analysis of human follicular fluid using an alternative bottom-up approach. *Journal of proteome research*, 7(01), 443-449.

Hans, C. P., Weisenburger, D. D., Greiner, T. C., Gascoyne, R. D., Delabie, J., Ott, G., ... & Pan, Z. (2004). Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*, 103(1), 275-282.

Harhaj, N. S., & Antonetti, D. A. (2004). Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(7), 1206-1237.

Hartsough, M. T., & Mulder, K. M. (1995). Transforming growth factor β activation of p44mapk in proliferating cultures of epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 270(13), 7117-7124.

Hasegawa, M., Wilson, G., Russell, L. D., & Meistrich, M. L. (1997). Radiation-induced cell death in the mouse testis: relationship to apoptosis. *Radiation research*, 147(4), 457-467.

Hausmann, R., Tyson, L. D. A., & Zahidi, S. (2012, August). The global gender gap report 2012. Geneva: World Economic Forum.

Hayashi, K., de Sousa Lopes, S. M. C., Tang, F., & Surani, M. A. (2008). Dynamic equilibrium and heterogeneity of mouse pluripotent stem cells with distinct functional and epigenetic states. *Cell stem cell*, 3(4), 391-401.

He, L., He, X., Lim, L. P., De Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., ... & Jackson, A. L. (2007). A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*, 447(7148), 1130.

He, Z., Jiang, J., Hofmann, M. C., & Dym, M. (2007). Gfra1 silencing in mouse spermatogonial stem cells results in their differentiation via the inactivation of RET tyrosine kinase. *Biology of reproduction*, 77(4), 723-733.

Hébert, S. S., Horré, K., Nicolai, L., Papadopoulou, A. S., Mandemakers, W., Silahatoglu, A. N., ... & De Strooper, B. (2008). Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/ β -secretase expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(17), 6415-6420.

Hejmej, A., Kopera, I., Kotula-Balak, M., Lydka, M., Lenartowicz, M., & Bilinska, B. (2012). Are expression and localization of tight and adherens junction proteins in testes of adult boar affected by foetal and neonatal exposure to flutamide?. *International journal of andrology*, 35(3), 340-352.

Hirase, T., Staddon, J. M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Itoh, M., Furuse, M., ... & Rubin, L. L. (1997). Okcludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *Journal of cell science*, 110(14), 1603-1613.

Hofmann, W., Friese, M., & Roefs, A. (2009). Three ways to resist temptation: The independent contributions of executive attention, inhibitory control, and affect regulation to the impulse control of eating behavior. *Journal of Experimental Social Psychology*, 45(2), 431-435.

Hu, F. P., Guo, Y., Zhu, D. M., Wang, F., Jiang, X. F., Xu, Y. C., ... & Kang, M. (2016). Resistance trends among clinical isolates in China reported from CHINET surveillance of bacterial resistance, 2005–2014. *Clinical microbiology and infection*, 22, S9-S14.

Hu, L. T., & Bentler, P. M. (1998). Fit indices in covariance structure modeling: Sensitivity to underparameterized model misspecification. *Psychological methods*, 3(4), 424.

Huckins, C. (1971). The spermatogonial stem cell population in adult Sığans. I. Their morphology, proliferation and maturation. *The Anatomical Record*, 169(3), 533-557.

Hunt, S. A., Abraham, W. T., Chin, M. H., Feldman, A. M., Francis, G. S., Ganiats, T. G., ... & Oates, J. A. (2009). 2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 guidelines for the diagnosis and management of heart failure in adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Journal of the American College of Cardiology*, 53(15), e1-e90.

Imam, J. S., Plyler, J. R., Bansal, H., Prajapati, S., Bansal, S., Rebeles, J., ... & Buddavarapu, K. C. (2012). Genomic loss of tumor suppressor mikroRNA-204 promotes cancer cell migration and invasion by activating AKT/mTOR/Rac1 signaling and actin reorganization. *PloS one*, 7(12), e52397.

Ilona A Kopera, Barbara Bilinska, C Yan Cheng, Dolores D Mruk. Sertoli-germ cell junctions in the testis: a review of recent data. *Philos. Trans. R. Soc. Lond, B, Biol. Sci.*2010;365(1546):1593-605

Innes, E. A., Wright, S. E., Maley, S., Rae, A., Schock, A., Kirvar, E., ... & Buxton, D. (2001). Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *International Journal for Parasitology*, 31(13), 1523-1534.

Ioannidis, J., & Donadeu, F. X. (2016). Circulating mikroRNA signatures of early pregnancy in cattle. *BMC genomics*, 17(1), 184.

Izadyar, F., Wong, J., Maki, C., Pacchiarotti, J., Ramos, T., Howerton, K., ... & Chow, Y. C. (2011). Identification and characterization of repopulating spermatogonial stem cells from the adult human testis. *Human Reproduction*, 26(6), 1296-1306.

Jackman, L. M., & Sternhell, S. (2013). *Application of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry: International Series in Organic Chemistry*. Elsevier.

Jain, N., Roberts, K. G., Jabbour, E., Patel, K., Eterovic, A. K., Chen, K., ... & Konoplev, S. (2017). Ph-like acute lymphoblastic leukemia: a high-risk subtype in adults. *Blood*, 129(5), 572-581.

Jalali, S., & Wohlin, C. (2012, September). Systematic literature studies: database searches vs. backward snowballing. In *Proceedings of the 2012 ACM-IEEE international symposium on empirical software engineering and measurement* (pp. 29-38). IEEE.

Jing, J., Wu, J., Liu, W., Xiong, S., Ma, W., Zhang, J., ... & Mei, J. (2014). Sex-biased mikroRNAs in gonad and their potential roles for testis development in yellow catfish. *PLoS One*, 9(9), e107946.

Jing, S., Wen, D., Yu, Y., Holst, P. L., Luo, Y., Fang, M., ... & Louis, J. C. (1996). GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR- α , a novel receptor for GDNF. *Cell*, 8

Josso, N., di Clemente, N., & Gouédard, L. (2001). Anti-Müllerian hormone and its receptors. *Molecular and cellular endocrinology*, 179(1-2), 25-32.

Junqueira, L. C., Carneiro, J., & Kelley, R. O. (2005). Connective tissue. *Basic histology text & atlas*, 11, 91-122.

Kaitu'u-Lino, T. U. J., Morison, N. B., & Salamonsen, L. A. (2007). Estrogen is not essential for full endometrial restoration after breakdown: lessons from a mouse model. *Endocrinology*, 148(10), 5105-5111.

Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Miki, H., Ogura, A., Toyokuni, S., & Shinohara, T. (2003). Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biology of reproduction*, 69(2), 612-616.

Kena, G., Hussar, W., McFarland, J., de Brey, C., Musu-Gillette, L., Wang, X., ... & Barmer, A. (2016). The Condition of Education 2016. NCES 2016-144. *National Center for Education Statistics*.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239.

Kieliszek, M., Błażej, S., Bzducha-Wróbel, A., & Kot, A. M. (2019). Effect of selenium on lipid and amino acid metabolism in yeast cells. *Biological trace element research*, 187(1), 316-327.

Kinjo, Y., Wu, D., Kim, G., Xing, G. W., Poles, M. A., Ho, D. D., ... & Kronenberg, M. (2005). Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature*, 434(7032), 520.

Kong, Y. W., Cannell, I. G., de Moor, C. H., Hill, K., Garside, P. G., Hamilton, T. L., ... & Willis, A. E. (2008). The mechanism of micro-RNA-mediated translation repression is determined by the promoter of the target gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(26), 8866-8871.

Korchynskyi, O., Landström, M., Stoika, R., Funa, K., Heldin, C. H., ten Dijke, P., & Souchelnytskyi, S. (1999). Expression of Smad proteins in human colorectal cancer. *International journal of cancer*, 82(2), 197-202.

Korhonen, J. T., Kettunen, M., Ras, R. H., & Ikkala, O. (2011). Hydrophobic nanocellulose aerogels as floating, sustainable, reusable, and recyclable oil absorbents. *ACS applied materials & interfaces*, 3(6), 1813-1816.

Kosova, F., & Ari, Z. (2011). Prostat kanseri ve apoptozis ilişkisi. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 2(1), 124-131.

Kotaja, N. (2014). MicroRNAs and spermatogenesis. *Fertility and sterility*, 101(6), 1552-1562.

Koval, I. A., Gamez, P., Belle, C., Selmeczi, K., & Reedijk, J. (2006). Synthetic models of the active site of catechol oxidase: mechanistic studies. *Chemical Society Reviews*, 35(9), 814-840.

Kramer, E. R., Aron, L., Ramakers, G. M., Seitz, S., Zhuang, X., Beyer, K., ... & Klein, R. (2007). Absence of Ret signaling in mice causes progressive and late degeneration of the nigrostriatal system. *PLoS biology*, 5(3), e39.

Kubota, H., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2004). Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(47), 16489-16494.

Kumar, T. R., Wang, Y., Lu, N., & Matzuk, M. M. (1997). Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nature genetics*, 15(2), 201.

Kuwabara, Y., Ono, K., Horie, T., Nishi, H., Nagao, K., Kinoshita, M., ... & Imai, M. (2011). Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 4(4), 446-454.

Lamberti, D., & Vicini, E. (2014). Promoter analysis of the gene encoding GDNF in murine Sertoli cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 394(1-2), 105-114.

Lécureuil, C., Fontaine, I., Crepieux, P., & Guillou, F. (2002). Sertoli and granulosa cell-specific Cre recombinase activity in transgenic mice. *genesis*, 33(3), 114-118.

Leduc, F., Acteau, G., Grégoire, M. C., Simard, O., Leroux, J., Carrier-Leclerc, A., ... & Boissonneault, G. (2011). Post-meiotic DNA damage and response in male germ cells. In *DNA repair*. IntechOpen.

Lee, J., Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Ogonuki, N., Miki, H., Toyokuni, S., ... & Shinohara, T. (2007). Akt mediates self-renewal division of mouse spermatogonial stem cells. *Development*, 134(10), 1853-1859.

Lee, N., Hui, D., Wu, A., Chan, P., Cameron, P., Joynt, G. M., ... & Lui, S. F. (2003). A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *New England Journal of Medicine*, 348(20), 1986-1994.

Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *cell*, 75(5), 843-854.

Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *cell*, 120(1), 15-20.

Li, X. F., Dong, H. L., Huang, X. Y., Qiu, Y. F., Wang, H. J., Deng, Y. Q., ... & Fan, H. (2016). Characterization of a 2016 clinical isolate of Zika virus in non-human primates. *EBioMedicine*, 12, 170-177.

LibeSıçani, N. T., Datto, M. B., Frederick, J. P., Shen, X., Wong, C., Rougier-Chapman, E. M., & Wang, X. F. (1999). Smads bind directly to the Jun family of AP-1 transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(9), 4844-4849.

Lin, L. F., Doherty, D. H., Lile, J. D., Bektesh, S., & Collins, F. (1993). GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*, 260(5111), 1130-1132.

Lindsey, J. S., & Wilkinson, M. F. (1996). Pem: a testosterone-and LH-regulated homeobox gene expressed in mouse Sertoli cells and epididymis. *Developmental biology*, 179(2), 471-484.

Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., ... & Yu, L. F. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet infectious diseases*, 16(2), 161-168.

Lizé, M., Klimke, A., & Dobbelstein, M. (2011). MicroRNA-449 in cell fate determination. *Cell cycle*, 10(17), 2874-2882.

Loomes, K. M., Russo, P., Ryan, M., Nelson, A., Underkoffler, L., Glover, C., ... & Oakey, R. J. (2007). Bile duct proliferation in liver-specific Jag1 conditional knockout mice: Effects of gene dosage. *Hepatology*, 45(2), 323-330.

Lu, F., Lee, H. P., & Lim, S. P. (2003). Modeling and analysis of micro piezoelectric power generators for micro-electromechanical-systems applications. *Smart Materials and Structures*, 13(1), 57.

Maatouk, D. M., DiNapoli, L., Alvers, A., Parker, K. L., Taketo, M. M., & Capel, B. (2008). Stabilization of β -catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Human molecular genetics*, 17(19), 2949-2955.

Ma'ayan, A., Jenkins, S. L., Neves, S., Hasseldine, A., Grace, E., Dubin-Thaler, B., ... & Kershenbaum, A. (2005). Formation of regulatory patterns during signal propagation in a mammalian cellular network. *Science*, 309(5737), 1078-1083.

Macías-Silva, M., Hoodless, P. A., Tang, S. J., Buchwald, M., & Wrana, J. L. (1998). Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. *Journal of Biological Chemistry*, 273(40), 25628-25636.

Macías-Silva, M., Abdollah, S., Hoodless, P. A., Pirone, R., Attisano, L., & Wrana, J. L. (1996). MADR2 is a substrate of the TGF β receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell*, 87(7), 1215-1224.

Maddocks, S., & Setchell, B. P. (1990). Recent evidence for immune privilege in the testis. *Journal of reproductive immunology*, 18(1), 9-18.

Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., ... & Simmons, D. (1998). Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *The Journal of cell biology*, 142(1), 117-127.

Massagué, J., & Chen, Y. G. (2000). Controlling TGF- β signaling. *Genes & development*, 14(6), 627-644.

McCarthy, K. M., Skare, I. B., Stankewich, M. C., Furuse, M., Tsukita, S., Rogers, R. A., ... & Schneeberger, E. E. (1996). Okludin is a functional component of the tight junction. *Journal of cell science*, 109(9), 2287-2298.

McKeith, I. G., Dickson, D. W., Lowe, J., Emre, M., O'brien, J. T., Feldman, H., ... & Aarsland, D. (2005). Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. *Neurology*, 65(12), 1863-1872.

Mease, P., Arnold, L. M., Bennett, R., Boonen, A., Buskila, D., Carville, S., ... & Gendreau, M. (2007). Fibromyalgia syndrome. *The Journal of Rheumatology*, 34(6), 1415-1425.

Meistrich, M. L. (2009). Male gonadal toxicity. *Pediatric blood & cancer*, 53(2), 261-266.

Meistrich, M. L., Wilson, G., Brown, B. W., Da Cunha, M. F., & Lipshultz, L. I. (1992). Impact of cyclophosphamide on long term reduction in sperm count in men treated with combination chemotherapy for Ewing and soft tissue sarcomas. *Cancer*, 70(11), 2703-2712.

Mélanie Lagarrigue, Michael Becker, Régis Lavigne, Sören-Oliver Deininger, Axel Walch, Florence Aubry, Detlev Suckau and Charles Pineau Molecular & Cellular Proteomics March 1, 2011, First published on December 12, 2010, 10 (3) M110.005991; Revisiting Rat Spermatogenesis with MALDI Imaging at 20-µm Resolution <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.005991>

Meng, F., Forbes, A. J., Miller, L. M., & Kelleher, N. L. (2005). Detection and localization of protein modifications by high resolution tandem mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews*, 24(2), 126-134.

Meng, X., de Rooij, D. G., Westerdahl, K., Saarma, M., & Sariola, H. (2001). Promotion of seminomatous tumors by targeted overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor in mouse testis. *Cancer Research*, 61(8), 3267-3271.

Meng, X., Lindahl, M., Hyvönen, M. E., Parvinen, M., de Rooij, D. G., Hess, M. W., ... & Pichel, J. G. (2000). Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science*, 287(5457), 1489-1493.

Mi, S., Lee, X., Li, X. P., Veldman, G. M., Finnerty, H., Racie, L., ... & Keith Jr, J. C. (2000). Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature*, 403(6771), 785.

Mital, P., Hinton, B. T., & Dufour, J. M. (2011). The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biology of reproduction*, 84(5), 851-858.

Mok, K. W., Mruk, D. D., Silvestrini, B., & Cheng, C. Y. (2012). rpS6 regulates blood-testis barrier dynamics by affecting F-actin organization and protein recruitment. *Endocrinology*, 153(10), 5036-5048.

Moore, K. L., Persaud, T. V. N., & Torchia, M. G. (2018). *The Developing Human-E-Book: Clinically Oriented Embryology*. Elsevier Health Sciences.

Morgan, D. H., Ghribi, O., Hui, L., Geiger, J. D., & Chen, X. (2014). Cholesterol-enriched diet disrupts the blood-testis barrier in rabbits. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 307(12), E1125-E1130.

Mullaney, B. P., & Skinner, M. K. (1993). Transforming growth factor-beta (beta 1, beta 2, and beta 3) gene expression and action during pubertal development of the seminiferous tubule: potential role at the onset of spermatogenesis. *Molecular Endocrinology*, 7(1), 67-76.

Mythili, Y., Sudharsan, P. T., Selvakumar, E., & Varalakshmi, P. (2004). Protective effect of DL- α -lipoic acid on cyclophosphamide induced oxidative cardiac

injury. *Chemico-biological interactions*, 151(1), 13-19.

Nakao, A., Imamura, T., Souchelnytskyi, S., Kawabata, M., Ishisaki, A., Oeda, E., ... & ten Dijke, P. (1997). TGF- β receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *The EMBO journal*, 16(17), 5353-5362.

Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K., & Matsukura, S. (2001). A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*, 409(6817), 194.

Naughton, C. K., Jain, S., Strickland, A. M., Gupta, A., & Milbrandt, J. (2006). Glial cell-line derived neurotrophic factor-mediated RET signaling regulates spermatogonial stem cell fate. *Biology of reproduction*, 74(2), 314-321.

Noveski, P., Popovska Jankovic, K., Kubelka Sabit, K., Filipovski, V., Lazarevski, S., Plaseski, T., & Plaseska Karanfilaska, D. (2016). Micro RNA expression profiles in testicular biopsies of patients with impaired spermatogenesis. *Andrology*, 4(6), 1020-1027.

Nowak, S. J., Nahirney, P. C., Hadjantonakis, A. K., & Baylies, M. K. (2009). Nap1-mediated actin remodeling is essential for mammalian myoblast fusion. *Journal of cell science*, 122(18), 3282-3293.

Nusrat, A., Turner, J. R., & Madara, J. L. (2000). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *American Journal of Physiology*, 279(1), G851-G857.

Okbay, A., Baselmans, B. M., De Neve, J. E., Turley, P., Nivard, M. G., Fontana, M. A., ... & GSİçanten, J. (2016). Genetic variants associated with subjective well-being, depressive symptoms, and neuroticism identified through genome-wide analyses. *Nature genetics*, 48(6), 624.

Oki, Y., Noorani, M., Lin, P., Davis, R. E., Neelapu, S. S., Ma, L., ... & Wang,

M. (2014). Double hit lymphoma: the MD Anderson Cancer Center clinical experience. *British journal of haematology*, 166(6), 891-901.

O'shaughnessy, J. (2014). *Competitive marketing (RLE marketing): A strategic approach*. Routledge.

Özorak, A., Nazıroğlu, M., Çelik, Ö., Yüksel, M., Özçelik, D., Özkaya, M. O., ... & Kose, S. A. (2013). Wi-Fi (2.45 GHz)-and mobile phone (900 and 1800 MHz)-induced risks on oxidative stress and elements in kidney and testis of rats during pregnancy and the development of offspring. *Biological trace element research*, 156(1-3), 221-229.

Pagano, M., & Gauvreau, K. (2018). *Principles of biostatistics*. Chapman and Hall/CRC.

Papaiouannou, M. D., & Nef, S. (2010). microRNAs in the testis: building up male fertility. *Journal of andrology*, 31(1), 26-33.

Papaiouannou, M. D., Pitetti, J. L., Ro, S., Park, C., Aubry, F., Schaad, O., ... & McManus, M. T. (2009). Sertoli cell Dicer is essential for spermatogenesis in mice. *Developmental biology*, 326(1), 250-259.

Parker, D., & Gill, B. (1976). *The Portable Dorothy Parker*. Penguin Books.

Periti, P., Mazzei, T., & Mini, E. (2002). Clinical pharmacokinetics of depot leuporelin. *Clinical pharmacokinetics*, 41(7), 485-504.

Piek, E., Moustakas, A., Kurisaki, A., Heldin, C. H., & ten Dijke, P. (1999). TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *J cell Sci*, 112(24), 4557-4568.

Qiblawi, J. R., Thompson, C. D., McGreevy, S. C., Siemienieć, D., Iglesias, M. S., & Bayer, J. (2011). *U.S. Patent Application No. 29/367,116*.

Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., ... & Peng, Y. (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, 490(7418), 55.

Qu N, Itoh M, Sakabe K. Effects of Chemotherapy and Radiotherapy on Spermatogenesis: The Role of Testicular Immunology. *Int J Mol Sci*. 2019 Feb 22;20(4). pii: E957. doi: 10.3390/ijms20040957. Review. PubMed PMID: 30813253;

Rahbar, K., Mahmoud, S., Al-Dadah, R. K., Moazami, N., & Mirhadizadeh, S. A. (2017). Review of organic Rankine cycle for small-scale applications. *Energy conversion and management*, 134, 135-155.

Rao, M. K., Wayne, C. M., Meistrich, M. L., & Wilkinson, M. F. (2003). Pem homeobox gene promoter sequences that direct transcription in a Sertoli cell-specific, stage-specific, and androgen-dependent manner in the testis in vivo. *Molecular endocrinology*, 17(2), 223-233.

Rebourcet, D., O'Shaughnessy, P. J., Monteiro, A., Milne, L., Cruickshanks, L., Jeffrey, N., ... & Smith, L. B. (2014). Sertoli cells maintain Leydig cell number and peritubular myoid cell activity in the adult mouse testis. *PloS one*, 9(8), e105687.

Rice, S. J., Lai, S. C., Wood, L. W., Helsley, K. R., Runkle, E. A., Winslow, M. M., & Mu, D. (2013). MicroRNA-33a mediates the regulation of high mobility group AT-hook 2 gene (HMGA2) by thyroid transcription factor 1 (TTF-1/NKX2-1). *Journal of Biological Chemistry*, 288(23), 16348-16360.

Ro, S., Park, C., Sanders, K. M., McCarrey, J. R., & Yan, W. (2007). Cloning and expression profiling of testis-expressed microRNAs. *Developmental biology*, 311(2), 592-602.

Ross, M., & Pawlina, W. (2017). *Histology, A text and atlas, with correlated cell and molecular biology*. Lippincott Williams & Wilkins.

Roth, L., Saur, J., Retherford, K. D., Strobel, D. F., Feldman, P. D., McGStıçanh,

M. A., & Nimmo, F. (2014). Transient water vapor at Europa's south pole. *Science*, 343(6167), 171-174.

Runkle, E. A., Sundstrom, J. M., Runkle, K. B., Liu, X., & Antonetti, D. A. (2011). Okludin localizes to centrosomes and modifies mitotic entry. *Journal of Biological Chemistry*, 286(35), 30847-30858.

Russell, D. S., & Rubinstein, L. J. (1977). *Pathology of tumours of the nervous system*. Williams and Wilkins Co..

Russell L. D., Etllin R. A., Sinha Hikim A. P., Clegg E. D. (1990) Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, FL

Ruven, H. J., Berg, R. J., Seelen, C. M. J., Dekkers, J. A., Lohman, P. H., Mullenders, L. H., & van Zeeland, A. A. (1993). Ultraviolet-induced cyclobutane pyrimidine dimers are selectively removed from transcriptionally active genes in the epidermis of the hairless mouse. *Cancer research*, 53(7), 1642-1645.

Sadler, T. W. (2011). *Langman's medical embryology*. Lippincott Williams & Wilkins.

Saitou, M., Fujimoto, K., Doi, Y., Itoh, M., Fujimoto, T., Furuse, M., ... & Tsukita, S. (1998). Okludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *The Journal of cell biology*, 141(2), 397-408.

Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J. D., Fromm, M., Takano, H., ... & Tsukita, S. (2000). Complex phenotype of mice lacking Okludin, a component of tight junction strands. *Molecular biology of the cell*, 11(12), 4131-4142.

Sancak, B., & Cumhuri, M. (2008). Fonksiyonel Anatomi Baş Boyun ve İç Organlar, 4. baskı. ODTÜ yayıncılık, Ankara, Türkiye, 291.

Savitt, J., Singh, D., Zhang, C., Chen, L. C., Folmer, J., Shokat, K. M., &

Wright, W. W. (2012). The in vivo response of stem and other undifferentiated spermatogonia to the reversible inhibition of glial cell line-derived neurotrophic factor signaling in the adult. *Stem Cells*, 30(4), 732-740.

Schmitz, H., & Nadvi, K. (1999). Clustering and industrialization: introduction.

Schuchardt, A., D'Agati, V., Larsson-Blomberg, L., Costantini, F., & Pachnis, V. (1994). Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature*, 367(6461), 380.

Schulzke, J. D., Gitter, A. H., Mankertz, J., Spiegel, S., Seidler, U., Amasheh, S., ... & Fromm, M. (2005). Epithelial transport and barrier function in Okludin-deficient mice. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-Biomembranes*, 1669(1), 34-42.

Scientific, L. I. G. O., Abbott, B. P., Abbott, R., Abbott, T. D., Acernese, F., Ackley, K., ... & Adya, V. B. (2017). GW170104: observation of a 50-solar-mass binary black hole coalescence at redshift 0.2. *Physical Review Letters*, 118(22), 221101.

Setchell, K. D. R., Lawson, A. M., Mitchell, F. L., Adlercreutz, H., Kirk, D. N., & Axelson, M. (1980). Lignans in man and in animal species. *Nature*, 287(5784), 740.

Shetty, G., & Meistrich, M. L. (2005). Hormonal approaches to preservation and restoration of male fertility after cancer treatment. *JNCI Monographs*, 2005(34), 36-39.

Shi, J., Barakat, M., Chen, D., & Chen, L. (2018). Bicellular Tight Junctions and Wound Healing. *International journal of molecular sciences*, 19(12), 3862.

Shi, T., McAllister, D. A., O'Brien, K. L., Simoes, E. A., Madhi, S. A., Gessner, B. D., ... & Alassani, I. (2017). Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *The Lancet*, 390(10098), 946-958.

Singh, J., & Handelsman, D. J. (1996). Neonatal administration of FSH increases Sertoli cell numbers and spermatogenesis in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *Journal of Endocrinology*, 151(1), 37-48.

Sinha, S., Anderson, J. P., Barbour, R., Basi, G. S., Caccavello, R., Davis, D., ... & Jacobson-Croak, K. (1999). Purification and cloning of amyloid precursor protein β -secretase from human brain. *Nature*, 402(6761), 537.

Sistigu, A., Viaud, S., Chaput, N., Bracci, L., Proietti, E., & Zitvogel, L. (2011, July). Immunomodulatory effects of cyclophosphamide and implications for vaccine design. In *Seminars in immunopathology* (Vol. 33, No. 4, pp. 369-383). Springer-Verlag.

Skinner, E. A., & Belmont, M. J. (1993). Motivation in the classroom: Reciprocal effects of teacher behavior and student engagement across the school year. *Journal of educational psychology*, 85(4), 571.

Smorag, L., Zheng, Y., Nolte, J., Zechner, U., Engel, W., & Pantakani, D. V. K. (2012). MicroRNA signature in various cell types of mouse spermatogenesis: Evidence for stage-specifically expressed microRNA-221, -203 and -34b-5p mediated spermatogenesis regulation. *Biology of the Cell*, 104(11), 677-692.

Sporn, M. B., & Roberts, A. B. (1990). TGF-beta: problems and prospects. *Cell regulation*, 1(12), 875-882.

Starkey Lewis, P. J., Dear, J., Platt, V., Simpson, K. J., Craig, D. G., Antoine, D. J., ... & Neoptolemos, J. P. (2011). Circulating microRNAs as potential belirteçs of human drug-induced liver injury. *Hepatology*, 54(5), 1767-1776.

Surace, E. I., Strickland, A., Hess, R. A., Gutmann, D. H., & Naughton, C. K. (2006). Tslc1 (nectin-like molecule-2) is essential for spermatozoa motility and male fertility. *Journal of andrology*, 27(6), 816-825.

SUTTON, K. A., MATH, S., TRIBLEY, W. A., LINDSEY, J. S., MEISTRICH, M. L., BUCANA, C. D., ... & WILKINSON, M. F. (1998). Androgen regulation of the Pem homeodomain gene in mice and rat Sertoli and epididymal cells. *Journal of andrology*, 19(1), 21-30.

Suzuki, S., Takasaki, S., Ozaki, T., & Kobayashi, Y. (1999, July). Tissue oxygenation monitor using NIR spatially resolved spectroscopy. In *Optical tomography and spectroscopy of tissue III* (Vol. 3597, pp. 582-592). International Society for Optics and Photonics.

Tadokoro, Y., Yomogida, K., Ohta, H., Tohda, A., & Nishimune, Y. (2002). Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. *Mechanisms of development*, 113(1), 29-39.

Tamaki, N., Shimizu, M., Nishida, K., & Hiroyasu, H. (1998). Effects of cavitation and internal flow on atomization of a liquid jet. *Atomization and Sprays*, 8(2).

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28(10), 2731-2739.

Tanwar, R. K., Prakash, A., Panda, S. K., Swain, N. C., Garg, D. K., & Singh, S. P. (2010). S. Sathya kumar and OM Bambawale (2010) Rice swarming caterpillar (*Spodoptera mauritia*) and its management strategies. *Technical Bulletin*, 24.

Tapia, R., Huerta, M., Islas, S., Avila-Flores, A., Lopez-Bayghen, E., Weiske, J., ... & González-Mariscal, L. (2009). Zona occludens-2 inhibits cyclin D1 expression and cell proliferation and exhibits changes in localization along the cell cycle. *Molecular biology of the cell*, 20(3), 1102-1117.

Tarulli, G. A., Meachem, S. J., Schlatt, S., & Stanton, P. G. (2008). Regulation of testicular tight junctions by gonadotrophins in the adult Djungarian hamster in vivo. *Reproduction*, 135(6), 867-877.

Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A. M., Lim, B., & Rigoutsos, I. (2008). MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*, 455(7216), 1124.

Throup, J. P., Koretke, K. K., Bryant, A. P., Ingraham, K. A., Chalker, A. F., Ge, Y., ... & Rosenberg, M. (2000). A genomic analysis of two component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular microbiology*, 35(3), 566-576.

Tinggaard, J., Aksglaede, L., Sørensen, K., Mouritsen, A., Wohlfahrt Veje, C., Hagen, C. P., ... & Petersen, J. H. (2014). The 2014 Danish references from birth to 20 years for height, weight and body mass index. *Acta Paediatrica*, 103(2), 214-224.

Travers, M. J., McCarthy, M. C., Gottlieb, C. A., & Thaddeus, P. (1996). LaboSiçanory detection of the C7H radical. *The Astrophysical Journal Letters*, 465(1), L77.

Tripathi, D. N., & Jena, G. B. (2008). Astaxanthin inhibits cytotoxic and genotoxic effects of cyclophosphamide in mice germ cells. *Toxicology*, 248(2-3), 96-103.

Trupp, M., Belluardo, N., Funakoshi, H., & Ibáñez, C. F. (1997). Complementary and overlapping expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), c-ret proto-oncogene, and GDNF receptor- α indicates multiple mechanisms of trophic actions in the adult rat CNS. *Journal of Neuroscience*, 17(10), 3554-3567.

Tsukita, S., Furuse, M., & Itoh, M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2(4), 285.

TUNALI, S., & BAŞAR, R. (2012). Testisin Vasküler Anatomisi. *Türkiye Klinikleri Urology-Special Topics*, 5(3), 1-5.

Van den Berg, A. J., Turner, S. M., Van Duyl, F. C., & Ruurdij, P. (1996). Model structure and analysis of dimethylsulphide (DMS) production in the southern North Sea, considering phytoplankton dimethylsulphoniopropionate-(DMSP) lyase and eutrophication effects. *Marine Ecology Progress Series*, 145, 233-244.

Varambally, S., Dhanasekaran, S. M., Zhou, M., Barrette, T. R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M. G., ... & Rubin, M. A. (2002). The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*, 419(6907), 624.

Vergouwen, R. P. F. A., Jacobs, S. G. P. M., Huiskamp, R., Davids, J. A. G., & De Rooij, D. G. (1991). Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *Reproduction*, 93(1), 233-243.

Vogelmeier, C. F., Criner, G. J., Martinez, F. J., Anzueto, A., Barnes, P. J., Bourbeau, J., ... & Frith, P. (2017). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease 2017 report. GOLD executive summary. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 195(5), 557-582.

Voineagu, I., Wang, X., Johnston, P., Lowe, J. K., Tian, Y., Horvath, S., ... & Geschwind, D. H. (2011). Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. *Nature*, 474(7351), 380.

Vojtek, A. B., & Cooper, J. A. (1995). Rho family members: activators of MAP kinase cascades. *Cell*, 82(4), 527-529.

Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., ... & Prueitt, R. L. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(7), 2257-2261.

Von Hoff, D. D., Ervin, T., Arena, F. P., Chiorean, E. G., Infante, J., Moore, M., ... & Harris, M. (2013). Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *New England Journal of Medicine*, 369(18), 1691-1703.

Waldman, D. A., De Luque, M. S., Washburn, N., House, R. J., Adetoun, B., Barrasa, A., ... & Dorfman, P. (2006). Cultural and leadership predictors of corporate social responsibility values of top management: A GLOBE study of 15 countries. *Journal of International Business Studies*, 37(6), 823-837.

Wang, T., Fahrmann, J. F., Lee, H., Li, Y. J., Tripathi, S. C., Yue, C., ... & Somlo, G. (2018). JAK/STAT3-regulated fatty acid β -oxidation is critical for breast cancer stem cell self-renewal and chemoresistance. *Cell metabolism*, 27(1), 136-150.

Wang, Y. P., Teng, M. C., & Chung, K. W. (2001). Seismic isolation of rigid cylindrical tanks using friction pendulum bearings. *Earthquake engineering & structural dynamics*, 30(7), 1083-1099.

Wang, Z., Mandell, K. J., Parkos, C. A., Mrsny, R. J., & NusSıçan, A. (2005). The second loop of Okludin is required for suppression of Raf1-induced tumor growth. *Oncogene*, 24(27), 4412.

Weber, M. A., Schiffrin, E. L., White, W. B., Mann, S., Lindholm, L. H., Kenerson, J. G., ... & Cohen, D. L. (2014). Clinical practice guidelines for the management of hypertension in the community: a statement by the American Society of Hypertension and the International Society of Hypertension. *The journal of clinical hypertension*, 16(1), 14-26.

Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 6578-6583.

Widimsky, P., Wijns, W., Fajadet, J., De Belder, M., Knot, J., Aaberge, L., ... & Danchin, N. (2009). Reperfusion therapy for ST elevation acute myocardial infarction in Europe: description of the current situation in 30 countries. *European heart journal*, 31(8), 943-957.

Wu, G., Cheng, Y., Yang, Z., Jia, Z., Wu, H., Yang, L., ... & Lv, H. (2018). Design of carbon sphere/magnetic quantum dots with tunable phase compositions and boost dielectric loss behavior. *Chemical Engineering Journal*, 333, 519-528.

Wu, T., Geng, J., Guo, W., Gao, J., & Zhu, X. (2017). Asiatic acid inhibits lung cancer cell growth in vitro and in vivo by destroying mitochondria. *Acta pharmaceutica sinica B*, 7(1), 65-72.

Wu, Y., Schuster, M., Chen, Z., Le, Q. V., Norouzi, M., Macherey, W., ... & Klingner, J. (2016). Google's neural machine translation system: Bridging the gap between human and machine translation. *arXiv preprint arXiv:1609.08144*.

Yaffe, K., Barnes, D., Nevitt, M., Lui, L. Y., & Covinsky, K. (2001). A prospective study of physical activity and cognitive decline in elderly women: women who walk. *Archives of internal medicine*, 161(14), 1703-1708.

Yan, H., Parsons, D. W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B. A., Yuan, W., ... & Friedman, H. (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *New England Journal of Medicine*, 360(8), 765-773.

Yang, L., Ren, F., Feng, Q., Xu, G., Li, X., Li, Y., ... & Fan, S. (2018). Effect of Cu Doping on the Structural and Electrochemical Performance of LiNi 1/3 Co 1/3 Mn 1/3 O 2 Cathode Materials. *Journal of Electronic Materials*, 47(7), 3996-4002.

Yang, W. S., Noh, J. H., Jeon, N. J., Kim, Y. C., Ryu, S., Seo, J., & Seok, S. I. (2015). High-performance photovoltaic perovskite layers fabricated through intramolecular exchange. *Science*, 348(6240), 1234-1237.

Yang, Y. Y., Chung, T. S., & Ng, N. P. (2001). Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials*, 22(3), 231-241.

Yao, S., Gao, C., Zhu, H., Zhang, Y., Wang, S., & Qin, C. (2016). Effects of additives on absorbable organic halide reduction in elemental chlorine-free bleaching of bagasse kraft pulp. *BioResources*, 11(1), 996-1006.

Yeh, Y. C., Creran, B., & Rotello, V. M. (2012). Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale*, 4(6), 1871-1880.

YILMAZ, A., & HAKAN, B. Spermatogenez Süreçlerinin Düzenlenmesinde GDNF'nin (Glial Cell Line-Derived Neurotropic Factor) Rolü. *SDÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 5(2), 83-87.

Yılmaz A, Gökdağ Ö. Allografting and Xenografting of Testis Tissue and Using Possibilities in the Future. *Kafkas Unı Vet Derg*.2010; 16 (6): 1073-1077

Yi, Z., Ye, J., Kikugawa, N., Kako, T., Ouyang, S., Stuart-Williams, H., ... & Liu, Y. (2010). An orthophosphate semiconductor with photooxidation properties under visible-light irradiation. *Nature materials*, 9(7), 559.

Yu, K. S. H., Wong, A. H. Y., Yau, K. W. Y., Wong, Y. S., & Tam, N. F. Y. (2005). Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. *Marine pollution bulletin*, 51(8-12), 1071-1077.

Zhang, C. S., Jiang, B., Li, M., Zhu, M., Peng, Y., Zhang, Y. L., ... & Lian, G. (2014). The lysosomal v-ATPase-Ragulator complex is a common activator for AMPK and mTORC1, acting as a switch between catabolism and anabolism. *Cell metabolism*, 20(3), 526-540.

Zhang, L., Hou, D., Chen, X., Li, D., Zhu, L., Zhang, Y., ... & Yin, Y. (2012). Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell research*, 22(1), 107.

Zhang, T., & Lin, W. (2014). Metal–organic frameworks for artificial photosynthesis and photocatalysis. *Chemical Society Reviews*, 43(16), 5982-5993.

Zhang, X., & Cai, X. (2011). Climate change impacts on global agricultural land availability. *Environmental Research Letters*, 6(1), 014014.

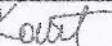
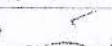
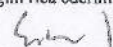
Zhou, C., Wu, Y. L., Chen, G., Feng, J., Liu, X. Q., Wang, C., ... & Lu, S. (2011). Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *The lancet oncology*, 12(8), 735-742.

Zhou, L., & Haas, Z. J. (1999). Securing ad hoc networks. *IEEE network*, 13(6), 24-30.

Zhou, L., Tan, Y., Ji, D., Zhu, B., Zhang, P., Xu, J., ... & Zhu, J. (2016). Self-assembly of highly efficient, broadband plasmonic absorbers for solar steam generation. *Science Advances*, 2(4), e1501227.

9. EKLER

T.C.
Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

KARAR TARİH / NO	25 / 09 / 2018 / 77.637.435 -			
ARAŞTIRMANIN ADI	Azospermli oluşturulan farelerde testis hasarının serum miRNA düzeyi ile belirlenmesi			
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Prof. Dr. M. Kemal ÖZBİLGİN - MCBÜ Tıp Fak. Histoloji ve Embriyoloji AD			
ARAŞTIRMA EKİBİ	Yük. Lisans Öğr. Selda DEMİRÖREN			
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Uzmanlık Tezi ☐	Yüksek Lisans/Doktora ☒	Akademik ☐	Eğitim ☐
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	03 / 09 / 2018 / Tarih ve 39969 sayılı; araştırma dosyasının tekrar değerlendirilmesi konulu dilekçe			
KARAR BİLGİLERİ	Dilekçe incelenmiş; bilimsel ve etik açıdan UYGUN olduğuna oy çokluğu ile karar verilmiştir.			
Unvanı / Adı / Soyadı	İmza	Araştırma İle İlişkisi Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye	
Prof. Dr. Emin KURT Göz Hastalıkları AD		☐	☐	
Prof. Dr. İsmet TOPÇU Anestezi ve Reanimasyon AD		☐	☐	
Prof. Dr. Ertuğrul TATLISUMAK Anatomi AD		☐	☐	
Prof. Dr. Kamil VURAL Farmakoloji AD		☐	☐	
Doç. Dr. Kıvanç GÜNHAN DEHAM MD		☐	☐	
Dr. Öğr. Üyesi Selim ALTAN Tıp Tarihi ve Etik AD		☐	☐	
Yavuz DEMİR Veteriner Hekim		☐	☐	
Saim ÖZKARA Sivil Toplum Üyesi		☐	☐	
Etik Kurulumuzun kararı yukarıda belirtilmiştir. Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.  Prof. Dr. Emin KURT Başkan				

YÖNETİM KURULU KARAR ÖRNEĞİ

Karar Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
27.07.2018	29	19

Karar 2- Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı 161350002 numaralı tezli yüksek lisans programı öğrencisi Serdağ DEMİRÖREN'in 01.12.2017 tarih 47/5 sayılı yönetim kurulunda belirlenen **"Oligoazospermi Vakalarında Seminal Plazmada ve Serumda Bulunan mikroRNA'ların Değerlendirilmesi"** başlıklı tez konusunun etik kurul onayı alınması kaydı ile **"Azospermi Oluşturulan Farelerde Testis Hasarının Serum MikroRNA Düzeyi İle Belirlenmesi"** olarak değiştirilmesine **OY BİRLİĞİ** ile karar verildi.

e-imzalıdır Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER Enstitü Müdürü V.	
e-imzalıdır Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER Müdür Yardımcısı	e-imzalıdır Prof. Dr. Necip KUTLU Üye
e-imzalıdır Prof. Dr. Sezgi ÇINAR PAKYÜZ Üye	e-imzalıdır Doç. Dr. Murat TAŞ Üye
e-imzalıdır Aynur PALAMUTÇUOĞLU Enstitü Sekreteri	

Aslı Gibidir
08/08 /2018



Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER
Enstitü Sekreteri V.

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu

Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Başkanlığı'na

Tez Adı AZOSPERMİ OLUŞTURULAN FARELERDE TESTİS HASARININ SERUM MİKRORNA DÜZEYİ İLE BELİRLENMESİ

Tezime ilişkin 30/07/2019. tarihinde yapılan Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 6'dır.

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

Adı Soyadı :SERDAĞ DEMİRÖREN
Öğrenci No :161350002
Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji
Programı :Tezli Yüksek Lisans

Tarih ve İmza

[İmza]
31.07.2019

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR
(Unvan, Ad Soyad, İmza)

Açıklamalar

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

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Serdağ	Soyadı	DEMİRÖREN
Doğum Yeri	GAZİANTEP	Doğum Tarihi	20.07.1976
Uyruğu	Türk	Tel	05362498762
E-mail	ser.demiroren@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Manisa Celal Bayar Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Bölümü	2016-Halen devam ediyor.
Lisans	Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü	1998
Lise	Manisa Lisesi	1993

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre(Yıl-Yıl)
Biyoloji Öğretmeni	Saruhanlı Anadolu Lisesi	2017 - Halen devam ediyor.
Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma
Memur	MCBU İşletme Fakültesi	2016-2017
İngilizce Öğretmeni	Orta	Orta
Biyoloji Öğretmeni	Orta	Orta

Yabancı Dil Sınav Notu

Yökdil	YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	66,98868	68,09430	65,13958
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Power Point	İyi
Microsoft Word	İyi
Microsoft Excel	İyi