

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**FARKLI BÜYÜME FAKTÖRÜ KOMBİNASYONLARININ
SERTOLİ HÜCRELERİNİN ÜÇ BOYUTLU TÜBÜL
OLUŞTURMA KAPASİTELERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

BEGÜM DURKUT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2021-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

FARKLI BÜYÜME FAKTÖRÜ KOMBİNASYONLARININ
SERTOLİ HÜCRELERİNİN ÜÇ BOYUTLU TÜBÜL
OLUŞTURMA KAPASİTELERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

BEGÜM DURKUT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. ÇİLER ÇELİK ÖZENCİ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2020-5481 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2021-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Üreme Biyolojisi Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. .../.../.....

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENÇİ
Akdeniz Üniversitesi

.....

Üye : Doç. Dr. Güler Leyla SATI
Akdeniz Üniversitesi

.....

Üye : Prof. Dr. Sevil ÇAYLI
Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi

.....

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun .../.../..... tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

ETİK 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 çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

BEGÜM DURKUT

İmza

Tez Danışmanı

PROF. DR. ÇİLER ÇELİK ÖZENCİ

İmza

TEŞEKKÜR

Akademik kariyerimin ilk basamağı olan yüksek lisans eğitimim sürecince her konuda beni destekleyen, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum danışman hocam Sayın Prof. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ'ye,

Çalışmamızda kullanılan hücre hattının teminini sağlayan Prof. Dr. Sevil ÇAYLI'ya,

Çalışma sürecimde bana her konuda yardımcı olan, yol gösteren, bilgi ve deneyimleriyle destek sağlayan ekip arkadaşlarım Dr. Pınar Şahin, Dr. Nilay KUŞÇU, Dr. Soner Çelik, Dileyra Adıgüzel, Remziye Kendirci ve Nayçe İlayda Bektaş'a,

Yüksek lisans eğitim sürecimde, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri başta olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma,

Her daim güler yüzlü ve yardıma hazır olan Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün tüm değerli çalışanlarına,

Eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, hayallerimi öngörüp sonuna kadar arkasında duran annem Ayşe DURKUT, babam Savaş DURKUT, kardeşim Barış DURKUT ve ailemin diğer tüm fertlerine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Sertoli hücrelerinin *in vitro* testiküler organizasyon süreci iki aşamadan oluşur: testis kordonu benzeri yapıların ve tübül benzeri yapıların oluşması. Embriyonik dönemde seminifer tübüllerin oluşumunda direkt rol oynayan faktörlerden hepatosit büyüme faktörü (HGF), postnatal dönemde de Sertoli hücrelerinden salgılanır. Gliyal hücre kökenli nörotrofik faktör (GDNF) spermatogonyal kök hücre devamlılığını sağlar. Renal tübülogenez sürecinde; GDNF'nin HGF'nin *in vitro* tübül oluşturma kapasitesini arttırdığı ortaya konmuştur. Testis tübüllerinin oluşumunda HGF'nin rolü olduğu bilinmesine rağmen, renal tübülogeneze benzer olarak, GDNF'nin de bu süreçte görev alıp almadığı hakkında literatürde henüz bir bilgi yoktur. Bu çalışmada; GDNF'nin, HGF'ye ek olarak, Sertoli hücrelerinin üç boyutlu (3B) tübül oluşturma kapasitelerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: 15P-1 Sertoli hücre hattı kullanılarak; kontrol, sadece HGF varlığında, sadece GDNF varlığında ve HGF ile GDNF varlığında olacak şekilde 4 grup oluşturulmuştur. Beş gün boyunca Matrigel™' içerisinde 3B kültüre edilen Sertoli hücrelerinin tübül oluşturma kapasiteleri invert mikroskop altında ve parafin kesitlerde hematoxilen-eozin boyaması ile değerlendirilmiştir. Sertoli hücrelerinin kimliğinin değişmediğini göstermek için kit ligand (Sertoli belirteci; pozitif kontrol) ve c-kit (Germ hücre belirteci; negatif kontrol); polarizasyonunu göstermek için ise sıkı bağlantı proteini zonula okludens-1 (ZO-1) protein ifadeleri immünofloresan yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Bulgular: HGF ile birlikte GDNF uygulaması Sertoli hücrelerinin 3B kültürü sırasında *in vitro* organizasyonunu, lümen benzeri yapıların oluşumunu ve Sertoli hücrelerinin polaritesini anlamlı olarak arttırmıştır.

Sonuç: HGF ile uyarılmış Sertoli hücrelerinin 3B tübül oluşturma kapasitesini GDNF eklenmesi daha da arttırır.

Anahtar Kelimeler: 15P-1 Sertoli hücre hattı, 3B hücre kültürü, HGF, GDNF, *in vitro* tübülogenez

ABSTRACT

Objective: The process of testicular organization of Sertoli cells *in vitro* consists of two stages: the formation of testicular cord-like structures and tubule-like structures. Hepatocyte growth factor (HGF), which is one of the factors that play a direct role in the formation of seminiferous tubules in the embryonic period, is secreted from Sertoli cells in the postnatal period. Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) provides sustainability of the spermatogonial stem cell. In the process of renal tubulogenesis; GDNF has been shown to increase the tubule forming capacity of HGF *in vitro*. Although it is known that HGF has a role in the formation of testicular tubules, there is no information in the literature about whether GDNF is also involved in this process, similar to renal tubulogenesis. In this study; it was aimed to investigate the effect of GDNF, in addition to HGF, on the three-dimensional (3D) tubule forming capacity of Sertoli cells.

Method: 15P-1 Sertoli cell line was used, and the following 4 groups were established: control, HGF-administrated only, GDNF-administrated only and HGF-administrated and GDNF-administrated. The tubule forming capacity of Sertoli cells cultured in 3D in Matrigel™ for five days was evaluated under an inverted microscope and by hematoxylin-eosin staining on paraffin sections. To characterize the Sertoli cells during culture, expression of kit ligand (Sertoli marker; positive control) and c-kit (Germ cell marker; negative control); to show the 3D polarization of Sertoli cells, tight junction protein zonula occludens-1 (ZO-1) immunofluorescence staining was performed.

Results: Administration of GDNF together with HGF significantly increased the *in vitro* organization, formation of luminal-like structures and polarity of Sertoli cells during 3D culture of Sertoli cells.

Conclusion: The addition of GDNF further enhances the 3D tubule forming capacity of HGF-stimulated Sertoli cells.

Key words: 15P-1 Sertoli cell line, 3D cell culture, HGF, GDNF , *in vitro* tubulogenesis

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Testis gelişimi ve morfolojik düzeninin kurulması	3
2.2. Seminifer tübüllerin organizasyonu ve spermatogenezde rol oynayan faktörler	6
2.2.1. Testis kordonlarının oluşumu	8
2.2.2. Spermatogenezde rol oynayan faktörler	9
2.3. Testis kordonları ve tübül oluşumunda HGF/c-Met sinyal yolağının rolü	10
2.4. GDNF ve HGF/c-Met sinyal yolağı ile ilişkisi	11
2.5. Sertoli hücrelerinin tübül oluşumdaki önemi	12
2.6. <i>İn vitro</i> çalışmalarda kullanılan Sertoli hücre hatları ve özellikleri	13
2.7. Sertoli hücrelerinin <i>in vitro</i> testiküler organizasyon süreci	14
2.7.1. İki boyutlu modeller	15
2.7.2. Üç boyutlu modeller	17
2.7.3. Matrigel™ tabanlı kültür sistemi	18
3.GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. 15P-1 Sertoli hücre hattı (ATCC® CRL-2618™) ‘nın <i>in vitro</i> koşullarda çoğaltılması	21
3.1.1. Hücre canlılığının değerlendirilmesi	21
3.1.2 15P-1 Sertoli hücre hattının immünofloresan yöntem ile kimliğinin belirlenmesi	22
3.2. Deney gruplarının oluşturulması	22

3.2.1. Deney grupları uygulamaları için HGF ve GDNF hazırlanması	22
3.2.2. Çoğaltılan 15P-1 Sertoli hücrelerinin Matrigel™ içerisinde 3B kültürü	23
3.2.3. <i>In vitro</i> hücresel organizasyonun sayısal değerlendirilmesi	24
3.2.4. Parafin blokların elde edilmesi	25
3.3. Hematoksilen-Eozin boyama	26
3.4. İmmünofloresan boyama	27
3.5. İstatistiksel analizler	27
4.BULGULAR	29
4.1. 15P-1 Sertoli hücre hattı <i>in vitro</i> koşullarda başarıyla çoğaltılmıştır	29
4.2. 15P-1 Sertoli hücre hattı kültür süresi boyunca kimliğini korumuştur	30
4.3. 15P-1 Sertoli hücrelerinin Matrigel™ içerisinde 3B kültürü başarıyla gerçekleştirilmiştir	31
4.4. 15P-1 Sertoli hücrelerinin Matrigel™ içerisinde 3B kültürü sonrasında lümen benzeri yapılar oluşturma kapasiteleri HGF ve GDNF varlığında daha yüksektir	37
4.5. Üç boyutlu Matrigel™ kültüründe oluşan hücresel organizasyon HE boyaması ile gözlendi	43
4.6 Sertoli hücreleri kültürün sonuna kadar kimliklerini korudular ve HGF+GDNF grubunda sıkı bağlantı yapıları oluşturdular	46
5.TARTIŞMA	50
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	57
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	64

TABLÖLAR DİZİNİ

TABLO 4.1. Üç boyutlu hücre kültürünün 24. saatinde kontrol, HGF, HGF+GDNF ve GDNF gruplarında hücreler arası etkileşim sayıları.	38
TABLO 4.2. Üç boyutlu hücre kültürünün 48. saatinde kontrol, HGF, HGF+GDNF ve GDNF gruplarında kordon benzeri yapıların sayısı.	39
TABLO 4.3. Üç boyutlu hücre kültürünün 72. saatinde kontrol, HGF, HGF+GDNF ve GDNF gruplarında kordon benzeri yapıların sayısı.	40
TABLO 4.4. Üç boyutlu hücre kültürünün 96. saatinde kontrol, HGF, HGF+GDNF ve GDNF gruplarında lümen benzeri yapıların sayısı.	41
TABLO 4.5. Üç boyutlu hücre kültürünün 120. saatinde kontrol, HGF, HGF+GDNF ve GDNF gruplarında lümen benzeri yapıların sayısı.	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL 2.1. Gelişen fare testisinin şema şeklinde gösterimi	5
ŞEKİL 2.2. Seminifer tübülde hücrelerin yerleşimi	7
ŞEKİL 2.3. Testis kordon oluşumunun şematik gösterimi	8
ŞEKİL 2.4. Met reseptörünün HGF ve GDNF aracılığıyla başlatılan ortak sinyalizasyonu	12
ŞEKİL 2.5. Ölümsüzleştirilmiş Sertoli hücre hatlarının oluşumunu gösteren şema	14
ŞEKİL 2.6. Testiküler hücre tiplerinin <i>in vitro</i> yeniden düzenlenmesinin kronolojik süreci	15
ŞEKİL 3.1. Çalışmanın deneysel basamaklarını özetleyen şema	20
ŞEKİL 3.2. Üç boyutlu Matrigel™ kültürü için kullanılan 8 kuyucuklu kültür slaytı	24
ŞEKİL 3.3. Üç boyutlu Matrigel™ kültürünü parafine gömme yöntemi	26
ŞEKİL 4.1. 15P-1 Sertoli hücre hattının 14. pasajına ait 2B hücre kültürü. 24, 48 ve 72 saat süreyle kültüre edilmiş hücrelerin invert mikroskop ile görüntülenmesi.	29
ŞEKİL 4.2. 15P-1 Sertoli hücrelerinin 14. pasajının karakterizasyonu. 72 saat süreyle kültüre edilmiş hücrelerin immünofloresan mikroskop ile görüntülenmesi.	30
ŞEKİL 4.3. 15P-1 Sertoli hücre hattının 14. pasajına ait 3B hücre kültürünün oluşturulduğu gün (G0). Hücrelerin invert mikroskop ile görüntülenmesi.	32
ŞEKİL 4.4. 15P-1 Sertoli hücre hattının 14. pasajına ait 3B hücre kültürünün 24. saati (G1). Hücrelerin invert mikroskop ile görüntülenmesi.	33
ŞEKİL 4.5. 15P-1 Sertoli hücre hattının 14. pasajına ait 3B hücre kültürünün 48. saati (G2). Hücrelerin invert mikroskop ile görüntülenmesi.	34

ŞEKİL 4.6. 15P-1 Sertoli hücre hattının 14. pasajına ait 3B hücre kültürünün 72. saati (G3). Hücrelerin invert mikroskop ile görüntülenmesi.	35
ŞEKİL 4.7. 15P-1 Sertoli hücre hattının 14. pasajına ait 3B hücre kültürünün 96. saati (G4). Hücrelerin invert mikroskop ile görüntülenmesi.	36
ŞEKİL 4.8. 15P-1 Sertoli hücre hattının 14. pasajına ait 3B hücre kültürünün 120. saati (G5). Hücrelerin invert mikroskop ile görüntülenmesi.	37
ŞEKİL 4.9. Üç boyutlu hücre kültürünün 24. saatinde kontrol, HGF, HGF+GDNF ve GDNF gruplarında hücreler arası etkileşimin analizi	38
ŞEKİL 4.10. Üç boyutlu hücre kültürünün 48. saatinde kontrol, HGF, HGF+GDNF ve GDNF gruplarında hücreler arası etkileşim sayılarının analizi.	39
ŞEKİL 4.11. Üç boyutlu hücre kültürünün 72. saatinde kontrol, HGF, HGF+GDNF ve GDNF gruplarında kordon benzeri yapıların sayılarının analizi.	40
ŞEKİL 4.12. Üç boyutlu hücre kültürünün 96. saatinde kontrol, HGF, HGF+GDNF ve GDNF gruplarında lümen benzeri yapıların sayılarının analizi.	42
ŞEKİL 4.13. Üç boyutlu hücre kültürünün 120. saatinde kontrol, HGF, HGF+GDNF ve GDNF gruplarında lümen benzeri yapıların sayılarının analizi.	43
ŞEKİL 4.14. Üç boyutlu kültürün 120. saatinde kontrol, HGF, HGF+GDNF ve GDNF gruplarından elde edilen parafin kesitlerinin 20x ve 40x büyütmede görüntülenmiş hematoksilin-eozin boyamaları.	45
ŞEKİL 4.15. Üç boyutlu kültürün 120. saatinde kontrol, HGF, HGF+GDNF ve GDNF gruplarından elde edilen parafin kesitlerde kit ligand (Scf) ifadesinin immünofloresan görüntüleri.	47
ŞEKİL 4.16. Üç boyutlu kültürün 120. saatinde kontrol, HGF, HGF+GDNF ve GDNF gruplarından elde edilen parafin kesitlerinde c-kit ifadesinin immünofloresan görüntüleri.	48

ŞEKİL 4.17. Üç boyutlu kültürün 120. saatinde kontrol, HGF, HGF+GDNF ve GDNF gruplarından elde edilen parafin kesitlerinde zonula okludens (ZO-1) ifadesinin immünofloresan görüntüleri.

49



SİMGELER VE KISALTMALAR

2B : İki Boyutlu

3B	: Üç Boyutlu
ABP	: Androjen Bağlayıcı Protein
ALK 4/5/7	: Anaplastik Lenfoma Kinaz 4/5/7
AMH	: Anti-Müllerian Hormon
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
FLH	: Fetal Leydig Hücreleri
GDNF	: Gliyal Hücre Kökenli Nörotrofik Faktör
HGF	: Hepatosit Büyüme Faktörü
KTb	: Kan Testis Bariyeri
LEH	: Lenfatik Endotel Hücrelerinin
MEF	: Fare Embriyonik Fibroblastlar
NRTK	: Nörotrofik Reseptör Tirozin Kinaz
PAS	: Periyodik Asit Schiff
PGAL	: Fosfogliseraldehit
PGH	: Primordiyal Germ Hücreleri
PTMH	: Peritübüler Miyoid Hücreler
PyLT	: Poliomavirüs Büyük T Antijeni
SKH	: Spermatogonyal Kök Hücreler
SV40	: Simian Virüsü 40
TERT	: Telomeraz Reverse Transkriptaz
TGF	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü
TGF-β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta
WT1	: Wilm's Tümör



1. GİRİŞ

1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Testis oluşumu sırasında seminifer tübüllerin oluşumuna öncülük eden hücreler Sertoli hücreleridir. Olgun bir testiste; Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücreler seminifer tübüller içerisinde yer alırken, vasküler endotel hücreler, peritübüler miyoid hücreler ve Leydig hücreleri ise seminifer tübüller dışında yer alırlar. Testisin bu hücreSEL organizasyonu; spermatogonyal kök hücreler (SKH)'in çoğalması ve farklılaşması için çeşitli hücrelerden salgılanan faktörleri ve hücreler arası etkileşimleri sağlayarak erkek fertilitasını sürdürür. SKH'in devamlılığını sağlayan faktörlerden biri olan gliyal hücre kökenli nörotrofik faktör (GDNF); Sertoli hücreleri, peritübüler miyoid hücreler ve testiküler endotel hücreleri tarafından salgılanmaktadır. Embriyonik morfogenezde seminifer tübüllerin oluşumunda direkt rol oynayan faktörlerden biri olan hepatosit büyüme faktörü (HGF) ise, postnatal dönemde Sertoli hücrelerinden salgılanarak, mezenkimal ve epitelial hücreler arasında parakrin bir karşılıklı konuşma sağlamaktadır. Sertoli hücreleri kullanarak *in vitro* tübülogenez oluşturmayı hedefleyen çalışmalarda, iki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) kültür sistemleri ve 3B biyo-yazıcılar kullanılarak, testis morfolojisinin düzenlenmesi ve hücrelerin birbirleriyle etkileşimleri araştırılmıştır. Bu gelişmiş teknolojilerin bu alana uygulanmasının öneminin yanı sıra, farklı büyüme faktörü faktörlerinin *in vitro* tübülogenez sürecindeki etkileri henüz tamamen aydınlatılamamıştır. Renal tübülogenez sürecinde; GDNF'nin HGF'nin *in vitro* tübül oluşturma kapasitesini daha da arttırdığı 2019 yılında literatürde bildirilmiştir. Testis tübüllerinin *in vivo* ve tübül benzeri yapıların *in vitro* oluşumunda HGF'nin rolü olduğu bilinmesine rağmen, renal tübülogeneze benzer olarak, GDNF'nin de Sertoli hücrelerinin *in vitro* tübülogenezi sürecinde görev alıp almadığı hakkında literatürde henüz bir bilgi yoktur. Buradan yola çıkarak bu çalışmanın hipotezi; “Üç boyutlu Sertoli hücre kültüründe GDNF, HGF'nin *in vitro* tübül oluşturma kapasitesini artırır” olarak kurulmuştur. Bu hipotezi test etmek için üç temel amaç belirlenmiştir: (i) Hücre hattı kullanarak Sertoli hücrelerinin kültürü sonrasında sayıca çoğalan hücrelerden Matrigel™ destekli 3B Sertoli hücre kültür sistemi oluşturmak ve invert mikroskop altında Sertoli

hücrelerinin *in vitro* tübül oluşturma kapasitesini sayısal olarak değerlendirmek, (ii) Üç boyutlu kültürde Sertoli hücrelerinin *in vitro* tübül oluşturma kapasitesini hematoksil-eozin (HE) boyalı parafin kesitlerde değerlendirmek, (iii) Tübül benzeri yapılar oluşturan Sertoli hücrelerinin bu süreçte kimliğini koruduğunu ve polarizasyon gösterdiğini belirlemek için; kit ligand, c-kit ve ZO-1 protein ekspresyonlarını immüno Floresan yöntemle değerlendirmek. Bu çalışmanın sonuçları; farklı büyüme faktörlerinin kombinasyonunun *in vitro* tübülogenez sürecindeki etkinliğini ortaya koyarak, testis morfolojisinin organizasyonundaki moleküler süreçlerin aydınlatılmasına ve ileride SKH'in çoğaltılarak *ex vivo* spermatogenez sürecinde kullanılabilmeleri için uygun kültür ortamlarının geliştirilmesi bağlamında yeni araştırmaların planlanmasına önemli katkılar sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

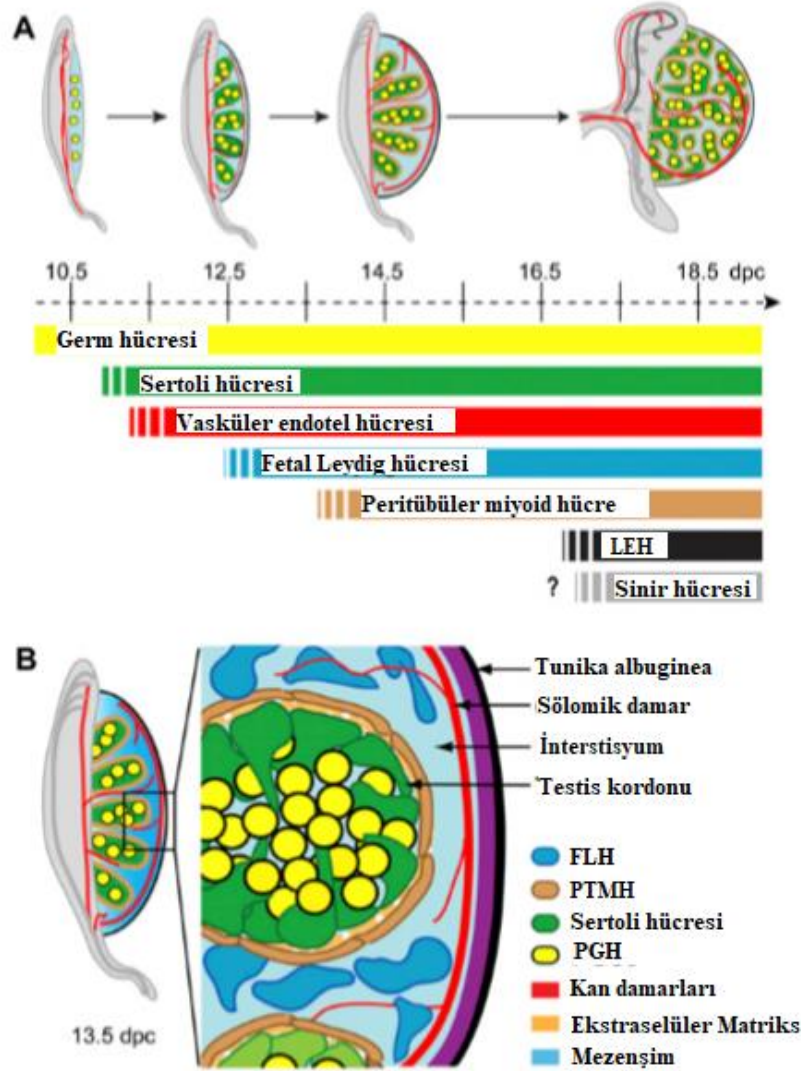
Erkek üreme sisteminin bir çift organı olarak bulunan testis, temel olarak erkek fertilitesi olmak üzere testosteron hormonun üretilmesi ve salgılanması, sperm üretimi ve erkek fiziksel özelliklerinin gelişmesi gibi önemli rollere sahiptir. Embriyonik gelişim sürecinde farklı hücre tiplerinin ve hücresel faktörlerin testis oluşumunu tetiklemesi ile oluşan testis, puberte sonrasında olgun hücresel fonksiyon işlevini kazanır. Embriyonik dönemden puberteye kadar testiste oluşan SKH'den, puberte sonrasında dalgalar halinde spermatozoa üretilir. Testis morfolojik yapısı ve testiküler niş SKH havuzunun korunması ve spermatogenezin sürdürebilmesi için organize olmuştur.

2.1. Testis gelişimi ve morfolojik düzeninin kurulması

İnsanda gonad gelişimi; embriyonik dönemin 4. haftasının sonunda mezonefroz ile son bağırsağın dorsal kısmı arasında genital kabartı oluşturarak, 6. haftada bu mezoderminin içerisine vitellüs kesesi duvarından göç eden primordiyal germ hücreleri (PGH) yerleşince başlar (Boizet-Bonhoure, 2015). Erkek gonadın morfolojik özellikleri embriyonik gelişimin 7. haftasında ilk kez belirmeye başlar (Mclaren, 1991). İlk farklı hücreler olan ve sölomik epitelden köken alan Sertoli hücreleri seminifer tübül duvarının en çok sayıda bulunan hücreleridir (Karl ve Capel, 1998). Fonksiyonları; bir yandan seminifer kordonları oluşturmak diğer yandan da paramezonefrik kanalların gerilemesini sağlayan Anti-Müllerian hormon (AMH) salgılamaktır. AMH salgılanması puberteye kadar devam eder ve puberteden sonra sona erer (Rehman ve ark., 2017). Primordiyal germ hücreleri, seminifer kordonlar içerisinde önce gonositlere ve doğumdan sonra ise spermatogonyumlara farklılaşarak kök hücre havuzunu oluşturan ve aynı zamanda spermatogenezi sağlayan temel hücrelerdir (Sosa ve ark., 2018). Seminifer tübüller arasındaki mezenşimden ilk olarak fetal Leydig hücreleri (FLH) ve bağ dokusu gelişmeye başlar ve Leydig hücreleri 8. haftadan itibaren testosteron ve androstenedion üretirler (Inoue ve ark., 2018). Seminifer tübüllerin arasındaki (intersitisyel) alanı oluşturacak bağ dokusu, Leydig hücrelerinin dışında mezenşimden köken alan

peritübüler miyoid hücreler (PTMH) ve vasküler endotel hücreler gibi destek hücrelerinden meydana gelmektedir (Heinrich ve DeFalco, 2020).

Bu gelişim süreci kemirgenlerde; insan gelişimine benzer olarak, Sertoli hücrelerinin birbirlerine tutunarak seminifer kordonları oluşturmak için göç eden PGH'ni çevrelemesi ile başlar. Bu süreç sıçanda prenatal 13.5 ile 14.5'uncu gün ve farede 11.5 ile 12.5'uncu günler arasında gerçekleşir (**Şekil 2.1**). Daha sonra Sertoli hücreleri, doğum sonrası 16. güne ve farede 17. güne kadar çoğalmaya devam ederler (Migrenne ve ark., 2012). **Şekil 2.1A**'da fare testisi oluşumu sırasında gelişim günlerine göre meydana gelen hücresel farklılaşma gösterilmektedir. Farklılaşan ilk somatik hücreler Sertoli hücreleridir (yeşil) ve endotel hücreleri de ilkel vasküler yapıyı (kırmızı) oluşturmak üzere erken aşamada gonad içine göç ederler. Sertoli hücre proliferasyonunun ardından, fetal Leydig hücreleri (FLH'ler; mavi) ve peritübüler miyoid hücreler (PTMH'ler; kahverengi) farklılaşır. Venöz damarların ve lenfatik endotel hücrelerinin (LEH'ler; siyah) gelişimi ile vasküler yapı tamamlanır. Postnatal dönemde testis, nöronlar da içermesine rağmen, bu hücrelerin ortaya çıktıkları ilk gelişim aşaması belirsizliğini korumaktadır. Embriyonik gelişimde, 13.5 güne kadar fare testisi testis kordonlarına ve intersitisyel alana ayrılarak olgun testis morfolojik yapısı neredeyse tamamlanmış olur (**Şekil 2.1B**).



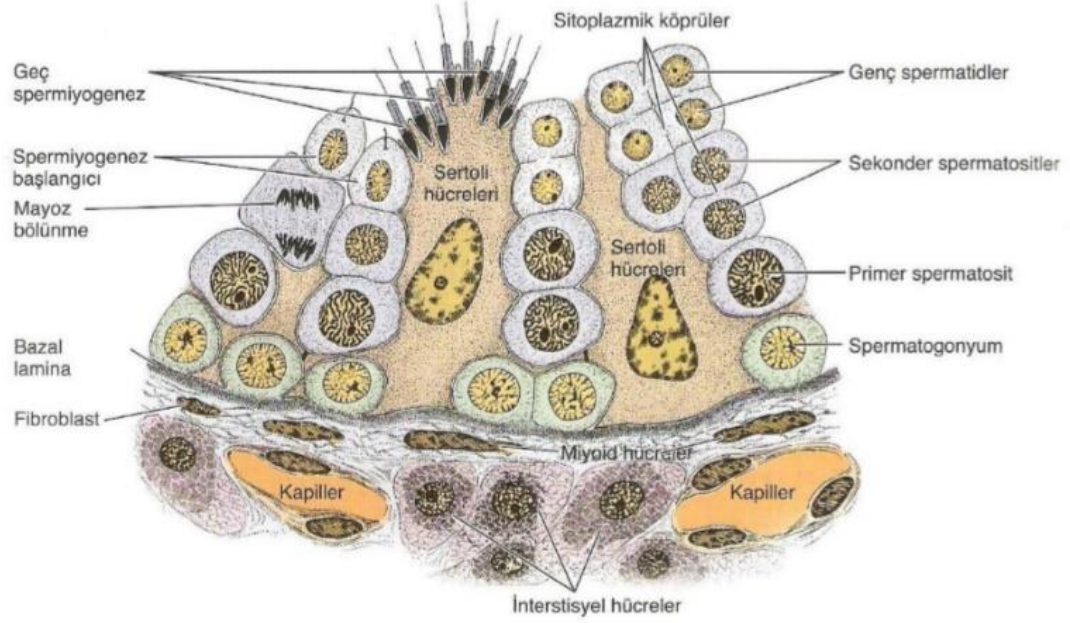
Şekil 2. 1. Gelişen fare testisinin şema şeklinde gösterimi (Svingen ve Koopman, 2013). FLH: Fetal Leydig hücresi, PTMH: Peritübüler miyoid hücre, PGH: Primordiyal germ hücresi, dpc: embriyonik gelişim günü. Şekil orijinal halinden Türkçeleştirilmiştir.

Seminifer tübüllerin oluşumu birkaç basamakta gerçekleşir. İlk olarak; prenatal dönemde testiküler kordon oluşumunu Sertoli hücrelerinin bir araya gelmesi sağlar (Abe ve ark., 2017). Postnatal dönemde ise, gonositlerin spermatogonyumlara farklılaşarak Sertoli hücrelerinin bazaline yerleşmesi ve bu süreçteki hücrel etkileşimler sayesinde tübül lümeni ve esasen seminifer tübül oluşumu gerçekleşir (Naillat ve ark., 2014). Seminifer kordonlar oluşurken testiste bulunan vasküler endotel hücreler, Sertoli hücrelerine rehberlik ederek, diğer bir deyişle seminifer kordonların mezonefrozdaki göç eden vasküler endotel hücreleri ile paralel dizilmesini sağlayarak, önemli bir rol oynarlar

(Combes, Wilhelm, ve ark., 2009). Seminifer tübüllerin oluşumunu fibroblast büyüme faktörü (FGF) sinyali ve HGF doğrudan veya dolaylı olarak etkilemektedir (Ricci ve ark., 1999; Hiramatsu ve ark., 2010).

2.2. Seminifer tübüllerin organizasyonu ve spermatogeneizde rol oynayan faktörler

Testisin hücresel organizasyonu erkek fertilitesi; SKH çoğalması, farklılaşması ve spermatogenezin devamlılığı için çeşitli hücrelerden salgılanan faktörler ve doğru hücreler arası etkileşimler ile sağlar. Olgun bir testiste; Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücreler seminifer tübüller içerisinde yer alırken, testiküler endotel hücreler, PTMH'ler ve Leydig hücreleri ise seminifer tübüller dışında yer alırlar (**şekil 2.2**) (Heinrich ve DeFalco, 2020). Spermatogonyumlar kök hücrelerdir ve farklı olarak spermatozoayı oluştururlar (Kanatsu-Shinohara ve Shinohara, 2013). Sertoli hücreleri androjen bağlayıcı protein (ABP), inhibin, GDNF, FGF2 gibi faktörleri salgılayarak ve spermatogenik hücreler ile bağlantılar kurarak bu hücelere ve testis gelişiminde destek görevi g r rl r (Baazm ve ark., 2017). Leydig hücreleri, erkek genital organlarının embriyolojik farklılaşmasında da etkili olan testosteron hormonunu üretirler ve spermatogenez için Sertoli hücrelerine destek olurlar (Zhou ve ark., 2019). Testiküler endotel hücreleri, GDNF  reterek SKH'i destekler ve testiste vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) aracılı damar oluşumunu sağlar (Bhang ve ark., 2018).



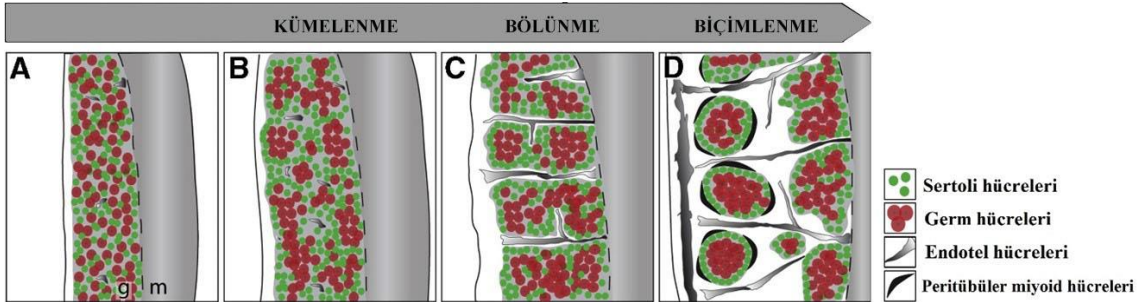
Şekil 2. 2. Seminifer tübülde hücrelerinin yerleşimi (Junqueira, 2009). Şekil orijinal halinden Türkçeleştirilmiştir.

Seminifer tübüller; ilk olarak lümensiz testiküler kordonlar şeklinde oluşur ve postnatal hayatta SKH'in bazale doğru göç etmesiyle, lümeni olan yapılara dönüşürler (van der Wee ve Hofmann, 1999). Sertoli hücrelerinin; spermatogonyumlar, PTMH ve vasküler endotel hücreler ile arasındaki etkileşimlerinin bu süreci desteklemesiyle, Sertoli hücreleri bir araya gelerek testis kordonlarını oluşturur (Combes, Wilhelm, ve ark., 2009). Ardından, seminifer tübüllerde lümen yapılarının gözlenmesi ile eş zamanlı olarak Sertoli hücreleri arasında sıkı bağlantıların ortaya çıkması (kan-testis bariyerinin kurulması) gerçekleşmektedir. Bu durum, Sertoli hücrelerinin seminifer tübül lümenlerinin oluşumunda temel rol oynadığını göstermektedir (Russell ve ark., 1989). Diğer organların embriyonik gelişimlerine benzer olarak seminifer tübüllerin morfogenezi, Sertoli hücreleri ile peritübüler ve/veya Leydig hücreleri arasındaki epitelyal-mezenşimal hücre etkileşimlerini içerir (Grobstein, 1967; Gumbiner, 1992). Bu karşılıklı etkileşimler hücresel farklılaşmanın yanında gelişimin ileriki süreçlerinde fizyolojinin belirlenmesi için gereklidir (Matsumoto ve Nakamura, 1996; Birchmeier ve Gherardi, 1998). Bu bilgiler, mezenşim kökenli Leydig ve PTMH tarafından salgılanan parakrin faktörlerin Sertoli hücrelerinin yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak, seminifer

tübüllerin morfogenezinde ve devamlılığında rol oynadığını göstermektedir (van der Wee ve Hofmann, 1999).

2.2.1. Testis kordonlarının oluşumu

Sertoli hücreleri endotel, peritübüler miyoid ve Leydig hücrelerinin bulunduğu ve zenginleştirilmiş ekstraselüler matriks içeren jel ile 3B kültüre edildiğinde, Sertoli hücrelerinin kültür ortamında bulunan hücreler arasındaki etkileşimiyle, kordon oluşumunun gerçekleştiği gösterilmiştir (Combes, Wilhelm, ve ark., 2009). Bununla birlikte, testis kordon oluşumunda mezonefrozdaki göçen hücrelerin de bu süreçte kritik rol oynadığı belirtilmiştir (Buehr ve ark., 1993). Sertoli hücrelerinin ve mezonefrozdaki endotel hücrelerinin göçünün, testis kordonlarının oluşumu ve şekillenmesi için gerekli olduğu bilinmektedir. Testis kordon oluşum süreci; hücrelerin kümelenme, bölünme ve biçimlenme fazlarını içermektedir (Combes, Lesieur, ve ark., 2009) (**Şekil 2.3**). Pre-Sertoli ve germ hücrelerinin gonad içinde yerleşimi sonrasında, nörotrofik reseptör tirozin kinaz (NRTK)'lar testiküler kordon oluşumu sürecindeki hücrelerin kümelenme fazında rol oynamaktadır (Gassei ve ark., 2008) (**Şekil 2.3B**). Moleküler düzenlemelerin devamında ise göç eden endotel hücreleri ile hücreler arası etkileşimler testis kordonlarının oluşumu sürecindeki bölünme fazında rol oynar (**Şekil 2.3C**). Testis kordonlarının bölünmesiyle Sertoli hücreleri, bazal membran oluşturmak üzere PTMH'le birbirlerine tutunur ve testis kordonlarının şekli ve boyutu bu hücreler arasındaki etkileşim ile düzenlenir (**Şekil 2.3D**).



Şekil 2.3. Testis kordon oluşumunun şematik gösterimi (Combes, Wilhelm, ve ark., 2009). Şekil orijinal halinden Türkçeleştirilmiştir.

Pre-Sertoli hücrelerindeki yapısal değişiklikler testis kordonlarının oluşumunu ve genişlemesini sağlamaktadır (Cool ve ark., 2012). Bu yapısal değişiklikler, Sertoli hücrelerinin folikül uyarıcı hormon (FSH), tiroid hormonu (T_3) ve aktivin A gibi çeşitli faktörlerin uyarımıyla, insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF1) yolağını düzenleyerek proliferasyonunu içermektedir (Chojnacka ve ark., 2016). Ancak Sertoli hücrelerinin testis kordon oluşumu sürecindeki rolünün altında yatan moleküler mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır (Chojnacka ve ark., 2016). Diğer yandan, endotel hücreleri gebeliğin 11.5'uncu gününden başlayarak mezonefroza göç eder ve testis kordonların organizasyonu ile eş zamanlı olarak testis damar sistemini oluşturur (Brennan ve ark., 2002). Damar sisteminin kurulması ve göç eden hücrelere yol gösterici olarak testis kordon oluşumu süreci kordonların sayısını ve şeklini belirlemektedir. Bu nedenle, endotel hücreleri tarafından oluşturulan testis damar sistemi testis kordon gelişimi için gereklidir ve yokluğunda testis kordon gelişimi gecikmeye uğramaktadır (Combes, Lesieur, ve ark., 2009).

2.2.2. Spermatogenezde rol oynayan faktörler

Doğumdan önce kapalı olan, lümeni olmayan, seminifer kordonların doğumdan bir süre sonra gonositlerin spermatogonyumlara farklılaşmasıyla lümenleri oluşur ve spermatogenez bu tübüler yapı içerisinde Sertoli hücreleri ve diğer çevre hücreler tarafından desteklenir (Kanatsu-Shinohara ve Shinohara, 2013). Spermatogonyal kök hücrelerin korunması ve spermatogenezin sürdürülmesi erkek fertilitesi açısından önemlidir. Spermatogenik hücre nişini; Sertoli hücreleriyle beraber tübül duvarında ve intersitisyel alanda yer alan hücreler ile bu somatik hücrelerin salgıladıkları faktörler desteklemektedir. Spermatogonyal kök hücrelerin devamlılığında rol oynayan faktörler insülin benzeri büyüme faktörü bağlama proteini-2 (IGFBP-2), stroma kökenli faktör-1 (SDF-1), makrofaj inflamasyon proteini (MIP-2), GDNF ve FGF-2'dir (Bhang ve ark., 2018).

2.3. Testis kordonları ve tübül oluşumunda HGF/c-Met sinyal yolağının rolü

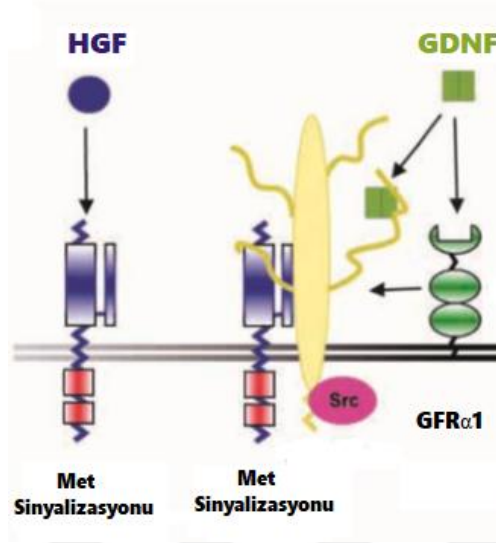
Seminifer tübüllerin oluşumunu doğrudan veya dolaylı şekilde etkileyen faktörler vardır ve bunlar; FGF, HGF, dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) beta reseptör 1 (ALK 4/5/7), NRTK, tirozin-protein kinaz (ErbB4) gibi hücreler arası iletişimi sağlayan sinyal yolakları ile ilişkilidir (Hiramatsu ve ark., 2010; Naillat ve ark., 2014; Ricci ve Catizone, 2014; Abe ve ark., 2017).

Hepatosit büyüme faktörü (HGF)/c-Met sinyal yolağı, prenatal ve postnatal testis gelişimi ve fonksiyonu da dahil olmak üzere tübülogenez ile ilişkili morfogenez süreçlerinde önemli rolü olan bir sinyal yolağıdır (Catizone ve ark., 2001; Ricci ve Catizone, 2014). HGF, epitelyal ve endotelyal hücrelerinin proliferasyonu, motilitesi ve tübülogenez gibi olaylardan sorumlu çok fonksiyonlu bir büyüme faktörüdür (Birchmeier ve Gherardi, 1998). HGF reseptörü olan c-Met, bir tirozin kinaz reseptör proteinidir (Catizone ve ark., 2001). Fare testisinde HGF/c-Met ekspresyonu 11.5 dpc'de başlar ve prenatal ve postnatal testis gelişimi süresince devam eder (Ricci ve Catizone, 2014). Gonad gelişiminin erken evresinde gonadda dağılım gösteren HGF, mezenşimal hücrelerden salgılanan FGF-9, platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve nörotrofin gibi büyüme faktörleri ile birlikte çalışmaktadır (Ricci ve Catizone, 2014). HGF böbrek, akciğer ve karaciğer gibi organlarda tübül oluşumu için parakrin bir faktör olmasının yanı sıra, testiküler tübül oluşumu sürecinde de rol oynamaktadır (Barros ve ark., 1995). Mezenkimal ve stromal hücreler tarafından ifade edilen HGF, reseptörü olan c-Met aracılığıyla epitelyal hücreleri etkiler (Kamalati ve ark., 1999). Testiste, PTMH, endotel hücreler ve Leydig hücreleri mezenşimal/stromal kökenli hücreleri temsil ederken, Sertoli hücreleri epitelyal kökenli hücreleri temsil etmektedir. 1999 yılında yapılan bir çalışmada, Sertoli hücre hattı ve primer Sertoli hücreleri kullanılarak yapılan *in vitro* epitelyal tübülogenez sürecinde HGF'nin gerekli olduğu ortaya konmuştur (van der Wee ve Hofmann, 1999). Mezenkimal ve somatik hücreler tarafından üretilen HGF, c-Met reseptörü ifade eden Sertoli hücrelerinin seminifer tübül oluşturmalarını sağlar ve Sertoli hücrelerinin tübül yerleşimini düzenler (Catizone ve ark., 2001). c-Met ile birlikte HGF ifadesi, postnatal 25. günden itibaren Sertoli hücrelerinde görülür (Lemagueresse ve Jegou, 1988). HGF reseptörü ve c-Met PTMH tarafından da ifade edilmektedir

(Catizone ve ark., 1999) ve bu hücreler testiküler tübülogenez sürecindeki parakrin sinyal yolağının önemli bir parçasıdır (van der Wee ve Hofmann, 1999). Sertoli hücrelerinin testis gelişimi sürecinde tübül oluşumunu sağlaması, germ hücreleri için gerekli olan mikroçevreyi oluşturmaktadır. Dolayısıyla, HGF dolaylı olarak spermatogenezi düzenlemektedir (Catizone ve ark., 2001).

2.4. GDNF ve HGF/c-Met sinyal yolağıyla ilişkisi

GDNF'nin SKH'in desteklenmesi ve kendilerini yenilemesi için kritik olduğu tanımlanmıştır (Meng ve ark., 2000). Spermatogenez için GDNF'nin gerekli olduğu ortaya konduktan sonra, fare SKH'inin destekleyici fare embriyonik fibroblastlar (MEF) üzerinde kültüre edilmesi ve yeterli GDNF ile diğer büyüme faktörlerinin eklenmesi sayesinde kültürde sayılarını arttırma koşulları hızla geliştirilmiştir (Kubota ve ark., 2004). Glial hücre kökenli nörotrofik faktör Sertoli hücreleri, PTMH ve testiküler vasküler hücreler tarafından salgılanır (Spinnler ve ark., 2010; Bhang ve ark., 2018) ve GFR α 1/Ret reseptör kompleksine bağlanan ve dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β) süper ailesinin üyesi olan önemli bir parakrin faktördür (Parekh ve ark., 2019). 2003 yılında yapılan bir çalışmada, GDNF'nin kültür ortamında Madin-Darby Köpek Böbrek (MDCK) hücrelerinin üreterik dallanmalarını, Ret sinyalini kullanmadan, HGF reseptörü olan Met'i aktive ederek indüklediği gösterilmiştir (Popsueva ve ark., 2003) (**Şekil 2.4**). Önemli olarak, GDNF'nin; HGF'nin *in vitro* renal tübül oluşturma kapasitesini arttırdığı 2019 yılında ortaya konmuştur (Nakasatomi ve ark., 2019).



Şekil 2. 4. Met reseptörünün HGF ve GDNF aracılığıyla başlatılan ortak sinyalizasyonu (Sariola ve Saarma, 2003). Şekil orijinal halinden Türkçeleştirilmiştir.

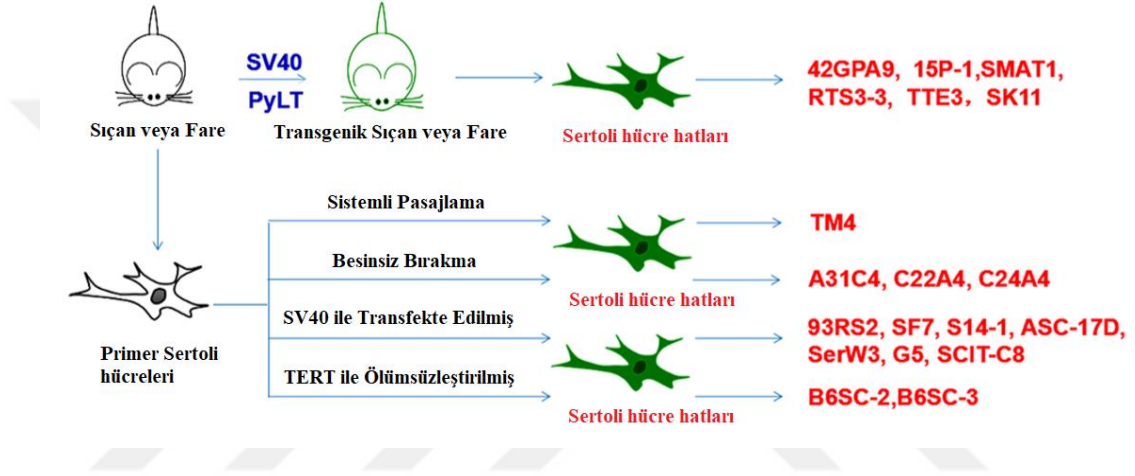
2.5. Sertoli hücrelerinin tübül yapısındaki önemi

Sertoli hücreleri hem fetal dönemde hem de doğum sonrası testis gelişiminde germ hücreleri için destek görevi görmektedir. Sertoli hücreleri birbirlerine sıkı bağlantılarla bağlanarak tübül dışından lümen içine büyük moleküllerin geçişini önlemektedir ve adlüminal tübüler kompartmanda da hücrelerarası ortamın düzenlenmesi sağlamaktadır. Bu bağlantılar, tübül çevresindeki doku ile birlikte kan-testis bariyeri (KTB)'nin temelini oluşturmaktadır (Cheng ve Mruk, 2012). Sertoli hücreleri KTB'ni oluşturmanın yanı sıra, gelişmiş hücre iskeleti sayesinde seminifer tübüllerin temel yapısal desteğini de sağlar (Stanton, 2016). Sertoli hücreleri olgunlaşmasını tamamlayan testiste, puberte sonrasında, artık mitoz bölünmeler geçirmezler. Genel fonksiyonları; büyüme faktörlerini salgılamak ve spermatogenez sürecini destekleyerek kontrol etmektir. Üzerinde FSH reseptörü (FSHR) bulunan Sertoli hücrelerinin aktivitesi, adenohipofizden salgılanan FSH tarafından düzenlenmektedir (Baazm ve ark., 2017). Sertoli hücresi ABP, inhibin, GDNF ve FGF-2 gibi büyüme faktörlerini salgılayarak spermatogenik hücreleri desteklemektedir. FGF-2, GDNF salgılanmasını sağlar (Baazm ve ark., 2017). İki boyutlu ve 3B *in vitro* kültüre edilen Sertoli hücreleri, tübülogenez çalışmaları ve *ex vivo* spermatogenezin desteklenmesi için kullanılan değerli modellerdir.

2.6. *In vitro* çalışmalarda kullanılan Sertoli hücre hatları ve özellikleri

Son yıllarda, germ hücreleri ve Sertoli hücrelerinin birlikte kültür edilmesiyle erkek infertilitesinin tedavisinde umut verici sonuçlar ortaya çıkmaktadır (Wang ve ark., 2016). Bu bağlamda, bu iki hücre tipinin ölümsüz hücre hatlarını geliştirmek ve bunların *in vitro* çalışmalarda kullanılması spermatogenez fizyolojisinin anlaşılması, ilaç uygulama araştırmaları açısından değerlidir. Bu yöntemler temel olarak şu başlıklar altında toplanır: (i) telomeraz reverse transkriptaz (Tert) overekspresyonu, (ii) virüsler (örneğin; simian virüsü 40 (SV40) büyük T antijeni, poliomavirüs büyük T antijeni (PyLT), papillomavirüs E6 ve E7, adenovirüs E1A ve herpesvirüs saimiri), (iii) onkogenler (örneğin; Myc, Ras, Jun) ve (iv) tümör baskılayıcı genler (p16, p53, Rb) (Blagosklonova ve ark., 2002; Sharpe ve ark., 2003; Hai ve ark., 2014). Primer germ hücrelerini *in vitro* koşullarda çoğaltmak zor olduğu için temelde önemli olan, Sertoli hücreleri gibi germ hücrelerine niş oluşturan destek hücreleri ölümsüzleştirmektir. Sertoli hücrelerinin ölümsüzleştirilmesi için kullanılan güncel yöntemler ve oluşturulan hücre hatları aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (**Şekil 2.5**). Gen transfeksiyonu olmadan oluşturulan Sertoli hücre kimliğine sahip TM4 hücre hattı immatür farelerden elde edildiğinden, özellikleri prepubertal kemirgen hücrelerin karakterlerine oldukça benzerdir ve olgun olmayan Sertoli hücrelerinin bölünme mekanizmalarını araştırmak için bir model olarak kullanılmaktadır (Wang ve ark., 2016). Transgenik hayvanlardan veya primer Sertoli hücrelerini onkogenlerle enfekte ederek oluşturulan Sertoli hücre hatları da bulunmaktadır. Örneğin; 42GPA9 ve 15P-1 Sertoli hücre hatları, PyLT transgenik farelerinden üretilmiştir (Paquis-Flucklinger ve ark., 1993; Bourdon ve ark., 1998). 15P-1 hücre hattı ise primer Sertoli hücrelerinin morfolojik ve fonksiyonel özelliklerini korumaktadır ve SKH'lerin kendi kendini yenileme ve farklılaşmalarını incelemek için kullanılan hücre hatlarındandır. Altı aylık genç farelerden elde edilen 15P-1 hücre hattı, Sertoli hücrelerinin olgun olmayan (prepubertal) ve olgun (postpubertal) dönem özelliklerini gösteren Wilm's tümör (Wt1) ve kit ligand belirteçlerini ifade eder (Paquis-Flucklinger ve ark., 1993; Rassoulzadegan ve ark., 1993). 15P-1 hücre hattı işlem görmemiş testis hücre süspansiyonundan türetildiği için, germ ve Sertoli hücrelerinin karışık olduğu belirtilmiştir ve bu hücre hattında bulunan az

sayıdaki hücrelerde germ hücrelerine özgü LDH-X, Hox 1.4 ve c-kit genlerinin ekspresyonu gözlenmiştir (Paquis-Flucklinger ve ark., 1993). PyLT transgenik farelerden oluşturulan klonal Sertoli hücre hatları, normal Sertoli hücresinin özgün fonksiyonlarını ifade etme potansiyeline sahip olduğundan, germ hücre gelişiminde Sertoli hücre fonksiyonunun araştırıldığı çalışmalarda değerlidir (Bourdon ve ark., 1998).

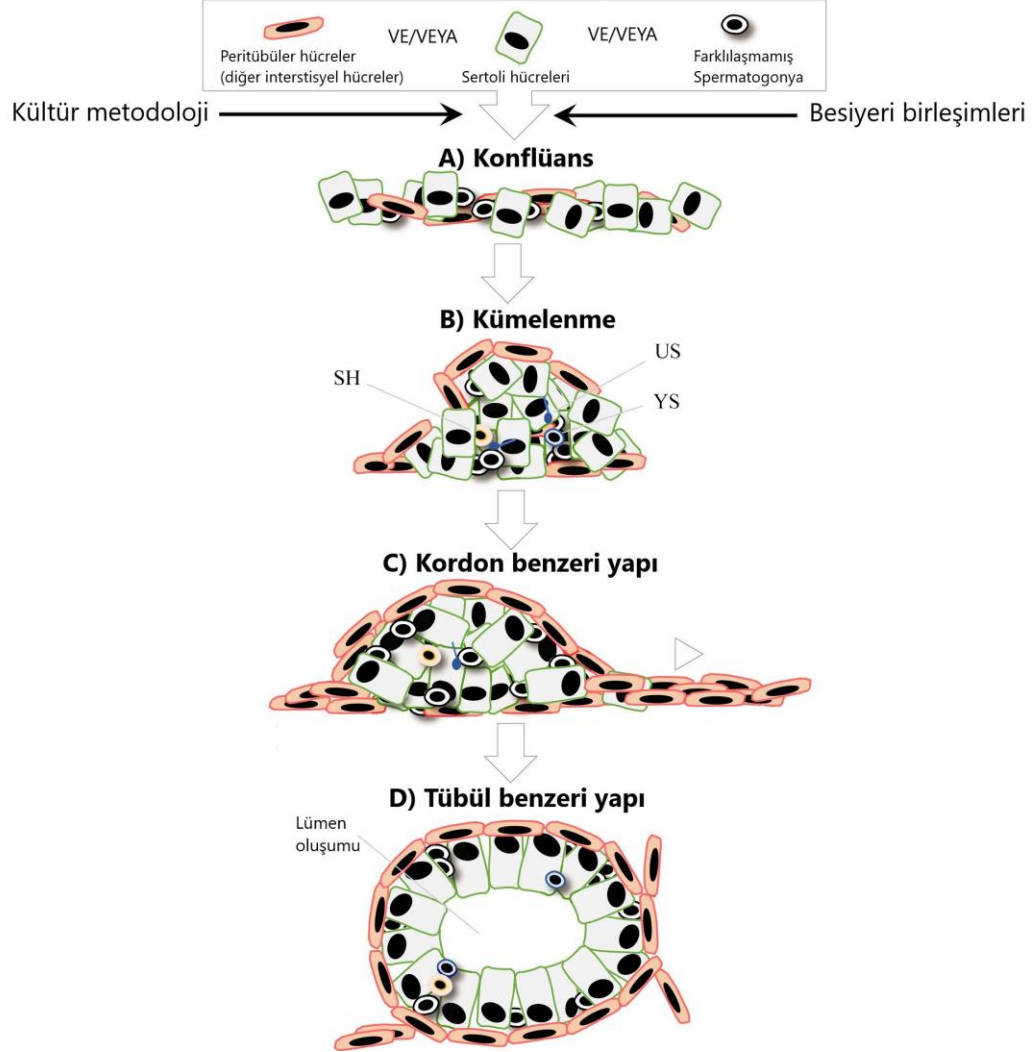


Şekil 2. 5. Ölümsüzleştirilmiş Sertoli hücre hatlarının oluşumunu gösteren şema (Wang ve ark., 2016). Şekil orijinal halinden Türkçeleştirilmiştir.

2.7. Sertoli hücrelerinin *in vitro* testiküler organizasyon süreci

In vitro testiküler organizasyon süreci birkaç hücre tipinin rol oynadığı temel iki bölümden oluşur: testis kordonu benzer yapılar ve tübül benzeri yapılar (Richer ve ark., 2020) (**Şekil 2.6**). Temel olarak Sertoli hücreleri ve onlara eşlik eden diğer testiküler hücreler ile birlikte hem 2B hem de 3B kültür modellerinde organizasyon aynı biçimde ilerlemektedir. En önemli basamak, hücrelerin birbirleriyle etkileşimleriyle birlikte “konflüans” sağlanmasıdır (**Şekil 2.6A**). İkinci aşamada, kasılabilir PTMH’in de etkisiyle Sertoli hücrelerinin multi-nodüler kümeler halinde toplanmaktadır (**Şekil 2.6B**). Hücrelerin oluşturduğu kümelerin birbirleriyle oluşturdukları bağlantılar ile kordon benzeri yapılar meydana gelmektedir (**Şekil 2.6C**). Lümen oluşumuyla tübül benzeri yapılar son aşamayı tamamlamaktadır (**Şekil 2.6D**). Testis hücrelerinin *in vitro* olarak yeniden düzenlenmesi sonrasında spermatogonia farklılaşması da görülebilmektedir (**Şekil 2.6**). Testis gelişimini ve fizyolojisini anlamak için, Sertoli hücreleri ve diğer

testis hücreleri ve bunlar arasındaki hücre-hücre ve hücre-ECM etkileşimi ile 2B ve 3B kültür modelleri kullanılmıştır. Ayrıca, testis hücrelerinin bir işlevi olan bu yeniden organizasyon, testis hücre yaşından önemli ölçüde etkilenir (Gao ve ark., 2020).



Şekil 2. 6. Testiküler hücre tiplerinin in vitro yeniden düzenlenmesinin kronolojik süreci (Richer ve ark., 2020). SH: Spermatogenik hücre, US: uzamış spermatid, YS: yuvarlak spermatid. Şekil orijinal halinden Türkçeleştirilmiştir.

2.7.1. İki Boyutlu modeller

Sertoli hücreleri, *in vitro* testiküler kültürlerde temel hücreler olarak kullanılır ve PTMH veya diğer interstisyel hücreler tarafından desteklenebilir. Önceki *in vitro* çalışmalarda,

birincil veya ölümsüzleştirilmiş Sertoli hücre hatlarıyla oluşturulan hücre kültürlerinin, kümelenme, testiküler kordon benzeri yapı ve tübül benzeri yapıların meydana gelmesi için önemli olduğu bildirilmiştir (Alves-Lopes ve Stukenborg, 2018). İki boyutlu kültür sistemlerinde *in vitro* testiküler benzeri yapıların oluşması için birincil hücreler veya ölümsüzleştirilmiş hücre hatlarının gerekli olmasının yanı sıra; yeniden yapılandırılmış bazal membran (Hadley ve ark., 1985), Matrigel™ (GFR- Matrigel™) (van der Wee ve Hofmann, 1999), laminin (Tung ve Fritz, 1986; Schlatt ve ark., 1996; Gassei ve ark., 2006), fibronectin (Mackay ve ark., 1999) ve kollajen tip IV (Tung ve Fritz, 1986) gibi materyaller ile kaplanmış yüzeyler de kullanılmaktadır. Testis morfogenezini araştıran önceki 2B kültür çalışmalarında, hücre-hücre etkileşimlerini ve hücre-matriks arasındaki etkileşimleri tanımlayabilmek ve 3B modellere daha yakın olduğu için kaplanmış yüzeyler tercih edilmiştir. Ayrıca, testiküler hücrelerin *in vitro* morfogenezik değişiklikleri laminin ve kollajen tip IV ile ilişkili iken, fibronectin ile değildir (Tung ve Fritz, 1986; Richardson ve ark., 1995; Schlatt ve ark., 1996). *In vitro* testis organizasyonunda önemli rol oynayan Sertoli hücrelerinin farklılaşmasında da bu sistemler önemli rol oynar. Özellikle laminin, fibronectin gibi hücre dışı matriks bileşenleri ile kaplı kültür sistemleri ve yeniden yapılandırılmış bazal membranlar Sertoli hücrelerinin farklılaşmasını teşvik etmek için kullanılır (Hadley ve ark., 1985). Yapılan bir çalışmada fibronectin ve lamininin hücre adezyonunu ve farklılaşmasını desteklediği, yeniden yapılan bazal membranın ise pre-Sertoli hücrelerin polarizasyonunu gerçekleştirerek en yüksek farklılaşmayı sağladığı ve bununla birlikte kordon benzeri yapılar oluştuğu gösterilmiştir (Mackay ve ark., 1999). Geçmişte yapılan bir çalışmada, ölümsüzleştirilmiş Sertoli hücre hatları, PTMH ve germ hücreleri Agar ile kaplanmış kültür kabında kültüre edildiğinde, testis kordonuna benzer bir yapı elde edildiği ve germ hücrelerinin en az 7 gün canlılıklarını koruduğu gösterilmiştir (Hofmann ve ark., 1992). 1999 yılında yapılan bir başka çalışmada, ölümsüzleştirilmiş Sertoli hücre hattı ile GFR-Matrigel™ içeren kültürde tek tabakalı testis tübülü benzeri yapılar oluşturulmuştur (van der Wee ve Hofmann, 1999). Herhangi bir materyal ile kaplanmamış kültürde, testis dokusundan elde edilen birincil hücrelerinin kullanıldığı çalışmalarda, genellikle hücrelerin kümelenmiş formunu ve germ hücrelerinin kimliği gösterilmiştir (Gao ve ark., 2020). Ayrıca, spermatogenez ile ilgili çalışmalar için uygun

Sertoli hücreleri, kısa süreli 2B kültür sistemlerinde germ hücreleri ile kültüre edilmiştir. (Vigier ve ark., 2004; Iwanami ve ark., 2006; Xie ve ark., 2010).

Sonuç olarak, 2B modellerde birlikte kültüre edilen olgun Sertoli ve germ hücreleri, esas olarak *in vitro* spermatogenez çalışmalarına öncülük ederken, Sertoli hücre hatları veya genç birincil Sertoli hücreleri veya testis hücreleri içeren/içermeyen diğer kültürler, hücre göçü, bu süreçteki etkileşimlerini inceleyen yapıları araştırmak için tercih edilmektedir (Richer ve ark., 2020). Ancak 2B modeller ile uzun süreli kültürler yapılamaması ve *in vitro* testiküler yapıların oluşumu kısmen tamamlandığından, farklı modellere literatürde hala ihtiyaç duyulmaktadır.

2.7.2. Üç boyutlu modeller

Kültür metotları olarak kullanılan içerikler açısından 3B modeller iki başlık altında toplanabilir: testiküler organ kültürü ve ayrılmış testiküler hücrelerin kültürü. Önceki çalışmalara göre testis organ kültürünü içeren araştırmalar testis organizasyonunu desteklemezken ayrılmış testis hücrelerini kullanan çalışmalar testis organizasyonunun oluşumunu teşvik etmektedir (Alves-Lopes ve Stukenborg, 2018). Ayrılmış testiküler hücrelerini içeren kültür metodolojisinde kullanılan materyaller Agar kültür sistemi, metilselüloz kültür sistemi, Matrigel™, kollajen, kalsiyum aljinat, fosfogliseraldehit (PGAL), hücresizleştirilmiş matriks, süngerler ve nanotüplerdir (Alves-Lopes ve Stukenborg, 2018). İki boyutlu kültür sistemlerine benzer şekilde 3B kültür sistemlerinde yetişkin insan testis hücreleri kullanılırken; sıçan, fare, maymun ve buzağı gibi model organizmalarda ise farklı yaş gruplarındaki hücreler kullanılabilir (Alves-Lopes ve Stukenborg, 2018). 2006 yılında yapılan çalışmalarda, yetişkin insan testis hücrelerinin kalsiyum aljinat ve kollajen gibi yumuşak matriksler kullanılarak kültüre edilmesi sonucunda hücreler küme yapıları oluşturmuştur (D. R. Lee, Kim, Yang, ve ark., 2006; J. H. Lee, Kim, Kim, ve ark., 2006). İki boyutlu kültür sisteminden farklı olarak, 3B kültür sistemleri aracılığıyla hücresel organizasyon, kümelenme ve kordon benzeri yapıların dışında seminifer tübül benzeri yapılara ulaşmıştır. Örneğin; Matrigel™ ile kültüre edilen farklı yaşlardaki testislerden elde edilen hücrelerin, kümelenmiş yapılar ardından kordon benzeri yapılar da oluştuğu gösterilmiştir ve

yetişkin testis hücrelerinin kültüre edilmesiyle seminifer tübül benzeri yapılar oluşturulmuştur (Hadley ve ark., 1985; Hadley ve ark., 1990; Gassei ve ark., 2010; Legendre ve ark., 2010; Alves-Lopes ve ark., 2017; X. F. Zhang ve ark., 2017; Alves-Lopes ve Stukenborg, 2018). Testis hücreleri 3B kültür sisteminde kollajen jel matriks ile kültüre edildiğinde, kümelenmelerin oluşmasıyla *in vitro* spermatogenez desteklenebilir ve hücre canlılığı daha uzun süre korunabilmektedir (J. H. Lee, Kim, Kim, ve ark., 2006). Birçok araştırma için hala 2B kültür sistemleri kullanılsa da 3B kültür endüstrisi, özellikle kanser tedavisi ve kök hücre araştırmalarında, gelişmektedir. Üç boyutlu hücre kültürlerinin kullanımın artan kabulü ve kullanımının nedenleri şu şekilde sıralanabilir; (i) canlı bir organizmadaki koşulların daha iyi simülasyonu, (ii) farklı hücre türleri arasındaki etkileşimin sağlanması, (iii) akış entegrasyonun sağlanması ve (iv) bariyer bağlantılarının oluşturulması. Ancak 3B kültür sistemleri, görüntüleme ve ölçümler açısından zorlukların yanı sıra gerekli malzemelerin pahalı olması, oksijen ve diğer gerekli besinleri doğru yere ulaştırma gibi sorunları da içermektedir. Dolayısıyla, testis açısından da *in vitro* kültür modellerinin geliştirilmesi ve hücre kültürü sürelerinin uzatılması konusunda çalışmalar gereklidir.

2.7.3. Matrigel™ tabanlı kültür sistemi

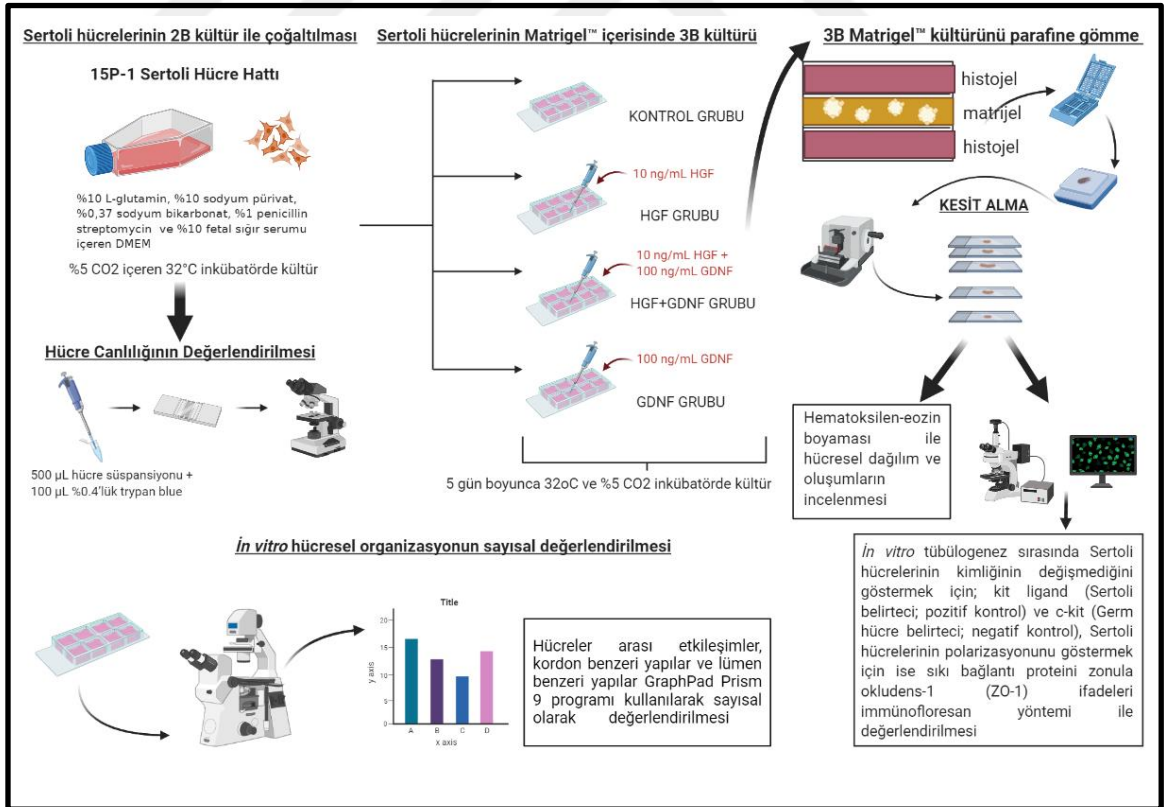
Genel olarak, 2B sistemle karşılaştırıldığında, Matrigel™ tabanlı bir kültür sisteminde gelişmiş hücre organizasyonu ve yaşama yeteneği gözlemlenmektedir (Richer ve ark., 2020). En önemlisi, fare oositlerini dölleyebilen insan yuvarlak spermatidleri, Matrigel™ tabanlı bir kültür sisteminde elde edilmiştir (Sun ve ark., 2018). Fakat, bazı araştırmalara rağmen, 3B kültür sistemlerinde spermatogenezin etkinliği, testise özgü mimarinin sınırlı olmasından kaynaklı düşük kalmıştır (Kanbar ve ark., 2021). Ayrıca, yüksek hücre yoğunluğu kullanıldığında Matrigel™'de sıçan testiküler organoidlerinin gelişmiş organizasyonu meydana geldiği gösterilmiştir (Kanbar ve ark., 2021). Bu durum Matrigel™ tabanlı bir kültür sisteminin testiküler organoid oluşumunda da kullanılabileceğini ortaya koymaktadır (Kanbar ve ark., 2021). Matrigel™ tabanlı bir kültür sistemlerinin tercih edilmesinin bir başka sebebi ise hücre polarite oluşumunu düzenleyebilmesidir (Kanbar ve ark., 2021). İçerisinde bulunan laminin, entaktin gibi bazal membran bileşenleri açısından zengin olması, hücre polaritesi çalışmaları için

avantaj sağlamaktadır. Matrigel™, epitelyal morfogenez sürecini analiz etmek için en uygun olan daha hızlı ve daha tutarlı hücre polarizasyonu ve lümen oluşum oranları ile sonuçlanır (Kanbar ve ark., 2021).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

Deney Tasarımı: Çalışmamız; rastgele seçilmiş (randomize), kontrol grubu içeren, ileriye yönelik (prospektif) bir *in vitro* deneysel araştırma şeklinde planlanmıştır. Bağımlı değişkenler; çalışmaya ait ölçüm parametreleri (hücre sayısı ölçümleri), bağımsız değişkenler; deney koşulları (kültür ortamlarına HGF ve GDNF uygulamaları) olmak üzere çalışmaya ait ölçüm parametreleridir. Çalışmamız, 3B ve Matrigel™ kültür yöntemleri ile ilgili makalelerden yola çıkılarak, *in vitro* koşullarda doğrulayıcı hipotez testi çalışması düzeninde, deney ve kontrol gruplarını içerecek biçimde tasarlanmıştır (van der Wee ve Hofmann, 1999; Pinto ve ark., 2011; Nakasatomi ve ark., 2019). Çalışmamız, literatürde kullanılan “her deney tekrarı için gerekli en az hücre sayısı” göz önünde tutularak planlanmıştır (van der Wee ve Hofmann, 1999). Çalışmanın deneysel tasarımı Şekil 3.1’de gösterilmektedir.



Şekil 3. 1. Çalışmanın deneysel basamaklarını özetleyen şema.

3.1. 15P-1 Sertoli hücre hattı (ATCC® CRL-2618™) ‘nın *in vitro* koşullarda çoğaltılması

Dondurulmuş 15P-1 Sertoli hücre hattı (ATCC® CRL-2618™), 32°C sıcaklığındaki su banyosu içerisinde yaklaşık 2 dakikada eritildi. %1 penisilin streptomisin (Gibco™, 15070063) ve %10 fetal sığır serumu (Gibco™, 2025-s4) eklenerek hazırlanan yüksek glukozlu Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, D6429) besiyeri 32°C sıcaklığındaki su banyosu içerisinde önceden ısıtıldı. Çözülen hücreler, 10 mL DMEM içeren 15 mL’lik falkon içerisine aktarıldı ve yaklaşık 125 x g’de 7 dakika boyunca santrifüj edildi. 4.0 mL DMEM ile hücre pelleti yeniden süspanse edildikten sonra 25 cm²’lik bir kültür tabağına dağıtıldı. Hücre kültürü, %5 CO₂ içeren 32°C inkübatörde gerçekleştirildi. Her 3 günde bir besiyeri değiştirildi. Hücre doluluk oranı %80’ni geçtiğinde kültür tabağı %0.25’lik Tripsin-EDTA (Gibco®, 25200056) çözeltisi ile hücre katmanı yıkandı ve kültür kabına 2.0 mL %0.25’lik Tripsin/EDTA (Gibco®, 25200056) çözeltisi eklendi. Hücreler kültür tabağından kalkana kadar yaklaşık 6 dakika 32°C’de inkübe edildi. Enzimatik tepkimeyi durdurmak için 2.0 mL DMEM eklendikten sonra hücreler pipetlenerek aspire edildi. Yeni kültür tabaklarına uygun hücre süspansiyonu “alikuatlar” şeklinde eklenerek pasajlama yapıldı (3:1 oranında). Sertoli hücrelerinin çoğalma hızı ve hücre doluluk oranına göre 3 veya 4 bir pasaj yapıldı ve 2 günde bir besiyeri yenilendi (Rassoulzadegan ve ark., 1993).

3.1.1. Hücre canlılığının değerlendirilmesi

Kültüre edilen hücrelerden, hücre sayısı 2×10^5 hücre/mL olan hücre süspansiyonundan Eppendorf tüpüne 500 µL hücre süspansiyonu eklendi. Daha sonra üzerine 100 µL %0,4’lük tripan mavisi (Invitrogen™, 10702404) solüsyonu eklenerek 5 dakika bekletildikten sonra örnekler Thoma lamına yerleştirilerek mikroskop altında gözlemlendi. Ölü hücreler mavi renk görünürken, canlı hücreler renksizdi. Canlı hücre oranı (%) = $\frac{\text{Boya almamış hücrelerin sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \times 100$ formülü ile hesaplandı.

3.1.2 15P-1 Sertoli hücre hattının immüno Floresan yöntem ile kimliğinin belirlenmesi

Deney grubunun oluşturulması için kullanılacak 15P-1 Sertoli hücre hattının kimliğinin belirlenmesi için hücre fiksasyonu gerçekleştirildi. İlk olarak 3 adet yuvarlak lamel UV altında 15 dakika steril edildi. Sonrasında 24 kuyucuklu kültür tabağının 3 kuyucuğuna yerleştirildi. Üzerine 300 µL steril FBS eklendi ve 30 dakika 32°C inkübatör içerisinde bekletildi. İnkübasyon sonrasında FBS uzaklaştırıldı ve her kuyucuğa 1×10^5 hücre olacak şekilde 400 µL hücre süspansiyonu koyuldu. Hücreler tutunana kadar 32°C’de inkübe edildi. Hücreler tutunduktan sonra steril PBS ile 3 kez yıkandı. PBS uzaklaştırılıp 200 µL %4’lük paraformaldehit ile 20 dakika fikse edildi. Fiksasyon işlemi sonrasında PBS ile 3 kez 10 dakika yıkandı. Sonra 3 kuyucuğa da 200 µL %0.1’lik Triton X-100 (Sigma-Aldrich, x100) eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından PBS ile 3 kez 3 dakika yıkama yapıldıktan sonra hücreler, 200 µL %0.5’lik normal keçi serum eklendi ve 1 saat bloklama işlemi yapıldı. Bloklamadan sonra yıkama işlemi yapılmadan 1/100 seyreltilmiş kit ligand (Bioss, bs-0545R) ve c-kit (Bioss, bs-10005R) primer antikorları ile + 4°C’de gece boyu inkübe edildi. Normal tavşan IgG negatif kontrol olarak kullanıldı. Ertesi gün PBS ile 3 kez 3 dakika yıkama yapıldı ve Alexa Flour-488 konjuge keçi anti-tavşan sekonder antikorları ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Ardından 3 kez 3 dakika PBS ile yıkandı. Hücre nükleuslarının boyanması amacıyla hücreler 1/2000 seyreltilmiş Hoescht (Thermo, H1399) boyası ile 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve 3 kez 3 dakika PBS ile yıkandı. Kuyucuklar içerisindeki yuvarlak lameller lamlara alınarak gliserol ve distile su ile 1:9 oranında hazırlanmış kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Boyanmalar DAPI ve FITC filtreleri kullanılarak Olympus BX61 Floresan mikroskobu görüntülendi ve fotoğrafları çekildi.

3.2. Deney gruplarının oluşturulması

3.2.1. Deney grupları uygulamaları için HGF ve GDNF hazırlanması

HGF hazırlanışı ve uygulanışı:

Stok olan 20µg HGF (Sigma-Aldrich, SRP3300-20ug), 20 µL distile su içerisinde çözülerek 1µg/µL konsantrasyon elde edildi ve -20°C’de saklandı. Elde edilen 1µg/µL konsantrasyon HGF’den 1µL alınarak 9µL distile suda seyreltildi ve 0,1 µg/µL konsantrasyonda HGF çözeltisi elde edildi. Bu çözelti buzdolabında bir hafta boyunca saklanarak uygulamalar için kullanıldı. İki µL HGF (0,1 µg/µL) ile 20 mL yüksek glukozlu DMEM (Sigma-Aldrich, D6429) besiyeri %1 penisilin streptomisin (Gibco™, 15070063) ve %10 fetal sıgır serumu (Gibco™, 2025-s4) ile karıştırılarak 0,01 ng/µL HGF elde edildi ve hücre kültüründe besiyeri olarak kullanıldı.

GDNF hazırlanışı ve uygulanışı:

Stok olan 10 µg GDNF (Sigma-Aldrich, SRP3200-10ug), 10 µL distile su içerisinde çözülerek 1µg/µL konsantrasyon elde edildi ve -20°C’de saklandı. İki µL GDNF (1 µg/µL) ile 20 mL yüksek glukozlu DMEM (Sigma-Aldrich, D6429) besiyeri %1 penisilin streptomisin (Gibco™, 15070063) ve %10 fetal sıgır serumu (Gibco™, 2025-s4) ile karıştırılarak 0,01 ng/µL GDNF elde edildi ve hücre kültüründe besiyeri olarak kullanıldı.

3.2.2. Çoğaltılan 15P-1 Sertoli hücrelerinin Matrigel™ içerisinde 3B kültürü

Matrigel™ matriksi (Corning®, 354230) kullanmadan önce 4°C buzdolabında bekleterek gece boyunca çözüldü. Matrigel™ matriksi çözüldükten sonra, malzemenin dağıldığından emin olmak için şişe döndürülerek akışkanlığı kontrol edildi. Buz üzerinde Matrigel™ matriksi soğuk hücre kültürü besiyeri %1 penisilin streptomisin (Gibco™, 15070063) ve %10 fetal sıgır serumu (Gibco™, 2025-s4) içeren yüksek glukozlu DMEM (Sigma-Aldrich, D6429) ile 5 mg/mL’ye seyreltildi. Önceden soğutulmuş pipet uçları kullanılarak, önceden soğutulmuş 8 kuyucuklu kültür slaytına (**Şekil 3.2**) 50 µL Matrigel™ matriksi (5mg/mL) eklenerek bir pipet ucuyla eşit şekilde zeminin kaplanması için yayıldı ve jel oluşturmak için 32°C’de 30 dakika inkübe edildi.

Tek hücreli bir süspansiyon elde etmek için hücreler tek tabakadan %0.25'lik Tripsin-EDTA (Gibco®, 25200056) ile kaldırıldı ve 5 dakika boyunca 125 × g'de oda sıcaklığında santrifüj edildi. Hücre canlılıkları değerlendirildi ve hücre doluluk oranı yaklaşık %80-85 olarak hesaplandı. Hücreler besiyeri ile hücre yoğunluğu 3×10^5 hücre/mL olacak şekilde süspanse edildi ve buz üzerinde tutulan 90 µL Matrigel™ matriks solüsyonuna (5 mg/mL) 10 µL hücre süspansiyonu aktarıldı. Oluşturulan kültür 32°C'de 45 dakika inkübe edildi. Seyreltilmiş Matrigel™ çözeltisinin bir matriks halinde düzgün şekilde polimerize olabilmesini sağlamak için, hücre yoğunluğu Matrigel™ matriks çözeltisinin %10'undan fazla olmayacak şekilde hazırlandı. Deney gruplarının bulunduğu kuyucuklara göre yavaşça 200 µL hücre besiyerleri eklendi: 10 ng/mL HGF (HGF Fare SRP3300-20UG, Sigma-Aldrich) eklenerek HGF grupları, 100 ng/mL GDNF (GDNF Fare SRP3200-10UG, Sigma-Aldrich) eklenerek GDNF grupları, 10 ng/mL HGF ve 100 ng/mL GDNF birlikte eklenerek HGF+GDNF grupları oluşturuldu. Tüm gruplar 5 gün boyunca 32°C ayarlı, %5 CO₂ inkübatörde inkübe edildi ve her 2 günde bir besiyerleri yenilendi.



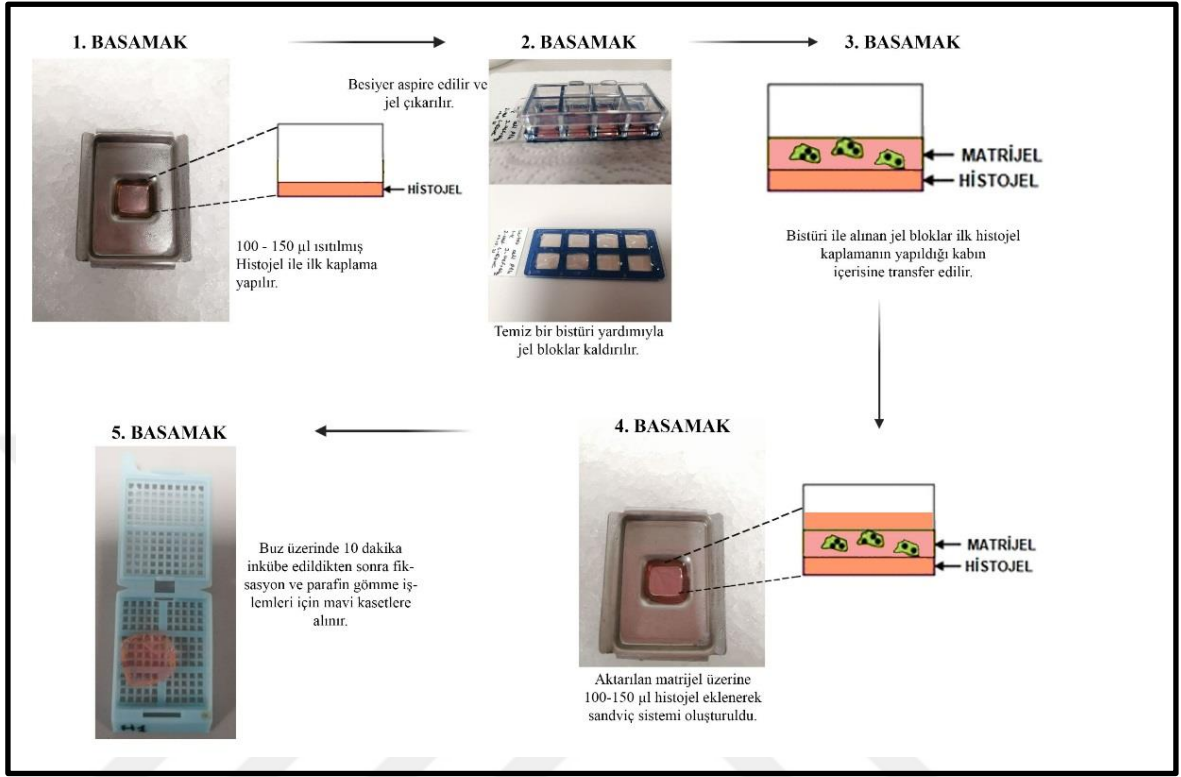
Şekil 3.2. Üç boyutlu Matrigel™ kültürü için kullanılan 8 kuyucuklu kültür slaytı.

3.2.3. *In vitro* hücresel organizasyonun sayısal değerlendirilmesi

15P-1 Sertoli hücrelerinin Matrigel™ içerisinde 3B kültürü 120 saat boyunca devam etti. Hücrelerin kültüre alındığı gün (G0) dahil her 24 saatte bir Olympus IX71 invert mikroskopta 20x büyütmede görüntülendi. Hücreler arası etkileşimler, kordon benzeri yapılar ve lümen benzeri yapılar sayısal olarak değerlendirildi.

3.2.4. Parafin blokların elde edilmesi

Gruplarda yer alan hücreler, 5. günün sonunda histolojik analizler için fiksasyon ve parafine gömme işlemi öncesinde Matrigel™ hücre kültürü blokları biyopsi kabında HistoGel™ (Epredia™, HG-4000-012) sandviçi oluşturulacak şekilde yerleştirildi ve daha sonra parafine gömmek için mavi patoloji kasetlerine aktarıldı (Pinto ve ark., 2011) (**Şekil 3.3**). Yapılan işlemler sırasıyla şöyleydi: HistoGel™ bir tüp içerisinde 65-70°C sıcaklıkta tamamen sıvılaşana kadar eritildi. Buz üzerinde bulunan biyopsi kapları ısıtılmış 150 µL histojel ile dolduruldu. Üç boyutlu Matrigel™ kültürler hücreler dağılmayacak şekilde ve bloklar halinde bisturi yardımı ile çıkarıldı. Çıkarılan Matrigel™ bloklar gömme kasetlerindeki HistoGel™ içerisine bisturi yardımı ile yerleştirildi. Daha sonra biyopsi kabına tekrar 150 µL erimiş HistoGel™ eklenerek sandviç sistemi oluşturuldu ve 10 dakika buz üzerinde bekletildi. HistoGel™ sandviç, doku kasetleri içerisine alınarak 16 saat %10 formalin ile fikse edildi. Fiksasyondan 16 saat sonra; %70, %80 ve %90'lık artan etil alkol serilerinde 24 saat ve %100'lük etil alkolde 3 saat tutulan dokuları sudan kurtarma işlemi gerçekleştirildi. Kasetler, ksilolde 30 saniye bekletilerek, hücreler şeffaflaştırıldı. 56 °C'ye ayarlı etüvde hücreler, temiz parafin serilerinden geçirilerek parafin bloklar hazırlandı. Parafin bloklardan 5µm kalınlığında kesitler lamlara alındıktan sonra 56°C etüvde kesitlerin lamlara yapışması sağlandı.



Şekil 3. 3. Üç boyutlu Matrigel™ kültürünü parafine gömme yöntemi.

3.3. Hematoksilen-Eozin boyama

Parafin kesitlerden parafini uzaklaştırmak için 2 kez 15 dakika ksilolde bekletildi. Ardından, derecesi azalan (%100, %90, %80 ve %70) etil alkol serilerinde 5'er dakika tutuldu ve son olarak 5 dakika suda bekletildi. Kesitler 1 dakika boyunca hematoksilende bekletilerek hücre nükleusları boyandı ve suda yıkanarak fazla hematoksilen uzaklaştırıldı. Yıkama sonrasında 10 saniye eozinde bekletilerek hücre sitoplazması boyandı ve suda yıkanarak fazla eozin uzaklaştırıldı. Kesitlerden suyu uzaklaştırmak için dereceli etil alkol serileri geçirildi ve %100 etil alkolde 5 dakika bekletildi. Ardından alkolü uzaklaştırmak için 15 dakika ksilolde bekletilerek entellan ile kapatma işlemi yapıldı. Kapatılan kesitler kurutulduktan sonra Olympus, CX43 mikroskopunda 20x ve 40x büyütmede fotoğraflandı.

3.4. İmmünofloresan boyama

Parafin kesitlerden parafini uzaklaştırmak için ksilolde 15’şer dakika olmak üzere iki kez bekletildi. Ardından, derecesi azalan (%100, %90, %80 ve %70) etil alkol serilerinde 5’er dakika tutuldu ve son olarak 5 dakika suda bekletildi. “Antijen retrieval” uygulaması yapıldı (kesitler sitrik asit solüsyonunda 700W 4 dakika + 450 3 dakika boyunca kaynatıldı.) ve kesitler 40 dakika buz üzerinde soğumaya bırakıldı. fosfat tamponlu salin (PBS) solüsyonunda 3 kez 5’er dakika yıkama gerçekleştirdikten sonra %0.3’lük TritonX-100 (Sigma-Aldrich, x100) eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu işlemden sonra kesitler PBS solüsyonunda 3 kez 5’er dakika yıkandı. Bir sonraki adımda %1 oranında normal keçi serumu 1 saat uygulanarak ikincil antikorun özgün olmayan bağlanma bölgeleri blokladı. Bloklama işleminden sonra tavşanda üretilmiş poliklonal kit ligand (Bioss, bs-0545R), c-kit (Bioss, bs-10005R) ve ZO-1 (Bioss, bs-1329R) 1:100 oranında PBS ile seyreltilerek seri kesitler üzerine uygulandı. İzotip kontrol için kesitlere birincil antikorlar ile aynı miktarda tavşan IgG proteini 1:500 oranında PBS ile seyreltilerek uygulandı. Birincil antikor uygulandıktan sonra kesitler +4°C’de gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün PBS solüsyonunda 3 kez 5’er dakika yıkandıktan sonra 1:500 oranında PBS ile seyreltilen keçi anti-tavşan Alexa Fluor-488 bağlı ikincil antikor (Invitrogen™, A11008) ile birincil antikorlar işaretlendi. Hücre çekirdeklerinin boyanması için 1:2000 saf su ile seyreltilmiş Hoechst (Invitrogen™, H1399) ile 5 dk boyama yapıldı. Kesitler, gliserol ve distile su ile 1:9 oranında hazırlanmış kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Boyanma sonuçları Olympos BX-61 dik immünofloresan mikroskobunda DAPI ve FITC filtreleri kullanılarak 20x ve 40x büyütmede görüntülendi ve fotoğraflandı. Sertoli hücrelerinin kimliğinin belirlenmesi ve bağlantı kompleksi oluşumu açısından tüm gruplarda karşılaştırıldı.

3.5. İstatistiksel analizler

15P-1 Sertoli hücrelerinin 120 saat 3B kültürü boyunca, hücrelerin kültüre alındığı gün dahil her 24 saatte bir Olympos IX71 invert mikroskopta 20x büyütmede görüntülendi ve hücreler arası etkileşimler, kordon benzeri yapılar ve lümen benzeri yapılar sayısal

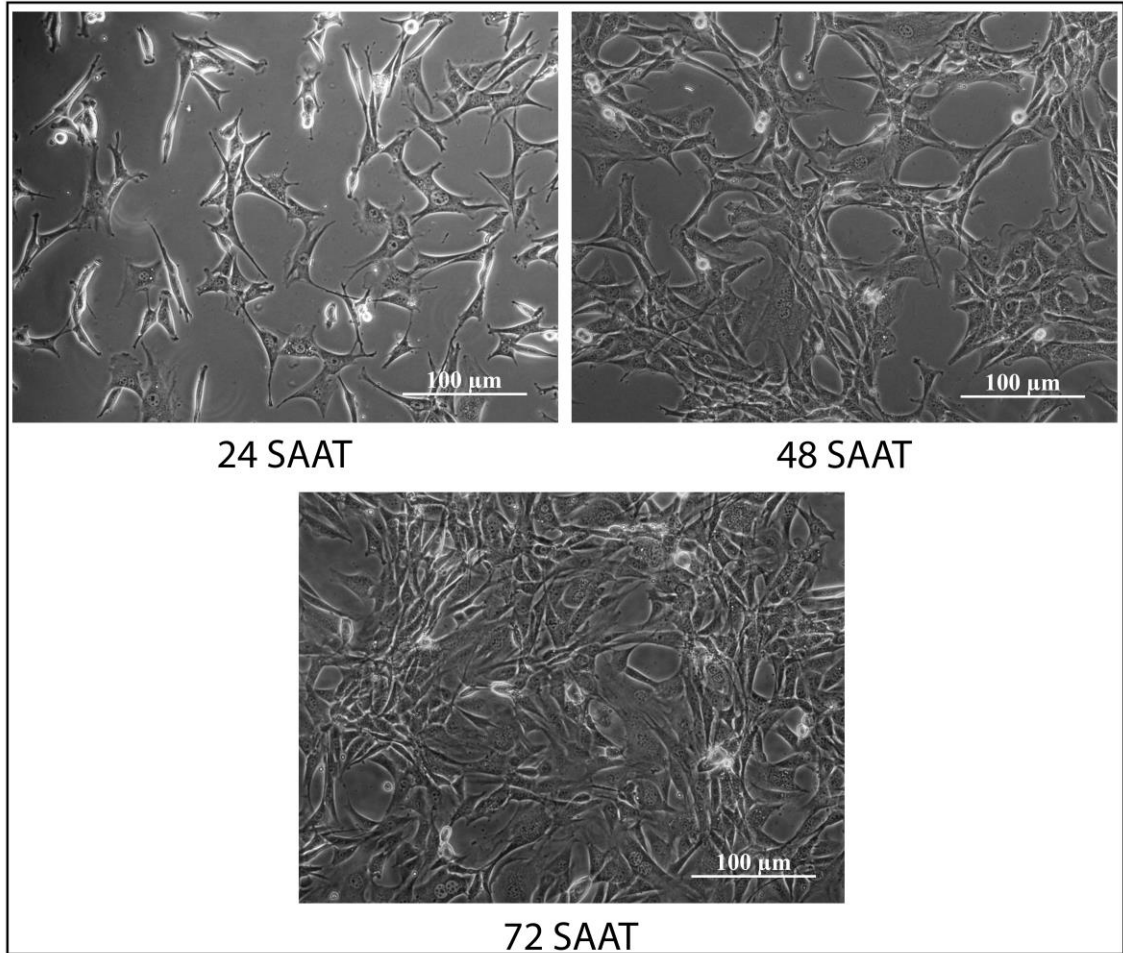
olarak değerlendirildi. Elde edilen tüm veriler GraphPad Prism 9 programı kullanılarak analiz edilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası (SEM) olarak belirtilmiştir ve her grubun normal dağılıma uygun olduğu Shapiro-Wilk test ($p>0.05$) ile gösterilmiştir. Gruplar arası farkları belirlemek için one-way ANOVA testi uygulanarak $p<0.05$ altında bulunan değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir. Gruplar kendi aralarında karşılaştırılarak farkları belirlemek için Tukey's çoklu karşılaştırmalar testi uygulanarak $p<0.05$ altında bulunan değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. 15P-1 Sertoli hücre hattı *in vitro* koşullarda başarıyla çoğaltılmıştır

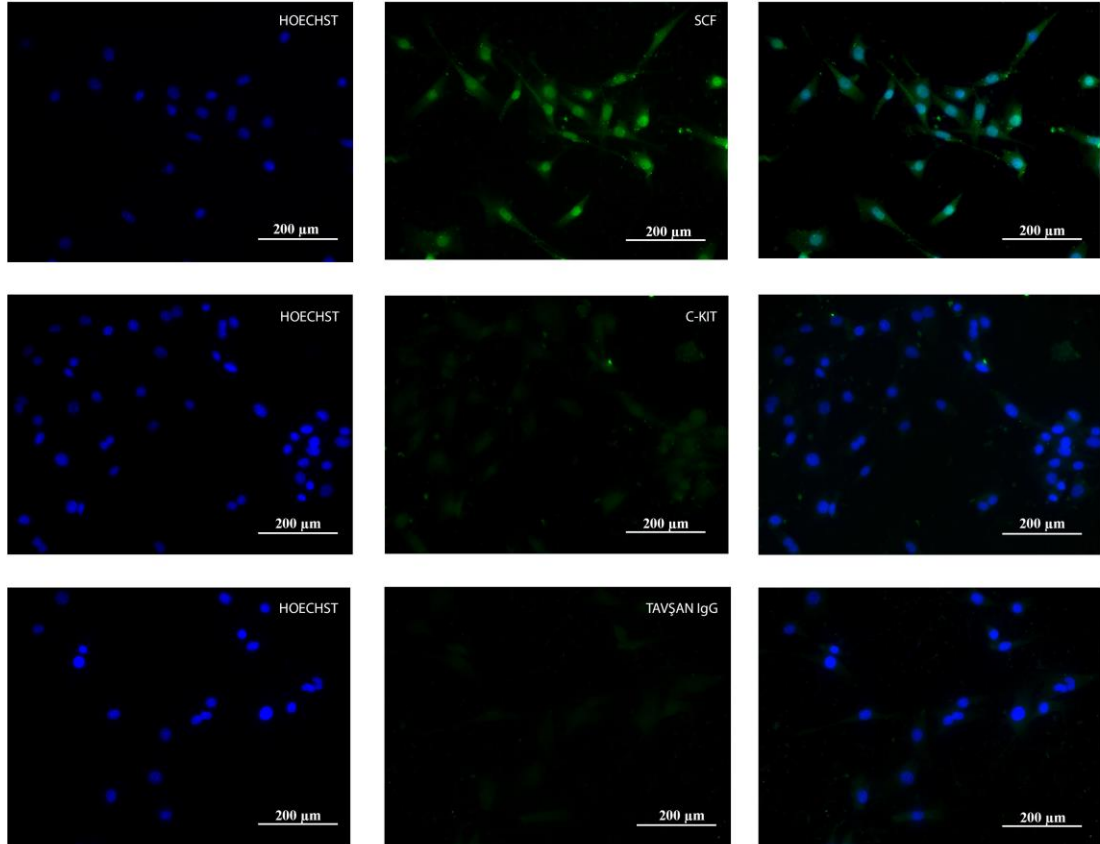
15P-1 Sertoli hücre hattının 14. pasajı 2B kültürde 72 saat süreyle gözlemlendi ve fotoğraflandı (**Şekil 4.1**). Kültürde elde edilen hücreler 72. saatin sonunda yaklaşık %90 hücre doluluk oranına sahipti. Hücre doluluk oranı %80'i geçen hücrelerin 3B Matrigel™ kültürüne geçmeden önce sayıları hesaplandı. Bir 25cm²'lik kültür kabında yaklaşık 2.8x10⁶ canlı hücre olduğu belirlendi.



Şekil 4.1. 15P-1 Sertoli hücre hattının 14. pasajına ait 2B hücre kültürü. 24, 48 ve 72 saat süreyle kültüre edilmiş hücrelerin invert mikroskop ile görüntülenmesi (20X).

4.2. 15P-1 Sertoli hücre hattı kültür süresi boyunca kimliğini korumuştur

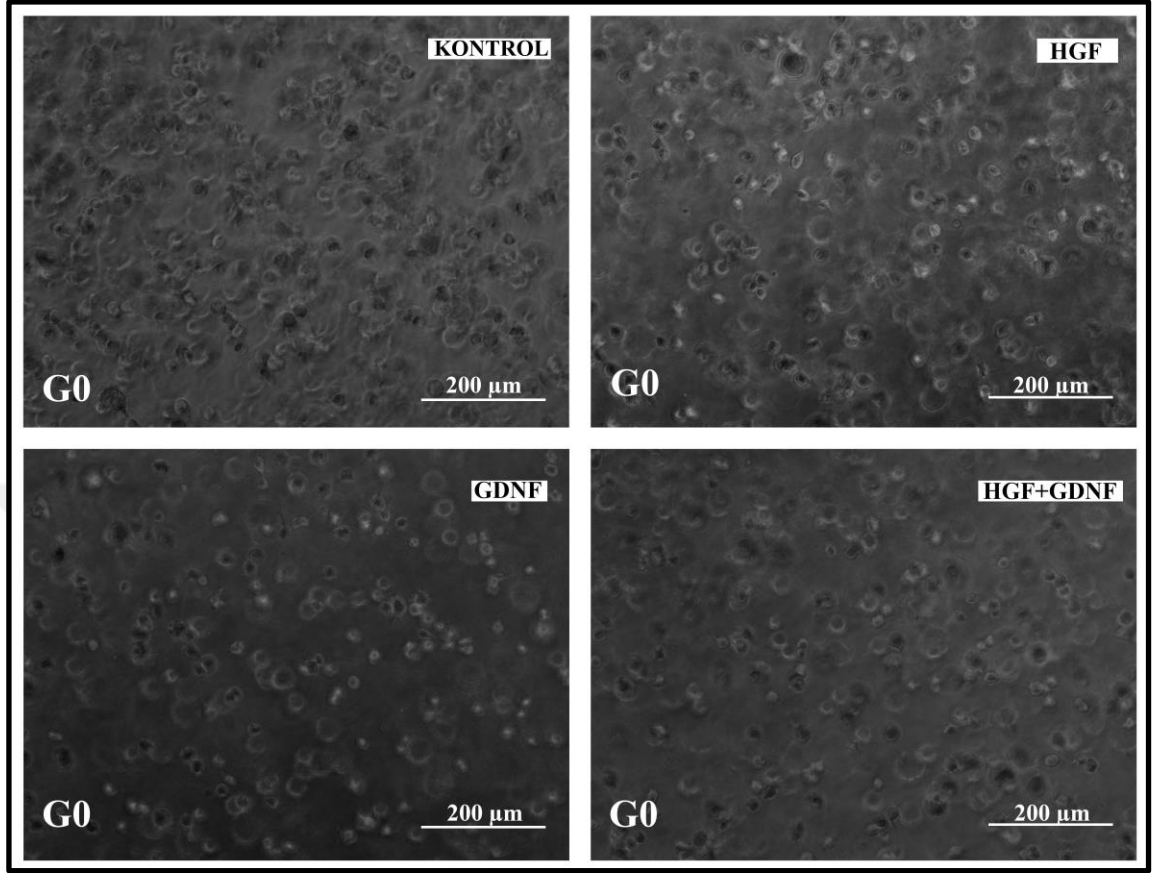
15P-1 Sertoli hücrelerinin 3B kültürü için kullanılacak 14. pasajının kimliğinin belirlenmesi için immünofloresan yöntemi kullanıldı ve Olympos BX-61 dik immünofloresan mikroskobunda DAPI ve FITC filtreleri kullanılarak 20x ve 40x büyütmede görüntülendi ve fotoğraflandı (Şekil 4.2). Sertoli hücresi belirteci olan Scf proteininin hem sitoplazmik hem de nükleer olarak varlığı belirlendi. Aynı zamanda, germ hücresi belirteci olan c-kit proteini değerlendirildi. Kültür koşulları Sertoli hücresine uygun olmasından dolayı, germ hücresini içermesi beklenmemektedir. Dolayısıyla germ hücre belirteci c-kit negatif kontrol olarak kullanıldı ve hücrelerde herhangi bir boyanma gözlenmedi. Primer antikoru spesifik olup olmadığını kontrol etmek için tavşan IgG izotip kontrol olarak kullanıldığında, herhangi bir boyanma olmadığı için antikorların özgül olduğu belirlendi. Sonuç olarak; kültürde bulunan hücrelerin yalnızca Sertoli hücreleri olduğu belirlendi.



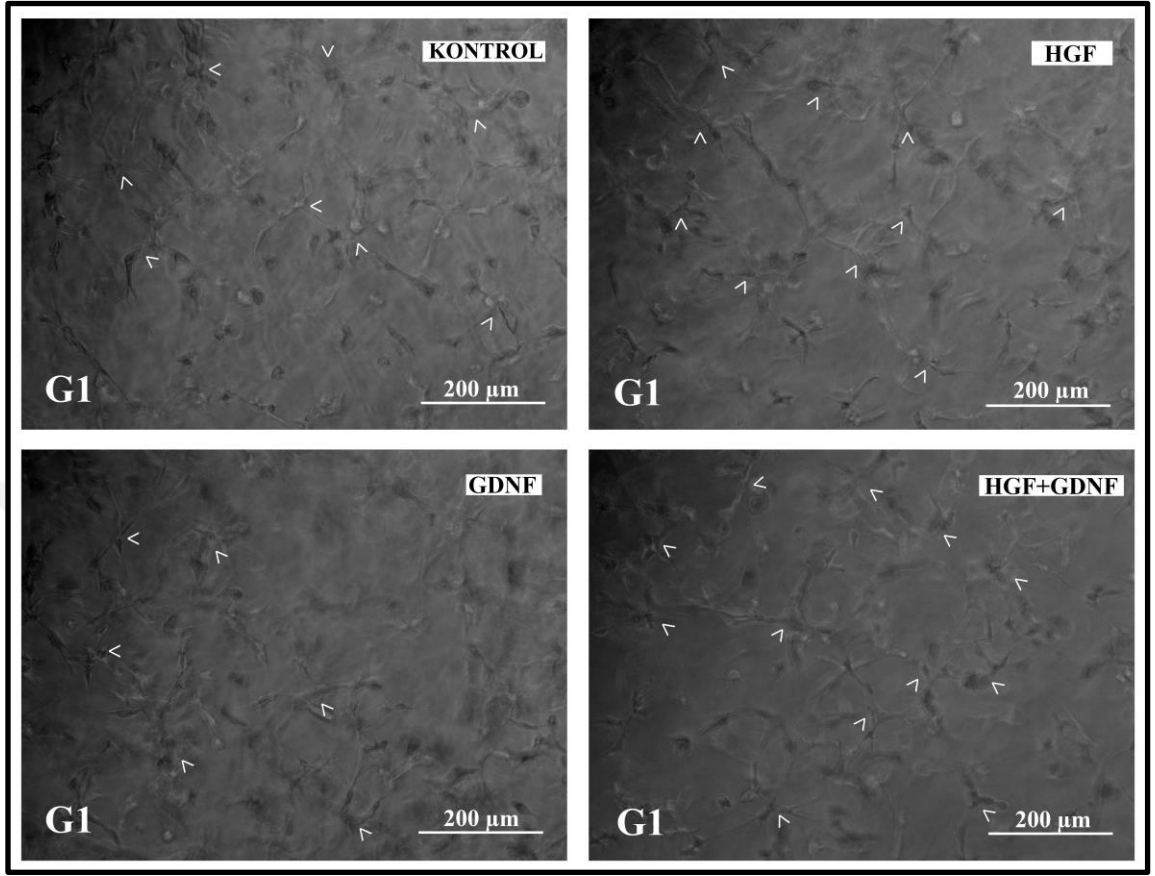
Şekil 4.2. 15P-1 Sertoli hücrelerinin 14. pasajının karakterizasyonu. 72 saat süreyle kültüre edilmiş hücrelerin immüno Floresan mikroskop ile görüntülenmesi (40X). (Scf: Sertoli hücresi belirteci, pozitif kontrol; c-kit: germ hücresi belirteci, negatif kontrol; rabbit IgG: negatif kontrol.)

4.3. 15P-1 Sertoli hücrelerinin Matrigel™ içerisinde 3B kültürü başarıyla gerçekleştirilmiştir

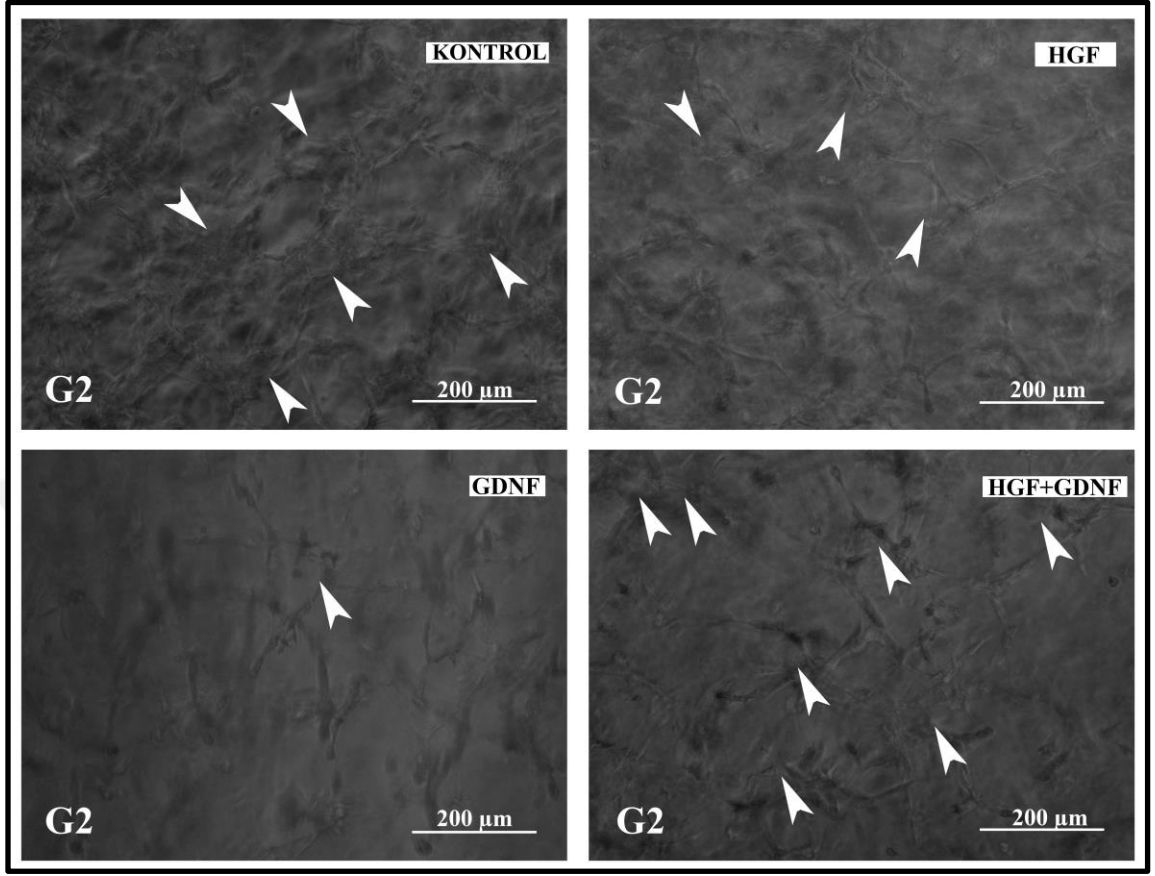
Çoğaltılan 15P-1 Sertoli hücreleriyle; HGF ve GDNF yokluğunda (kontrol grubu), sadece HGF varlığında (HGF grubu), sadece GDNF varlığında (GDNF grubu) ve HGF ile birlikte GDNF varlığında (HGF+GDNF grubu) olacak şekilde 120 saat boyunca Matrigel™ içerisinde *in vitro* koşullarda kültüre edilerek deney grupları oluşturuldu. Kültürün oluşturulduğu gün G0 olarak kabul edildi ve her 24 saatte bir hücreler fotoğraflandı (**Şekiller 4.3, 4.4, 4.5, 4.6-4.7-4.8**). Bu süreçte; hücrelerin çoğalması, hücrelerin birbirleriyle etkileşimleri, kordon benzeri yapıların oluşumu ve lümen benzeri yapıların oluşumu gözlemlendi. Hücreler G0'da matrikse henüz tutunmadıkları için tüm gruplarda yuvarlak hücre morfolojisine sahipti (**Şekil 4.3**). Hücreler arası etkileşimlerin tüm gruplarda G1'de başladığı gözlemlendi. Bu etkileşimler sonucu hücrelerin bir araya toplanarak kümeler oluşturduğu gözlemlendi (**Şekil 4.4**). Hücrelerin G2 ve G3'te belirli bölgelerde organize oldukları ve kümelerin birbirleriyle etkileşimleriyle birlikte kurdukları bağlantıların oluşturduğu kordon benzeri yapılar gözlemlendi (**Şekil 4.5-4.6**). 96. saatte hücre topluluklarının ve bağlantıların yoğunlaşarak boşluklar oluşturduğu gözlemlendi ve bu yapıların lümen benzeri yapılar olduğu belirlendi (**Şekil 4.7-4.8**).



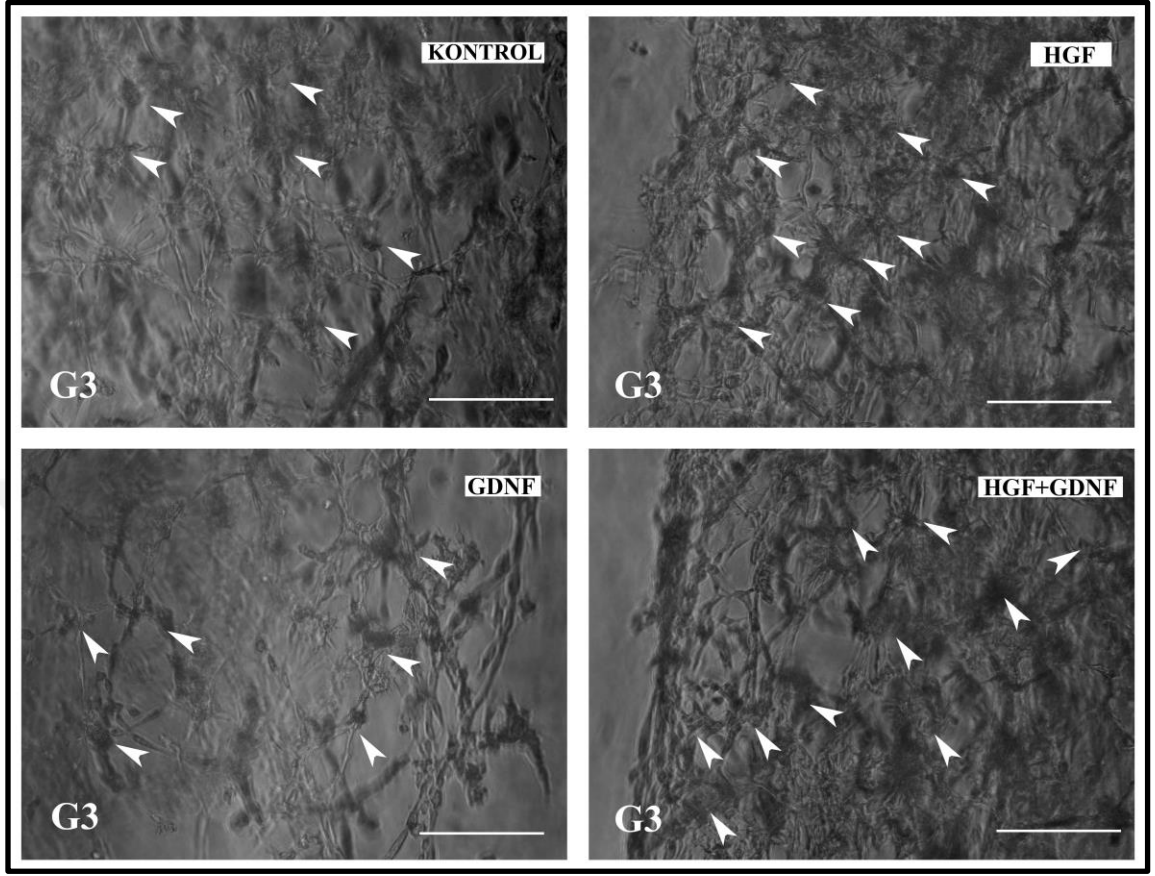
Şekil 4.3. 15P-1 Sertoli hücre hattının 14. pasajına ait 3B hücre kültürünün oluşturulduğu gün (G0). Hücrelerin invert mikroskop ile görüntülenmesi (20X).



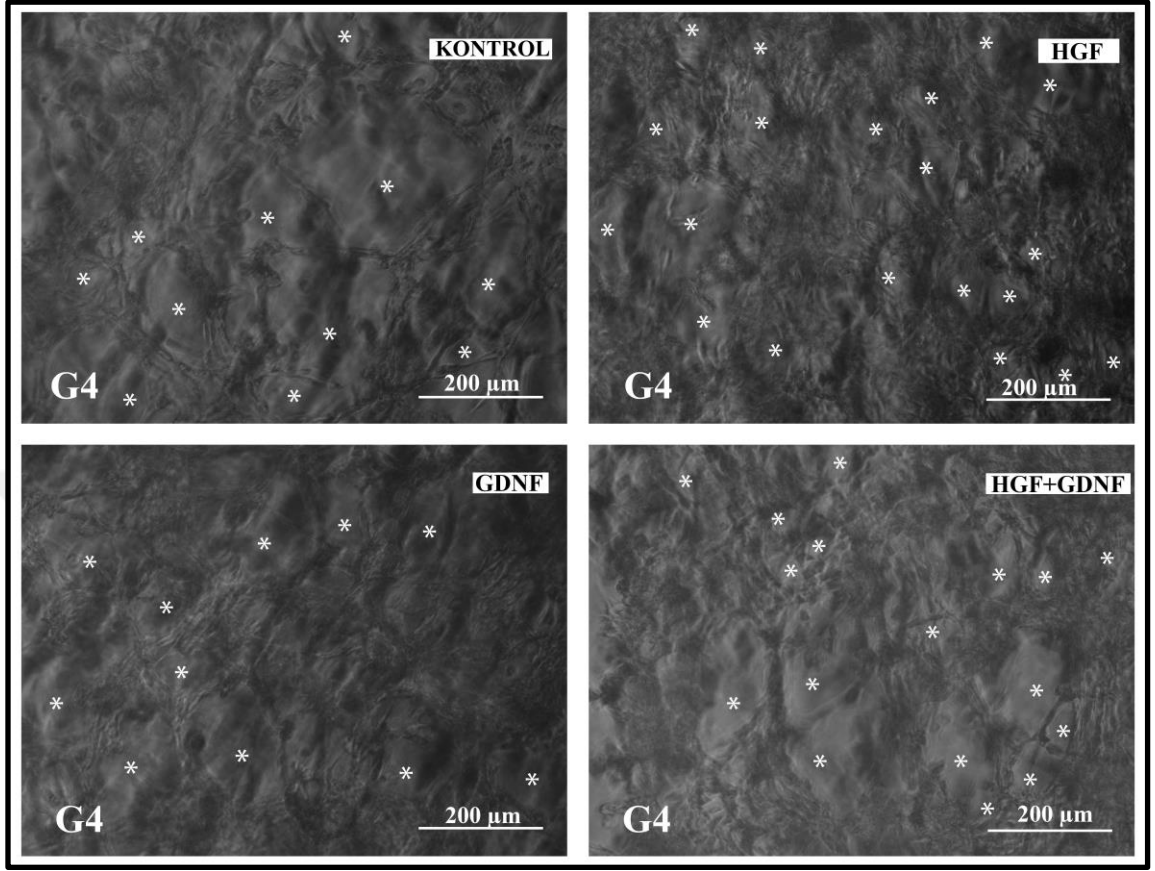
Şekil 4.4. 15P-1 Sertoli hücre hattının 14. pasajına ait 3B hücre kültürünün 24. saati (G1). Hücrelerin invert mikroskop ile görüntülenmesi (20X). (Beyaz ok başı: Hücreler arası etkileşimleri ve kümelenme)



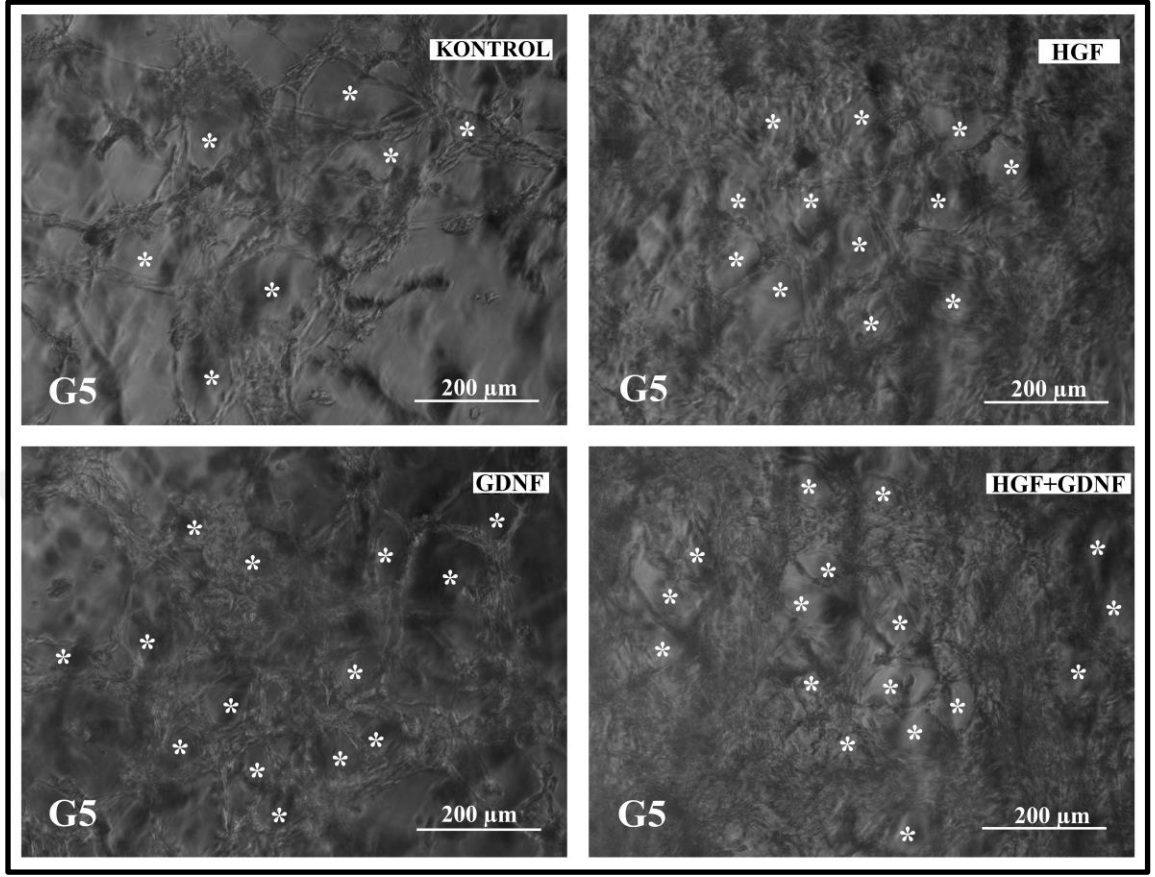
Şekil 4.5. 15P-1 Sertoli hücre hattının 14. pasajına ait 3B hücre kültürünün 48. saati (G2). Hücrelerin invert mikroskop ile görüntülenmesi (20X). (Beyaz ok başı: Kordon benzeri yapılar)



Şekil 4.6. 15P-1 Sertoli hücre hattının 14. pasajına ait 3B hücre kültürünün 72. saati (G3). Hücrelerin invert mikroskop ile görüntülenmesi (20X). (Beyaz ok başı: Kordon benzeri yapılar.)



Şekil 4.7. 15P-1 Sertoli hücre hattının 14. pasajına ait 3B hücre kültürünün 96. saati (G4). Hücrelerin invert mikroskop ile görüntülenmesi (20X). (Yıldız imi: Lümen benzeri yapılar)



Şekil 4.8. 15P-1 Sertoli hücre hattının 14. pasajına ait 3B hücre kültürünün 120. saati (G5). Hücrelerin invert mikroskop ile görüntülenmesi (20X). (Yıldız imi: Lümen benzeri yapılar.)

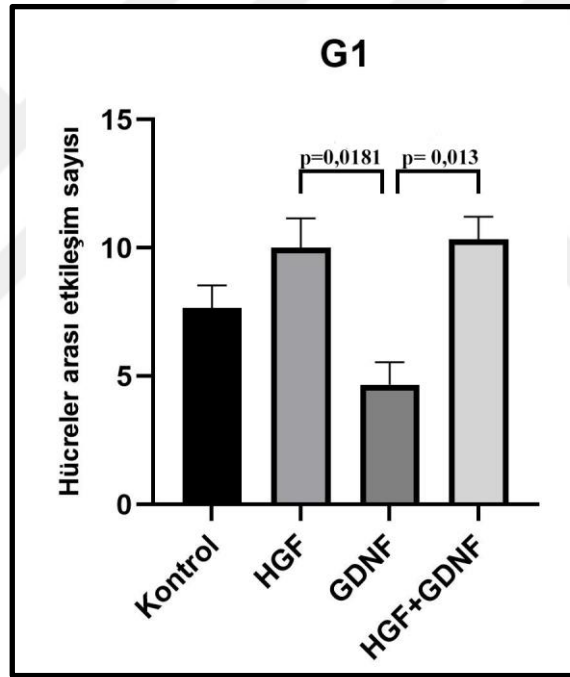
4.4. 15P-1 Sertoli hücrelerinin Matrigel™ içerisinde 3B kültürü sonrasında lümen benzeri yapılar oluşturma kapasiteleri HGF ve GDNF varlığında daha yüksektir

15P-1 Sertoli hücreleri 120 saat boyunca Matrigel™ içerisinde kültüre edildi ve hücre organizasyonları sayısal olarak değerlendirildi.

Kültürün 24. saatinde hücreler arası etkileşimler değerlendirildiğinde, tüm grupların sayısal değerleri normal dağılıyordu (**Tablo 4.1**). GDNF grubuna göre; HGF ve HGF+GDNF gruplarının hücresel etkileşim sayısı anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla; $p=0,0181$, $p= 0,013$) (**Şekil 4.9**).

Tablo 4.1. Üç boyutlu hücre kültürünün 24. saatinde kontrol, HGF, HGF+GDNF ve GDNF gruplarında hücreler arası etkileşim sayıları.

GRUPLAR	Hücreler arası etkileşim sayısı
	[Ortalama $\pm$ Ortalamanın Standart hatası (SEM)]
Kontrol	7,667 $\pm$ 0,8819
HGF	10 $\pm$ 1,155
GDNF	4,667 $\pm$ 0,8819
HGF+GDNF	10,33 $\pm$ 0,8819



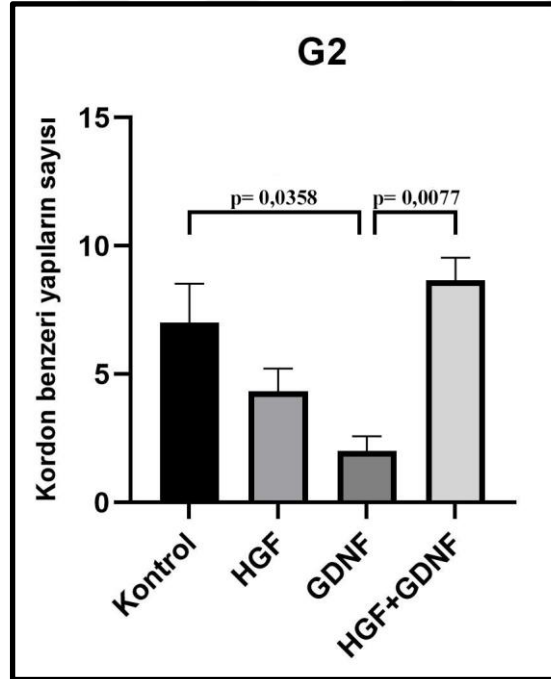
Şekil 4.9. Üç boyutlu hücre kültürünün 24. saatinde kontrol, HGF, HGF+GDNF ve GDNF gruplarında hücreler arası etkileşimin analizi

Kültürün 48. ve 72. saatlerinde hücrelerin etkileşimleri sonucu oluşturdukları kordon benzeri yapılar sayısal olarak değerlendirildiğinde, her grubun sayısal değerleri normal dağılıma uyuyordu (**Tablo 4.2 ve 4.3**). Kontrol grubuna göre GDNF grubundaki kordon benzeri yapıların sayısı anlamlı olarak düşük iken, HGF+GDNF grubundaki kordon benzeri yapı sayısı GDNF grubuna göre anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla; $p= 0,0358$; $p= 0,0077$) (**Şekil 4.10**). Kültürün 3. gününde; hem HGF grubu hem de HGF+GDNF

grubundaki kordon benzeri yapı sayısı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla $p= 0,0453$; $p= 0,0247$). Ayrıca HGF+GDNF grubundaki kordon benzeri yapı sayısı GDNF grubundan yüksekti ($p= 0,0334$) (Şekil 4.11).

Tablo 4.2. Üç boyutlu hücre kültürünün 48. saatinde kontrol, HGF, HGF+GDNF ve GDNF gruplarında kordon benzeri yapıların sayısı.

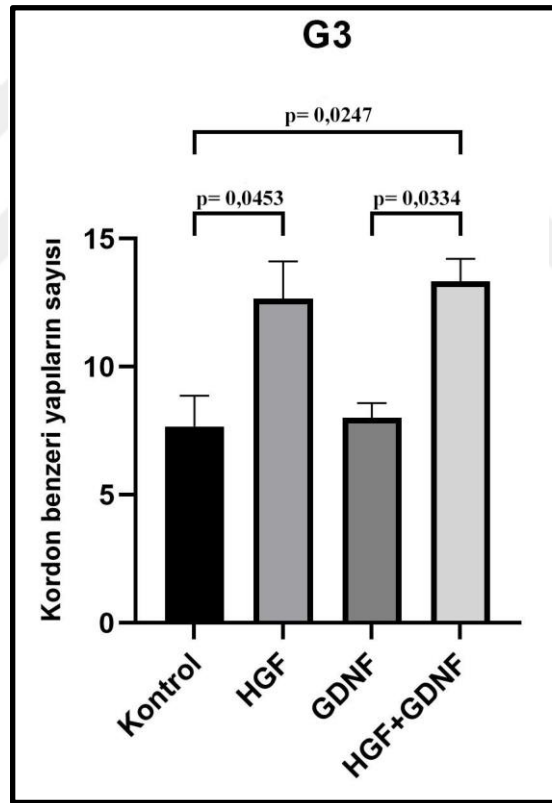
GRUPLAR	Kordon benzeri yapıların sayısı
	[Ortalama $\pm$ Ortalamanın Standart hatası (SEM)]
Kontrol	$7 \pm 1,528$
HGF	$4,333 \pm 0,8819$
GDNF	$2 \pm 0,3333$
HGF+GDNF	$8,667 \pm 0,8819$



Şekil 4.10. Üç boyutlu hücre kültürünün 48. saatinde kontrol, HGF, HGF+GDNF ve GDNF gruplarında hücreler arası etkileşim sayılarının analizi.

Tablo 4.3. Üç boyutlu hücre kültürünün 72. saatinde kontrol, HGF, HGF+GDNF ve GDNF gruplarında kordon benzeri yapıların sayısı.

GRUPLAR	Kordon benzeri yapıların sayısı [Ortalama $\pm$ Ortalamanın Standart hatası (SEM)]
Kontrol	7,667 $\pm$ 1,202
HGF	12,67 $\pm$ 1,453
GDNF	8 $\pm$ 0,5774
HGF+GDNF	13,33 $\pm$ 0,8819



Şekil 4.11. Üç boyutlu hücre kültürünün 72. saatinde kontrol, HGF, HGF+GDNF ve GDNF gruplarında kordon benzeri yapıların sayılarının analizi.

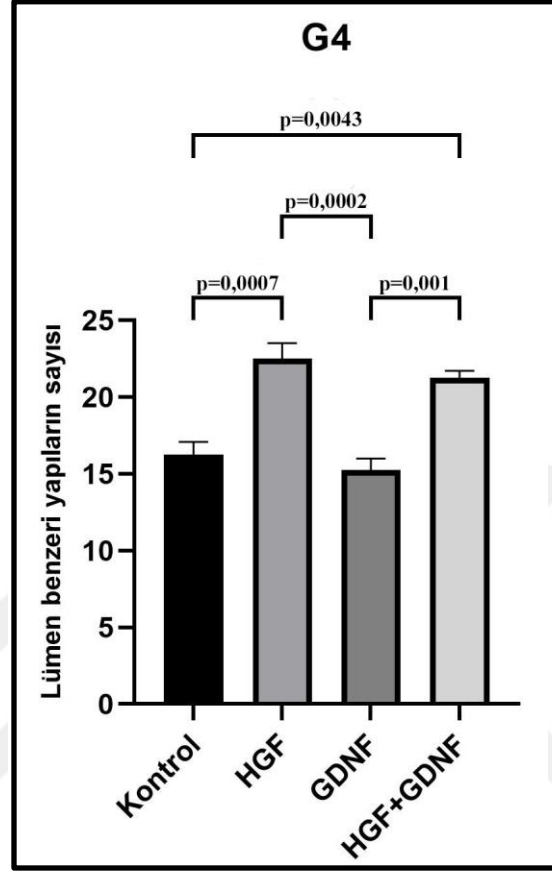
Kültürün 96. ve 120. saatlerinde hücrelerin oluşturduğu kümelerin yoğunlaşması ve boşluklar meydana getirmesi sonucunda oluşan lümen benzeri yapılar değerlendirildiğinde, tüm grupların sayısal değerleri normal dağılıma uyuyordu (**Tablo 4.4 ve 4.5**). Dördüncü günde, kontrol grubuna ve GDNF grubuna göre hem HGF hem de

HGF+GDNF grubundaki lümen benzeri yapıların sayısı anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla $p=0,0007$; $p=0,0043$; $p=0,001$; $p=0,0002$) (Şekil 4.12).

Beşinci günde, HGF+GDNF grubundaki lümen benzeri yapıların sayısı kontrol, HGF ve GDNF gruplarından anlamlı olarak yüksekti ($p<0,0001$; $p<0,0001$; $p=0,0058$; $p=0,0007$) (Şekil 4.13).

Tablo 4.4. Üç boyutlu hücre kültürünün 96. saatinde kontrol, HGF, HGF+GDNF ve GDNF gruplarında lümen benzeri yapıların sayısı.

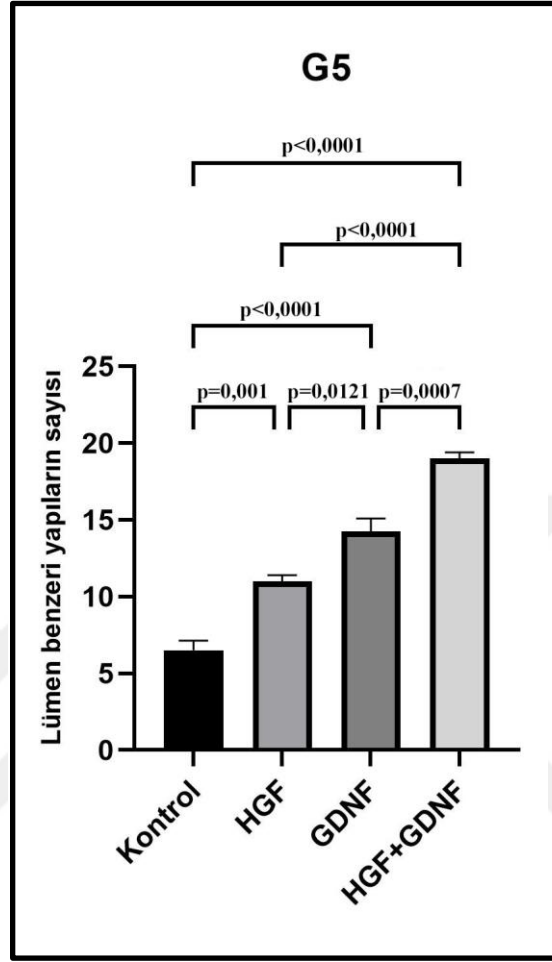
GRUPLAR	Lümen benzeri yapıların sayısı
	[Ortalama $\pm$ Ortalamanın Standart hatası (SEM)]
Kontrol	16,25 $\pm$ 0,8539
HGF	22,5 $\pm$ 1,041
GDNF	15,25 $\pm$ 0,75
HGF+GDNF	21,25 $\pm$ 0,4787



Şekil 4.12. Üç boyutlu hücre kültürünün 96. saatinde kontrol, HGF, HGF+GDNF ve GDNF gruplarında lümen benzeri yapıların sayılarının analizi.

Tablo 4.5. Üç boyutlu hücre kültürünün 120. saatinde kontrol, HGF, HGF+GDNF ve GDNF gruplarında lümen benzeri yapıların sayısı.

GRUPLAR	Lümen benzeri yapıların sayısı
	[Ortalama ± Ortalamanın Standart hatası (SEM)]
Kontrol	6,5 ± 0,6455
HGF	11 ± 0,4082
GDNF	14,25 ± 0,8539
HGF+GDNF	19 ± 0,4082



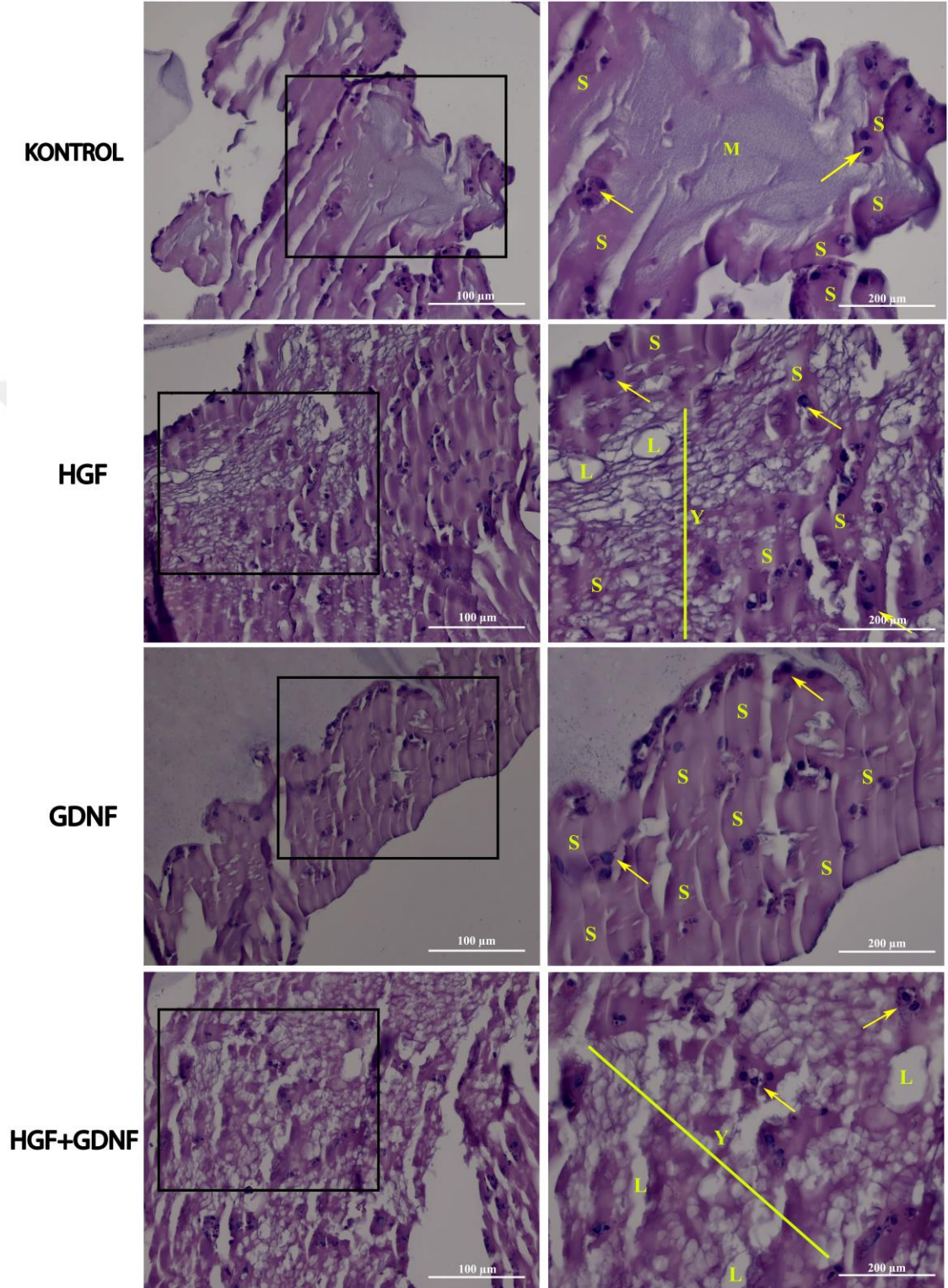
Şekil 4.13. Üç boyutlu hücre kültürünün 120. saatinde kontrol, HGF, HGF+GDNF ve GDNF gruplarında lümen benzeri yapıların sayılarının analizi.

4.5. Üç boyutlu Matrigel™ kültüründe oluşan hücresel organizasyon HE boyaması ile gözlemlendi

Kontrol, HGF, HGF+GDNF ve GDNF gruplarının 120 saat boyunca 3B Matrigel™ kültürü sonrasında parafin kesitler elde edildi ve hematoksilin-eozin boyaması yapıldı (**Şekil 4.14**). Hematoksilin hücre nükleusunu mor renk boyarken, pembe renk ise hücre sitoplazmasını boyamaktadır. Kontrol grubunda hücrelerin kenarlarda toplandığı ve sitoplazmalarının matriks içerisine homojen olarak ve yeterli sayıda dağılmadığı gözlemlendi. HGF ve HGF+GDNF gruplarında ise hücre sitoplazmasının tüm matrikse yayıldığı ve aynı zamanda yağ damlacığı benzeri yapıları meydana getirdiği gözlemlendi. HGF+GDNF grubunda HGF grubuna göre daha geniş bir alana ulaşmış yağ damlacığı benzeri yapılar olduğu belirlendi. Bununla birlikte, HGF ve HGF+GDNF gruplarında

lumen benzeri boşlukların oluştuğu gözlemlendi. GDNF grubunda ise, hücrelerin matriks içine dağıldığı ve hücre sitoplazmalarının matrikse yayıldığı fakat yağ damlacığı benzeri yapıların oluşmadığı gözlemlendi.



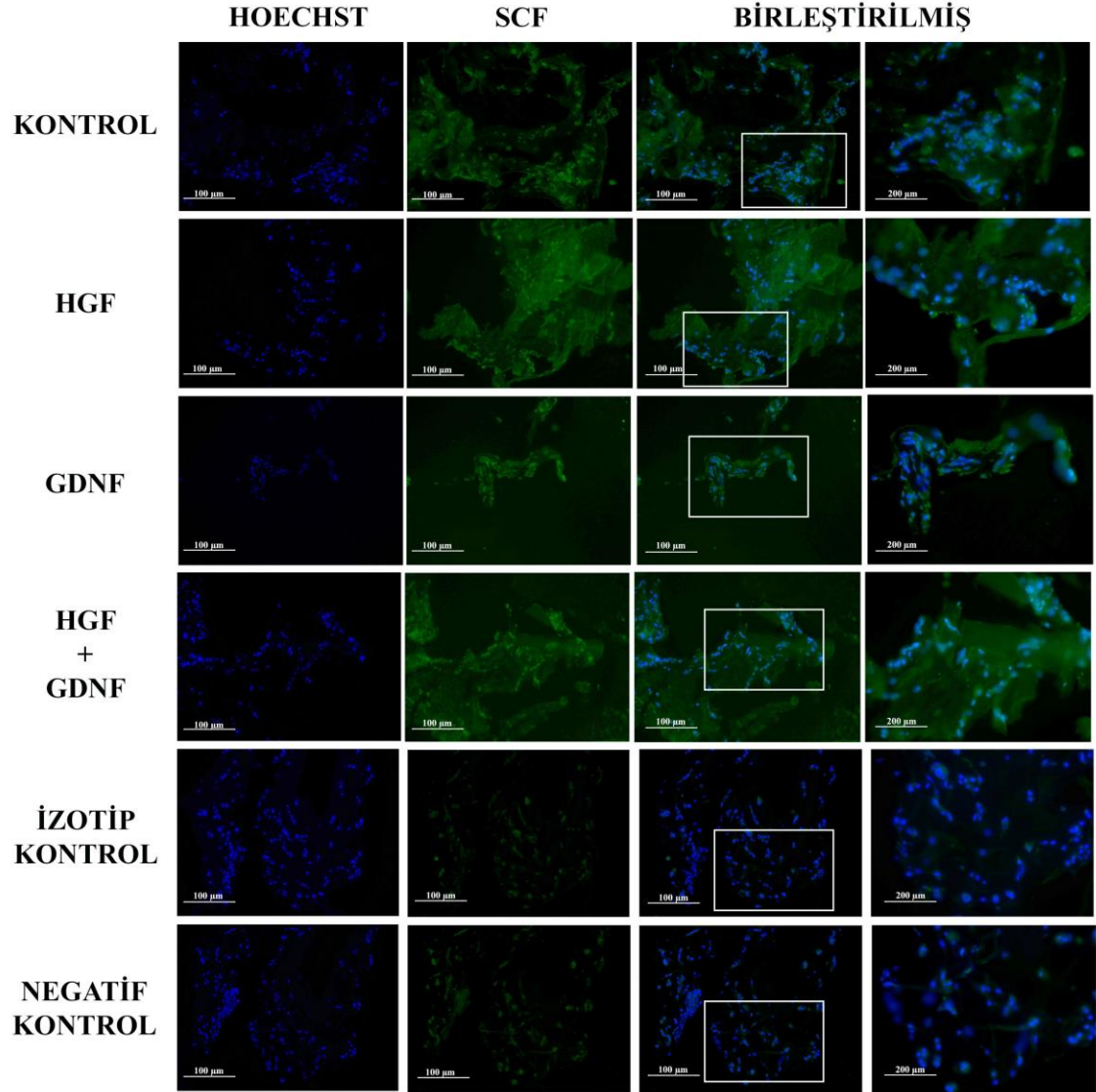


Şekil 4.14. Üç boyutlu kültürün 120. saatinde kontrol, HGF, HGF+GDNF ve GDNF gruplarından elde edilen parafin kesitlerinin 20x ve 40x büyütmede görüntülenmiş hematoksisilen-eozin boyamaları. Dikdörtgenler sağ sütunda büyütülen alanları işaret etmektedir (Ok işareti: Hücre çekirdeği, M:

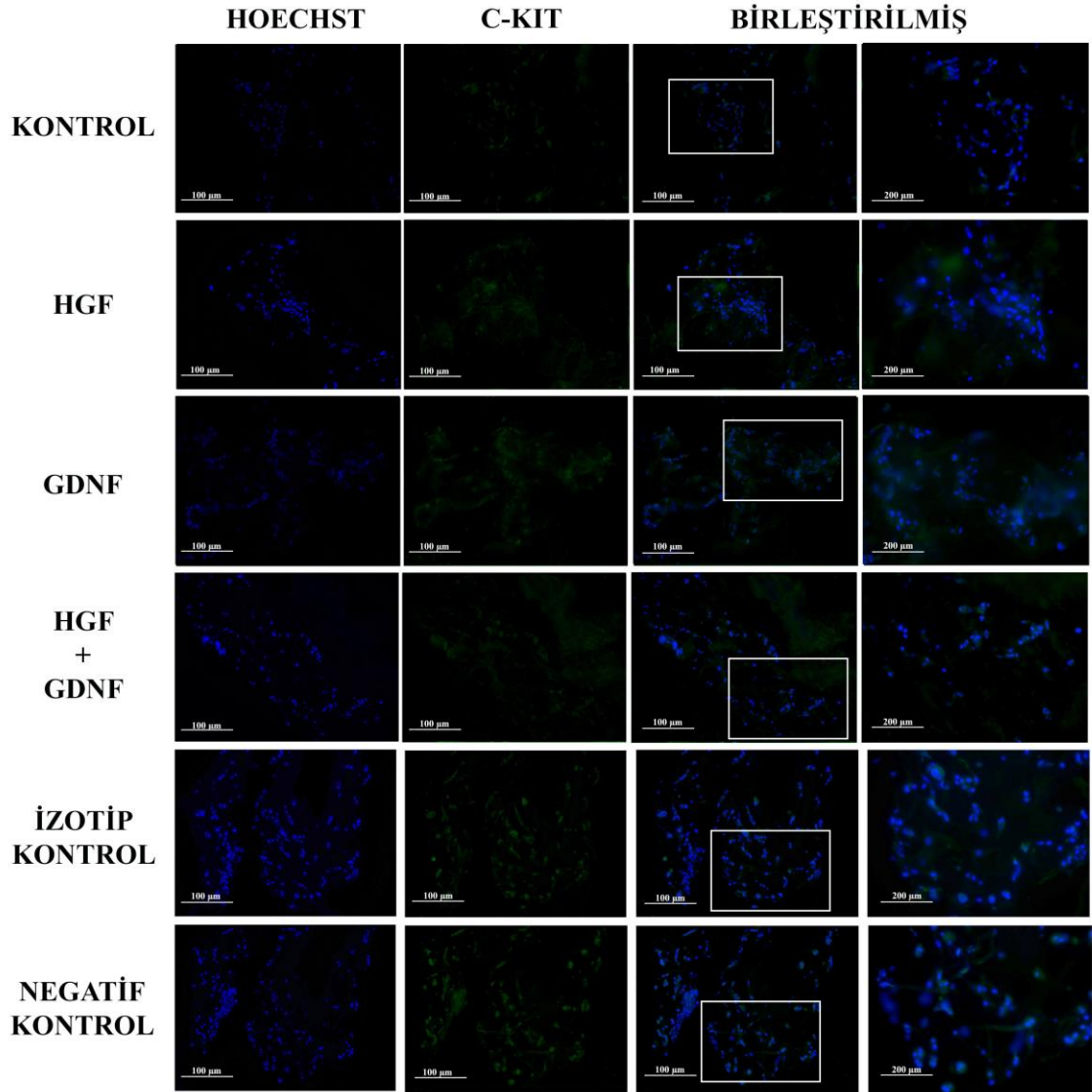
Matrigel™ matriks, S: Sitoplazma, L: Lümen benzeri yapı, Çizgi ile birlikte yer alan Y: Yağ damlacığı benzeri yapı).

4.6 Sertoli hücreleri kültürün sonuna kadar kimliklerini korudular ve HGF+GDNF grubunda sıkı bağlantı yapıları oluşturdular

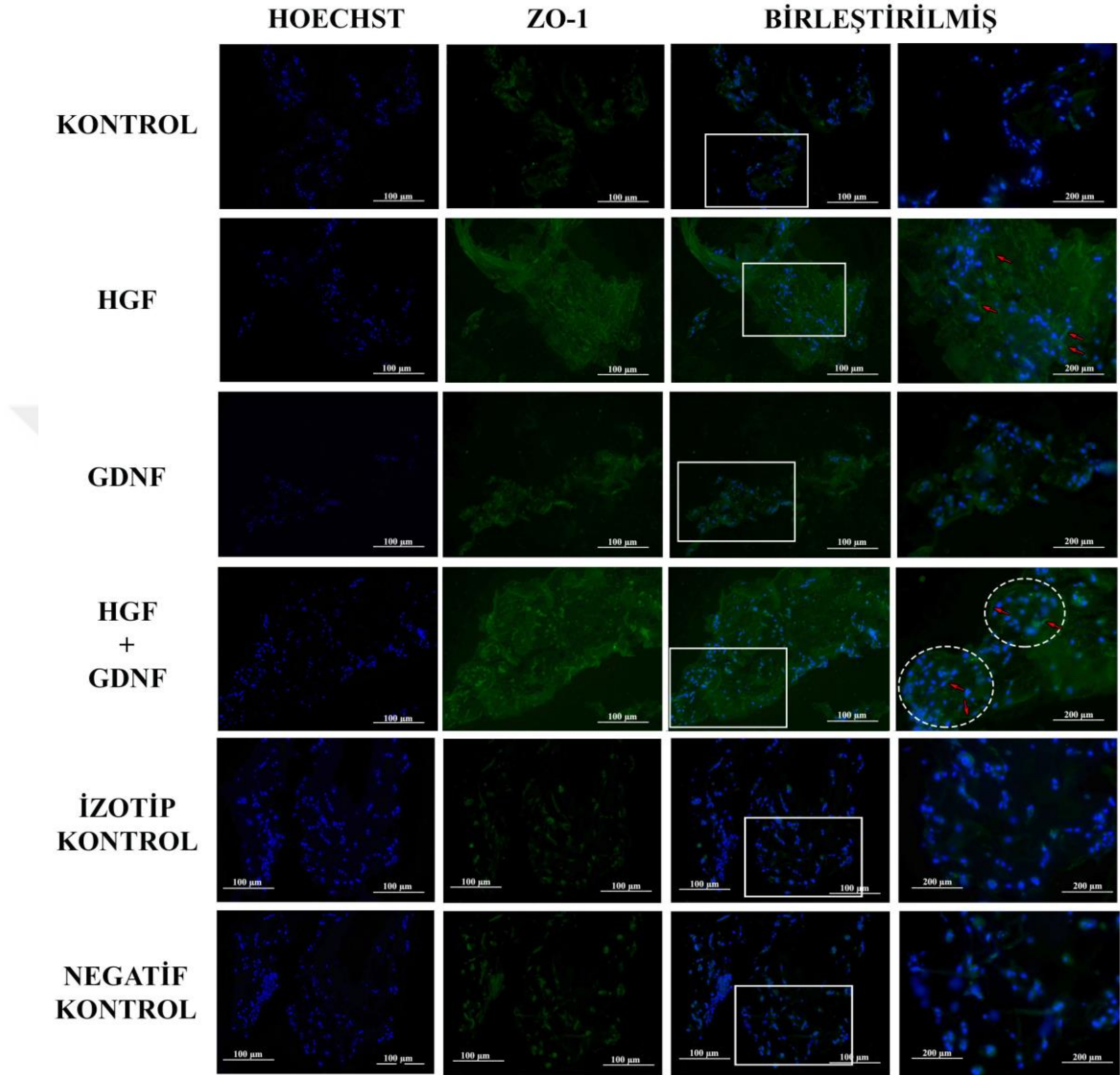
Sertoli hücrelerinin kimliğinin belirlenmesi ve bağlantı kompleksi oluşumu açısından sırasıyla; kit ligand, c-kit ve ZO-1 ifadeleri tüm gruplarda immünofloresan yöntem ile değerlendirildi. Hoechst, DAPI filtresi ile nükleus mavi; hücrelerdeki protein ifadeleri, FITC filtresi ile yeşil olarak görüntülendi. Protein ifadelerinin özgül olduğunu belirlemek için izotip kontrol olarak tavşan immüoglobülin G; sekonder antikorun özgül olduğunu belirlemek için negatif kontrol olarak primer antikorların hazırlandığı normal keçi serumu kullanıldı. Sonuç olarak protein ifadelerinin ve sekonder antikorun özgül olduğu belirlendi (**Şekil 4.15**). 15P-1 Sertoli hücre hattının pozitif kontrolü olan scf protein ifadesi değerlendirildiğinde, tüm gruplarda hem sitoplazmik hem de nükleer olduğu gösterildi (**Şekil 4.16**). HGF ve HGF+GDNF grubunda scf ifadesinin kontrol ve GDNF grubuna göre daha geniş alana yayıldığı gözlemlendi. 15P-1 Sertoli hücre hattının negatif kontrolü olan c-kit protein ifadesi değerlendirildiğinde; hiçbir grupta bu proteinin ifadesi gözlenmedi (**Şekil 4.17**). Hücreler arasında sıkı bağlantılar kurulduğunun bir belirtisi olan ZO-1 proteinin ifadesi değerlendirildiğinde; HGF ve HGF+GDNF gruplarında sitoplazmik ifadelerin kontrol grubuna göre daha yoğun olduğu belirlendi (**Şekil 4.18**). Diğer yandan HGF+GDNF grubunda tübül benzeri yapıların oluşturduğu ZO ekspresyonları belirgindi. GDNF grubunda ise HGF ve HGF+GDNF gruplarına göre zayıf ZO-1 ifadesine rastlandı. Değerlendirmeler sonucunda; Sertoli hücrelerinin beş günlük kültür süresince kimliğini koruduğu ve HGF ve HGF+GDNF gruplarında hücreler arası sıkı bağlantıların kurulduğu belirlendi. HGF+GDNF grubunda ise Tübül benzeri yapıların ise sıkı bağlantılarıyla birlikte HGF grubuna kıyasla belirgin olduğu ortaya kondu. Kontrol ve GDNF gruplarında Sertoli hücreleri arası sıkı bağlantıların kurulmadığı belirlendi.



Şekil 4.15. Üç boyutlu kültürün 120. saatinde kontrol, HGF, HGF+GDNF ve GDNF gruplarından elde edilen parafin kesitlerde kit ligand (Scf) ifadesinin immünofloresan görüntüleri. Dikdörtgen alanları sağ sütundaki büyütme bölgelerini işaret etmektedir.



Şekil 4.16. Üç boyutlu kültürün 120. saatinde kontrol, HGF, HGF+GDNF ve GDNF gruplarından elde edilen parafin kesitlerinde c-kit ifadesinin immüno Floresan görüntüleri. Dikdörtgen alanları en sağdaki sütundaki büyütme bölgelerini işaret etmektedir.



Şekil 4.17. Üç boyutlu kültürün 120. saatinde kontrol, HGF, HGF+GDNF ve GDNF gruplarından elde edilen parafin kesitlerinde zonula okludens (ZO-1) ifadesinin immünofloresan görüntüleri. (Kırmızı ok işareti: sıkı bağlantılar; kesikli çember: kordon benzeri yapılar). Dikdörtgen alanları en sağdaki sütundaki büyütme bölgelerini işaret etmektedir.

5. TARTIŞMA

Bu tez kapsamında, HGF ile uyarılmış Sertoli hücrelerinin 3B tübül oluşturma kapasitesine GDNF eklenmesinin etkisi gösterilmiştir. Sertoli hücrelerinin 3B kültürü sırasında HGF ile birlikte GDNF uygulaması, hücreler arası etkileşimleri arttırmış ve hücrelerin bir araya gelerek organizasyonlarını hızlandırmıştır. Hücre kültürünün 5. gününde, HGF+GDNF grubundaki lümen benzeri yapıların sayısı kontrol, HGF ve GDNF gruplarına göre yüksektir. Bununla birlikte, kültür ortamında HGF'ye ek olarak GDNF bulunması, Sertoli hücrelerinin polaritesinin bir göstergesi olan sıkı bağlantıları da arttırmıştır. Hematoksilen-eozin boyamalarıyla gösterilen hücrelerin matriks içerisine dağılımlarında ise HGF ve HGF ile birlikte GDNF uygulamasının lümen benzeri yapıları oluşturduğu ve yağ damlacığı benzeri yapıları arttırdığı ortaya konmuştur.

Bu çalışmada; altı aylık genç PyLT transgenik farelerinden üretilmiş olan ve hem morfolojik hem fonksiyonel olarak primer Sertoli hücrelerinin özelliklerini gösteren 15P-1 Sertoli hücre hatları kullanılmıştır (Paquis-Flucklinger ve ark., 1993; Bourdon ve ark., 1998). PyLT transgenik farelerden oluşturulan klonal Sertoli hücre hatları, normal Sertoli hücrelerinin özgün fonksiyonlarını ifade etme potansiyeline sahip olduğundan, germ hücre gelişiminde Sertoli hücre fonksiyonunun araştırıldığı çalışmalarda değerlidir (Bourdon ve ark., 1998). Çalışmamızın yaygın etkilerinden biri de, erkek germ hücrelerinin gelişimini destekleyen *in vitro* kültür ortamlarını geliştirmek olduğundan 15P-1 Sertoli hücre hattı tercih edilmiştir.

15P-1 Sertoli hücre hattının 14. pasajı *in vitro* koşullarda 72 saat kültüre edilerek çoğaltılarak, 24., 48. ve 72. saatlerde invert mikroskop kullanılarak 20x büyütmede görüntülendiğinde, hücrelerin morfolojilerinin literatürde belirtilene uygun olduğu belirlenmiştir (Paquis-Flucklinger ve ark., 1993; Bourdon ve ark., 1998). 15P-1 hücre hattı Wilm's tümör (Wt1) ve kit ligand proteinlerini ifade ettiği bilinmektedir (Paquis-Flucklinger ve ark., 1993; Rassoulzadegan ve ark., 1993). 15P-1 hücre hattı işlem görmemiş testis hücre süspansiyonundan türetildiği için, germ ve Sertoli hücrelerinin karışık olduğu belirtilmiştir ve bu hücre hattında bulunan az sayıdaki hücrelerde germ

hücrelerine özgü LDH-X, Hox 1.4 ve c-kit genlerinin ifadeleri gözlenmiştir (Paquis-Flucklinger ve ark., 1993). Bu bilgiler ışığında, Sertoli hücrelerinin kimliğinin belirlenmesi için kit ligand (scf) ve c-kit protein ifadeleri immüno Floresan yöntem ile değerlendirilmiştir. Tüm hücrelerde scf proteininin sitoplazmik ve nükleer ifadesi gösterilirken c-kit protein ifadesine rastlanmamıştır. Sonuç olarak; kültür ortamı Sertoli hücrelerine uygun koşullarda hazırlandığı için yalnızca Sertoli hücresi bulunduğu ve kimliğini koruduğu gösterilmiştir.

Sertoli hücreleri testis oluşumu sırasında seminifer tübüllerin oluşumuna öncülük eden hücrelerdir. Seminifer tübüllerin gelişimi ilk olarak prenatal dönemde Sertoli hücrelerinin bir araya gelmesiyle testiküler kordonların oluşumu ile başlar (Abe ve ark., 2017). Testis kordon oluşum süreci; hücreler kümelene, bölüne ve biçimlene fazlarını içermektedir (Combes, Lesieur, ve ark., 2009). Bu süreçte, nörotrofik reseptör tirozin kinaz (NRTK)'lar aracılığıyla moleküler düzenlemeler ve devamında hücreler organizasyon gerçekleşmektedir (Gassei ve ark., 2008). Postnatal dönemde ise, Sertoli hücrelerinin germ hücreleriyle etkileşimleri sayesinde tübül lümeni ve seminifer tübül oluşumu gerçekleşir (Naillat ve ark., 2014).

Seminifer tübüllerin oluşumunu doğrudan etkileyen faktörlerden biri HGF'dir ve c-Met de onun reseptörüdür. Literatürde HGF/c-Met sinyal yolağının, prenatal ve postnatal testis gelişimi ve fonksiyonu da dahil olmak üzere tübülogenez ile ilişkili morfogenez süreçlerinde önemli rolü olduğu bildirilmiştir (Catizone ve ark., 2001; Ricci ve Catizone, 2014). Testiste, GDNF'nin SKH'in desteklenmesi ve kendilerini yenilemesi için kritik olduğu tanımlanırken, seminifer tübül gelişiminde herhangi bir rolü olup olmadığı hakkında literatürde bir bilgi yoktur (Meng ve ark., 2000; Parekh ve ark., 2019). Böbrek tübüllerinin gelişimiyle ilgili bir çalışmada, GDNF'nin kültür ortamında MDCK hücrelerinin üreterik dallanmalarını, Ret sinyalini kullanmadan, HGF reseptörü olan Met'i aktive ederek uyardığı gösterilmiştir (Popsueva ve ark., 2003). Başka bir çalışmada ise, GDNF'nin HGF ile uyarılmış *in vitro* renal tübül oluşturma kapasitesini arttırdığı ortaya konmuştur (Nakasatomi ve ark., 2019). Benzer şekilde, bu çalışmanın

sonuçları da, HGF'ye ek olarak GDNF uygulamasının hücre kültürünün 5. gününde lümen benzeri yapıların sayısını arttırdığını ortaya koymuştur.

İki boyutlu ve 3B *in vitro* testiküler kültürlerde temel hücreler olarak kullanılan hücreler Sertoli hücreleridir. İki boyutlu modeller, esas olarak; Sertoli hücre hatları veya genç birincil Sertoli hücreleri kullanılarak hücre göçü ve bu süreçteki testiküler hücrelerle etkileşimlerini göstermek gibi *in vitro* spermatogenez çalışmalarına öncülük etmektedir (Richer ve ark., 2020). Ancak 2B modeller ile uzun süreli kültürler yapılamaması ve *in vitro* testiküler yapıların oluşumu kısmen tamamlandığından, hücresel organizasyon çalışmaları için 3B modeller tercih edilmektedir. Genel olarak, 2B sistemle karşılaştırıldığında, Matrigel™ tabanlı bir kültür sisteminde gelişmiş hücre organizasyonu ve yaşama yeteneği gözlemlenmektedir (Richer ve ark., 2020). Matrigel™ tabanlı bir kültür sistemlerinin tercih edilmesinin bir başka sebebi ise hücre polarite oluşumunu düzenleyebilmesidir (Kanbar ve ark., 2021). İçerisinde bulunan laminin, entaktin gibi bazal membran bileşenleri açısından zengin olması, hücre polaritesi çalışmaları için avantaj sağlamaktadır. Matrigel™, epitelyal morfogenez sürecini analiz etmek için en uygun olan daha hızlı ve daha tutarlı hücre polarizasyonu ve lümen oluşum oranları ile sonuçlanır (Kanbar ve ark., 2021). Çalışmamız, daha uzun süreli ve *in vitro* spermatogeneze uygun olan bir Matrigel™ kültürü oluşturmayı amaçlamıştır. Dolayısıyla, Matrigel™ tabanlı bir kültür sistemi kullanılmış ve SKH'in desteklenmesi ve kendilerini yenilemesi için kritik olduğu bilinen GDNF uygulamasının etkisi araştırılmıştır.

In vitro testiküler organizasyon süreci de *in vivo* seminifer tübül gelişimine benzer olarak iki bölümden oluşur: testis kordonu benzer yapılar ve tübül benzeri yapılar (Richer ve ark., 2020). Esas olarak Sertoli hücreleri kullanılarak oluşturulan hem 2B hem de 3B kültür modellerinde testiküler hücrelerin organizasyonu bu iki süreci içermektedir. Hücresel etkileşimlerle birlikte “konflüans” sağlanması, en önemli basamak olarak kabul edilmekte ve takiben Sertoli hücrelerinin multi-nodüler kümeler halinde toplanması gerçekleşmektedir. Kümeler birbirleriyle bağlantılar kurarak kordon benzeri yapılar ve sonrasında hücreler arası etkileşimle lümen oluşumu bir diğer deyişle

tübül benzeri yapılar meydana getirmektedir (Richer ve ark., 2020). Çalışmamızda, HGF ve/veya GDNF içeren *in vitro* koşullarda 120 saat boyunca Matrigel™ içerisinde kültüre edilen Sertoli hücrelerinin hücrel organizasyonu 24 saate bir gözlenmiştir. Bu süreçte; hücrelerin çoğalması, hücrelerin birbirleriyle etkileşimleri, kordon benzeri yapıların oluşumları ve lümen benzeri yapıların oluşumları dikkate alınmıştır. G0'da, matrikse henüz tutunmadıkları için yuvarlak görünüme sahip Sertoli hücreleri gözlenmiştir. G1'de hücreler arası etkileşimlerin başladığı ve bu etkileşimler sonucu hücrelerin bir araya toplanarak kümeler oluşturmaya başladığı görülmüştür. Literatüre benzer şekilde hücrelerin “konflüans” ve kümelenme aşamaları, çalışmamızda da ilk 24 saatte gerçekleşti. 48. ve 72. saatlerde ise kümelerin birbiriyle bağlantıları sayesinde kordon benzeri yapılar elde edildi. Son aşama; 96. saatte hücre etkileşmelerinin lümen oluşumunu sağlamasıyla gerçekleştirilmiştir. 120. Saatte ise HGF'ye ek olarak kültür ortamında GDNF bulunması, lümen benzeri yapıların sayısının diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek olmasını sağlamıştır. Bu çalışmada, *in vitro* testiküler tübülogenez aşamaları literatüre benzer şekilde gerçekleşmiştir (Hadley ve ark., 1985; Hadley ve ark., 1990; Gassei ve ark., 2010; Legendre ve ark., 2010; Alves-Lopes ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2017; Alves-Lopes ve Stukenborg, 2018).

Çalışmamızda 3B Matrigel™ kültürünün 24. saatinde gruplar arasında anlamlı bir fark belirlendi. Gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında HGF+GDNF grubu ile GDNF grubu arasında anlamlı bir fark tespit edildi. HGF ile birlikte GDNF uygulaması 24 saat içerisinde gerçekleşen hücreler arasında etkileşimi arttırdığı gösterilmiştir. Bu etkileşimler ise kümelenme aşamasını göstermektedir. 48. saatte kümeler arası bağlantıların kurulduğu ve bu bağlantıların kordon benzeri yapılar olduğu gözlemlendi. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde, gruplar arası anlamlı fark olduğu tespit edildi. HGF ve HGF+GDNF grubu arasındaki anlamlı fark, GDNF'nin kümeler arasında daha fazla bağlantı kurulduğunu ortaya koydu. 72. saatte kordon benzeri yapıların oluşumunun devam ettiği gözlemlendi ve gruplar arasında fark tespit edildi. HGF grubundaki artış, HGF'nin kümeler arası etkileşimin 72. saatte arttırdığını göstermektedir. Gruplar arası farklara bakıldığında, GDNF'nin HGF'nin kordon benzeri yapıların oluşum sürecini 48. saate çektiğini göstermektedir. Böylece, GDNF'nin HGF

ile uyarılmış Sertoli hücrelerinin kordon benzeri yapıları oluşturmaya etkisi ilk kez ortaya konmuştur. Kültürün 96. saatinde, hücre kümeleri arasındaki bağlantılar yoğunlaşarak lümen benzeri yapılar meydana gelmiştir. Lümen benzeri yapıların sayıları gruplar arasında karşılaştırıldığında kontrol ve GDNF gruplarına göre HGF ve HGF+GDNF gruplarında anlamlı bir artış ortaya konmuştur. 120. saatte lümen benzeri yapıların sayısının sadece HGF eklene gruba göre HGF+GDNF grubunda daha yüksek olması dikkat çekicidir. 96. saatte anlamlı bir fark yok iken, kültürün 120. saatinde HGF ve HGF+GDNF grupları arasında anlamlı bir fark bulunmuş ve HGF+GDNF grubunda bulunan lümen benzeri yapıların sayısının HGF grubuna göre fazla olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla, GDNF'nin Sertoli hücre kültüründe lümen benzeri yapıların sayısını arttırdığı ve daha uzun süre devam etmelerini sağladığı ortaya konmuştur.

Sertoli hücreleri, spermatogenezin kontrolünde merkezi bir rol oynamaktadır (Ahmed ve ark., 2016). Memelilerde bildirildiği üzere Sertoli hücrelerinin esas işlevleri, yapısal destek sağlamak, dejenere olan germ hücrelerini fagosite etmek, germ hücrelerini korumak, spermiyasyonda spermatidleri serbest bırakmak ve gelişen germ hücrelerini beslemektir (Griswold, 1998; Hai ve ark., 2014). Ayrıca, Sertoli hücreleri nötr lipidlerin sitoplazmik depoları olan lipid damlacıklarının oluşumunda da rol oynar (Ueno ve Mori, 1990). Diğer yandan, otofajinin; fare Sertoli hücrelerinde ektoplazmik özelleşmenin birleştirilmesinde aktif rolü ve ektoplazmik özelleşmelerin de lümen oluşumunda destekleyici etkisi olduğu literatürde bilinmektedir (Ueno ve Mori, 1990). Otofaji, ökaryotlar arasında korunan hücre içi bir bozunma sistemidir ve otofajinin belirgin bir özelliği, otofagosomlar olarak bilinen çift zarlı küresel yapıların oluşumuyla sonuçlanan dinamik zarın yeniden düzenlenmesidir. Bu çift zar yapısı lipid damlacıkları etrafında geliştiğinde lipofagosom olarak adlandırılır ve sürece lipofaji denir (Singh ve Cuervo, 2011; Hashemi ve Goodman, 2015). Çalışmamızın 3B Matrigel™ kültürünün parafin kesitlerinde yapılan hematoksisilen-eozin boyama sonuçlarında HGF ve HGF+GDNF gruplarında yağ damlacığı benzeri yapılar gösterilmiştir. HGF ve GDNF'nin matriks içerisine yayılmış sitoplazmalarda yağ damlacığı benzeri yapıların arttığı belirlenmiştir. Aynı zamanda, kontrol ve GDNF gruplarından farklı olarak, HGF ve HGF+GDNF gruplarında lümen benzeri yapılar gözlenmiştir. Bu bilgiler ışığında, HGF ve GDNF; 3B

Matrigel™ kültüründeki 15P-1 Sertoli hücreleri yağ damlacığı benzeri yapıları arttırarak lümen oluşumuna katkı sağladığı kanısındayız.

Çalışmamızda, Sertoli hücrelerinin kimliğinin belirlenmesi açısından scf ifadesi tüm gruplarda immünofloresan yöntem ile değerlendirildiğinde; kültür ortamı Sertoli hücresine uygun koşul olduğu için deneyler sürecinde yalnızca Sertoli hücrelerinin ortamda bulunduğu gösterilmiştir. HGF ve HGF+GDNF gruplarında, hücrelerel etkileşimler diğer gruplara kıyasla daha fazla olduğundan ve matriks içerisine dağıldıklarından scf ifadesinin daha geniş bir alana yayıldığı tespit edilmiştir. 15P-1 Sertoli hücre hattının negatif kontrolü olan c-kit protein ifadesi değerlendirildiğinde; hiçbir grupta c-kit ifadesine rastlanmamıştır.

Seminifer tübüllerde gerçekleşen spermatogenez sürecinde, germ hücrelerinin olgun spermatidlere başarılı bir şekilde farklılaşması ve spermatogenik hücre tiplerinin immüno-koruması için Sertoli hücrelerinin rolü çok önemlidir (Hai ve ark., 2014). Ayrıca, Sertoli hücreleri arasında, zonula okludens gibi çoklu integral membran proteinlerini içeren sıkı bağlantıların kurulmasının tübül lümenlerinin oluşumunda temel rol oynadığı bilinmektedir (Russell ve ark., 1989). HGF, hücre-hücre temas bölgelerinden sitoplazmaya ZO-1 translokasyonuna ve bununla birlikte fosforilasyon yoluyla aktivasyonuna neden olur (Suarez-Causado ve ark., 2015). Ayrıca enterik gliyal hücreler ile yapılan bir çalışmada, GDNF'nin ZO-1 ifadesini arttırarak geçirgenliği azalttığı gösterilmiştir (D. K. Zhang ve ark., 2010). Çalışmamızda, hücreler arası sıkı bağlantılar kurulduğunda ifade edilen protein olan ZO-1 değerlendirildiğinde; HGF ve HGF+GDNF gruplarında sitoplazmik ifadelerin kontrol grubuna göre yoğun olduğu tespit edilmiştir. Değerlendirmeler sonucunda; HGF ile birlikte GDNF uygulamasının Sertoli hücrelerinin kimliğini koruduğu ve bu grupta hücreler arası sıkı bağlantıların kurularak tübül benzeri yapıların oluştuğu ortaya konmuştur. Dolayısıyla, GDNF'nin HGF ile indüklenmiş Sertoli hücrelerinin etkileşimini destekleyerek sıkı bağlantılar kurmasındaki etkisini arttırdığı kanısındayız.

Sonuç olarak; bu yüksek lisans tezinde, HGF ve GDNF'nin 15P-1 Sertoli hücre hattının 3B Matrigel™ kültüründe tübül oluşturma kapasitesine birlikte etkisi ilk kez gösterilmiştir. Bu çalışmanın bulguları, HGF ve GDNF'nin *in vitro* tübülogenez sürecindeki rollerinin ortaya konması, testis morfolojisinin organizasyonundaki moleküler süreçlerin aydınlatılmasına ve ileride SKH'in çoğaltılarak *ex vivo* spermatogenez sürecinde kullanılabilmeleri için uygun kültür ortamlarının geliştirilmesi bağlamında yeni araştırmaların planlanmasına önemli katkılar sağlamıştır.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, 15P-1 Sertoli hücre hattı kullanılarak; kontrol grubu, HGF grubu, GDNF grubu ve HGF+GDNF grubu olacak şekilde Matrigel™’de 3B kültür oluşturulmuştur. Tüm gruplarda; tübül oluşma kapasiteleri 24 saatte bir görüntülenerek, *in vitro* tübülogenez sırasında Sertoli hücrelerinin kimliğinin değişmediği ve sıkı bağlantılar kurduğu sırasıyla kit ligand (scf), c-kit ve ZO-1 protein ifadeleri ile gösterilmiştir. Özetle;

1. Üç boyutlu Matrigel™ kültürüyle oluşturulan tüm gruplarda, 15P-1 Sertoli hücrelerinin arasındaki etkileşimler ve kümelenmeler 24 saat içerisinde başladı. En fazla hücrel etkileşim HGF+GDNF grubuna aitti.
2. Üç boyutlu Matrigel™ kültürüyle oluşturulan tüm gruplarda, 48. ve 72. saatlerde kümelenmeler arasındaki bağlantılar sağlanarak kordon benzeri yapılar oluştuğu gözlemlendi. 48. saatte en fazla kordon benzeri yapılar HGF ve HGF+GDNF grubuna aitti. 72. saatte en fazla kordon benzeri yapılar HGF ve HGF+GDNF grubuna aitti.
3. Üç boyutlu Matrigel™ kültürüyle oluşturulan tüm gruplarda, 96. ve 120. saatte hücrel etkileşimler yoğunlaşarak boşluklar oluşturduğu gözlemlendi ve bu yapıların lümen benzeri yapılar olduğu belirlendi. 96. saatte en fazla lümen benzeri yapılar HGF ve HGF+GDNF grubuna aitti. 120. saatte en fazla lümen benzeri yapılar HGF+GDNF grubuna aitti.
4. HGF ve GDNF; 3B Matrigel™ kültüründeki 15P-1 Sertoli hücreleri yağ damlacığı benzeri yapıları arttırarak lümen oluşumuna katkı sağladı.
5. GDNF; Sertoli hücrelerinin etkileşimini destekleyerek HGF’nin sıkı bağlantılar kurulmasındaki etkisini arttırdı.

6. HGF ve GDNF'nin *in vitro* tübülogenez sürecinde birlikte rollerinin ortaya konması, testis morfolojisinin organizasyonundaki moleküler süreçlerin aydınlatılması ve ileride SKH'in çoğaltılarak *ex vivo* spermatogenez sürecinde kullanılabilmeleri için uygun kültür ortamlarının geliştirilmesi adına literatüre katkı sağlamaktadır.



KAYNAKLAR

- Abe, S. I., Abe, K., Zhang, J., Harada, T., Mizumoto, G., Oshikawa, H., . . . Shimamura, K. Roles of cd34+ cells and alk5 signaling in the reconstruction of seminiferous tubule-like structures in 3-d re-aggregate culture of dissociated cells from neonatal mouse testes. *Plos One*. 2017; 12 (11): e0188705.
- Ahmed, N., Liu, Y., Chen, H., Yang, P., Waqas, Y., Liu, T., . . . Chen, Q. Novel cellular evidence of lipophagy within the sertoli cells during spermatogenesis in the turtle. *Aging (Albany NY)*. 2016; 9 (1): 41-51.
- Alves-Lopes, J. P., Soder, O., & Stukenborg, J. B. Testicular organoid generation by a novel in vitro three-layer gradient system. *Biomaterials*. 2017; 130: 76-89.
- Alves-Lopes, J. P., & Stukenborg, J. B. Testicular organoids: A new model to study the testicular microenvironment in vitro? *Hum Reprod Update*. 2018; 24 (2): 176-191.
- Baazm, M., Mashayekhi, F. J., Babaie, S., Bayat, P., Beyer, C., & Zendedel, A. Effects of different sertoli cell types on the maintenance of adult spermatogonial stem cells in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2017; 53 (8): 752-758.
- Barros, E. J. G., Santos, O. F. P., Matsumoto, K., Nakamura, T., & Nigam, S. K. Differential tubulogenic and branching morphogenetic activities of growth-factors - implications for epithelial tissue-development. *P Natl Acad Sci USA*. 1995; 92 (10): 4412-4416.
- Bhang, D. H., Kim, B. J., Kim, B. G., Schadler, K., Baek, K. H., Kim, Y. H., . . . Ryeom, S. Testicular endothelial cells are a critical population in the germline stem cell niche. *Nat Commun*. 2018; 9 (1): 4379.
- Birchmeier, C., & Gherardi, E. Developmental roles of hgf/sf and its receptor, the c-met tyrosine kinase. *Trends Cell Biol*. 1998; 8 (10): 404-410.
- Blagosklonova, O., Joanne, C., Roux, C., Bittard, H., Fellmann, F., & Bresson, J. L. Absence of anti-mullerian hormone (amh) and m2a immunoreactivities in sertoli cell-only syndrome and maturation arrest with and without azf microdeletions. *Hum Reprod*. 2002; 17 (8): 2062-2065.
- Boizet-Bonhoure, B. Development and pathology of the gonad. *Semin Cell Dev Biol*. 2015; 45: 57-58.
- Bourdon, V., Lablack, A., Abbe, P., Segretain, D., & Pointis, G. Characterization of a clonal sertoli cell line using adult pylt transgenic mice. *Biol Reprod*. 1998; 58 (2): 591-599.
- Brennan, J., Karl, J., & Capel, B. Divergent vascular mechanisms downstream of sry establish the arterial system in the xy gonad. *Developmental Biology*. 2002; 244 (2): 418-428.
- Buehr, M., Gu, S., & McLaren, A. Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development*. 1993; 117 (1): 273-281.

Catizone, A., Ricci, G., Arista, V., Innocenzi, A., & Galdieri, M. Hepatocyte growth factor and c-met are expressed in rat prepubertal testis. *Endocrinology*. 1999; 140 (7): 3106-3113.

Catizone, A., Ricci, G., & Galdieri, M. Expression and functional role of hepatocyte growth factor receptor (c-met) during postnatal rat testis development. *Endocrinology*. 2001; 142 (5): 1828-1834.

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

Chojnacka, K., Zarzycka, M., & Mruk, D. D. Biology of the sertoli cell in the fetal, pubertal, and adult mammalian testis. *Results Probl Cell D*. 2016; 58: 225-251.

Combes, A. N., Lesieur, E., Harley, V. R., Sinclair, A. H., Little, M. H., Wilhelm, D., & Koopman, P. Three-dimensional visualization of testis cord morphogenesis, a novel tubulogenic mechanism in development. *Dev Dynam*. 2009; 238 (5): 1033-1041.

Combes, A. N., Wilhelm, D., Davidson, T., Dejana, E., Harley, V., Sinclair, A., & Koopman, P. Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Dev Biol*. 2009; 326 (1): 112-120.

Cool, J., DeFalco, T., & Capel, B. Testis formation in the fetal mouse: Dynamic and complex de novo tubulogenesis. *Wires Dev Biol*. 2012; 1 (6): 847-859.

Gao, H., Liu, C., Wu, B., Cui, H., Zhao, Y., Duan, Y., . . . Li, W. Effects of different biomaterials and cellular status on testicular cell self-organization. *Adv Biosyst*. 2020; 4 (7): e1900292.

Gassei, K., Ehmcke, J., & Schlatt, S. Initiation of testicular tubulogenesis is controlled by neurotrophic tyrosine receptor kinases in a three-dimensional sertoli cell aggregation assay. *Reproduction*. 2008; 136 (4): 459-469.

Gassei, K., Ehmcke, J., Wood, M., Walker, W., & Schlatt, S. Immature rat seminiferous tubules reconstructed in vitro express markers of sertoli cell maturation after xenografting into nude mouse hosts. *Mol Hum Reprod*. 2010; 16 (2): 97-110.

Gassei, K., Schlatt, S., & Ehmcke, J. De novo morphogenesis of seminiferous tubules from dissociated immature rat testicular cells in xenografts. *J Androl*. 2006; 27 (4): 611-618.

Griswold, M. D. The central role of sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 1998; 9 (4): 411-416.

Grobstein, C. Mechanisms of organogenetic tissue interaction. *Natl Cancer Inst Monogr*. 1967; 26: 279-299.

Gumbiner, B. M. Epithelial morphogenesis. *Cell*. 1992; 69 (3): 385-387.

Hadley, M. A., Byers, S. W., Suarez-Quian, C. A., Kleinman, H. K., & Dym, M. Extracellular matrix regulates sertoli cell differentiation, testicular cord formation, and germ cell development in vitro. *J Cell Biol*. 1985; 101 (4): 1511-1522.

Hadley, M. A., Weeks, B. S., Kleinman, H. K., & Dym, M. Laminin promotes formation of cord-like structures by sertoli cells in vitro. *Dev Biol.* 1990; 140 (2): 318-327.

Hai, Y. A., Hou, J. M., Liu, Y., Liu, Y., Yang, H., Li, Z., & He, Z. P. The roles and regulation of sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2014; 29: 66-75.

Hashemi, H. F., & Goodman, J. M. The life cycle of lipid droplets. *Curr Opin Cell Biol.* 2015; 33: 119-124.

Heinrich, A., & DeFalco, T. Essential roles of interstitial cells in testicular development and function. *Andrology-Us.* 2020; 8 (4): 903-914.

Hiramatsu, R., Harikae, K., Tsunekawa, N., Kurohmaru, M., Matsuo, I., & Kanai, Y. Fgf signaling directs a center-to-pole expansion of tubulogenesis in mouse testis differentiation. *Development.* 2010; 137 (2): 303-312.

Hofmann, M. C., Narisawa, S., Hess, R. A., & Millan, J. L. Immortalization of germ-cells and somatic testicular cells using the sv40 large t-antigen. *Exp Cell Res.* 1992; 201 (2): 417-435.

Inoue, M., Baba, T., & Morohashi, K. Recent progress in understanding the mechanisms of leydig cell differentiation. *Mol Cell Endocrinol.* 2018; 468: 39-46.

Iwanami, Y., Kobayashi, T., Kato, M., Hirabayashi, M., & Hochi, S. Characteristics of rat round spermatids differentiated from spermatogonial cells during co-culture with sertoli cells, assessed by flow cytometry, microinsemination and rt-pcr. *Theriogenology.* 2006; 65 (2): 288-298.

Kamalati, T., Niranjana, B., Yant, J., & Buluwela, L. Hgf/sf in mammary epithelial growth and morphogenesis: In vitro and in vivo models. *J Mammary Gland Biol.* 1999; 4 (1): 69-77.

Kanatsu-Shinohara, M., & Shinohara, T. Spermatogonial stem cell self-renewal and development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2013; 29: 163-187.

Kanbar, M., Vermeulen, M., & Wyns, C. Organoids as tools to investigate the molecular mechanisms of male infertility and its treatments. *Reproduction.* 2021; 161 (5): R103-R112.

Karl, J., & Capel, B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Developmental Biology.* 1998; 198 (1): 181-181.

Kubota, H., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *P Natl Acad Sci USA.* 2004; 101 (47): 16489-16494.

Lee, D. R., Kim, K. S., Yang, Y. H., Oh, H. S., Lee, S. H., Chung, T. G., . . . Cha, K. Y. Isolation of male germ stem cell-like cells from testicular tissue of non-obstructive azoospermic patients and differentiation into haploid male germ cells in vitro. *Hum Reprod.* 2006; 21 (2): 471-476.

Lee, J. H., Kim, H. J., Kim, H., Lee, S. J., & Gye, M. C. In vitro spermatogenesis by three-dimensional culture of rat testicular cells in collagen gel matrix. *Biomaterials*. 2006; 27 (14): 2845-2853.

Legendre, A., Froment, P., Desmots, S., Lecomte, A., Habert, R., & Lemazurier, E. An engineered 3d blood-testis barrier model for the assessment of reproductive toxicity potential. *Biomaterials*. 2010; 31 (16): 4492-4505.

Lemagueresse, B., & Jegou, B. Paracrine control of immature sertoli cells by adult germ-cells, in the rat (an invitro study) - cell-cell interactions within the testis. *Mol Cell Endocrinol*. 1988; 58 (1): 65-72.

Mackay, S., Booth, S. H., MacGowan, A., & Smith, R. A. Ultrastructural studies demonstrate that epithelial polarity is established in cultured mouse pre-sertoli cells by extracellular matrix components. *J Electron Microsc*. 1999; 48 (2): 159-165.

Matsumoto, K., & Nakamura, T. Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor. *J Biochem*. 1996; 119 (4): 591-600.

Mclaren, A. Sex determination in mammals. *Oxford Rev Reprod B*. 1991; 13: 1-33.

Meng, X. J., Lindahl, M., Hyvonen, M. E., Parvinen, M., de Rooij, D. G., Hess, M. W., . . . Sariola, H. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by gdnf. *Science*. 2000; 287 (5457): 1489-1493.

Migrenne, S., Moreau, E., Pakarinen, P., Dierich, A., Merlet, J., Habert, R., & Racine, C. Mouse testis development and function are differently regulated by follicle-stimulating hormone receptors signaling during fetal and prepubertal life. *Plos One*. 2012; 7 (12).

Naillat, F., Veikkolainen, V., Miinalainen, I., Sipila, P., Poutanen, M., Elenius, K., & Vainio, S. J. Erbb4, a receptor tyrosine kinase, coordinates organization of the seminiferous tubules in the developing testis. *Mol Endocrinol*. 2014; 28 (9): 1534-1546.

Nakasatomi, M., Takahashi, S., Sakairi, T., Ikeuchi, H., Kaneko, Y., Hiromura, K., . . . Maeshima, A. Enhancement of hgf-induced tubulogenesis by endothelial cell-derived gdnf. *Plos One*. 2019; 14 (3).

Paquis-Flucklinger, V., Michiels, J. F., Vidal, F., Alquier, C., Pointis, G., Bourdon, V., . . . Rassoulzadegan, M. Expression in transgenic mice of the large t antigen of polyomavirus induces sertoli cell tumours and allows the establishment of differentiated cell lines. *Oncogene*. 1993; 8 (8): 2087-2094.

Parekh, P. A., Garcia, T. X., & Hofmann, M. C. Regulation of gdnf expression in sertoli cells. *Reproduction*. 2019; 157 (3): R95-R107.

Pinto, M. P., Jacobsen, B. M., & Horwitz, K. B. An immunohistochemical method to study breast cancer cell subpopulations and their growth regulation by hormones in three-dimensional cultures. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2011; 2: 15.

Popsueva, A., Poteryaev, D., Arighi, E., Meng, X., Angers-Loustau, A., Kaplan, D., . . . Sariola, H. Gdnf promotes tubulogenesis of gfralpha1-expressing mdck cells by src-

mediated phosphorylation of met receptor tyrosine kinase. *J Cell Biol.* 2003; 161 (1): 119-129.

Rassoulzadegan, M., Paquisflucklinger, V., Bertino, B., Sage, J., Jasin, M., Miyagawa, K., . . . Cuzin, F. Transmeiotic differentiation of male germ-cells in culture. *Cell.* 1993; 75 (5): 997-1006.

Rehman, Z. U., Worku, T., Davis, J. S., Talpur, H. S., Bhattarai, D., Kadariya, I., . . . Yang, L. G. Role and mechanism of amh in the regulation of sertoli cells in mice. *J Steroid Biochem.* 2017; 174: 133-140.

Ricci, G., & Catizone, A. Pleiotropic activities of hgf/c-met system in testicular physiology: Paracrine and endocrine implications. *Front Endocrinol.* 2014; 5.

Ricci, G., Catizone, A., Innocenzi, A., & Galdieri, M. Hepatocyte growth factor (hgf) receptor expression and role of hgf during embryonic mouse testis development. *Dev Biol.* 1999; 216 (1): 340-347.

Richardson, L. L., Kleinman, H. K., & Dym, M. Basement membrane gene expression by sertoli and peritubular myoid cells in vitro in the rat. *Biol Reprod.* 1995; 52 (2): 320-330.

Richer, G., Baert, Y., & Goossens, E. In-vitro spermatogenesis through testis modelling: Toward the generation of testicular organoids. *Andrology-U.S.* 2020; 8 (4): 879-891.

Russell, L. D., Bartke, A., & Goh, J. C. Postnatal-development of the sertoli-cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. *Am J Anat.* 1989; 184 (3): 179-189.

Sariola, H., & Saarma, M. Novel functions and signalling pathways for gdnf. *J Cell Sci.* 2003; 116 (19): 3855-3862.

Schlatt, S., deKretser, D. M., & Loveland, K. L. Discriminative analysis of rat sertoli and peritubular cells and their proliferation in vitro: Evidence for follicle-stimulating hormone-mediated contact inhibition of sertoli cell mitosis. *Biol Reprod.* 1996; 55 (2): 227-235.

Sharpe, R. M., McKinnell, C., Kivlin, C., & Fisher, J. S. Proliferation and functional maturation of sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction.* 2003; 125 (6): 769-784.

Singh, R., & Cuervo, A. M. Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab.* 2011; 13 (5): 495-504.

Sosa, E., Chen, D., Rojas, E. J., Hennebold, J. D., Peters, K. A., Wu, Z., . . . Clark, A. T. Differentiation of primate primordial germ cell-like cells following transplantation into the adult gonadal niche. *Nat Commun.* 2018; 9.

Spinnler, K., Kohn, F. M., Schwarzer, U., & Mayerhofer, A. Glial cell line-derived neurotrophic factor is constitutively produced by human testicular peritubular cells and may contribute to the spermatogonial stem cell niche in man. *Hum Reprod.* 2010; 25 (9): 2181-2187.

Stanton, P. G. Regulation of the blood-testis barrier. *Semin Cell Dev Biol.* 2016; 59: 166-173.

Suarez-Causado, A., Caballero-Diaz, D., Bertran, E., Roncero, C., Addante, A., Garcia-Alvaro, M., . . . Sanchez, A. Hgf/c-met signaling promotes liver progenitor cell migration and invasion by an epithelial-mesenchymal transition-independent, phosphatidyl inositol-3 kinase-dependent pathway in an in vitro model. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1853 (10 Pt A): 2453-2463.

Sun, M., Yuan, Q., Niu, M., Wang, H., Wen, L., Yao, C., . . . He, Z. Efficient generation of functional haploid spermatids from human germline stem cells by three-dimensional-induced system. *Cell Death Differ.* 2018; 25 (4): 749-766.

Svingen, T., & Koopman, P. Building the mammalian testis: Origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. *Gene Dev.* 2013; 27 (22): 2409-2426.

Tung, P. S., & Fritz, I. B. Extracellular matrix components and testicular peritubular cells influence the rate and pattern of sertoli cell migration in vitro. *Dev Biol.* 1986; 113 (1): 119-134.

Ueno, H., & Mori, H. Morphometrical analysis of sertoli cell ultrastructure during the seminiferous epithelial cycle in rats. *Biol Reprod.* 1990; 43 (5): 769-776.

van der Wee, K., & Hofmann, M. C. An in vitro tubule assay identifies hgf as a morphogen for the formation of seminiferous tubules in the postnatal mouse testis. *Exp Cell Res.* 1999; 252 (1): 175-185.

Vigier, M., Weiss, M., Perrard, M. H., Godet, M., & Durand, P. The effects of fsh and of testosterone on the completion of meiosis and the very early steps of spermiogenesis of the rat: An in vitro study. *J Mol Endocrinol.* 2004; 33 (3): 729-742.

Wang, H., Wen, L., Yuan, Q., Sun, M., Niu, M., & He, Z. Establishment and applications of male germ cell and sertoli cell lines. *Reproduction.* 2016; 152 (2): R31-40.

Xie, B., Qin, Z., Huang, B., Xie, T., Yao, H., Wei, Y., . . . Jiang, H. In vitro culture and differentiation of buffalo (*bubalus bubalis*) spermatogonia. *Reprod Domest Anim.* 2010; 45 (2): 275-282.

Zhang, D. K., He, F. Q., Li, T. K., Pang, X. H., Cui, D. J., Xie, Q., . . . Gan, H. T. Glial-derived neurotrophic factor regulates intestinal epithelial barrier function and inflammation and is therapeutic for murine colitis. *J Pathol.* 2010; 222 (2): 213-222.

Zhang, X. F., Wang, L., Zhang, X. D., Ren, L. J., Shi, W. J., Tian, Y. J., . . . Zhang, T. B. The use use of knockout serum replacement (ksr) in three dimensional rat testicular cells co-culture model: An improved male reproductive toxicity testing system. *Food Chem Toxicol.* 2017; 106: 487-495.

Zhou, R., Wu, J., Liu, B., Jiang, Y., Chen, W., Li, J., . . . He, Z. The roles and mechanisms of leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2019; 76 (14): 2681-2695.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Begüm	Uyruğu	TC
Soyadı	DURKUT	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Bornova Suphi Koyuncuoğlu Anadolu Lisesi	2014
Lisans	İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü	2019
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Devam ediyor.

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Stajer	Çek Bilimler Akademisi Deneysel Botanik Enstitüsü	2018 (2 ay)

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	Yökdil (Sağlık bilimleri)	73,750

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Sertoli hücrelerinin HUVEC-koşullu besiyerinde 3 boyutlu tübül oluşturma kapasitelerinin araştırılması	TÜBİTAK	2020-2021

Uluslararası Yayın:

Sema AVCI, Nilay KUSCU, **Begum DURKUT**, Leyla KILINC, Ismail USTUNEL, Ciler CELIK-OZENCI. Prostaglandin inhibition delays preterm birth by regulating the Notch pathway and Tlr receptors in LPS-induced preterm labor model. Journal of Assisted Reproduction and Genetics (2021, değerlendirmede).

Uluslararası Bildiriler

Sema AVCI, Nilay KUSCU, **Begum DURKUT**, Leyla KILINC, Ismail USTUNEL, Ciler CELIK-OZENCI. Indomethacin can protect placental inflammation and prevent preterm birth in the LPS-induced preterm delivery model. American Society for Reproductive Medicine (ASRM), October 16-20, 2021. Baltimore, Maryland, ABD.