



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK GLİKOZLU BESİYERİ İLE
DENEYSEL DİYABETİK MODELDE
HASARA UĞRAMIŞ SPERMLERE
KÖK HÜCRE VE NİŞ İLE DESTEKLENMİŞ
TROMBOSİT ZENGİN PLAZMA (PRP) VE
STROMAL VASKÜLER FRAKSİYON (SVF) ETKİSİ

HAZIRLAYAN: RABİA DURUŞMA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ

DANIŞMAN

DOÇ. DR. ERDOĞAN KOCAMAZ

MANİSA-2022



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK GLİKOZLU BESİYERİ İLE
DENEYSEL DİYABETİK MODELDE
HASARA UĞRAMIŞ SPERMLERE
KÖK HÜCRE VE NİŞ İLE DESTEKLENMİŞ
TROMBOSİT ZENGİN PLAZMA (PRP) VE
STROMAL VASKÜLER FRAKSİYON (SVF) ETKİSİ

HAZIRLAYAN: RABİA DURUŞMA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ

TEZ SAVUNMA JÜRİ ÜYELERİ

Doç. Dr. ERDOĞAN KOCAMAZ

(Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU

(Tez Jürisi)

Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER

(Tez Jürisi)

MANİSA–2022

I. BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından, veri toplanması ve 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, yine bu tezin çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Rabia DURUŞMA

II. TEŞEKKÜR

Bu tez, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2020/059 proje numarası ile desteklenmiştir. Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi'ne ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübeleriyle yanımda olan, manevi ve bilimsel desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca her daim, bilgi ve deneyimlerini en verimli şekilde aktaran Sayın Prof. Dr. Seda VATANSEVER'e, Prof. Dr. Kemal ÖZBİLGİN'e ve Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER'e,

Bu süreçte her zaman manevi ve bilimsel destek olan Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU'ya,

Yüksek lisans eğitimim boyunca birlikte çalıştığım ve laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan asistan arkadaşlarım Arş. Gör. Tuna ÖNAL'a, Arş. Gör. Yusuf PEKMEZCİ'ye, Arş. Gör. Mustafa ÖZTATLICI'ya ve emeği geçen tüm uzman-asistan arkadaşlarıma,

Hayatımın boyunca güçlü kişiliği ve karakteri açısından örnek aldığım ve beni bu günlere getirmek için maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen CANIM ANNEME ve hayatımın her anında beni destekleyen canım AİLEM'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Rabia DURUŞMA

III. KISALTMALAR VE SİMGELER

AKMKH	Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler
DB	Diyabetik
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
e-NOS	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
FSH	Folikül Stimüle Edici Hormon
GDNF	Gliyal Hücre Hattı Kaynaklı Nörotropik Faktör
GLUT	Glikoz Taşıyıcıları
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
hCG	Koryonik Gonadotropin Hormonu
HKE	Hematopoietik Kök Hücreler
HT	Hücrel Terapi
i- NOS	İndüklenebilen Nitrik Oksit Sentaz
KBY	Koşullu Besiyeri
KTb	Kan- Testis Bariyeri
LH	Luteinize Edici Hormon
MIS	Müllerian İnhibe Edici Madde
MKH	Mezenkimal Kök Hücreler
PAF	Prostatik Asit Fosfataz
PGC	Primordial Germ Hücreleri
PRP	Platelet Zengin Plazma
PSA	Prostat Spesifik Antijen
ROS	Reaktif Oksijen Radikalleri
SF-1	Steroidojenik Faktör-1
İHK	İmmünohistokimya
SSC	Spermatogonyal Kök Hücreler
STZ	Streptozotosin
SVF	Stromal Vasküler Fraksiyon
TUNEL	Terminal Transferased UTP Nick End Labeling

IV. İÇİNDEKİLER

I. BEYAN	
II. TEŞEKKÜR.....	ii
III. KISALTMALAR VE SİMGELER.....	iii
IV. İÇİNDEKİLER	iv
V. ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ.....	xiii
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4. 1 Erkek Üreme Sisteminin Genel Yapısı	5
4.1.1 Testis Anatomisi.....	6
4.1.2 Testis Embriyolojisi.....	8
4.1.2.1 Testis İnisi.....	12
4.1.3 Testis Histolojisi.....	13
4.1.3.1 Seminifer Tübül Histolojisi.....	14
4.1.3.2 Spermatogenez.....	15
4.1.3.3 Spermatogonyal evre.....	16
4.1.3.4 Spermatozit evresi.....	17
4.1.3.5 Spermatid Evresi	18
4.1.3.6 Spermiyogenez	19
4.1.3.7 Olgun Spermin Yapısı	19
4.1.3.8 Leydig hücreleri.....	20
4.1.3.9 Sertoli Hücreleri.....	22
4.1.3.10 Spermatogenezin Hormanal Kontrolü	22
4.1.3.11 Testis İçi Genital Kanallar	23
4.1.3.12 Genital Boşaltım Kanalları	24
4.1.3.13 Yardımcı Genital Bezler.....	26
4.1.4 Epididimis.....	28
4.1.4.1 Epididimis Histolojisi	28
4.2 Diabetes Mellitus Tanımı	30
4.2.1 Diabetes Mellitusun Epidemiyolojisi ve Prevalansı.....	30
4.2.2 Diabetes Mellitusun ve Prediyabetin Tanısı.....	31
4.2.2.1 Prediyabet Tanısı.....	31
4.2.3 Diabetes Mellitusun Sınıflandırılması.....	31
4.2.4 Diabetes Mellitusun Semptomları ve Komplikasyonları	32
4.2.5 Streptozotoksin ile Diyabet Oluşturma Mekanizması	32
4.2.6 Diyabet ve İnfertilite İlişkisi.....	32
4.2.7 Diyabetik Testiste Glikoz Metabolizmasının Moleküler Temeli	

.....	33
4.3 Hücresel Tedaviler.....	33
4.3.1 Kök Hücre Tanımı ve Çeşitleri.....	33
4.3.2 PRP Tanımı ve Büyüme Faktörleri	36
4.3.3 Stromal Vasküler Fraksiyon (SVF).....	39
4.3.4 Mezenkimal Kök Hücre Nişi.....	39
4.3.4.1 Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanımı.....	40
4.4 İnfertilite.....	41
4.4.1 Erkek İnfertilitesi.....	41
4.5 Apoptoz.....	42
4.6 Hücresel Tedavi [HT] Uygulamalarında Birlikte Kullanım.....	43
4.6.1 Tekli Uygulamalar	43
4.6.2 İkili Uygulamalar.....	46
4.6.3 Üçlü Uygulamalar.....	48
4.6.4 Dörtlü Uygulamalar	51
5. GEREÇ VE YÖNTEM	52
5.1 Deney Hayvanlarının Temini ve Deney Grupları.....	52
5.2 Deneysel Diyabet Modelinin Oluşturulması.....	55
5.3 Mezenkimal Kök Hücrelerin ve Nişin Eldesi	55
5.3.1 Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Eldesi ve Karakterizasyonu	55
5.3.2 Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Nişinin Eldesi	56
5.4 PRP Elde Edilmesi.....	57
5.5 SVF Elde Edilmesi	58
5.6 Testis Dokularının Alınması.....	58
5.6.1 Kan Şekerlerinin Ölçülmesi.....	58
5.6.2 Vücut Ağırlıklarının Ölçülmesi	59
5.7 Testis Dokularının Takibi ve Histopatolojik Değerlendirilmesi.....	59
5.7.1 Parafin Doku Takibi.....	59
5.7.2 Testis Dokularının Hematoksilen- Eozin (H&E) Boyaması ...	60
5.7.3 Seminifer Tübül Çapı Ölçümü	60
5.7.4 Johsen Skoru	60
5.8 Spermilerin Hazırlanması ve Analizi.....	60
5.8.1 Sperm Sayımı	60
5.8.2 Sperm Morfolojisi.....	61
5.8.2.1 Diff-Quick Boyama	62
5.8.3 Hareketlilik.....	62
5.8.4 Canlılık.....	62
5.9 İmmunohistokimyasal Boyama	62
5.10 TUNEL Boyaması.....	63
5.11 İstatistiksel Analiz.....	64
6. BULGULAR	65
6.1 Diyabet Bulguları.....	65
6.1.1 Kan Şekerleri	65
6.1.2 Vücut Ağırlıkları.....	66
6.1.3 Hücresel Tedavi Belirteçleri	66
6.1.3.1 SVF Karakterizasyonu	66

6.1.3.2 PRP Karakterizasyonu.....	67
6.1.3.3 MKH Karakterizasyonu	68
6.2. Testis Bulguları	70
6.2.1 HE Bulguları	70
6.2.2 Seminifer Tübül Çapı.....	72
6.3. Tekli Uygulamaların Bulguları	73
6.3.1 Tekli Uygulamaların Canlılık Bulguları.....	73
6.3.2 Tekli Uygulamaların Hareket Bulguları	76
6.3.3 Tekli Uygulamaların Morfoloji Bulguları.....	79
6.3.4 Tekli Uygulamaların eNOS İmmunohistokimyasal Bulguları .	82
6.3.5 Tekli Uygulamaların iNOS İmmunohistokimyasal Bulguları..	85
6.3.6 TUNEL işaretlemeesi	88
6.3.7 Tekli Uygulamaların Caspase 3 İmmunohistokimyasal Bulguları	90
6.3.8 Tekli Uygulamaların Caspase 8 İmmunohistokimyasal Bulguları	93
6.3.9 Tekli Uygulamaların Caspase 9 İmmunohistokimyasal Bulguları	96
6.4 İkili Uygulamaların Bulguları	99
6.4.1 İkili Uygulamaların Canlılık Bulguları	99
6.4.2 İkili Uygulamaların Hareket Bulguları	102
6.4.3 Morfoloji Değerlendirmesi.....	105
6.4.4 İkili Uygulamaların eNOS İmmunohistokimyasal Bulguları .	108
6.4.5 İkili Uygulamaların iNOS İmmunohistokimyasal Bulguları..	111
6.4.6 TUNEL işaretlemeesi	114
6.4.7 İkili Uygulamaların Caspase 3 İmmunohistokimyasal Bulguları	117
6.4.8 İkili Uygulamaların Caspase 8 İmmunohistokimyasal Bulguları	120
6.4.9 İkili Uygulamaların Caspase 9 İmmunohistokimyasal Bulguları	123
6.5 Üçlü Uygulamaların Bulguları	126
6.5.1 Üçlü Uygulamaların Canlılık Bulguları.....	126
6.5.2 Üçlü Uygulamaların Hareket Bulguları	129
6.5.3 Üçlü Uygulamaların Morfoloji Değerlendirmesi.....	131
6.5.4 Üçlü Uygulamaların eNOS İmmunohistokimyasal Bulguları	154
6.5.5 Üçlü Uygulamaların iNOS İmmunohistokimyasal Bulguları.	157
6.5.6 TUNEL işaretlemeesi	136
6.5.7 Üçlü Uygulamaların Caspase 3 İmmunohistokimyasal Bulguları	138
6.5.8 Üçlü Uygulamaların Caspase 8 İmmunohistokimyasal Bulguları	140
6.5.9 Üçlü Uygulamaların Caspase 9 İmmunohistokimyasal Bulguları	142
6.6 Dörtlü Uygulama Bulguları	145
6.6.1 Dörtlü Uygulamaların Canlılık Bulguları	145
6.6.2 Dörtlü Uygulamaların Hareket Bulguları	148
6.6.3 Dörtlü Uygulamaların Morfoloji Değerlendirmesi	151
6.6.4 Dörtlü Uygulamaların eNOS İmmunohistokimyasal Bulguları	154
6.6.5 Dörtlü Uygulamaların iNOS İmmunohistokimyasal Bulguları	

.....	157
6.6.6 TUNEL işaretlemeesi	160
6.6.7 Dörtlü Uygulamaların Caspase 3 İmmunohistokimyasal Bulguları.....	163
6.6.8 Dörtlü Uygulamaların Caspase 8 İmmunohistokimyasal Bulguları.....	166
6.6.9 Dörtlü Uygulamaların Caspase 9 İmmunohistokimyasal Bulguları.....	169
7. TARTIŞMA	173
8 . SONUÇ VE ÖNERİLER	186
9. KAYNAKLAR.....	188
10. EKLER.....	208
11. ÖZGEÇMİŞ	211



V. ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Erkek üreme sisteminin anatomik görünümü	5
Şekil 4.2. Testisin Gelişim Evresi	12
Şekil 4.3. Testisin Sagital Kesiti	14
Şekil 4.4. Seminifer Epitel	18
Şekil 4.5. Spermatogenez aşamaları	20
Şekil 4.6. Yağ kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin özellikleri, farklılaşması ve klinik uygulamaları	41
Şekil 6.1. Deney Gruplarında AKŞ değerleri.....	65
Şekil 6.2. Deney Gruplarında İlk ve Son Vücut Ağırlıkları farkı.	66
Şekil 6.3. SVF karakterizasyonu için HE ve CD90 boyaması.	67
Şekil 6.4. PRP karakterizasyonu için HE boyaması.....	67
Şekil 6.5. MKH karakterizasyonu için PBS, CD45, CD34 ve CD73, C90,CD105 boyaması	68
Şekil 6.6. MKH karakterizasyonu için PBS, CD45, CD34 ve CD73, C90, CD105 İmmunoreaktivitesi.	69
Şekil 6.7. Johnson skorlaması.	71
Şekil 6.8. Seminifer Tübül Çapı.....	73
Şekil 6.9. Tekli HT uygulamaları için canlılık testi.	75
Şekil 6.10. Tekli HT uygulamaları için hareketlilik testi.	78
Şekil 6.11. Tekli HT uygulamaları için morfoloji değerlendirmesi.	81
Şekil 6.12. Tekli HT uygulamalarında h-skor ile eNOS İHK değerlendirmesi.	84
Şekil 6.13. Tekli HT uygulamalarında h-skor ile iNOS İHK değerlendirmesi.....	87
Şekil 6.14. Tekli HT uygulamalarında Apoptotik indeks ile TUNEL değerlendirmesi.	90
Şekil 6.15. Tekli HT uygulamalarında kaspaz 3 İHK değerlendirmesi.	92
Şekil 6.16. Tekli HT uygulamalarında kaspaz 8 İHK değerlendirmesi.	95
Şekil 6.17. Tekli HT uygulamalarında kaspaz 9 İHK değerlendirmesi.	98
Şekil 6.18. İkili HT uygulamaları için canlılık testi.	101
Şekil 6.19. İkili HT uygulamaları için hareket testi.	104
Şekil 6.20. İkili HT uygulamaları için morfoloji değerlendirmesi.....	107

Şekil 6.21. İkili HT uygulamaları için e-NOS İHK değerlendirmesi.	110
Şekil 6.22. İkili HT uygulamaları için iNOS İHK değerlendirmesi.	113
Şekil 6.23. İkili HT uygulamalarında Apoptotik indeks ile TUNEL değerlendirmesi.	116
Şekil 6.24. İkili HT uygulamalarında kaspaz 3 İHK değerlendirmesi.	119
Şekil 6.25. İkili HT uygulamalarında kaspaz 8 İHK değerlendirmesi.	122
Şekil 6.26. İkili HT uygulamalarında kaspaz 9 İHK değerlendirmesi.	125
Şekil 6.27. Üçlü HT uygulamaları için canlılık testi.	128
Şekil 6.28. Üçlü HT uygulamaları için hareketlilik testi.	130
Şekil 6.29. Üçlü HT uygulamaları için morfoloji değerlendirmesi.	132
Şekil 6.30. Üçlü HT uygulamaları için e-NOS İHK değerlendirmesi.	134
Şekil 6.31. Üçlü HT uygulamaları için i-NOS İHK değerlendirmesi.	136
Şekil 6.32. Üçlü HT uygulamalarında Apoptotik indeks ile TUNEL değerlendirmesi.	138
Şekil 6.33. Üçlü HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 3 İHK değerlendirmesi.	140
Şekil 6.34. Üçlü HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 8 İHK değerlendirmesi.	142
Şekil 6.35. Üçlü HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 9 İHK değerlendirmesi.	144
Şekil 6.36. Dörtlü HT uygulamaları için canlılık testi.	147
Şekil 6.37. Dörtlü HT uygulamaları için hareketlilik testi.	150
Şekil 6.38. Dörtlü HT uygulamaları için morfoloji değerlendirmesi.	153
Şekil 6.39. Dörtlü HT uygulamaları için e-NOS İHK değerlendirmesi.	156
Şekil 6.40. Dörtlü HT uygulamaları için i-NOS İHK değerlendirmesi.	159
Şekil 6.41. Dörtlü HT uygulamalarında Apoptotik indeks ile TUNEL değerlendirmesi.	162
Şekil 6.42. Dörtlü HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 3 İHK değerlendirmesi.	165
Şekil 6.43. Dörtlü HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 8 İHK değerlendirmesi.	168
Şekil 6.44. Dörtlü HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 9 İHK değerlendirmesi.	171

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 5.1. Deney Grupları	53
Tablo 6.1. MKH karakterizasyonu için H-skor Analizi.	69
Tablo 6.2. Tekli HT uygulamaları için canlılık testi.	75
Tablo 6.3. Tekli HT uygulamaları için hareketlilik testi.	78
Tablo 6.4. Tekli uygulamaları için morfoloji değerlendirme si	81
Tablo 6.5. Tekli HT uygulamalarında h-skor ile eNOS İHK değerlendirme si.	84
Tablo 6.6. Tekli HT uygulamalarında h-skor ile iNOS İHK değerlendirme si.	87
Tablo 6.7. Tekli HT uygulamalarında apoptotik indeks ile TUNEL değerlendirme si.	90
Tablo 6.8. Tekli HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 3 İHK değerlendirme si.	92
Tablo 6.9. Tekli HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 8 İHK değerlendirme si.	95
Tablo 6.10. Tekli HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 9 İHK değerlendirme si	98
Tablo 6.11. İkili HT uygulamaları için canlılık testi.	101
Tablo 6.12. İkili HT uygulamaları için hareketlilik testi.	104
Tablo 6.13. İkili uygulamaları için morfoloji değerlendirme si.	107
Tablo 6.14. İkili HT uygulamalarında h-skor ile eNOS İHK değerlendirme si.	110
Tablo 6.15. İkili HT uygulamalarında h-skor ile iNOS İHK değerlendirme si.	113
Tablo 6.16. İkili HT uygulamalarında apoptotik indeks ile TUNEL değerlendirme si.	116
Tablo 6.17. İkili HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 3 İHK değerlendirme si. ...	119
Tablo 6.18. İkili HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 8 İHK değerlendirme si. ...	122
Tablo 6.19. Üçlü HT uygulamaları h-skor ile kaspaz 9 İHK değerlendirme si.	125
Tablo 6.20. Üçlü HT uygulamaları için canlılık testi.	128
Tablo 6.21. Üçlü HT uygulamaları için hareketlilik testi.	130
Tablo 6.22. Üçlü HT uygulamaları için morfoloji değerlendirme si.	132
Tablo 6.23. Üçlü HT uygulamalarında h-skor ile eNOS İHK değerlendirme si.	134
Tablo 6.24. Üçlü HT uygulamalarında h-skor ile iNOS İHK değerlendirme si.	136
Tablo 6.25. Üçlü HT uygulamalarında apoptotik indeks ile TUNEL değerlendirme si.	138

Tablo 6.26. Üçlü HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 3 İHK değerlendirmesi...	140
Tablo 6.27. Üçlü HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 8 İHK değerlendirmesi...	142
Tablo 6.28. Üçlü HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 9 İHK değerlendirmesi...	144
Tablo 6.29. Dörtlü HT uygulamaları için canlılık testi.....	147
Tablo 6.30. Dörtlü HT uygulamaları için hareketlilik testi.....	150
Tablo 6.31. Dörtlü HT uygulamaları için morfoloji değerlendirmesi.....	153
Tablo 6.32. Dörtlü HT uygulamalarında h-skor ile eNOS İHK değerlendirmesi. ...	156
Tablo 6.33. Dörtlü HT uygulamalarında h-skor ile iNOS İHK değerlendirmesi.....	159
Tablo 6.34. Dörtlü HT uygulamalarında apoptotik indeks ile TUNEL değerlendirmesi.....	162
Tablo 6.35. Dörtlü HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 3 İHK değerlendirmesi.	165
Tablo 6.36. Dörtlü HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 8 İHK değerlendirmesi.	168
Tablo 6.37. Dörtlü HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 9 İHK değerlendirmesi.	171

RESİMLER DİZİNİ

Resim 5.1. Denekten PRP elde etmek için kan alımı.....	57
Resim 5.2. Santrifüj işlemi sonrası elde edilen PRP'nin görünümü	57
Resim 5.3. Santrifüj ile dipte çökmüş halde bulunan SVF	58
Resim 5.4. STZ uygulaması sonrası kan şekeri ölçümü	59
Resim 5.5. Epididimis dokularının alınması.....	61
Resim 6.1. Testis histolojisi HE örnekleri.	71
Resim 6.2. Seminifer Tübül Çapı.....	72
Resim 6.3. Tekli HT uygulamaları için canlılık boyaması.	74
Resim 6.4. Tekli HT uygulamaları için hareketliliğin faz kontrast görüntüleri.....	77
Resim 6.5. Tekli HT uygulamalarında Diff Quick ile yapılan morfoloji değerlendirmesi.....	80
Resim 6.6. Tekli HT uygulamalarında Oksidatif stresin eNOS ile değerlendirilmesi. 83	
Resim 6.7. Tekli HT uygulamalarında Oksidatif stresin iNOS ile değerlendirilmesi.. 86	
Resim 6.8. Tekli HT uygulamalarında Apoptozun TUNEL işaretlemesi ile değerlendirmesi.....	89
Resim 6.9. Tekli HT uygulamalarında Apoptozun kaspaz 3 ile değerlendirilmesi.....	91
Resim 6.10. Tekli HT uygulamalarında Apoptozun kaspaz 8 ile değerlendirilmesi....	94
Resim 6.11. Tekli HT uygulamalarında Apoptozun kaspaz 9 ile değerlendirilmesi... 97	
Resim 6.12. İkili HT uygulamaları için canlılık boyaması.	100
Resim 6.13. İkili HT uygulamaları için hareketliliğin faz kontrast görüntüleri.....	103
Resim 6.14. İkili HT uygulamalarında Diff Quick ile morfoloji değerlendirilmesi... 106	
Resim 6.15. İkili HT uygulamalarında Oksidatif stresin eNOS ile değerlendirilmesi.	109
Resim 6.16. İkili HT uygulamalarında Oksidatif stresin iNOS ile değerlendirilmesi.112	
Resim 6.17. İkili HT uygulamalarında Apoptozun TUNEL işaretlemesi ile değerlendirmesi.....	115
Resim 6.18. İkili HT uygulamalarında Apoptozun kaspaz 3 ile değerlendirilmesi. .. 118	
Resim 6.19. İkili HT uygulamalarında Apoptozun kaspaz 8 ile değerlendirilmesi. .. 121	

Resim 6.20. Üçlü HT uygulamalarında Apoptozun kaspaz 9 ile değerlendirmesi. .	124
Resim 6.21. Üçlü HT uygulamaları için canlılık boyaması.	127
Resim 6.22. Üçlü HT uygulamaları için hareketliliğin faz kontrast görüntüleri.....	129
Resim 6.23 Üçlü HT uygulamalarında Diff Quick ile morfoloji değerlendirmesi. .	131
Resim 6.24. Üçlü HT uygulamalarında Oksidatif stresin eNOS ile değerlendirmesi.	133
Resim 6.25. Üçlü HT uygulamalarında Oksidatif stresin iNOS ile değerlendirmesi.	135
Resim 6.26. Üçlü HT uygulamalarında Apoptozun TUNEL işaretlemesi ile değerlendirmesi.	137
Resim 6.27. Üçlü HT uygulamalarında Apoptozun kaspaz 3 ile değerlendirmesi. .	139
Resim 6.28. Üçlü HT uygulamalarında Apoptozun kaspaz 8 ile değerlendirmesi. .	141
Resim 6.29. Üçlü HT uygulamalarında Apoptozun kaspaz 9 ile değerlendirmesi. .	143
Resim 6.30. Dörtlü HT uygulamaları için canlılık boyaması.	146
Resim 6.31. Dörtlü HT uygulamaları için hareketliliğin faz kontrast görüntüleri...	149
Resim 6.32. Dörtlü HT uygulamalarında Diff Quick ile morfoloji değerlendirmesi.	152
Resim 6.33. Dörtlü HT uygulamalarında Oksidatif stresin eNOS ile değerlendirmesi.	155
Resim 6.34. Dörtlü HT uygulamalarında Oksidatif stresin iNOS ile değerlendirmesi.	158
Resim 6.35. Dörtlü HT uygulamalarında Apoptozun TUNEL işaretlemesi ile değerlendirmesi.	161
Resim 6.36. Dörtlü HT uygulamalarında Apoptozun kaspaz 3 ile değerlendirmesi.	164
Resim 6.37. Dörtlü HT uygulamalarında Apoptozun kaspaz 8 ile değerlendirmesi.	167
Resim 6.38. Dörtlü HT uygulamalarında Apoptozun kaspaz 9 ile değerlendirmesi.	170

Başlığı: Yüksek Glikozlu Besiyeri ile Deneysel Diyabetik Modelde Hasara Uğramış Spermlere Kök Hücre ve Niş ile Desteklenmiş Trombosit Zengin Plazma (PRP) ve Stromal Vasküler Fraksiyon (SVF) Etkisi

Öğrencinin Adı: Rabia DURUşMA

Danışmanı: Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ

Anabilim Dalı: Histoloji- Embriyoloji

1. ÖZET

Amaç: Bu çalışmada sağlıklı hayvanlardan alınan spermlerde kültür ortamında yüksek glikozlu besiyeri kullanılarak diyabetik hasar [DH] oluşturuldu. Spermlere mezenkimal kök hücre [MKH], 48 saatlik salgıladıkları faktörler olan koşullu besiyeri [KB] yani Niş ve Trombosit Zengin Plazma [PRP] ile desteklenmiş Stromal Vasküler Fraksiyon (SVF) uygulamaları yapılarak deneysel diyabetik modelde sperm hasarının azaltılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: 12 haftalık Wistar Albino cinsi 15 adet erkek sıçandan elde edilen spermlerkltr ortamında 6 gözlü flasklara alınarak 15 farklı grup olacak şekilde belirlendi. Kontrol (KG), Sham (SG), DG, DG+ MKH, DG + KBY, DG+MKH+ KBY, DG+ PRP, DG+ SVF, DG+ MKH+PRP, DG+ MKH+ SVF, DG+ KBY+ PRP, DG+ KBY+ SVF, DG+MKH+ KBY+ PRP, DG+MKH + KBY+ SVF ve DG+ MKH+ KBY+ PRP+SVF olarak grupları ayrıldı. Üç saatlik uygulamada morfoloji, canlılık ve hareket değerlendirilmeleri yapılarak yaymaları hazırlananrnekler oksidatif stres için e-NOS ve i-NOS ile apoptoz için TUNEL, CASPAZ 3, CASPAZ 8 ve CASPAZ 9 ile immünohistokimyasal olarak analiz edildi.

Bulgular: DH besiyeri ortamının sperme verdiği hasarda oluşan morfolojik, canlılık ve hareket bozukluklarının artan eNOS ve iNOS ile artan apoptotik belirteçler ile ilişkili olduğu belirlendi. Uygulamaların istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde sperm morfoloji, canlılık vehareketini koruyarak oksidatif stres ve apoptozu azalttığı görüldü. Bireysel uygulamalarda olumlu etki varken MKH+KB+PRP+SVF kombinasyonunun anlamlı bir şekilde daha etkin olduğu saptandı.

Sonuçlar: DH invitro modelin sperm hasarı yapması ve uygulamalar ile bu hasarın önlenebilmesi model olarak diğer tedavi olasılıkları için önemli olabileceğini gösterdi. MKH,PRP, KB ve SVF kombinasyonunun ilk defa kullanıldığı bu çalışma ile hücresel tedavi olarakhcre sayısının artırılması, büyüme faktörlerinin çoğaltılması ve sinyal mekanizmalarının güçlendirilmesi sonucunda oldukça yararlı olabileceği belirlendi. Toplumda yüksek prevalansta görülen ve giderek artan erkek infertilitesine yönelik hücresel tedavi gibi maliyetleri az ve etkinliği çok yeni rejeneratif yöntemin gelişmesine katkı sağlayacak sonuçlarımız ocuk sahibi olmak isteyen ailelere mit olacaktır. Deney hayvanı ve insan çalışmaları ile bulguların doğrulanması ve mekanizmaların aydınlatılması klinikte kullanımlarını sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: İnfertilite, Deneysel diyabet, Kök hücre, PRP, Koşullu besiyeri, SVF

Title: Effect of Platelet Rich Plasma (PRP) and Stromal Vascular Fraction (SVF) Supplemented with Stem Cells and Niches on Sperms Damaged in Experimental Diabetic Model with High Glucose Medium

Student Name: Rabia DURUŞMA

Supervisor: Assoc. Prof. Erdoğan KOCAMAZ

Department: Histology & Embryology

2. ABSTRACT

Aim: Diabetic damage (DD) was created in this work by utilizing a high glucose medium in the culture media of healthy animals sperm. We used mesenchymal stem cells (MSC), conditioned media (CM) Niche, which is the factors they secrete for 48 hours, and Stromal Vascular Fraction (SVF) mixed with Platelet Rich Plasma (PRP) to minimize sperm damage in experimental diabetes. Sperm samples from 15 Wistar Albino rats were collected and divided into 15 groups in 6-well flasks filled with culture medium.

Materials and Methods: The groups were divided into Control (CG), Sham (SG), DD, DD+MSC, DD+CM, DD+MKH+CM, DD+PRP, DD+SVF, DD+MSC+PRP, DD+MSC+SVF, DD+CM+PRP, DD+CM+SVF, DD+MKH+CM+PRP, DD+MSC+CM+SVF, and

DD+MSC+CM+PRP+SVF. Smears of sperms were prepared after analyzing morphology, viability, and movement in three-hour application by phase-contrast microscopy. Smears were used for morphology and immunocytochemistry which e-NOS and i-NOS for oxidative stress, and TUNEL, Caspase 3, 8, and 9 for apoptosis were used. It was observed that morphological, viability, and movement abnormalities produced by diabetic medium damage to sperm were linked to higher levels of eNOS and iNOS, as well as higher levels of apoptotic markers. The applications reversed these markers to lower level while preserving sperm morphology, vitality, and motility. These results were statistically significant. While individual applications showed promise, the combination of MSC+CM+PRP SVF showed much more success.

Results: The high glucose medium as an in vitro model for DD has been proven to induce sperm damage similar to diabetic testis which could be good model for other treatment options. As a consequence of raising the number of MSC, boosting the growth factors, and enhancing the signaling mechanisms by combination of cell therapies used in this study, it was found that the combination of MSC, PRP, CM, and SVF might be highly effective as a cellular therapy.

Conclusions: Our results, which will aid in the creation of a novel low-cost, high-efficiency regenerative treatment, such as cellular therapy for male infertility which has a high prevalence in society and is gradually expanding, will provide hope to families who wish to have a baby. Experimental animal and human investigations will be used to confirm these findings and elucidate the mechanisms, allowing them to be used in the clinic.

Keywords: Infertility, Diabetes, Stem cell, PRP, Conditional medium, SVF

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Açıklanamayan erkek infertilitesinin %30-40'ını anormal sperm parametreleri olan erkekler oluşturur. Spermatogenik defektlerin nedenleri infertil bireylerde multifaktöryeldir. Ancak erkek infertilitesi hala tam olarak çözüme kavuşmamış bir sorun olup yenilikçi tedavilerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Son yapılan çalışmalarda, diyabetin erkek infertilitesine neden olan faktörlerden biri olduğu gösterilmiştir (Hamada ve ark. 2012).

Hücrel tedaviler ve kök hücrenin üreme sağlığında tedavi edici etkisi önemli bulunmaktadır. Önemli bir kaynak olarak yağ kaynaklı mezenkimal kök hücrenin (YKMKH) giderek artan bir şekilde etkin bir kullanımı başlamıştır. Mezenkimal kök hücreler [MKH] farklı hücre tiplerine dönüşüm kapasitelerinin yanı sıra, ürettikleri birden fazla büyüme faktörü ve sitokinlerle immün baskılayıcı ve trofik etki potansiyeline sahip hücrelerdir. Rejeneratif tıp araştırmalarında, MKH'lerin sistemik olarak vücuda verildikten sonra hedef bölgeye eğilimi olduğundan ve in vivo düzenleyici parakrin etkisi nedeniyle önerilmektedir (Tekeli 2016). Kültür ortamında bu hücrelerin 24 saatlik besiyerine salgıladıkları faktörler özellikle büyüme faktörleri ayrıca katkı sağlayan bir ortam olmakta ve Koşullu besiyeri [Niş] olarak isimlendirilmektedir.

Trombositten zengin plasma [PRP], yakın zamanda dikkat çeken ve tedavide yardımcı madde olarak kullanılan, büyüme faktörü açısından zengin bir biyolojik üründür. PRP alınan kandan santrifüj sonrası üstte kalan sarı jelatinöz kıvamlı kısım olup kolayca elde edilir. Kök hücre çoğalmasını ve doku iyileşmesini destekleyerek etkili olduğunu gösteren kanıtlar vardır. PRP trombositlerin alfa granüllerinde yer alan zengin büyüme faktörleri nedeniyle, antioksidan ve anti-apoptotik aktivite yoluyla etkili olduğu düşünülmektedir.

Stromal vasküler fraksiyon [SVF] kasık bölgesinden kolaylıkla elde edilen yağ dokusunun santrifüj edilmesi sonrası orta çaplı yağ hücreleri ile birçok öncül hücreyi de içeren önemli bir üründür. Hücrel tedavi yaklaşımı için umut vaat eden yetişkin kök hücre ve progenitor kaynağı olarak [SVF], hücre kültürü sırasında mikrobiyal

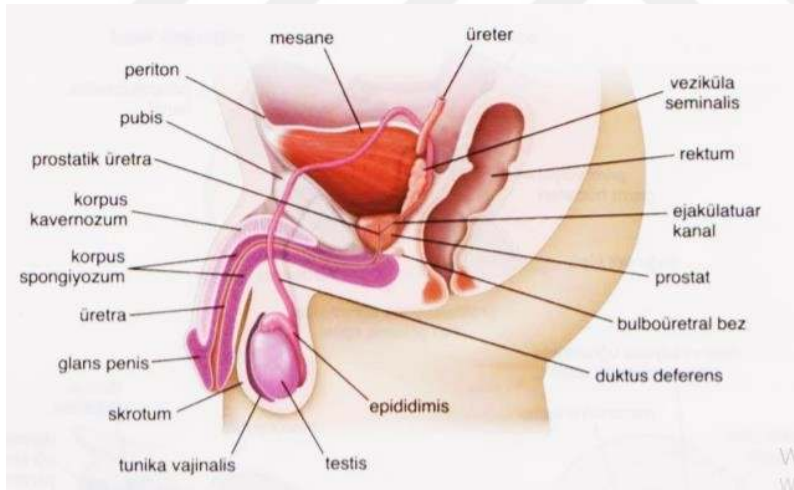
kontaminasyon, ksenojenik besin kaynakları ve benzeri gibi potansiyel riskleri önleyebilecek yetenektedir. Testiste hasara karşı etkili olduğu düşünülmüştür.

Diyabet ile ilişkili infertilite sürecinde iyileşme problemleri ve sperm anomalileri tıbbın önemli bir problemidir ve bununla ilgili çalışmalar günümüzde sürmektedir. İnsan deneylerinin etik sorunları ve getireceği zararlar nedeniyle bilimsel çalışmanın kültür ortamında taklit edilmesi bilinen bir yöntemdir. Çalışmamızda, sağlıklı hayvanlardan alınan spermier kültürde yüksek glikoz ortamında diyabetik hasar oluşturulmuştur. Spermier kültür ortamında mezenkimal kök hücre ve koşullu besiyeri ile desteklenmiş Trombosit Zengin Plazma [PRP] ve Stromal Vasküler Fraksiyon [SVF] uygulamaları yaparak, deneysel diyabetik modelde uğrattığı hasarı azaltmayı ve teorik hesaplamalarla deneysel sonuçları desteklemesi amaçlanmıştır. Ratlar üzerinde elde edilen deneysel ve teorik sonuçların olumlu çıkması durumunda infertil vakalarda uygulanması hedeflenmektedir.

4. GENEL BİLGİLER

4. 1 Erkek Üreme Sisteminin Genel Yapısı

Esas amacı sperm ve hormon üretimi olan erkek üreme sistemi, testis, epididimis, vas deferens kanalı, seminal vezikül, prostat, bulboüretral aksesuar bezlerinden ve penisten oluşmaktadır. Testisin seminifer tübüllerinde, sperm [spermatozoa] hücrelerini oluşturmak için devamlı bölünebilen spermatogenetik kök hücreler yer alır. Primer erkek cinsiyet hormonu olan testesteron ve folikül stimüle edici hormon [FSH] gibi bazı hormonların kontrolü altında spermier epididimiste olgunlaşmaya başlarlar ve aynı zamanda burada depolanırlar. Ejakülasyon sırasında epididimiste depolanan spermier vas [duktus] deferens yoluyla ejakülatör kanaldan geçerek prostat bezine bağlanır ve olgun spermier penil üretraya ulaştırır. Spermierinoosite ulaşana kadar yaşaması için ihtiyaç duyduğu salgıları aksesuar bezler üretirler (Eroschenko 2008; Kierszenbaum 2006; McLaughlin, Stamford, and White 2006).



Şekil 4.1. Erkek üreme sisteminin anatomik görünümü (Ross ve Pawlina 2011)

4.1.1 Testis Anatomisi

Testisler, skrotal septumla birbirinden ayrılan elips şeklinde, skrotum ile abdominal duvar arasında yer alan funiculus spermaticus ile asılı olarak yerleşmiş olan bir çift organdır. Her bir çiftin ortalama ağırlıkları yetişkinlerde 10-15 gram kadar olup 2.5-3 cm. genişliğinde, 3.5-5 cm. uzunluğunda ve 3 cm. derinliğindedir. Erkek genital sistemi, bir seri kanal ve tübül yapısından oluşur. Testis, epididimis, vas deferens, ejakülar kanal gibi ana yapılar yan hatlarda, üretra ve peniste orta hatta konumlandır. Abdomen, pelvis ve perin yapıları testislerin gelişimine öncülük eder ve 3. ve 5. lumbal omurların sağında ve solunda posterior abdominal duvarda gelişimine başlar. Doğumdan önce 7. ayda kanalis inguinalis yoluyla skrotuma inisi tamamlanır. Skrotum, testis, epididimis ve funikulus spermaticus ile vas deferensin bir kısmını da içeren deri yapısı kıvrımlı olan torbadır (Cosgun and Aras 1998; Drake 2008; Gökmen 2003; Snell 2000).

Testis dıştan içe doğru, skrotum, Tunica dartos, Fascia spermatica externa, Fascia cremasterica, Fascia spermatica interna, Tunica vaginalis, Lamina parietalis, Lamina visceralis, Tunica albuginea ve Tunica vasculosa ile sarılmıştır (Arıncı ve Elhan 2020). Testisin, facies medialis ve facies lateralis olmak üzere iki tarafı, extremitas superior ve extremitas inferior olmak üzere iki ucu, margo anterior ve margo posterior olmak üzere iki kenarı bulunmaktadır. Margo posteriorda; korpus epididimis, damar, sinir ve kanalların yer aldığı mediastinum testis bulunmaktadır. Extremitas superior kaput epididimise yerleşmiş olan kısımdır ve extremitas inferior ise kauda epididimis ile sarılmış halde bulunmaktadır (Gökmen 2003). Margo anterior, extremitas superior ve inferior uçları ve iki tarafı visseral peritonla sarılıyken, margo posteriorda sadece lateral kısımlar visseral peritonla sarılıdır. Periton bulunmayan kısmında epididimis yer alırken, üst kısmında ise appendix testis bulunur. Küçük yassılaştırmış bu yapı, parametonefrik kanalın kalıntısıdır ve diğer mezonefroza ait ikinci embriyonel kalıntı ise appendix epididimistir (Sancak and Cumhur 2008; Sargon 2012). Testislerin karın içindeki bağlantılarını ileten funiculus spermaticusun fonksiyonu skrotum içerisinde oblik olarak yerleşmiş testislerin asılı kalmasını sağlamaktır. Funiculus spermaticus; vas deferens, A. ductus deferentes, plexus ductus deferentes, A. testicularis, plexus testicularis, plexus pampiniformis, ramus genitalis nervus genitofemoralis, lenf

damarları ve fascialar, dışta kas lifleri olan fascia spermatica externa, fascia spermatica interna ve cremaster tabakalarından oluşmaktadır ve bu yapılar gevşek bağ dokusu ile birbirine bağlanmıştır (Sargon 2012). Gelişimin ileri döneminde kanalis ingualis fibröz bir yapı haline gelerek gubernakulum testisi oluşturur. İnferiorda testis skrotuma, gubernaculumun bir kalıntısı olan skrotal ligament ile sabitlenir. Testislerin skrotuma inişi 7. ayda gerçekleşmektedir. Bu sürece, arka kenarın lateral kısmını saran peritonun parmaksı çıkıntısı olan processus vajinalis öncülük eder. Processus vajinalis iniş esnasında, fascia spermatica externa, fascia crematerica, m. cremaster ve fascia spermatica interna'yı da beraberinde götürür. Bu yapı, doğumdan bir süre sonra tamamen kapanarak, processus vajinalisin'in kalıntısı olarak tunica vaginalisi oluşturur. Tunica vaginalis; lamina parietalis ve lamina visceralis denilen iki yaprakтан oluşur ve yaprakların arasında az miktarda seröz sıvı barındıran boşluk bulunur (Sargon 2012; Swartz 2009).

Önden ve iki taraftan saran lamina visseralis iç yaprağı, testis ve epididimisin üzerini sarar. Arka ve lateral kısımdan çevreleyen lamina pariyetalis dış yaprağı ise skrotumun iç yüzünü örter. Mezotelle kaplı olan lamina parietalisin iç yüzü düzdür. Testisi saran diğer iki iç katman, tunica albuginea ve vasculosadır. Arka kenarı hariç dıştan lamina visseralis tarafından örtülü olan tunica albuginea kollajenden zengin kalın fibröz bir tabakadır. Tunica albugineanın iç yüzünde bulunan, tunica vasculosa gevşek bağ dokusu yapısındaki damar ağıdır. Tunica albuginea, arka kenardan testisin içine doğru kalın bölme olacak şekilde uzantı göndererek mediastinum testisi oluşturur. Bu yapı, testisin üst ucundan alt ucuna kadar uzanarak testis parankimasını piramit şeklinde lobüllere ayırmaktadır. Her bir lobül içerisinde kıvrımlı kanallar (tubuli seminiferi conterti) ve düz kanallar (tubuli seminiferi recti) içerir ve bu kanal sistemi rete testis adı verilen bir ağısı yapı oluşturur. Üretilen spermier rete testis ve ductuli efferentesten geçerek epididimise ulaşır (Barbara Young 2006; Arıncı ve Elhan 2020; Moore ve ark. 2013; Sancak ve Cumhuri 2008; Yıldırım 2013).

Arterial destek iki testis içinde, öncelikle kan akımının 2/3'sini sağlayan abdominal aorta'nın dalı olan testiküler arterlerden, renal arterlerin inferiorundan, renal abdominal aortun lateral yüzünden sağlanır. Retroperitoneal alanda ureterler üzerinde çapraz giriş yaparak, inguinal kanaldan skrotuma ulaşarak testis yüzeyinde dallanma

gösterirler. Testiküler arter dallarından biri vas deferensin arteriyle anastozom yapar (Tunalı ve Başar 2012; Yıldırım 2013). Testislerin kanlanmasına katkı sağlayan diğer arterler, deferansiyel arter ve kremasterik arterdir. Özellikle deferensiyel arter, testis kanlanmasını katkı sağlarken, bunun yanı sıra epididimisin beslenmesinde de ana rol oynamaktadır. Diğer testiküler arter olan kremasterik arter, internal spermatic ve deferensiyel arterlerle mediastinumda anastomoz yapar. Testisin yaklaşık altıda birlik kanlanmasını sağlayan bu arterin ana fonksiyonu tunica vaginalis'i beslemesidir (Gürbüz 2004; Orhan ve ark. 2004). Testislerde, mediastinumdan çıkan küçük venler sayesinde venöz drenajı gerçekleşir. Mediastinum testisten sonra venler, 8-12 damar ağından oluşan pampiniform venöz plexusu olarak devam eder. Funiculus spermaticus'da testiküler arteri çevreleyen bu damar ağı, inguinal kanaldan geçerek abdomene ulaşır. Bu venler, testis ve epididimis venleriyle birleşerek, testiküler arterin her iki yanında önce bir çift testiküler veni oluştururlar. Bir çift venlerde daha sonra birleşerek tek bir testiküler venin oluşmasını sağlar. Testis venleri, sağ tarafta vena cava inferior'a, sol tarafta ise sol renal vene açılmaktadır (Sargon 2012; Tunalı ve Başar 2012). Testislerin lenfatik drenajı, tunica vaginalis'in alt kısmından başlayan yüzeysel damar ağı ile epididimis ve testisin içindeki derin damar ağıyla sağlanmaktadır. Testiküler arterler beraber yol alarak lenfatik nodüllere açılırlar (Gökmen 2003). Testisleri inerve eden sempatik sinir lifleri medulla spinalisin T10-T11 segmentlerinden gelir. Bu sinirler plexus renalis ve plexus aorticus abdominalis adı verilen otonomik plexuslar içerisinde testislere ulaşılırlar. Genitofemoral sinirin dalları, tunika vajinalis ve skrotumun duyarlılığını sağlamaktadır (Sargon 2012; Tunalı ve Başar 2012).

4.1.2 Testis Embriyolojisi

Gametlerin öncüleri olan primordiyal germ hücreleri (PGC), epiblastan köken alıp, primitif çizgi boyunca yol alarak 3.haftada vitellus kesesinin allontoise yakın duvarındaki hücrelerinin arasına yerleşirler. 4.haftada çoğalan bu hücreler ameboid hareketler ile son bağırsağın mezenterinden dorsal eksen boyunca ilerler. PGC hücreleri, 5. haftada mezonefrozun medialinde mezotel ve altındaki mezenşimin çoğalması ile bir kalınlaşma halinde gelişen gonadal kabartıya ulaşır. PGC'nin ulaşmasından hemen önce ve ulaşma zamanında gonadal kabartının epiteli altındaki mezenşim aralarına doğru çoğalarak, primitif cinsiyet kordonları olarak adlandırılan

düzensiz şekilli kordonları oluştururlar. PGC'lerinin göçü Stella, Fragilis genleri ve BMP-4 tarafından düzenlenmektedir. Primitif cinsiyet kordonları hem erkek hemde dişi embriyolarda yüzey epiteline bağlıdır. 7. haftaya kadar olan bu dönemde erkek veya dişi gonadların birbirinden ayırt edilmesi mümkün değildir ve bu evre farklanmamış gonad evresi olarak adlandırılır. Gonadlar özetle, embriyonik mezoderm, primordiyal germ hücreleri ve mezonefrozun medial kısmındaki mezotel hücrelerinden gelişir. Gonadlar özetle, üç kaynaktan köken alarak gelişirler. Bu kaynaklar; embriyonik mezoderm, primordiyal germ hücreleri ve mezonefrozun medial kısmındaki mezotel hücrelerinden gelişir. Farklanmamış gonadlar dışta korteks içte medulla olmak üzere iki şekilde gelişir (Rehman J ve ark., 1997).

Gonadların gelişimi için gereken en erken genlerden biri olan WT-1, ara mezoderm boyunca eksprese edilen ve erken böbrek oluşumunda önemlidir. Erken süreçte farklanmamış gonadda steroidojenik faktör-1 [SF-1] ekspre edilir. Lim1 gonadal gelişimin ilk evresinde yer alan diğer büyük gendir ve ekspresyonunun olmaması sonucu gonadlar oluşmaz. Fertilizasyonla embriyonun genotipi (46, XX veya 46, XY) belirlenir. 1-6. haftalarda, embriyo cinsel olarak farklılaşmamış evrededir ve bu erkek ya da dişi embriyoların fenotipik olarak ayırt edilemez olduğu anlamına gelir. 7. hafta boyunca, embriyo farklılaşmaya başlar. 12. haftada dış genital organların kadın veya erkek özellikleri tanınabilir ve 20. haftaya kadar fenotipik farklılaşma tamamlanır. Farklanmamış gonadlar, dışta korteks içte medulla bölümlerinden oluşur. Testis gelişiminde medulla kısmı gelişip farklılanırken, korteks kısmı ise gerileyerek dejenerasyona uğrar. Gonadal farklılaşmanın altında yatan prensip ise, Y kromozomu üzerindeki SRY geninin etkisi altında gerçekleşir. Bu genin ifadesi yokluğunda, gonadlar ovaryuma dönüşür. Kromozom Yp11.3'teki SRY geni, Y kromozomunun cinsiyet belirleme bölgesini kodlar ve testis belirleme faktörü (TDF) olarak da adlandırılır (Carlsoln Bruce M. 2014). TDF, yüksek oranda korunmuş bir DNA bağlayıcı bölge içeren 220 aminoasitlik histonik olmayan bir proteindir. Cinsiyeti belirleyen genler, germ hücreleri üzerinde değil, testisin somatik kısmı üzerinde etkilidir. SRY, farklılaşmamış stromal hücrelerin Sertoli hücrelerine farklılaşmasını sağlayan SOX-9 ekspresyonunu uyarır. SOX-9 geni ise, SOX-9 aktivitesini güçlendiren FGF-9 aktivitesini uyarır (Carlsoln Bruce M. 2014; Dudek 2014; Moore. ve ark. 2013). Testisin farklılaşmasında zamanlama önemli olup testis ovaryumdan daha hızlı gelişir. Sertoli hücrelerinin öncüleri testis farklılaşması için

belirli bir süre genetik sinyalleri (Sox-9) alacak şekilde hazır olmalıdır. Eğer bu durum oluşmazsa, PGC'ler mayoz bölünmeye girerek ovaryuma dönüşür. SRY geni X kromozomları üzerinde bulunan dişi belirleyici genleri DAX1 ve WNT4'ü inhibe ettiği için testislerin oluşumunu sağlar (Carson Bruce M. 2014; Gartner, Hiatt, J.L., and Strum 2010).

Testisin erken farklılaşması, mezonefrozlardan gelen WT-1 sinyaline bağlıdır. Mezonefroz yokluğunda testis kordonları zayıf bir şekilde farklılaşır. Altıncı haftanın başında, SOX-9'un etkisiyle, bir dizi primitif seks kordonu genital kabartıda şekillenir ve PGC'ler primitif seks kordonlarına göç ederler. Altıncı haftanın sonunda primitif seks kordonları genişler ve farklılaştıkça, yüzey epitelinden tunika albuginea adı verilen yoğun bir bağ dokusu tabakası ile ayrılırlar. Seks kordonlarının dış kısımları seminifer tübülleri, iç kısımlar ağısı yapıdaki rete testisi oluşturur ve mezonefrik tübüllerden gelişen duktuli efferenteslere katılır (Carson Bruce M. 2014). Gelişimin ilk ikinci ayında, Leydig hücreleri embriyonik testiste ayırt edilemez. Genital kabarıklıklardan kaynaklanan lokal steroidojenik hücelere ek olarak, Leydig hücre öncülleri mezonefrozlardan testise geçebilir. Sekizinci hafta boyunca tanınabilir hale gelirler ve androjenik (testosteron ve androstenedion) hormonları sentezlemeye başlar. Erkek genital kanal sisteminin ve dış genital organların farklılaşması fetal testisin salgıladığı seks hormonlarına bağlıdır. Fetal Leydig hücrelerinin salgıladığı testosteron ve androstenedion hormonlar sadece 9 ile 14 haftalar arasında genital kanalların farklılaştığı dönemde salgılanır. 17. ve 18. haftalardan sonra, fetal Leydig hücreleri yavaş yavaş geriler ve spermatogenezin başladığı döneme yani puberteye kadar ortaya çıkmazlar.

8-12'nci haftada en yüksek değere ulaşan koryonik gonadotropin hormonu [hCG] testosteron üretimini stimüle eder (Kopera ve ark. 2010). 8 haftada, embriyonik Sertoli hücreleri de dişi genital kanallarının oluşumunu baskılayan müllerian inhibe edici madde [MIS] ya da diğer bir adıyla anti-müllerian hormonu [AMH] üretir. Erkeklerde cinsel farklılaşmada sertoli hücrelerinin birden fazla görevi mevcuttur. Bunlar; mezenkimal hücrelerin [endotel hücreleri] mezonefrozdaki testise göçünü indüklemesi, erkek germ hücrelerinin mayoz bölünmesini engelleyen ve bunun yanında leydig hücrelerinin farklılaşmasını indükleyen sinyallerin üretimi ve müllerian inhibe edici madde [MIS] ve androjen bağlayıcı faktör üretimi sayılabilir. Geç embriyonik ve fetal

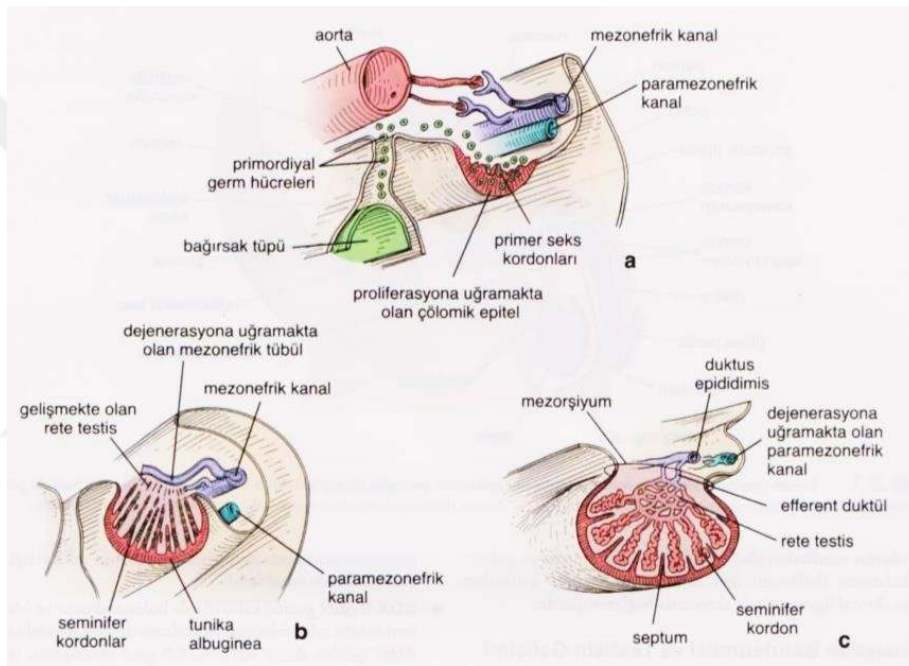
dönemlerde ve doğumdan sonra, PGC'ler mitoz ile yavaşça bölünür, ancak fetal Sertoli hücreleri androjenlere karşı duyarsızdır ve olgunlaşmazlar. Sertoli hücrelerinin mayozu önleyici bir faktör salgıladığı düşünülmektedir. Erkekte genital kanal sisteminin gelişimi, MIS etkisi altında 8. haftada Sertoli hücreleri tarafından salgılanan TGF β ekspresyonuyla kranial ve kaudal uçları hariç paramezonefrik [Müller] kanallar dejenere olur. MIS, paramezonefrik kanalların epiteli yerine çevredeki mezenkimi etkiler. Bu mezenkimal hücreler, MIS'e bağlanan serin-treonin kinaz membran reseptörünü kodlayan geni ifade eder. Çevredeki mezenkimal hücreler, müllerian kanalının epitel hücrelerinin apoptozla ve epitel hücrelerinin mezenkime dönüşümü yoluyla gerilemesini sağlar (Carslon Bruce M. 2014).

Dördüncü ayda, testis kordonları atnalı biçiminde kıvrıntılar yapar. İki uçları birleşerek ince bir kanal olan tubuli rekti'yi oluşturur (Cosgun and Aras 1998; Kierszenbaum 2006). Testis kordonları puberteye kadar solid haldedir ve pubertede lümenleri açılarak seminifer tübüllere dönüşürler. Seminifer tübüller kanalize olur ve rete testis tübülleriyle birleşerek duktuli deferenteslere girerler (Dudek 2014). Sertoli hücreleri, testisin yüzey epitelinden gelişirken diğer spermatogenik hücreler ise PCG farklılaşmaktadır (Kopera ve ark. 2010).

Sertoli hücrelerinden gelen iki sinyal, desert hedgehog ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü, testosteron salgılayan fetal Leydig hücrelerinin farklılaşmasını uyarır. Testosteronun etkisi altında, mezonefrik böbrekler dejenere olmasına rağmen mezonefrik kanallar gelişmeye devam eder. Mezonefrik kanallar, testisten üretraya sperm taşıyan vas deferens'e ayrılır bu kanalların proksimal ucu kıvrımlı bir şekil alarak duktus epididimisi oluşturur (Carslon Bruce M. 2014; Sadler 2019).

Dejenere olan mezonefrik tübüllerin bazı bölümleri testis yakınında paradidim olarak kalabilir. Hox genleri, özellikle Hoxa-10, kaudal epididimden vas deferensin üretraya ulaştığı noktaya kadar mezonefrik kanal boyunca eksprese edilir. Embriyoda, ürogenital sinüsün çevresindeki dokular, testosteronu dihidrotestosterona dönüştüren bir enzim olan 5 α -redüktazı sentezlerler Böylelikle, testosteronun her iki formu da uygun reseptörlerin etkisiyle erkek üreme sisteminin dokularını koruyup büyümesini sağlar (Carslon 2014). Bu kanalların kaudal uçlarından seminal bezler gelişir. Seminal

bezlere ait kanallar ve üretra arasındaki mezonefrik kanaldan ise duktus ejakulator gelişir. Üretranın prostatik parçasından oluşan endodermal çıkıntıların mezenşim içine doğru gelişmesiyle prostatın glandüler bezleri, üretranın spongios parçasından bülboüretal bezler oluşmaktadır (Moore ve ark. 2013). Kloakal zar etrafında mezoderm proliferasyonu, üstteki ektodermin yükselmesine sebep olarak fallus, ürogenital kıvrımlar ve labiyosrotal şişlikler olmak üzere üç yapıyı oluşturur. Fallustan glans penis, corpora cavernosa penis ve corpus spongiosum penis oluşur. Ürogenital kıvrımlar penisin ventral yönünü ve labiyokrostral şişliklerden de skrotum oluşur (Dudek 2014).



Şekil 4.2. Testisin Gelişim Evresi (Ross ve Pawlina 2011)

4.1.2.1 Testis İnişi

Gelişmekte olan skrotum ile testisin inferiyör kutbu arasında gubernakulum oluşur. Abdominal duvardan oblik olarak geçer ve testisleri gelecekteki skrotal kese olan genital şişkinliğe bağlar. Gebeliğin 3. ve 7. ayları arasında testis inguinal kanalın yakınında konumlanır. 9. ayda veya doğumdan hemen sonra, testisler inguinal kanaldan geçerek skrotal keseye ulaşır. Gubernakulum testosteron hormonuna duyarlıdır ve bu hormonun etkisiyle kısalarak her bir testis skrotuma çekilir. Bu iniş

sırasında testisler, duktus deferens kanalıyla birlikte kan damarlarını, lenf damarlarını ve sinirleri de beraberlerinde sürükler (Dudek 2014; Ross ve Pawlina 2011).

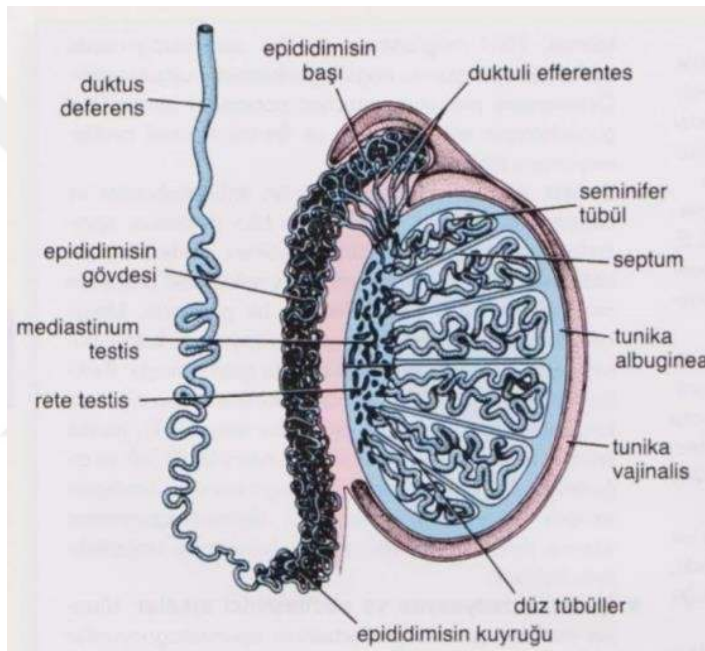
4.1.3 Testis Histolojisi

Testisler abdominal kavitenin dışında yer alan, skrotuma gubernakulumun kalıntıları olan skrotal ligamentlerle bağlanan bir çift oval şekilli endokrin ve ekzokrin salgılama organlardır. Spermatogenez, vücut sıcaklığının 2°C ila 3°C altındaki bir sıcaklıkta (34°C ile 35°C) gerçekleştiği için vücut boşluğunda yer alırlar. Hem testisler hem de epididimis sermatik kord tarafından asılır. Spermatik kord içerisinde vas deferens, spermatik arter, venöz ve lenfatik pleksuslar yer alır (Ross and Pawlina 2011). Sıcaklığının düşürülmesinde iki faktör etkilidir. Bunlar, skrotamal yüzeyden terin buharlaşması ve testisleri besleyen kan damarlarının özel düzenlenmesiyle gerçekleşir. Testislerde ters akım ısı değişim sistemi mevcuttur. Testislerden çıkan pampiniform pleksusundan dönen kan, skrotumdan testislere inen arterlerden daha serindir. Böylece, arteriyel kan, testislere girmeden önce venöz kan tarafından soğutulması sağlanarak sıcaklık korunmuş olur (Eroschenko 2008). Spermatik kordonda kremaster kaslarının kasılması sonucunda testislerin yüksek sıcaklıkta kalabileceği inguinal kanala çekilmesiyle sıcaklık ayarı sağlanır (Kierszenbaum 2006).

Testisler, tunika albuginea denilen fibroelastik bağ dokusundan oluşan bir kapsül ile çevrilidir. Bu bağ dokusu testislere beyaz bir görünüm sağlar. Tunika albuginea dıştan mezotelle örtülü tunika vaginalisle sarıdır. En iç kısmında kan damarları içeren gevşek bağ dokusundan tunika vasküloza yer alır Tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Buradan ince bir bağdokusu bezin içine uzanarak fibröz septumlarla bezi yaklaşık 250-300 adet primidal lobüle ayırır. Her bir lobüllün içinde 1-4 adet seminifer tübül yer almaktadır. Kan damarları, lenf damarları ve genital boşaltım kanalları testise giriş ve çıkışta mediastinumun içinden geçer (Ross and Pawlina 2011).

Seminifer tübülleri saran ve destekleyen ara gevşek bağ dokusu içerisinde, kanve lenf damarları, sinirler ve epitelioid hücre kümeleri olan olan Leydig (interstisyel) hücreleri bulunur. Bu hücreler testosteronu üretimini sağlayan steroid hücrelerdir. Her

seminifer tübülün germinal epitel, çoğalan spermatogenetik germ hücreleri ve  o almayan destekleyici Sertoli (sustenkular) hücreleriyle d  elidir. Seminifer tübüllerde spermatogenetik hücreler 4-8 tabaka halinde d zenlenmi lerdir ve bölünüp olgunla arak en son spermatozoları üretilir. Kıvrıntılı seminifer tübüller t b li rekti ile testiküler spermli, salgısal proteinleri ve iyonlar gibi seminifer epitelin ürünlerini toplayan a ımsı yapıdaki rete testise ba lanır. Rete testis daha sonra anastomozla arak 12-15 adet duktuli eferentes kanal sistemi ile mediastunuma ba lanır. Spermier en son duktus epididimisin proksimal bölümüne iletilir (Eroschenko 2008; Hassa 2003; Ross and Pawlina 2011).



Şekil 4.3. Testisin Sagital Kesiti (Ross ve Pawlina 2011)

4.1.3.1 Seminifer Tübül Histolojisi

Her seminifer tübül yaklaşık 150  m çapında ve 80 cm uzunluğundadır ve rete testise iki ucu açılan U şeklindeki bir yapıdır. Her testiste yaklaşık 250-1000 kıvrımlı yapıda seminifer tübül bulunmaktadır. Her bir testiste seminifer tübüllerin toplam uzunluğu 280-400 cm. arasındadır. Erişkin bir erkekte spermierin üretim hızı günde yaklaşık 2×10^8 'dir (Mescher 2017; Ovalle and Nahirney 2014). Seminifer tübüller, germinal epitel adı verilen  zelle mi ok tabakalı bir epitele sahiptir. Bu epitel, sperm  reteminden sorumlu olan spermatogenetik germ hücreleri ile destekleyici ve besleyici

Sertoli hücreleri olmak üzere iki farklı hücre tipi içerir. Spermatogenetik seri hücreleri, kök hücre özelliğindeki spermatogonyumlar, primer ve sekonder spermatositleri ve spermatidleri içerir. Germinal epitel, bazal membran ve bazal membranın dışında tunika propriya olarak adlandırılan 3-5 tabakalı bağ dokusundan bir duvar ile çevrilidir. Tunika propriya, peritübüler kontraktıl hücreler olarakta bilinen miyoid hücrelerden, fibroblastlardan, kollajen ve elastik liflerlerden zengin bir yapıdan oluşmaktadır. Aktin filamentleri içermesi yönünden düz kas hücrelerine benzeyen miyoid hücrelerinin görevi, ritmik kasılmalar yaparak hareketsiz spermlerin rete testise geçişini sağlamak ve ayrıca kollajen sentezlemektir (Eroschenko 2008; Kierszenbaum 2006).

4.1.3.2 Spermatogenez

Spermatogonyumların bölünme, farklılaşma ve olgunlaşma gibi aşamalar geçirerek olgun sperm üretmesine spermatogenez denir. Spermatogenez süreci, spermatogonyal evre, spermatosit evresi ve spermatid evresi olmak üzere 3 ayrı evrede incelenmektedir. Pubertede, spermatogenetik germ hücrelerinden sentezlenen BMP8B ve ayrıca testosteron hormonunun kritik değere ulaşmasıyla spermatogenez süreci başlar. Primordial germ hücreleri [PGC] kendilerinden daha küçük olan spermatogonyumları oluşturmak için bölünürler (Gilbert SF. 2000). Spermatogonyumlar, hücre ölümüne [apoptoz] uğrayabilirler ya da kendi kendini yenileyerek başka bir spermatogonyum tipini oluşturabilen kök hücrelerdir. Tip A açık, Tip A koyu ve Tip B olmak üzere üç tip spermatogonyal hücre bulunur ve mitoz bölünme geçiren son hücre tipi ise Tip B spermatogonyumlardır. Bu hücreler spermatositlerin öncüsüdür ve mitoz bölünmeler sonucu primer spermatositleri üretirler. Primer ve sekonder spermatositler, kromozom sayısını ve DNA [Deoksiribonükleik Asit] miktarını azaltmak için mayotik bölünmeye uğrarlar. Primer spermatositler, sekonder spermatositleri oluşturmak için birinci mayoz bölünmeye uğrarlar. Sekonder spermatositlerde ikinci mayoz bölünmeyle, 23 kromozom (22 X veya 22Y) içeren spermatid adı verilen haploid hücreleri üretirler. Spermatidler bölünmeye geçirmezler fakat spermiogenez denilen bir süreçle olgun spermlere dönüşürler. Spermatogenetik hücrelerin farklılaşması ve gelişimi sürecinde hücreler birbirine hücreler arası köprülerle bağlıdır. Bu köprüler, gelişmiş spermatidlerin olgun sperm olarak seminifer tübül lümenine salınacağı zaman ortadan kalkar (Eroschenko 2008; Gilbert SF. 2000).

4.1.3.3 Spermatogonyal Evre

Primordial germ hücrelerden [PGC'ler] köken alan spermatogonyal kök hücreler [SSC] mitoz bölünmelerle iki eş hücreyi üretirler. Bu hücrelerden biri SSC olarak kalırken; diğeri yeni nesil hücreleri üretmek için bir seri mitotik bölünmeler geçirir (Kierszenbaum ve Tres 2013). Folikül uyarıcı hormon [FSH] ile uyarılan Sertoli hücreleri, gliyal hücre hattı kaynaklı nörotropik faktör [GDNF] salgılar. GDNF-GFR α 1-RET kompleksi ve c-kit reseptör-kökhücre ligand kompleksinin parakrin etkisi altında Sertoli hücreleri tarafından SSC'lerin kendi kendini yenilemesi ve farklılaşması düzenlenmektedir. Tip A açık, Tip A koyu ve Tip B olmak üzere farklı morfolojide üç tip spermatogonyum çapında büyük, yuvarlak bir çekirdeğe sahip diploid hücrelerdir. Seminifer tübüllerin bazal membranına bitişik ve iki Sertoli hücresinin oluşturduğu sıkı bağlantılarının altında yer alırlar (Mescher 2017; Ovalle ve Nahirney 2014).

Tip A koyu hücreler, koyu oval çekirdeğe, bazofilik ve ince granüllü kromatine sahiptirler. Mitotik olarak inaktif rezerv hücreler olup hücre döngüsünün G0 fazında dinleme halindedirler. Puberteden itibaren mitotik olarak aktiftirler ve kaynağı korumak için aynı tipteki yani Tip A açık hücreleri veya B tipi spermatogonyumları üretirler. Tip B hücreler, Tip A açık hücrelerden farklı olarak koyu kromatine sahiptirler. B tipi spermatogonyumlar başarılı mitotik bölünmelerle, seminifer tübüllerin üçte birlik orta bölgesinde bulunan ve en büyük germ hücreleri olan primer spermatositleri üretirler (Cosgun ve Aras 1998). Spermatogonyal bölünmeler sırasında sitokinez olayının tam olarak tamamlanmaması sonucunda, her bir hücre yaklaşık 1 μ m çapında sitoplazmik köprüler aracılığıyla birbirleriyle iletişim kurduğu bir sinsityum oluştururlar. Bu sinsityum sayesinde, iyonlar ve moleküller bu hücreler arası köprülerden kolayca geçtiği için eşzamanlı olarak olgunlaşırlar. Kısacası, spermatogenezde senkronize bir hücre döngüsü mevcuttur (Dudek 2014; Gilbert 2000).

4.1.3.4 Spermatosit Evresi

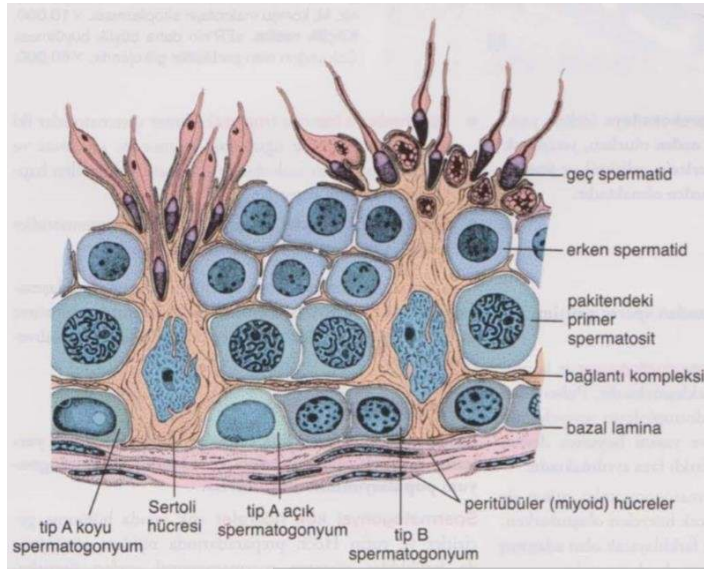
B tipi spermatogonyumlar S fazını yani DNA sentezini tamamlayarak G2 fazına geçerler. Mitoz bölünme gerçekleştirmeyip, birinci mayoz bölünmeyi başlatmak için adluminal bölmeye ilerleyerek mayoz bölünmenin profaz evresine girerler. Primer spermatositler 46 kromozom ($44+XY$) ve 4C DNA içeriğine sahip büyük diploid hücrelerdir. Spermatositler iki başarılı mayotik hücre bölünmesi geçirirler. Seminifer epitelyumun adluminal kompartımanında yer aldığı için mayoz bölünmeler kan testis bariyerinin içinde gerçekleşir. Primer spermatositler sekonder spermatositleri oluşturmak için, birinci mayoz bölünmeye girerek redüksiyon bölünmesi geçirirler. Birinci mayoz bölünmenin sonunda, kromozom sayıları ve DNA miktarları yarıya düşerek ($22+X$) ya da ($22+Y$) olan sekonder spermatositler oluşur. Her bir sekonder spermatosit artık iki adet haploid spermatidleri meydana getirir (Kierszenbaum ve Tres 2013; Mescher 2017). Kromozom sayıları özetle, birinci mayoz bölünmenin sonunda, primer spermatositlerin 4C DNA miktarı sekonder spermatositerde 2C'ye düşer. İkinci mayoz bölünmenin sonunda 2C DNA miktarı 1C'ye düşer. Seminifer epitelyumunda en fazla bulunan hücreler primer spermatositlerdir. Bu durum, birinci mayoz bölünmenin günlerce sürmesinden kaynaklıdır. İkinci mayoz bölünme, birinci mayoz bölünmeye göre çok kısa dakikalar içinde gerçekleştiğinden sekonder spermatositleri kesitlerde gözlemlemek zordur. Profaz evresi leptoten (iki kardeş kromatitten oluşan kromozomlar), zigoten (kromozomların eşleşmesi), pakiten (kromozomların kalınlaşması), diploten (eşleşmiş kromozomların ayrılması), diakinez (birbirinden uzaklaşan kromozomlar) aşamalarından oluşur (Kierszenbaum ve Tres 2013).

Homolog kromozomların eşleşmesini veya sinapsını kolaylaştırmak için zigoten-pakiten sırasında sinaptonemal kompleks adında üçlü bir yapının oluşumu gerçekleşir. Sinaptonemal kompleks oluşumu zigoten evresinde başlar ve pakiten evresinde tamamlanır. Mayoz I profazının en uzun aşaması olan pakiten evresinde paternal ve maternal homolog kromozomların kardeş olmayan kromatidleri arasında crossing over gerçekleşir. Diploten evresinde crossing-over olayı son bulurken, kromozomların arasında tetrad oluşumu gözlenir. Diakinez evresinde sinaptonemal kompleksin dağılır ve mikrotübül ipliği gelişmeye başlar. Profaz evresinin bitmesinin

ardından, metafaz evresinde kromozomların ekvatorial düzlemde sıralandığı görülür. Anafaz evresinde ise kardeş kromatidler rastgele zıt kutuplara çekilerek mayoz bölünme tamamlanır. Spermatidlerde genetik çeşitlilik crossing over olayı ve ayrıca anafazda homolog kromozomların karşılıklı kutuplara rastgele ayrılmaları sonucu oluşmaktadır (Ross ve Pawlina 2011).

4.1.3.5 Spermatid Evresi

Spermatidler, sekonder spermatositlerin bölünmesi sonucu oluşan 1C DNA içeren haploid hücrelerdir. Seminifer tübüllerin yakınında, adluminal bölmede yer alırlarlar. 7-8 um çapında olan spermatidler yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içeren nükleuslara sahiptirler. Bir çift sentriole, mitokondri, serbest ribozom, SER ve iyi gelişmiş bir Golgi kompleksine sahiptirler (Mescher 2017). Yuvarlak (erken) ve uzun (geç) spermatidler olmak üzere iki farklı morfolojide bulunmaktadır. Sertoli hücrelerinin sitoplazmasındaki nişlere yerleşenler yuvarlak spermatidlerdir. Uzun veya geç spermatidler, sertoli hücrelerinin apikal sitoplazmasındaki derin invajinasyonlarıyla oluşan kriptalara gömülüdürler. Sertoli hücrelerinin F-aktin içeren apikal ektoplazmik bölgesi, uzama esnasında spermatid başının üst üçte birinissarar ve kasılma kuvveti oluşturur (Kierszenbaum ve Tres 2013; Ovalle ve Nahirney 2014).



Şekil 4.4. Seminifer Epitel (Ross ve Pawlina 2011)

4.1.3.6 Spermiyogenez

Spermatidler spermiyogenez adı verilen bir süreç ile hareketli spermilere dönüşürler. Spermatidler, akrozom gelişimi, manşet gelişimi, flagella oluşumu ve çekirdeğin uzaması ve kromatinin yoğunlaşması gibi sıralı bir şekilde morfolojik değişime uğrarlar. Bu değişim aşamaları golgi fazı, kep fazı, akrozom ve olgunlaşma fazı olmak üzere 4 evreden oluşmaktadır (Ross ve Pawlina 2011).

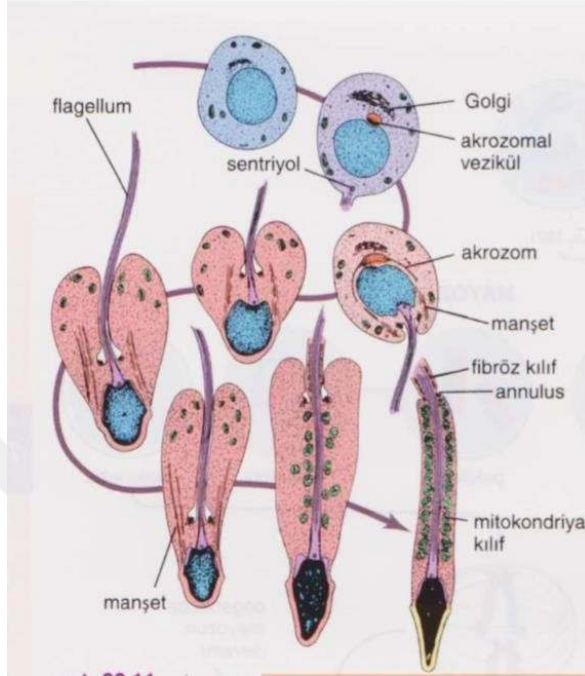
4.1.3.7. Olgun Spermin Yapısı

Spermin baş kısmının yapısı: Son aşama olan spermiyasyon sonucunda oluşan olgun spermin boyutu yaklaşık 60 um uzunluğundadır. Sperm başı 4. 5 um uzunluğunda, 3 um genişliğinde ve 1 um kalınlığındadır. Sivri ve yassı şekilli baş kısmında, oositin korona radiata hücrelerini ve zona pellucida tabakasını geçmesini sağlayan asit fosfataz, nöraminidaz, hiyalüronidaz ve proteaz hidrolitik enzimleri içeren akrozom yer almaktadır. Nükleusun ön üçte ikilik bölümünü saran akrozomdan bu enzimlerin salınması olayına akrozomal reaksiyon adı verilmektedir (Dudek 2014; Ross ve Pawlina 2011).

Spermin flagella yapısı: Boyun, orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere birbirinden farklı dört bölümden oluşmaktadır. Baş ile boyun bölgesindeki flagellanın geri kalanını oluşturan dokuz dış yoğun liflere tutunan bağlantı parçasını ve annulusa kadar uzanır. Annulus spermin orta kısmını ve ana parçaya bağlayan, plazma zarının altında bulunan halka şeklindeki bir yapıdır. Hücre iskelet proteinlerinden septin 4 proteini içeren annulus, spermiyogenez sırasında, proteinleri flagellumun farklı bölmelerine hapsederek difüzyon bariyeri olarak görev almaktadır (Kwitny ve ark. 2010; Ross ve Pawlina 2011).

Orta parça, dokuz periferik ve iki merkezi mikrotübül çiftinden oluşan aksonem yapısından, dokuz dış fibröz kılıftan ve spiral olarak düzenlenmiş bir mitokondriyal kılıfından oluşmaktadır. Mitokondriler flagellanın hareketi için gerekli olan enerjiyi sağlamaktadırlar. Esas parça yaklaşık 40 um uzunluğunda olup, annulustan son parçaya kadar uzanır. Esas parça, mitokondriyon içermeyen, fibröz bir kılıfla çevrili, yedi adet dış yoğun lifler ile aksonem yapısını içermektedir. Son parça flagellumun

yaklaşık son 5 urn'lik kısmı olup sadece aksonem içermektedir ve plazma zarıyla çevrilidir (Dudek 2014; Ross ve Pawlina 2011).



Şekil 4.5. Spermatogenez aşamaları (Ross ve Pawlina 2011)

4.1.3.8 Leydig hücreleri

İntertisyel hücreler olarak da bilinen Leydig hücreleri, seminifer tübüller arasındaki gevşek bağ dokusu yapısındaki interstisyel alanda bulunan büyük, eozinofilik sitoplazmalı, yuvarlak ya da poligonal hücrelerdir. Steroid sentezi yapan hücre karakterine sahip Leydig hücreleri, bir ya da iki çekirdekçik içeren merkezi çekirdeğe, tübüler kristal mitokondriye, iyi gelişmiş bir Golgi kompleksine, bol miktarda granülsüz endoplazmik retikulum ve tipik olarak birçok lipid damlacıklarına sahiptirler. İntertisyel alanda Leydig hücreleri, zengin kılcal damarlar ve lenfatik damarlar ile desteklenmektedir. Bu hücrelerde, ayırt edici olarak lipofuskin pigmenti ve çubuk şekilli fonksiyonları tam olarak bilinmeyen Reinke kristalleri bulunmaktadır. Bu kristallerin hücrenin bir protein ürünü olan inklüzyonlar olduğu düşünülmektedir ve refraktirdirler (Ross ve Pawlina 2011). Reinke kristalleri yaşla beraber daha belirgin hale gelirler. Leydig hücreleri testosteron hormonu üreten endokrin hücrelerdir. Bu

hormonun salgılanması, hipofiz bezinden üretilen Luteinize Edici Hormon [LH] hormonuyla sağlanır. Testesteronun öncül maddesi olan kolestroidür. Plazmadaki kolesterol hücreye girdiğinde, asetil koenzim A ile esterlenerek sitoplazmada lipit damlacıkları olarak saklanır. Yağ asitleri ise de düz endoplazmik retikulumda kolesterole çevirilir. Fazla lipit içeriğinden kaynaklı hücrenin sitoplazması köpüksü bir görünüme sahiptir. Kolesterol, steroidojenik akut düzenleyici protein (StAR) ile lipit damlacıklarından mitokondriye taşınır ve pregnenolon üretilir. Pregnenolon ilk olarak düz endoplazmik retikulumdaki enzimlerle progesterona ve daha sonra da testosterona dönüştürülür (Dudek 2014; Kierszenbaum 2006; Mescher 2017; Ovalle ve Nahirney 2014). Ergenlikten sonra, siklik adenosin monofosfat (cAMP) aracılı bir mekanizmayla LH uyarılıp, dihidrotestosteron 5alfa-redüktaz enzimi tarafından testosterona dönüştürülür. Testosteronun yaklaşık %95'i Leydig hücreleri tarafından sentezlenmektedir ve günde 7 mg kadar testosteron ürettiği tahmin edilmektedir. Sertoli hücreleri tarafından üretilen ABP yüksek testosteron konsantrasyonunu sürdürülmesini sağlar. Testesteronun hücre zarından difüzyonla geçişini artırmak için çok sayıda mikrovillus içerirler (Kierszenbaum 2006; Mescher 2017; Ovalle ve Nahirney 2014).

Fetal Leydig hücreleri, gebeliğin 8 ile 18'inci haftalar arasında aktiftirler ve özellikle 18. haftada hücreler baskın hale gelerek androjenlerin üretimi sağlarlar gonadların normal gelişimi için kritik öneme sahiptir. Androjen seviyeleri puberteye kadar düşük kalırken, puberte dönemine gelindiğinde LH'deki artışla androjen sentezi aktive edilir. LH'nin yanında, diğer bir hormon olan prolaktin LH reseptörünün gen ekspresyonunu düzenleyerek Leydig hücrelerinin işlevini düzenler. Prolaktin hormonunun salınım seviyesi önemlidir. Aşırı prolaktin salınımı androjen üretimini ve spermatogenezi azaltarak infertiliteye ve erektil disfonksiyonuna sebep olabilir. Pubertede, sperm üretimi ve sekonder seks karakterlerinin gelişimi testosteron hormonunu salgılanmasıyla başlar. Yetişkinde ise, spermatogenezin, sekonder seks karakterlerinin ve aksesuar cinsiyet bezlerinin hayat boyu sağlıklı bir şekilde fonksiyonunu sürdürebilmesi için gereklidir (Kierszenbaum 2006; Ross ve Pawlina 2011). Leydig hücrelerinden salınan testosteron özetle, kan-testis bariyerinin devamlılığının sürdürülmesi, mayoz bölünmenin ilerlemesi ve tamamlanması; spermatidlerin Sertoli hücrelerine tutunması ve olgun spermatitlerin lümene salınması

için gereklidir (Kierszenbaum 2006).

4.1.3.9 Sertoli Hücreleri

Sustenraküler hücreler olarak da tanımlanan sertoli hücreleri, seminifer tübülün epitelini oluşturmak için tübül duvarından lümene kadar uzanan tüm çoğalan ve farklılaşan spermatojenik hücrelerle temas halinde olan hücrelerdir. Sertoli hücreleri birçok fonksiyona sahip olan spermatojenik hücreler arasında bulunan destek hücreleridir. Puberteye kadar mitotik olarak dominant hücre tipiye, puberteden sonra postmitotik hale gelerek seminifer tübül epitelindeki hücrelerin yaklaşık %10'unu oluştururlar. Sertoli hücreleri komşu spermatojenik hücreleri çevreleyen ve apikal ve lateral uzantılara sahip, sınırları güçlkle ayırt edilebilen uzun prizmatik hücrelerdir (Kierszenbaum 2006; Ross ve Pawlina 2011). Aktif hücreler olan sertoli hücreleri, oval ya da üçgen sekilli ökromatik nükleusa ve spermatojenik hücrelerden farklı olarak belirgin bir nükleolus sahiptir. Hücrenin tabanında, bazal membranın üzerinde yer alan nükleus 7-9 nm'lik bir filament kılıfı ile sarılarak diğer organellerden ayrılır. Sertoli hücreleri sitoplazmaları yaygın düz endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş granülü endoplazmik retikulum, çok sayıda tübüler tipte mitokondri, yaygın Golgi aygıtına, lipofuksin içeren lizozomlara ve çok sayıda lipid damlacıklarına sahiptir. Ayrıca, değişken sayıda veziküllere, glikojen granüllerine ve mikrotübül, aktin mikrofilament, ara filament ve vimentinden zengin bir hücre iskeleti içermektedir. Bu sayede, spermatojenik hücreler seminifer tübülün çevresinden daha uzak ve lümene yakın bir yere hareket edebilmektedirler. Spermlerin desteklenmesinde ve beslenmesinde görev alan bu hücrelerin lümene bakan kısımlarında spermatidlerin yerleştiği kriptalar bulunmaktadır. Sertoli hücrelerine özgü, nükleusa yakın konumda, fusiform şekilli protein yapıdaki Charcot-Böttcher adı verilen kristalloid inklüzyon cisimcikleri görülmektedir. Bu yapıda, lipoprotein reseptör (CLA-1) proteinlerinin varlığından dolayı lipidlerin kullanımında rol oynadığı düşünülmektedir (Kierszenbaum ve Tres 2013; Ovalle ve Nahirney 2014; Ross ve Pawlina 2011).

4.1.3.10 Spermatogenezin Hormanal Kontrolü

Spermatogenez, negatif feedback mekanizması ile bir dizi endokrin ve parakrin

yolaklar üzerinden etki eden hormonlar tarafından kontrol edilir. Steroidogenik ve spermatogenik aktivite için, hipotalamustaki nöroendokrin hücrelerden salgılanan gonadotropin salgılatıcı hormon [GnRH] portal kan damarları yoluyla adenohipofize ulaşır. GnRH testiküler hormonların üretimi için adenohipofizden spermatogenezin primer düzenleyecileri olarak görev yapan LH ve FSH salınımını başlatır. Adenohipofizden salınan diğer bir hormon ise prolaktin hormonudur. Prolaktin hormonu, LH ile ortaklaşa çalışarak Leydig hücrelerinin steroidogenik aktivitesinin artmasını sağlayan diğer bir hormondur. Sertoli hücreleri tarafından da salgılanan inhibininin hipofiz bezi üzerinde inhibe edici etkisi vardır ve ek FSH üretimini baskılar. Aşırı testosteron seviyeleri LH salınımını inhibe ederken, Sertoli hücreleri tarafından salgılanan inhibin hormonu FSH salınımını inhibe eder.

Spermatogenetik hücreler, çevresel kaynaklı zararlı maddelere ve genetik faktörlere karşı hassastırlar. Spermatogenez sürecini olumsuz etkileyecek birçok faktöre maruz kalınması sonucunda infertilite problemi ortaya çıkmaktadır. Yetersiz beslenme, viral enfeksiyonlar, metabolik hastalıklar, steroid hormonlar, toksik ajanlar ve radyasyon negatif etkili faktörlerdendir. Özellikle, mitotik olarak aktif olan spermatogenetik hücreler, bölünmeyen sertoli hücreleri ve daha az aktif olan leydig hücrelerine kıyasla bu faktörlerden daha fazla etkilenmektedirler (Dudek 2014; Ross ve Pawlina 2011; Widmaier ve ark. 2008).

4.1.3.11 Testis İçi Genital Kanallar

Seminifer tübüllerden salınan sperm ve sıvılar, testisleri üstteki epididimise bağlayan intertestiküler kanallardan geçerek taşınırlar. Mediastinum testis içindeki (duktuli efferentes) boşaltım kanallarını oluşturmaktadır. Her bir seminifer tübül uzun olması nedeniyle kendi üzerine katlanarak halka şekline kıvrımlı bir yapı haline gelir.

Bu halka şeklindeki yapının uçları mediastinum bölgesine yakındır ve burada seminifer tübüller düz tübüllerde sonlanır. Düz tübüller spermatogenik hücreler içermeyen ve sadece sertoli hücrelerinden oluşan basit kübik veya alçak prizmatik epitelle çevrili kısa dar kanallardır (Ross ve Pawlina 2011). Rete testis, basit yassı-kübik ya da alçak prizmatikçe değişen epitelle çevrili bir tübül ağıdır. Sperm, rete

testisten epididimisin baş kısmına ileten yaklaşık 10- 20 kısa tübülden oluşan efferent kanallara (ductuli efferentes) girer. Ductuli efferentes rete testisi epididimin duktus epididimisine bağlanır. Duktuli efferentes yakınında rete testis daha geniştir. Duktuli efferentes düzyapıda olup, epididimisin baş kısmına yaklaştığı noktada kıvrımlı bir yapı haline gelir. Ductuli efferentes epiteli daha kısa kübik hücreler ve daha uzun prizmatik hücreler olmak üzere iki farklı hücre grubundan oluşan yalancı çok katlı prizmatik epitelde döşelidir. Farklı hücre yükseklikleri nedeniyle, duktuli efferentesin lümeni düzensiz bir yapıdadır. Spermilerin epididimise transportunda görevli uzun hücreler silya içerirken, sertoli hücreleri tarafından üretilen testis sıvısının geri emilimi için kübik hücreler mikrovillus içermektedir. Ayrıca epitelde bazal hücreler olan kök hücreler bulunmaktadır. Duktuli efferentesin çeperi, bazal membranın altında yer alanince sirküler bir düz kas tabakasıyla çevrilidir ve kanallarda ilk burada kas tabakası görülmektedir. Sperm transportunu sağlayan silyalı hücreler ile bu tübülleri çevreleyen kas tabakasının kontraksiyonu da bu sürece yardımcı olmaktadır. Bu kas tabakası dağınık halde bulunan elastik liflerle desteklenmiştir. Hücrelerin apikal kısmında endositotik fonksiyonunun bir belirtici olarak invajinasyonlar yoğun cisimcikler, lizozomlar ve pinositik veziküllerden zengindir (Dudek 2014; Ross ve Pawlina 2011).

4.1.3.12 Genital Boşaltım Kanalları

Spermilerin penise kadar iletimini sağlayan intertestiküler kanallar epididimis, duktus deferens (vas deferens) ve uretradır. Epididimis, testisi saran hilal şekilli bir yapı olup baş, gövde ve kuyruk olmak üzere 3 bölümden oluşur. Bağ dokusu ile çevrili uzun kıvrık bir tübül olan duktus epididimis ile duktuli efferentes birlikte yaklaşık 4-6 m uzunluğunda epididimisi oluşturur. Peristaltik kasılmalara uğrayan ve spermin vas deferens'e doğru taşınmasına yardımcı olan dairesel düz kas tabakası, bağ dokusu ve damarlarla çevrilidir. Duktuli efferentes epididimisin baş kısmını, duktus epididimis ise gövde ve kuyruk kısmını oluşturmaktadır. Epididimisin görevi, spermin geçici depolanmasını ve daha fazla olgunlaşmasını sağlamaktır (Dudek 2014; Ross ve Pawlina 2011). Bazal lamina tarafından çevrelenen esas ve bazal hücreler olmak üzere iki hücre tipini içeren yalancıçok katlı epitele sahiptir. Bazal hücreler, farklılaşmamış yuvarlak kök hücreler olup esas hücrelerin öncülleridir. Esas hücrelerin yüksekliği epididimis boyunca değişkenlik göstermektedir. Baş kısmında kuyruk kısmına kıyasla

neredeyse iki kat daha uzun olan prizmatik hücrelerdir. Duktuli efferentes'de emilmeyen testis sıvısının emiliminden sorumlu olan esas hücreler, işlevselliğine uygun olarak apikal yüzeylerinde hareketsiz uzun ve dallı mikrovilluslar olan stereosilyumlara sahiptirler. Hücrenin yüksekliği azaldıkça buna uyumlu olarak stereosilyumlarında uzunluğu azalmaktadır. Bu hücreler, yaygın bir Golgi kompleksine, nukleusun yakınında çok sayıda RER, lizozomlara, birçok apikal pinositotik ve kaplı veziküllere ve invaginasyonlara sahiptir. Epididimdeki esas hücrelerin diğer görevi, tübüllerde Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilmeyen artık cisimleri, anormal veya dejenere olan sperm hücrelerini ortadan kaldırmaktır. Ayrıca epitel içinde halo hücreleri olarak adlandırılan lenfositler yer almaktadır.

Spermier epididimise girdiğinde hareketsizdirler ve ayrıca bir oositi fertilize etme yeteneğine de sahip değillerdir. Epididimise ulaştıktan yaklaşık bir hafta sonra duktus epididimisten geçerken hareket yeteneği kazanırlar. Bu hücreler, ayrıca spermin dışı üreme sistemine ulaşınca kadar spermin kapasitasyonunu engelleyen yüzey-ilişkili dekapasitasyon faktörünü salgırlar. Dekapasite olan bir spermin oositifertilize etme yeteneğini yoktur. Kapasitasyon ancak sperm dışı üreme sistemi girdiğinde, dış akrozomal membrandaki yüzey-ilişkili dekapasitasyon faktörünün uzaklaşması sonucu gerçekleşir. Epididimisteki spermier olgunlaşma sürecindeyken diğer değişimler nukleustaki DNA'nın yoğunlaşması, spermin baş kısmının ve sitoplazmasının azalmasıdır (Dudek 2014; Eroschenko 2008; Ross ve Pawlina 2011).

Epidimiste spermin hareketliliği, protein kinazların ve protein fosfatazların üzerinden düzenlenmektedir. Bu protein fosforilasyonun aktivitesi hücre içi adenozin monofosfat (cAMP), kalsiyum iyon düzeyinden ve pH değişimlerinden etkilenmektedir. Spermier özellikle epididimisin kuyruk kısmında depolanır ve boşaltım kanallarında birkaç hafta canlılığını koruyabilirler. Dışı üreme sistemine girdiklerinde ise bu süreç sadece 2-3 gün kadardır. Epididimis baş kısmının tamamı ve gövde kısmının büyük çoğunluğu ince sirküler düz kas tabakasıyla çevrilidir. Fonksiyonuyla doğru orantılı olarak, spermierin depolanma yeri olan kuyruk bölgesin tabakalı hale gelmektedir. Bu bölgede peristaltik kasılmalar nadir gözlemlenir ve nöranal uyarım sonucunda spermier buradan güçlü kasılmalarla vas deferense iletilir (Ross ve Pawlina 2011).

Duktus (vas) deferens, uzunlamasına mukoza kıvrımları içeren ince bir mukoza, kalın bir muskularis tabakası ve bir adventisya tabakasından oluşan boşaltım kanalının en uzun parçasıdır. Duktus deferens, üç tabakalı kalın bir kas duvarına sahiptir. Kas tabakaları, içte ve dışta ince longitudinal, ortada kalın dairesel olarak düzenlenim gösteren kas tabakasından oluşmaktadır. Lümeni dar ve düzensiz olan duktus deferens duktus epididimise benzer şekilde sterosilyalı yalancı çok katlı epitelile kaplıdır, ancak epitelin yüksekliği biraz daha alçaktır. İnce lamina propria kollajenliflerinden ve ince bir elastik lif ağından oluşur. Duktusun adventiyası spermatik kordun bağ dokusu ile birleşerek inguinal kanalın içinden geçip abdomene ulaşır. Duktusun terminal kısmı mesane seviyesinde genişleyerek ampullayı oluşturur. Duktus deferensin ampullası duktus deferensin mukoza yapısından farklıdır. Ampullalümeni, duktus deferensin lümeninden daha büyüktür. Mukozayı çevreleyen kastabakasına uzanan çok sayıda düzensiz, dallanmış mukozal kıvrımlar ve derin glandüler divertikül yapısından oluşan basit prizmatik veya kübik epiteldir. Duktus deferensin ampullası mesanenin arkasında veziküla seminalisin kısa boşaltım kanalı ile birleşerek ejakülatuar kanalı oluşturur. Daha sonra, ejakülatuar kanal prostat bezinin içinden geçerek üretraya açılır (Dudek 2014; Eroschenko 2008; Ross ve Pawlina 2011).

4.1.3.13 Yardımcı Genital Bezler

Erkek üreme sisteminin aksesuar bir çift seminal vezikül, bir çift bulboüretal bez ve tek bir prostat bezinden oluşur. Görevleri, spermleri içeren semen sıvısının üretimidir. Seminal veziküllerin glandüler epitel yalancı çok katlı epitel-alçak prizmatik veya kübik olmak üzere testosteron düzeylerine bağlı olarak değişkenlik gösterir. Lamina propria, geniş primer ve daha dar olan sekonder kıvrımlardan oluşmaktadır. Her seminal vezikülün boşaltım kanalı, duktusun ampullasına birleşerek ejakülatör kanalı oluşturur. Ejakülatör kanal prostat bezinden geçerek prostatik üretraya açılır. Mukozanın karmaşık katlanması nedeniyle net ayırt edilemeyen içte dairesel ve dışta longitudinal düz kas tabakasına sahiptir. İnce fibroelastik bağ dokusundan adventisya muskularis tabakasını çevreler. Seminal veziküller, spermi viskoz bir sıvı salgılar ve bu sıvı insan ejakülatının yaklaşık %70'ini oluşturur (Dudek 2014; Eroschenko 2008; Ross ve Pawlina 2011).

Bezlerin en büyüğü olan prostat bezi fibroelastik kapsülle çevrili olup, kapsülün oluşturduğu septalar ile lobüllere ayrılmıştır. İçeriğini boşaltım kanallarıyla prostatik üretraya boşaltan bezin parankiması, boyutu ve şekli değişen 30-50 adet dallanmış tubuloalveoler prostatik bezden oluşur. Bezler üretranın etrafında periüretralmukozal, periüretral submukozal ve esas tabaka olmak üzere üç tabaka şeklinde düzenlenmiştir. Bağ doku ve düz kas hücrelerini içeren zengin fibromusküler stroma ile karakterizedir. Genellikle açık boyanmış basit prizmatik veya yalancı prizmatik hücrelerle çevrili lümen, bağ dokusu kıvrımlarından dolayı düzensiz ve geniştir. Bazı bölgelerde epitel değişkenlik gösterir ve lümen yassı veya kübik epitelle çevrilidir. Kanalların terminal kısımlarında epitel genellikle prizmatiktir ve hücreler üretraya girmeden daha koyu boyanmıştır. Lümeninde glikoprotein ve aynı zamanda yaşlı bireylerde bez salgılarının kalsifiye olmasıyla oluşan prostatik taşlar (corpora amilasea) içermektedir [3, 22, 34]. Prostat bezi, su, sitrik asit, Prostatik asit fosfataz [PAF] enzimlerini, kalsiyum ve çinko minerallerini, seminaplazmin, fosfolipidler, prostaglandinler, fibrinojen ve prostat spesifik antijen [PSA] gibi içerik bakımından zengin bazik bir sıvı salgılar. İçerdiği bu maddeler ile osmotik dengenin sağlanmasını, bakteriostatik işlevde ve özellikle PAF ve PSA kanser belirtecinde kullanılmaktadır. Ayrıca, fibrinojen pıhtı oluşturarak serviks ve vajinanın derin kısmında semenin tutunmasına yardımcı olmaktadır (Mescher 2017).

Bulboüretral bezler ya da Cowper bezleri, membranöz üretraya bitişik 3-5 µm çapındaki tübuloalveoler bezlerdir. Berrak renkte mukus benzeri salgı üretirler ve salgılarını membranöz üretranın lümenine boşaltırlar. Tek katlı kübik ya da prizmatik epitele sahiptirler. Düz ve iskelet kası içeren fibroelastik bir kapsül ile çevrilidirler. Kanalları penil üretranın proksimal kısmına girerek burada salgısıyla kayganlaştırıcı bir görev yaparlar (Dudek 2014; Mescher 2017).

Penis, endotel ile kaplı vasküler boşluklardan oluşur. Eretil corpora cavernosa dorsal tarafta ve korpus spongiosum ventral tarafta bulunur. Tunica albuginea eretil cisimleri çevrelemektedir.

4.1.4 Epididimis

Kıvrımlı bir tüp yapısında olan epididimis yaklaşık olarak boyu 4 ile 5 cm arasında farklılık gösteren duktus efferentes ile duktus deferentes arasında önemli bir bağlantı noktasıdır (Robaire ve ark., 2000). Epididimisin üç ana fonksiyonu; spermin olgunlaşması, hareket kazanması ve dölleme kabiliyetinin sağlanmasıdır (Robaire ve ark., 2000).

Erişkin bir epididiminin ana işlevi, döllemenin gelişimini ve sürdürülmesini destekleyen sürekli değişen bir çevresel ortama maruz kaldıkları için spermilerin kanal boyunca hareket etmesi için gerekli koşulları sağlamaktır. (Robaire ve ark., 2000).

Dorsal arter ve derin arterler erektile cisimlere kan sağlar (Eroschenko 2008). Benoit tarafından epididimis ilk kez 4 anatomik kısma ayrılarak; ilk segment, baş (kaput), gövde (korpus), kuyruk (kauda) olarak adlandırılmıştır (Benoit, 1926). Kalın bir kas katmanı ile çevrelenen ve düz bir tüp şeklinde olan vas deferens, epididimisin uzantısıdır (Turner ve ark.,1990).

4.1.4.1 Epididimis Histolojisi

Duktus epididimis, bağ dokusu ile ince düz kas katmanı tarafından çevrilmiş olup uzun ve kıvrımlı bir tübüldür. Epiteli, yalancı çok katlı prizmatik yapısı göstermektedir ve bazı kısımları olgun sperm yapısı içerir (Robaire ve Hermo, 1988).

Epididimis farklı özelliklere sahip epitel hücreleri içermektedir. Bunlardan bazıları kanal boyunca yer alırken diğerleri ise belirli özel bölgelerde bulunurlar (Benoit, 1926). Bu hücre tipleri belirli bölgelerde bulunurlar ayrıca bölgesel farklılıklar da dahil olmak üzere benzer yapısal özellikleri ve fonksiyonları paylaşırlar (Yeung ve ark., 1991; Kirchhoff, 1999). Epididimis 5 farklı hücre yapısına sahiptir. Bunlar; esas hücre epididimisin sahip olduğu hücre tiplerinden esas hücreler protein salgılanmasının yanında emiliminden, şeffaf ve apikal hücreler endositozundan, halo hücreleri bağışıklıktan ve bazal hücreler ise antioksidanların üretiminden

sorumludurlar (Robaire ve ark., 2000; França ve ark., 2005).

Esas hücreler; tüm memelilerin epididimisindeki başlıca hücre tipine verilen adlandırmadır. Bu hücreler tüm kanal boyunca yer alırlar, fakat her bölgede yapısal farklılıklar gösterirler (Hamilton, 1975; Robaire ve Hermo,1988).

Bu hücrelerin en dikkat çekici özellikleri; gelişmiş salgı, endositik mekanizma ve bazal kısmında sıralanmış olan çekirdekleridir. Esas hücreler, incelenen bölgeye bağlı olarak epididmisin toplam epitel hücre populasyonunun yaklaşık olarak %65 ile %80'ini oluştururlar (Trasler ve ark., 1988). Yapı ve işlevleri farklı bölgeler arasında önemli ölçüde değişiklik gösterir (Hamilton, 1975; Robaire ve ark.,1988; Hermo ve ark., 1994).

Bazal hücreler, bugüne kadar incelenen insanda dahil olmak üzere tüm türlerde bulunur (Hamilton, 1975; Robaire ve ark., 1988). Hemosferik grnmnlerinde, bazal memnrana yapışıktırlar ve doğrudan kanalın lümenine erişemezler (Veri ve ark., 1993). Bazal hücreler, epididimis tübüllerin çevresini büyük ölçüde çevreleyen ana yarı küresel hücre gövdesinden temel zar boyunca uzanan ince hücrelerdir (Veri ve ark., 1993).

Apikal hücreler; esas olarak ilk segment ve ara bölgenin epitelinde bulunur (Serre ve Robaire, 1998). Bu hücrelerin lümendeki maddeleri endositoz yapma yetenekleri dışında spesifik işlevleri hakkında çok az bilgi bilinmektedir (Adamali ve ark., 1999).

şeffaf hücreler, büyük ve aktif endositik hücrelerdir. İnsanlarda dahil olmak üzere birçok türde epididmisin kaput, korpus ve kauda bölgelerinde bulunur (Hamilton, 1975; Cooper 1986; Robaire ve Hermo, 1988). Bu hücrelerin apikal bölgesinde çok sayıda kesecik, endozom, multivaskler cisim ve lizozomabulunur. Bazal bölgelerinde ise çekirdek ve farklı miktarlarda lipid damlacıkları ieirirler Abou-Haila ve ark., 1984; Hermo ve ark., 1988; Robaire ve Hermo, 1988). şeffaf hücrelerde endositik aktivite özellikle epididmisin kauda kısmında esas hücrelere göre çok daha yüksektir (Moore

ve Bedford, 1979; Hermo ve ark., 1988). Şeffaf hücreler çoğunlukla spermier tarafından kanaldan geçerken salınımı gerçekleşen sitoplazmik damlacıkların içeriğini alırlar (Robaire ve Hermo, 1988; Hermo ve ark., 1988).

Halo hücreler küçük hücrelerdir ve epididimis epitelinde bulunan şeffaf sitoplazmanın dar kısmında yer alırlar. Bu hücreler genellikle epitel tabanında bulunurlar ancak bazal membranla temas etmezler ayrıca farklı sayılarda yoğun çekirdek granülleri vardır (Robaire ve Hermo, 1988). Halo hücreleri lenfositler veya monositler olarak tanımlanır. Bu iki hücre tipinin hem boyutları hemde çekirdek morfolojilerindeki benzerlikten dolayı ışık mikroskopunda ayırt edilmesi zordur (Reid ve Cleland, 1957; Hamilton, 1972; Robaire ve Hermo, 1988; Flickinger ve ark., 1997;). Erişkin hayvanlarda halo hücreleri yardımcı T lenfositleri, sitotoksik T lenfositleri ve monositleri içerirler ancak B lenfositlerini içermez (Serre ve Robaire, 1998).

4.2 Diabetes Mellitus Tanımı

Diabetes mellitus [DM], pankreastaki β hücrelerinin tahribatı sonucunda, tam ya da kısmı olarak yetersiz insülin salınımının eşlik ettiğı hiperglisemi ve glukagon yüksekliğı ile karakterize, akut metabolik ve kronik dejeneratif komplikasyonlara neden olan bir sendromdur. İnsülin hormonunun yetersizliğinde veya tamamen yokluğunda ana enerji kaynağı olan glikozun hücre içine girişı gerçekleşemez ve buna bağılı olarak kan dolaşımında yüksek glikoz seviyesine neden olmaktadır (Gavin ve ark. 2003; Maurya ve ark. 2019).

4.2.1 Diabetes Mellitusun Epidemiyolojisi ve Prevalansı

1980'den beri, küresel DM prevalansına ilişkin yapılan tahminlerin üstünde diyabet hastalığı tanısı konmaktadır. Bu yüzden günümüzde DM dünyada gittikçe artan ciddi bir sağıık sorunu haline gelmektedir. Prevalansı bazı ölkelerde dengeleniyor olsa da hiçbir ölkede önemli ölçüde azalmamaktadır. Diyabet için tahmini küresel sağıık harcamalarının 2003'ten bu yana üç kattan fazla arttığı gözlenmektedir (Gümüş ve ark 2020; Wang ve ark. 2018).

4.2.2 Diabetes Mellitusun ve Prediyabetin Tanısı

Klasik semptomları olan bir hastada teşhis için plazma glikozunun ölçümü yeterlidir. American Diabetes Association (ADA) 2021 Standartlarına göre belirlenmektedir. Kesin hipergliseminin yokluğunda, teşhis aynı numuneden veya iki ayrı test numunesinden iki anormal test sonucunu gerektirir (American Diabetes Association (ADA) 2021).

4.2.2.1 Prediyabet Tanısı

Kan şekeri düzeyi normalden yüksek olmasına rağmen diyabet tanısı koymaya yeterli yükseklikte olmayan bireyler prediyabetik olarak tanımlanır. Prediyabet tanısı alan bireyler Tip 2 diyabete adaydır ve genellikle 10 yıl içinde diyabetin geliştiği saptanmıştır. Prediyabetli bireylerde kardiyovasküler hastalık riskinormal bir bireye göre 1,5 kat fazlayken, bu değer diyabetli bireylerde 2-4 kat fazladır (Khan ve ark. 2019).

4.2.3 Diabetes Mellitusun Sınıflandırılması

Diyabet etiyolojik sınıflandırılması dört genel kategoride incelenmektedir.

1. Tip 1 diyabet
2. İmmunolojik
3. İdiopatik
4. Tip 2 diyabet

Diğer nedenlere bağlı spesifik diyabet türleri

İnsülin etkisinde genetik kusurlar

Ekzokrin pankreas hastalıkları

Endokrinopatiler

İlaç veya kimyasal kaynaklı

Enfeksiyonlar

Gestasyonel diabetes mellitus (American Diabetes Association (ADA) 2021).

4.2.4 Diabetes Mellitusun Semptomları ve Komplikasyonları

Dokuların insüline duyarlılığının azalmasına bağlı olarak; karbonhidrat, yağ ve protein metabolizması bozulmakta ve bu durum ileri dönemde akut ve kronik komplikasyonlara sebep olmaktadır. Diyabetin kronik hiperglisemisi, çeşitli organlarda işlev bozukluğuna ve yetmezliğe sebep olmaktadır.

Diyabetin akut komplikasyonları ketoasidozlu hiperglisemi, ketotik olmayan hiperosmolar sendrom, hipoglisemi ve laktik asidozdur (Gavin ve ark. 2003; Okur ve ark. 2017). Tip 1 diyabette semptomlar çoğunlukla hızla ilerlerlerken, tip 2 diyabette çok daha yavaş ilerler. Bu yüzden hastalık tanısı yıllar sonra konabilir (Gümüş ve ark. 2020).

4.2.5 Streptozotosin ile Diyabet Oluşturma Mekanizması

Deney hayvanlarında deneysel diyabet oluşumu kimyasal ajanlar, cerrahi, spontan veya virüs kullanılarak yapılabilir. Streptozotosin [STZ] gibi toksik kimyasalların uygulanmasıyla pankreastaki adacık hücreleri hasara uğratarak hiperglisemi modeli oluşturulmaktadır. Streptozotosin yanında, allokson, vacor, ditizon, 8-hidroksikinolon gibi kimyasal ajanların intraperitoneal, subkutan ve intravenöz uygulamaları ile diyabet modeli oluşturulmaktadır. STZ duyarlılığı artırmak için 8-12 saat açlıktan sonra, tek bir yüksek doz veya birden fazla düşük doz şeklinde pH 4.5 olan bir sitrat tamponunda çözündürülerek uygulanabilir. Tek seferde yüksek doz verilen STZ uygulamasında, farelerde 100-200 mg/kg, sıçanlarda ise 35-65 mg/kg'nın diyabete neden olduğu görülmüştür. Çoklu düşük dozlar günde 20 ila 40 mg / kg arasında 5 gün boyunca verilebilir (Dağışan ve Erbaş 2021).

4.2.6 Diyabet ve İnfertilite İlişkisi

Glikoz metabolizması spermatogenezde önemli bir faktör olup, yapılan klinik ve deneysel çalışmalarda, testis biyopsilerinde spermatogenez sürecinde histolojik değişiklikler izlenmiştir. Diyabetin sperm üzerindeki başlıca komplikasyonları, seminal sıvıda artan reaktif oksijen radikal (ROS) üretimine bağlı oksidatif stres,

lipoperoksidasyon, sperm DNA'sının onarımındaki genlerin ekspresyonunun etkilenmesiyle oluşan DNA fragmentasyonu, mitokondriyal DNA delesyonu, erektil disfonksiyon, azalmış sperm sayısı ve hareketliliği sayılabilir (Condorelli ve ark. 2018).

İnsülin eksikliği, leydig hücre fonksiyonunu, testosteron üretimini, FSH'deki düşüş nedeniyle sperm üretimini ve fertilizasyon oranını azalmaktadır. Bu durum, erkek germ hücre hattı yoluyla birden fazla nesile geçerek diyabet riskini artırabilir (Ding ve ark. 2015).

4.2.7 Diyabetik Testiste Glikoz Metabolizmasının Moleküler Temeli

Spermatogenezin devamlılığı glikoz metabolizmasına bağlı olup, glikoz ve diğer metabolik ara ürünlerin kandan germ hücrelere taşınması kan-testis bariyerindeki [KTB] sertoli hücreleri tarafından kontrol edilir. Testis boyutuyla sayıları değişkenlik gösteren sertoli hücreleri germ hücrelerinin gelişimi için gerekli olan metabolik öncülerin üretiminden sorumludur. Özellikle, sertoli hücreleri pakiten spermatositler ve yuvarlak spermatitler tarafından kullanılan yüksek oranda laktat üretirler ve bunu üretmek için de harici glikozu kullanırlar. Sertoli hücrelerinde glikoz taşıyıcılarından [GLUTs] GLUT1 ve GLUT3 izoformları tanımlanmıştır. Bu taşıyıcıların hormonlar, sitokinler veya büyüme faktörlerine duyarlı olduğu ve glukoz taşınımını düzenlediği gösterilmiştir. Taşıyıcılarla alınan glukoz piruvata oksitlenir ve NADH'ın oksidasyonu ile laktat dehidrojenaz [LDH] ile laktata indirgenir. Laktat, monokarboksilat taşıyıcısı 4 [MCT4] ile germ hücreleri tarafından kullanılmak üzere intratubular sıvıya aktarılır. Sertoli ve germ hücreleri, glikoz alımı ve laktat üretimine bağlı olan bir metabolik iş birliğine sahiptirler (Alves ve ark. 2013; Rato ve ark. 2015).

4.3 Hücresel Tedaviler

4.3.1 Kök Hücre Tanımı ve Çeşitleri

Kök hücreler, çok hücreli organizmalarda, farklı hücrelere farklılaşma yetkinliği (potensi), klon oluşturma yeteneği (klonite) ve mitotik hücre bölünmesi yoluyla

kendini yenileme yeteneğine sahip hücrelerdir (Weissman 2000, Can 2014). Kök hücreler, mikroçevre ve hücre içinden aldıkları sinyal yollarından dolayı dinlenme evresinde kalabilir, kendini yenileyebilir ya da farklılaşma gösterebilirler. Hücre içinde Oct4, Sox2, Nanog gibi transkripsiyon faktörleri ve LIF-STAT, MAP- ERK, PI3K ve Wnt gibi sinyal yolları rol oynamaktadır (Ören 2019).

Kök hücreler, beyin, kemik, kas, sinir, kan ve diğer organların gelişiminde, yenilenmesinde ve onarımında önemli rol oynarlar. Kök hücreler, farklı hücre tiplerine farklılaşma potansiyellerine göre, totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olmak üzere 5 tipe ayrılmaktadır (Kalra ve Tomar 2014).

Kök hücreler, farklı birden fazla kaynaktan elde edilebilirler. Orjinlerine veya lokasyonlarına göre iki kategoride sınıflandırılmaktadır. Embriyonik ve embriyonik olmayan kök hücreler olarak iki temel gruba ayrılmaktadırlar. Dokuya özgü kök hücreler olarak da adlandırılan yetişkin kök hücreler, embriyonik kök hücrelerdir (Can 2008).

Embriyonik kök hücreler [EKH], implantasyon öncesi blastosistin iç hücre topluluğundan elde edilmektedirler. Bu hücreler, pluripotent karakterde olduklarından dolayı hızlı çoğalma ve farklılaşma kapasiteleri bulunmakta olup, süresiz olarak çoğalabilme yeteneğindedirler. Bu aşamada embriyonik germ hücreleriyle aynı özelliklere sahiptirler (Gaskell ve ark. 2016).

Kemirgenler, primatlar ve insanlardan elde edilen embriyonik kök hücreler, farklı besleyici tabakalarda kültüre edildiklerinde embriyoid cisimcik denilen küresel agregatları oluştururlar. Bu küresel yapılar, her üç germ tabakasının da türevlerinden oluşmaktadır (Bishop ve ark. 2002).

Yetişkin kök hücreler multipotent hücre yapısındadır ayrıca doku kaybında veya hasarında polifere olarak hücrelerin yenilenmesinden sorumludur. Bu hücreler niş olarak adlandırılan özel bir vasküler mikroçevrede bulunurlar. Bu mikroçevrenin hücrelerin büyümesini ve gelişimini düzenlenmesinde etkisi bulunmaktadır. Yoğunlukla kemik iliği, kan, yağ dokusu, deriden izole edilirler. Hematopoietik kök

hücreler ve MKH'ler yetişkin kök hücrelerdir ve doku homeostazının sürdürülmesinde önemli rol oynarlar (Gavrilov ve Landry 2011; Hansen ve Inselman 2011; Łos ve ark. 2018).

Hematopoietik kök hücreler [HKE] ve MKH'ler için kemik iliği temel kaynaktır. HKE'ler genellikle CD34, CD45 ve CD14 hücre yüzeyi antijeninin eksprese ederler. Hematolojik bozukluklarda kemik iliği transplantasyonu için klinik olarak kullanılmaktadır (Chamberlain ve ark. 2007; Gavrilov ve Landry 2011).

Mezenkimal kök hücreler [MKH] terapötik uygulamalar için umut verici bir kaynak olan hematopoietik olmayan kök hücre popülasyonudur. Bu hücreler Friedenstein ve arkadaşları tarafından, ilk olarak 130 yıl önce kemik iliğinde yapışık, iğ şekilli hücreler şeklinde fibroblast benzeri bir populasyon olarak tanımlanmıştır. Daha sonra, yağ dokusu, deri, akciğer, sinoviyal membran, diş pulpası, nazal mukoza, anne sütü, kas, periosteum, periferik kan, endometriyal ve menstrüel kan, umbilikal kord, beyin, dalak, karaciğer, böbrek, timus ve pankreas gibi diğer yetişkin dokulardan da izole edilmişlerdir. MKH'ler osteoblastlar, adipositler ve kondrositler dahil olmak üzere hücre hatlarına dönüşebilirler. Günümüzde en çok kemik iliği ve subkutan yağ dokusu mezenkimal kök hücre kaynağı olarak tercih edilir (Hu ve ark. 2018; Keshtkar ve ark. 2018; Vizoso ve ark. 2017).

MKH'lerin karakterizasyonu için gerekli olan minimal kriterler şu şekildedir:

Standart kültür koşullarında muhafaza edildiklerinde plastiğe yapışmalıdır.

CD45, CD34, CD14 hematopoietik belirteçlerinden ve CD11b, CD79 α , CD19, HLA-DR, CD86, CD31(PECAM-1), CD18, CD56 yüzey moleküllerinin ekspresyonundan yoksun olmalıdırlar. Bu belirteçler MKH'lerin negatif belirteçleridir. Farelerde ise Sca-1, CD29, CD44 ve CD105 insanlarda, Stro-1, CD29, CD44, CD73, CD90 (Thy-1), CD105, CD146 ve SSEA4, CD106 (VCAM-1) ve ICAM -1, MKH'ler için pozitif belirteçlerdir. İn vitro olarak osteoblastlara, adipositlere ve kondroblastlara farklılaşması gerekir (Chamberlain ve ark. 2007; Huve ark. 2018).

Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler [AKMKH] ilk olarak 2001'de yağ dokusundaki MKH'ler olarak tanımlanmıştır. Adipoz dokusundan türetilen kök

hücreler için adipozdan türetilmiş stromal hücreler, işlenmiş lipoaspire hücreler, adipozdan türetilmiş MKH'ler, adipozdan türetilmiş yetişkin kök hücreler gibi farklı terimler kullanılmıştır. 2004 yılında adipozdan türetilen kök hücreler terimi kabul görmüştür. Karın, uyluk ve kolun deri altı yağ dokusundan kolayca izole edilebilirler (Tsuji 2014).

2006 yılında, Uluslararası Hücresel Terapi Derneği [ISCT], AKMKH'ler tanımlamak için CD73, CD90 ve CD105 pozitif, ancak CD45, CD34, CD14, CD19 ve HLA-DR yüzey moleküllerinin negatif olması gerektiğini tanımlamıştır. 2013'te ISCT, CD13, CD29 ve CD44 yüzey moleküllerin hücrelerin %80'inden fazlasında ifade edilmesi gerektiği, CD31, CD45 ve CD235a 'nın ise %2'den daha azında ifade edilmesi gereken negatif belirteçler olarak tanımlamıştır (Si ve ark. 2019).

4.3.2 PRP Tanımı ve Büyüme Faktörleri

Trombositten zengin plazma (platelet rich plasma – PRP), tam kandan daha yüksek yoğunlukta trombosit içeren bir plazma birleşimidir ve tam kanın sentrifüj edilmesi ile elde edilir (Paoloni ve ark. 2011). Otolog PRP, yara iyileşmesi sürecini hızlandırmasının yanı sıra toksik ve immünreaktif değildir.

PRP'de büyüme faktörleri Trombositlerin alfa granüllerinde birçok sayıda büyüme faktörü bulunmaktadır. Bunlardan bir kısmı; PDGF (Platelet-Derived Epidermal Growth Factor, Trombosit Kaynaklı Epidermal Büyüme Faktörü), PDGF (Platelet-Derived Angiogenesis Factor, Trombosit Büyüme Faktörü Kaynaklı Angiogenesis Faktör), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1, İnsülin benzeri büyüme Faktörü-1), TGF- β (Transforming Growth Factor- β , Transforme Edici Büyüme Faktörü- β), VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü), FGF-1 ve FGF-2 (Fibroblast Büyüme Faktörü 1 ve 2), EGF (Epidermal Büyüme Faktörü), PF-4 (Platelet Factor 4, Trombosit Faktör 4)'dür. PRP içeriğindeki büyüme faktörleri birbirleri ve çevrelerindeki moleküller ile etkileşime geçerek sadece bir büyüme faktörü kullanımına göre daha etkili olmaktadır (Hupp 2008, Özkaynak 2007).

PDGF (Platelet Derived Growth Factor, Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü)

bir glikoproteindir. Trombositlerdeki primer büyüme faktörü olmasına rağmen makrofajlar ve endotelial hücreler gibi hücreler tarafından da sentez edilir ve salgılanır. PDGF trombositlerin degranülasyonu sonucu yara bölgesine dağılır. Her bir trombositte hemen hemen 1200 PDGF molekülü bulunmaktadır. Bu da PDGF'nin potansiyelinin vurgulanması bakımından önemlidir. PDGF, moleküllerin etkisi membran reseptörlerine bağlandıklarında başlar. Bu bağlanmanın gerçekleşmesi, hücrelerin popülasyonlarının artması, angiogenezin ve makrofaj aktivasyonunun başlamasına bağlıdır (Lynch 1999, Hupp 2008).

TGF- β (Transforming Growth Factor- β , Transforme Edici Büyüme Faktörü- β) ailesinin üyeleri olan TGF- β 1 ve TGF- β 2, hücre farklılaşmasına neden olan faktör olarak ve bağ doku iyileşmesi ayrıca kemik rejenerasyonunda büyüme faktörü olarak görev almaktadırlar. Hem TGF- β 1 hem de TGF- β 2, PDGF gibi trombositlerden sentezlenirler ve dolayısıyla PRP'de bulunmasının yanı sıra makrofajlarda ve osteoblastlarda sentezlenmektedirler.

IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1, İnsülin benzeri Büyüme Faktörü-1), doğal yenilenme ve onarım süreçlerinde çeşitli faydaları bulunmaktadır. Trombositler içerisindeki büyüme faktörleri bu süreçleri desteklemektedir.

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor, Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü), tümör angiogenezi üzerindeki etkisi nedeniyle tanımlanmış bir faktördür (Storkebaum ve ark., 2004). Tümör hücrelerince salınan VEGF vasküler permeabilite faktörü olarak nitelendirilmiştir çünkü vasküler endotel hücre geçirgenliğini arttırarak, ödeme sebep olmaktadır. Angiogenezi, endotel hücreleri için güçlü angiogenik etki göstererek arttırmaktadır.

FGF-1 ve FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-1 and 2, Fibroblast Büyüme Faktörü 1 ve 2), endotel hücreleri, nöral hücreler, vasküler düz kas hücreleri ve keratinositler tarafından üretilirler. Her iki faktör de mezoderm ve nöroektoderm kökenli hücreler üzerine güçlü mitojenik etki gösterir (Grazul-Bilska ve ark., 2003).

EGF (Epithelial Growth Factor, Epidermal Büyüme Faktörü), erkek fare submandibuler bezinden, 1962 yılında Stanley Cohen tarafından izole edilmiştir

(Özbayoğlu, 2008). Endotel hücreleri, fibroblastlar ve sinir sistemi destek doku hücreleri için mitojeniktir. Ayrıca, anjiogenezde de önemli role sahiptir ve vasküler düz kas hücrelerine de mitojenik özelliktedir.

PRP otolog hazırlanması gerekmektedir (Tsay ve ark., 2005). PRP elde etmenin birçok değişik yolu vardır. Fakat en çok iki yol kullanılmaktadır. Birincisi hematolojik hücre ayırıştırıcıları ile yapılan kompleks teknikler, diğeri ise kullanılmaya hazır kitlerle yapılan basitleştirilmiş tekniklerdir. Bu basitleştirilmiş teknikte iki basamaklı santrifüj ile trombosit konsantrasyonu elde edilmektedir. Anuita'nın tariflediği teknikte, %3,8 lik sodyum sitrat ile yıkanmış enjektöre 2 ml kan alınır. Santrifüj tüpüne konulan kan 1800 devirde 8 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası tüpün alt kısmında eritrositlerin ağırlıkta olduğu kanın şekilli elemanları, üst kısmında trombositlerden fakir plazma toplanır.

Ortada kalan trombositlerden zengin plazma, altta şekilli elemanlar ile birleştiği hattın hemen üzerinden bir enjektör yardımıyla alınır. Sıçanlardan, alınan 1.5 ml kandan bu teknikle 0.2 ml PRP elde edilmekte, bunu aktiveştirmek için 0.01 ml kalsiyum klorid eklenip oda ısısında 10 dakika bekletilmektedir (Pietrzak ve ark., 2005; Anitua ve ark.1999; Whitman ve ark., 1997).

Ortada kalan trombositlerden zengin plazma, altta şekilli elemanlar ile birleştiği hattın hemen üzerinden bir enjektör yardımıyla alınır. Sıçanlardan, alınan 1.5 ml kandan bu teknikle 0.2 ml PRP elde edilmekte, bunu aktiveştirmek için 0.01 ml kalsiyum klorid eklenip oda ısısında 10 dakika bekletilmektedir (Pietrzak ve ark., 2005; Anitua ve ark.1999; Whitman ve ark., 1997).

PRP, bir kez üretildiğinde antikoagüle durumda, stabil ve steril olarak 8 saat kalır. Bu durumda, plazma ve şekilli elemanlar birbirinden ayrılarak saklanmalıdır çünkü konsantre PRP yavaşça aşağı dağılırarak eritrositle karışır ve RPP içeriğindeki trombosit miktarı düşer.

PRP, çeşitli şekillerde uygulanabilir. Örneğin; kemik grefti ile muamele edilebilir, bir tabaka olarak tek başına greft gibi yerleştirilebilir, yumuşak doku yüzeyine sprej gibi sıkılabilir, greftin en üstüne uygulanabilir ya da biyolojik bir membran gibi

kullanılabilir (Garg, 2004).

Pıhtılaşma ile trombositler aktive olur, hızlı bir şekilde büyüme faktörlerini salgılamaya başlarlar. 10 dakika içerisinde sahip oldukları büyüme faktörlerinin %70'ini salgırlar ve yaklaşık %100'ünü ilk saatte salgılamış olurlar. Sonrasında ilave miktarda büyüme faktörlerini 8 gün boyunca tükenip canlılıklarını yitirinceye kadar sentez ederler.

4.3.3 Stromal Vasküler Fraksiyon [SVF]

Stromal vasküler fraksiyon [SVF], yağ greftlerinin santrifüj edilmesi sonucu elde edilen ve yağ dokusu kökenli MKH'lerden zengin bir yağdoku komponentidir. Adipoz dokuya ait mononükleer fraksiyon mitojenik aktivitesi süren adipozit prekürsörleri olarak tanımlanmıştır. Daha sonra literatürde stromal vasküler fraksiyon olarak bahsedilmiştir (Riordan ve ark., 2009; Gimble, 2007; Gimble ve Nuttall, 2011).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, yağ dokusunun adipositler dışında, preadiposit, endotelial hücreler, düz kas hücreleri, fibroblastlar ve multipotent yağ kaynaklı kök hücre gibi hücreleri ihtiva ettiğini ortaya çıkarmıştır. Kök hücreler, bilindiği üzere diğer hücrelerden farklı olarak, kendive farklı türdeki hücrelere dönüşebilme kapasitesine sahip hücrelerdir. ADSCs, lipoaspirat materyalinin stromal vasküler fraksiyonunda bulunmaktadır. Bu MKH'lerin kemik, kas, kıkırdak, sinir, kan damarları gibi birçok mezodermal kaynaklı dokuya dönüşebildiği in-vivo ve in-vitro deneylerle gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda yağ dokusu içerisindeki bu hücrelerin, anjiyogenik ve antiapoptotik salgılarında olduğunu göstermiştir (Rehman J ve ark., 1997). Tüm bu bilgilerin sonucunda, kök hücre içeriği yüksek yağ greftinden elde edilen SVF'nun, verildiği dokularda yeni damar oluşumunu sağlayıp, vaskülariteyi arttırabileceği, hasara uğramış dokuları onararak eksiklikler giderilebileceği fikri ortaya atılmıştır (Mojallal ve ark., 2004; Mazzola ve ark., 2009).

4.3.4. Mezenkimal Kök Hücre Nişi

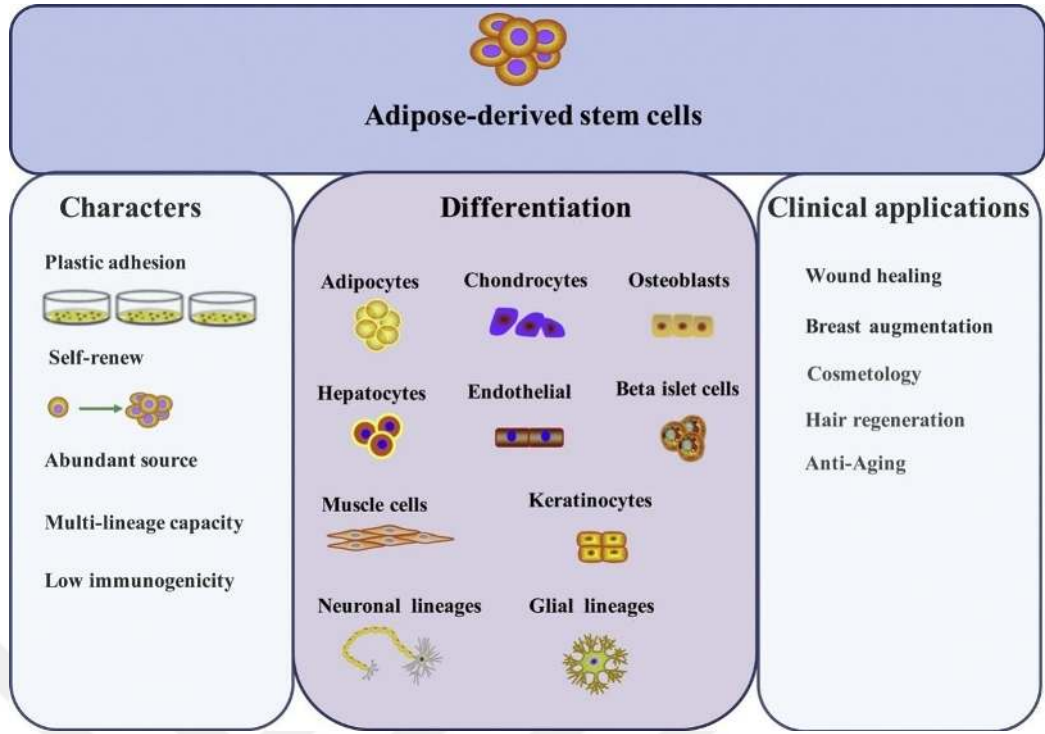
Kök hücrelerin, yapılan araştırmalarda, direk hücre-hücre etkileşimleriyle veya

kök hücre nişi olarak adlandırılan özel mikroçevreden yayılan sinyallerle kontrol edildiği gösterilmiştir. Kök hücrelerin proliferasyonunu, farklılaşmasını, sağ kalımını ve lokalizasyonu düzenleyen bu önemli paraselüler ortam, lokal ve sistemik kaynaklardan gelen hücresel ve hücresel olmayan bileşenleri (adheziv sinyalleri, çözünür faktörleri ve matriks proteinlerini) içermektedir. Nişin içeriği, embriyonik, yetişkin ve progenitor kök hücreler için değişiklik gösterebilir. Kök hücreler, fiziksel, humoral, parakrin, otokrin ve metabolik etkileşimler dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalarla çevredeki niş tarafından korunur. Bu nedenle, farklı mikroçevresel sinyaller ile rejenerasyon sürecini düzenleyebilir (Pennings ve ark. 2018; Youssef ve ark. 2017).

4.3.4.1 Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanımı

Son on yılda, hasarlı organ ve dokuların onarımı sırasında mezenkimal kök hücre fonksiyonula ilgili araştırmalar büyük bir ivme kazanmıştır. Hücre terapisinin uygulanması ve ayrıca rejeneratif tıp için farklı mekanizmalarla terapötiklerin geliştirilmesi büyük umut vaat etmektedir (Spees ve ark. 2016). MKH'ler parakrin mekanizmasıyla doku yenilenmesinde rol oynayan kemokinleri, sitokinleri ve büyüme faktörlerini salgırlar. Ayrıca, MKH'ler allojenik bir konakçıya transplante edildiğinde immünosupresyon gerektirmeyebilir. Bu nedenle, MKH'lerin immünojenik etkiye sahip olmaması klinik uygulamalar için büyük avantaj oluşturmaktadır (Chamberlain ve ark. 2007).

Özetle, AKMKH 'lerin elde edilme kolaylığı, bolluğu, farklı hücre hatlarına farklılaşabilme kapasitesi ve çeşitli immünomodülatör etkileriyle doku rejenerasyonunda günümüzde önemli bir kök hücre kaynağı haline gelmiştir (Si ve ark.,2019).



Şekil 4.6. Yağ kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin özellikleri, farklılaşması ve klinik uygulamaları (Si ve ark. 2019)

4.4 İnfertilite

İnfertilite tanım olarak; korunmasız, düzenli cinsel ilişkiye rağmen 35 yaşın altında 1 yıl, 35 yaşın üstünde ise 6 ay gebelik elde edilememesi durumudur . İnfertilite prevalansı toplumdan topluma ve gebelik istemi olan çiftlerin yaş aralığına göre değişmekle birlikte, reproduktif çağdaki çiftlerin yaklaşık %10-15'i infertiliteden etkilenmektedir (Zhang ve ark. 2014). İnfertilite tıbbi, psikolojik, sosyal sorunlara neden olan toplumsal, kültürel yönleri olan ayrıca bireylerin ve çiftlerin ihtiyaçlarını ve hedeflerini etkileyen, önemli bir sorundur.

4.4.1 Erkek İnfertilitesi

Toplumda çiftlerin yaklaşık %15'i infertilite sorunu yaşamaktadır. İnfertilite, %20-30 erkek kaynaklı, %20-35 kadın kaynaklı, %30-40 ise hem kadın hem erkek kaynaklı nedenlere bağlı olmaktadır. Açıklanamayan infertilite oranı ise %10-20'dir (ESHRE, 2014). Genel olarak erkek infertilitesi sperm üretimi, fonksiyonu ve

transportuyla ilgili sorunlar, genetik ve çevresel etkenler, kanser ve kanser tedavisine bağlı ortaya çıkmaktadır.

İnfertilite tanısı erkeklere fizik muayene ile spermiyogram, hormon testi, genetik test, radyolojik görüntüleme, testis biyopsisi ile konulur. Tedavi ise infertilitenin nedenine göre ve kadın ile erkeğin medikal durumuna göre uygulanır (Mayo Clinic, 2019).

4.5 Apoptoz

Apoptoz sitoplazmada ön enzimler olarak bulunan kaspazlar ile yönetilmekte olup, aktive edildiklerinde hücrede apoptoza yol açan bir dizi proteolitik yolağın akışını başlatırlar. Apoptozu başlatan üç aktivasyon yolağı vardır: Ekstrinsik (ölüm reseptörü) yolak, intrinsik (mitokondriyal) yolak ve granzim yolak. Bu yolaklarda çeşitli kaspazlar görev almakla birlikte her üç yolakta da efektör kaspaz 3' ün aktivasyonu diğer efektör kaspazların (kaspaz 6 ve 7) aktivasyonu ile apoptoza neden olur (Güneş, 2014; Kam & Ferch, 2000).

Ekstrinsik yolak hücre zarı reseptörü olan FAS veya TNF reseptörlerine ilişkili ligandların bağlanması ile başlatılır. Üçlü yapı oluşturması ve Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD) ve TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanı (TRADD) olarak adlandırılan proteinler ilişkili reseptörlerle birleşir. FADD kaspaz 8'e bağlanabilmek ve kesilmek için gerekli iki ölüm efektör alanına sahiptir. TRADD bu efektör alanlarına sahip olmadığından dolayı FADD ile birleşerek kaspaz 8'i aktive eder. Aktif hale gelen kaspaz 8, kaspaz 3'ü aktive ederek hücrenin apoptoza girmesini sağlar (Güneş, 2014; Kam & Ferch, 2000).

Intrinsik yolak stres, toksik reaktifler, UV ışını ve inflamasyon yoluyla tetiklenebilir. Mitokondri zar potansiyelindeki ($\Delta\Psi_m$) değişiklikler aracılığıyla aktive edilir. $\Delta\Psi_m$ değişiklikler mPTP'lerin açılması ve mitokondri iç zarında bulunan sitokrom c'nin sitozole translokasyonu ile sonuçlanmaktadır. Sitokrom c apoptoz proteaz aktifleştirici faktör 1 (APAF-1) bağlanarak, ATP varlığında kaspaz 9'u

keserek aktifleştirir. Kaspaz 9, kaspaz 3'ü aktive ederek hücrenin apoptoza girmesini sağlar. İntrinsik yolak dış mitokondriyal zarda yerleşik olan Bcl-2 tarafından düzenlenir. Bcl-2 ailesi üyelerinden Bcl-2 ve Bcl-x anti-apoptotik, Bax ve Bad pro-apoptotiktir (Gewies, 2003; Lawen, 2003).

4.6 Hücresel Tedavi [HT] Uygulamalarında Birlikte Kullanım

4.6.1 Tekli Uygulamalar

Fare testis dokuları ile hava-sıvı ara yüzü organ kültürü yöntemi kullanılarak in vitro spermatogenez [IVS] mümkündür. Bununla birlikte, aynı yöntem, fareler dışındaki hayvanlara pek uygulanamamıştır, yalnızca spermatogenezde ilerleme kaydedilmemekte veya sınırlı ilerleme kaydedilmektedir. Literatürdeki bir çalışmada, hormonlar, antioksidanlar ve lizofosfolipidler dahil olmak üzere kimyasal maddeler ekleyerek, kültür ortamının modifikasyonları ile sıçanların IVS'indeki eksiklik giderilmiştir. Buna ek olarak, dokuları daha düşük oksijen konsantrasyonuna sahip bir inkübatöre yerleştirerek veya doku üzerine silikon örtü tavanı uygulayarak oksijen gerilimini azaltmak, spermatojenik verimliliği arttırmada etkili olmuştur. Kültür koşulunun bu modifikasyonları yoluyla, kültürlenmiş dokuda 70 gün boyunca yuvarlak spermatidlere kadar sıçan spermatogenez korunmuştur. Mevcut sonuçlar, sıçan IVS'inde önemli bir ilerleme olduğunu göstermiştir, fareler ve sıçanlar için yaygın olarak uygun olan koşulları ortaya çıkarmıştır ve ayrıca sıçana özgü optimizasyonlar bulunmuştur. Bu, insanlar da dahil olmak üzere birçok hayvan türünde başarılı IVS'ye doğru önemli bir gelişmedir. (Takafumi Matsumura ve ark 2021).

Testislerinde spermatozoanın izlenemediği azospermi hastalarının tedavisine ilişkin son raporlar, daha çok MKH'ler gibi yetişkin kök hücrelerin potansiyel kullanımına odaklanılmıştır. Yapılan bir çalışmada, sıçan modellerini kullanarak azospermi tedavisinde yağ dokusundan elde edilen MKH'lerin potansiyel kullanımını göstermek amaçlanmıştır. Busulfan uygulamasından sonra, sıçanlara (n = 20) GFP (+) MKH'ler sol rete testislerine enjekte edilmiştir. 12 hafta sonra hücre enjeksiyonu ile testisler boyutsal ve immünohistokimyasal [İHK] analizden sonra kontrol ile karşılaştırılmıştır. MKH'lerle tedavi edilen testisler morfolojik olarak normal

görünüyor, ancak kök hücre tedavisi görmemiş, seminifer tübüllerin boş olduğu sıçanlarda atrofi gözlenmiştir. Spermatogenez, hücre ile tedavi edilen testislerin tüm tübüllerinde değil, bazılarında tespit edilmiştir. Testislerdeki GFP(+) /VASA(+) ve GFP(+)/SCP1(+) hücreleri, uygun mikro çevrede MKH'lerin spermatogenetik hücrelere farklılaşmasını göstermektedir. Hücre tedavisi ile sıçanlar, spermatogenezin tam olarak geri kazanıldığını göstermek için çiftleştirilmiştir ve sürekli nesiller elde edilmiştir. GFP ekspresyonu, yağ dokusu ve kemik iliğinden elde edilen MKH'lerde ve ayrıca yavruların spermalarında tespit edilmiştir. Sonuç olarak, MKH'ler gelecekte insanlarda aynı amaç için çalışılabilir (Cihangir Cakici ve ark 2013).

İnfertilite, farklı üreme bozukluklarının neden olduğu dünya çapında bir sorundur. Bugüne kadar, etiyolojiye özgü ilaçlar, hormonal tedaviler, cerrahi eksizyonlar ve yardımcı üreme teknolojileri dahil olmak üzere fertilitiyi geri kazanmak için çeşitli terapötik yaklaşımlar denenmiştir. Bu yaklaşımlar sonuç verse de her durumda fertilitiyi onarımını sağlayamaz. Kök hücre [KH] tedavisinin kullanılmasındaki ilerlemeler, kendilerini yenileme, farklılaşma ve hasarlı veya hasarlı hücreleri yenilemek ve etkilenen germ hücrelerini yenilemek için farklı parakrin faktörleri üretme yetenekleri nedeniyle infertil hastaları tedavi etmek için büyük bir umut vaat etmektedir. Ayrıca KH'ler, nükleik asitler, lipidler ve proteinler dahil biyolojik olarak aktif moleküller içeren hücre dışı veziküller (EV'ler) salgırlar. EV'ler çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde yer alır ve infertilite ile mücadele için umut verici hücresel olmayan terapötik kullanımlar göstermektedir. Birkaç çalışma, KH'lerin veya bunlardan türetilmiş EV'lerinin transplantasyonunun üreme sisteminin farklı bölümlerinin yenilenmesinde, oosit üretiminde ve sperm üretiminin başlatılmasında çok önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Bununla birlikte, mevcut kanıtlar, insan popülasyonunun infertilite sorunlarını çözmede KH transplantasyonu veya EV enjeksiyonunun etkinliğini kanıtlama ihtiyacını tetiklemiştir. Bu derlemede, kök hücreler veya bunlardan türetilen EV'ler tarafından olası tedavilere özel olarak odaklanarak, kadınlarda ve erkeklerde infertilite konularını kapsayan son literatürün altı çizilmiştir. (Ahmad Yar Qamar ve ark 2021).

Testis torsiyonu, iskemik yaralanmaya bağlı infertiliteye neden olabilen ürolojik bir acil durumdur. Orşiopeksi ile kısa sürede yapılan cerrahi düzeltme, infertiliteyi önlemenin tek yoludur ve spermatogenezin onarımı için etkili bir tedavi yoktur. Daha

önce testis torsiyon detorsiyonu üzerine lokal enjeksiyon yoluyla MKH'ler sperme farklılaşmadan spermatogenezi onardığı bildirmiştir. Bu çalışmada, testis torsiyon-detorsiyonu ile indüklenen germ hücre aktivitesini düzenlemede MKH'lerin moleküler mekanizmaları araştırılmıştır. 6-8 haftalık on altı erkek Sprague Dawley sıçanı, 3 saat boyunca sol testis 720° torsiyonu ve ardından MKH'li veya MKH'siz detorsiyon oluşturulmuştur. Testis torsiyonu olmaksızın sağ kasık derisi kesisi kontrol olarak kullanılmıştır. 3×10^4 hücreli MKH'ler, detorsiyondan 30 dakika önce sol testise lokal olarak enjekte edilmiştir. Ameliyattan üç gün sonra orşiektomi yapılmıştır ve testis, epididim ve sperm birbirinden ayrılmıştır. Sperm üzerindeki fonksiyonel değerlendirmeler, sperm miktarını ve sperm hareketliliğini saymayı, F-aktin boyamayı ve adenosin trifosfat [ATP] içeriğini ölçmeyi içermektedir. Her doku segmentindeki glikojenez ve glikolizin ayırt edici özellikleri Western blot ile ölçülmüştür. Testis torsiyonu-detorsiyonu, sperm miktarını önemli ölçüde azaltmıştır, hareketliliği engellemiştir, F-aktin ekspresyonunu azaltarak, spermdeki ATP içeriğini azaltmıştır. MKH'lerin lokal enjeksiyonu, özellikle sperm hareketliliğini ve sperm fonksiyonunu iyileştirmiştir. MKH'ler ile, testis torsiyon detorsiyonundan sonra ATP içeriği ve F aktin korunmuştur. İnsan kök hücre faktörü, sperm testis torsiyon detorsiyonunun neden olduğu germ hücre hasarının neden olduğu Akt/GSK3 ekseninin aktivasyonuna katkıda bulunmuştur. Testiküler torsiyon detorsiyonu ile hasar görmüş bir testise MKH'lerin lokal enjeksiyonu, esas olarak sperm hareketliliğini ve enerjisini geliştirerek sperm fonksiyonunu eski haline getirir. MKH'ler, spermdeki glikojenez ve glikoliz dengesizliğini düzenleyerek tersine çevirmiştir (Chi-Hao Hsiao ve ark 2019).

Azospermi hastalarının tedavisine ilişkin son raporlar, daha çok MKH'ler gibi yetişkin kök hücrelerin potansiyel kullanımına odaklanmıştır. Literatürdeki bir çalışmada, sıçan hastalığı modellerini kullanarak azospermi tedavisinde adipoz dokudan elde edilen MKH'lerin potansiyel kullanımını göstermek amaçlanmıştır. Busulfan uygulamasından sonra sıçanlara GFP+ MKH'ler sol rete testislerine enjekte edilmiştir. 12 hafta sonra hücre enjeksiyonu yapılan testisler (sağ testis) boyutsal ve immunohistokimyasal analizinden sonra kontrol (sol testis) ile karşılaştırılmıştır. MKH'lerle tedavi edilen testisler morfolojik olarak normal görünmektedir, ancak kök hücre tedavisi uygulanmayan ve seminifer tübüllerin boş olduğu sıçanlarda atrofik olarak izlenmiştir. Spermatogenez, hücre ile tedavi edilen testislerin tüm tübüllerinde olmasada, bazılarında tespit edilmiştir. GFP+/VASA+ ve GFP+/SCP1+ hücreleri,

uygun mikroçevrede MKH'lerin spermatogenetik hücrelere farklılaşmasını göstermiştir. Hücre tedavisi ile sıçanlar, spermatogenezin tam olarak geri kazanıldığını göstermek için çiftleştirilmiştir ve sürekli nesiller elde edilmiştir. GFP ekspresyonu, yağ dokusu ve kemik iliğinden elde edilen MKH'lerde ve ayrıca yavruların spermelerinde tespit edilmiştir. Sonuç olarak, MKH'ler gelecekte insanlarda aynı amaç için çalışılabilir. (Cihangir Cakici ve ark 2019).

2.6.2 İkili Uygulamalar

Rejeneratif tıpta kullanım için uygun hücre orijininin uygulanması en önemli konudur. Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp için çeşitli kök hücreler kullanılmıştır. Örneğin, rejeneratif tıp için tedavi seçeneği olarak birkaç stromal hücre kullanılmıştır. Örneğin, insan kemik iliğinden türetilen stromal hücreler ve adipozdan türetilen stromal hücreler (ADSC'ler), hücre bazlı terapide kullanılır. ADSC ile ilişkili kök hücre tedavisi ve süreçleri ile ilgili veriler, son 10 yılda dikkate değer bir şekilde gelişmiştir. Tıbbi seçenekler olarak hem SVF hem de ADSC, kusursuz hücre bazlı terapötikler olarak iyi bir fırsat sunmaktadır. Bazı biyolojik özellikler, hücre bağışıklık sistemi özelliklerinin modülasyonu ve sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri gibi biyoaktif proteinlerin salgılanması ve ayrıca bunların içsel anti ülser ve anti inflamatuvar potansiyeli dahil olmak üzere ADSC'lerin rejeneratif aktivitesini etkileyen ana faktörlerdir. ADSC'ler tarafından çeşitli hastalıklar tedavi edilmiştir ve ADSC'lerin daha geniş bir hastalık yelpazesini iyileştirmek için terapötik strateji olarak kullanılabilmesi olasılığına büyük ilgi gösterilmesi şaşırtıcı değildir. Bu, özellikle rutin tedavi yöntemlerinin hastalıkların tedavisinde tam olarak etkili olmadığı hatırlandığında önemlidir. Burada ADSC'nin kolit, karaciğer yetmezliği, diabetes mellitus, multipl skleroz, ortopedik bozukluklar, saç dökülmesi, fertilité sorunları ve tükürük bezi hasarına uygulamaları tartışılmıştır. (Tabatabaei Qomi R ve ark 2017).

İnsan adipoz kaynaklı MKH'ler inatçı hastalıkların veya travmatik doku hasarının tedavisi olarak klinik uygulaması dikkat çekmiştir. Zarar gören ovaryumları yeniden etkinleştirme yeteneğini ele almak için, bir antikanser ajanı olan siklofosfamid (CTX) kullanarak zarar görmüş ovaryumlara sahip bir sıçan modeli hazırlanmıştır. Daha sonra ovaryum fonksiyonu üzerindeki onarıcı etkileri ve yağ kaynaklı MKH'lerin (A-MKH'ler) güvenliğini araştırılmıştır. MKH'lerin anjiyogenezi indükleyebildiği ve

ovaryumlardaki over foliküllerinin ve korpus luteumun sayısını geri yükleyebildiği gösterilmiştir. F1 ve F2 sıçanlarında hiçbir deformasyon, tümör oluşumu veya ölüm gözlenmemiştir, bu da MKH'lerin overlere lokal enjeksiyonunun herhangi bir belirgin yan etkiye sahip olmadığını gösterir. Ayrıca, overlere erkek A MKH'leri enjekte edilerek floresan in situ hibridizasyon yöntemi kullanılarak Y kromozomunun lokalizasyonu araştırılmıştır; sonuç olarak, Y kromozomları foliküllerde değil, tekal katmanlarda lokalize olmuştur. ELISA, A-MKH'lerin kuyruk fibroblast hücrelerinden daha yüksek seviyelerde vasküler endotelial hücre büyüme faktörü (VEGF), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ve hepatosit büyüme faktörü (HGF) salgıladığını ortaya koymuştur. Nicel gerçek zamanlı PCR ve immünohistokimya, A MKH transplantasyonundan sonra CTX ile tedavi edilen overlerde VEGF, IGF-1 ve HGF'nin daha yüksek ekspresyon seviyelerinin gözlemlendiğini göstermiştir. Bu bulgular, MKH'lerin hasarlı over fonksiyonunu geri kazanmada bir rolü olabileceğini ve rejeneratif tıp için yararlı olabileceğini düşündürmektedir. (Takuya Aida ve ark 2013).

Kültürlenmiş adipoz türevli kök hücrelerin (ADSC'ler) intrakavernöz enjeksiyonu, yaralanma anında uygulandığında kavernöz sinir hasarı görmüş sıçanlarda erektile işlevi etkin bir şekilde geri yüklemektedir. Bununla birlikte, kültürlenme, ADSC'leri kontaminasyon ve farklılaşma riskine maruz bırakır. Kültürlenmemiş otolog adipoz türevli SVF, yaralanma sırasında veya yaralanmadan 4 hafta sonra uygulandığında kavernöz sinir yaralanmasının bir sıçan modelinde erektile fonksiyonun iyileştirilmesi üzerindeki etkisini keşfedilmiştir. 89 erkek Sprague Dawley sıçanı rastgele dört gruba ayrılmıştır. Çalışmanın başlangıcında kavernöz sinir yaralanması veya sham cerrahi uygulandı ve sıçanlar ya SVF ile tedavi edildi. Kavernöz sinir ezilme veya sham cerrahisinden 12 hafta sonra fonksiyonel testler ve histolojik analizler yapılmıştır. Kavernöz sinir ezilmesinden hemen sonra intrakavernöz salin enjeksiyonu (n = 23), kavernöz sinir ezilmesinden hemen sonra intrakavernöz SVF enjeksiyonu (n = 17), kavernöz sinir ezilmesinden 4 hafta sonra SVF intrakavernöz enjeksiyonu (n = 23) veya sham cerrahisi (n = 23) kullanılmıştır. Kavernöz sinir elektrostimülasyonuna intrakavernöz basınç yanıtını incelenmiştir ve midpenil kesitlerinin histolojik incelemesini yapılmıştır. Veriler, tek yönlü varyans analizi ve ardından Tukey-Kramer testi kullanılarak analiz edilmiştir.

SVF ile hem acil hem de gecikmeli tedavi, araçla tedavi edilen grupla

karşılaştırıldığında, ICP'nin ortalama arter basıncına oranının önemli ölçüde artmasıyla sonuçlandı. SVF ile hem acil hem de gecikmeli tedavi, araç grubuna kıyasla dorsal penil sinirlerde nöronal nitrik oksit sentaz ve nörofilament ekspresyonunu önemli ölçüde arttırmıştır. Ayrıca, korpus kavernozum içindeki düz kas-kollajen oranı, araçla tedavi edilen sıçanlara kıyasla her iki SVF grubunda da önemli ölçüde iyileştirmiştir. Çalışmanın ana kısıtlılığı, SVF bileşenlerinin belirlenmemiş olmasıdır.

Kültürlenmemiş otolog SVF, KS ezilmesinden hemen veya 4 hafta sonra enjekte edilmiştir, erektil fonksiyonu iyileştirmiştir, sinir rejenerasyonunu desteklemiştir ve KS yaralanmasını takiben korpus kavernozumda fibrozisi önlemiştir (Xuefeng Qiu ve ark 2012).

Son dönemlerde yapılan birçok çalışmada, MKH'lerin farklı hastalık modellerinde terapötik etkilerini göstermiştir. İnfertilite, dünya çapında yüksek yaygınlıkta görülen bir hastalıktır. Genetik faktörler, toksik maddelere maruziyet, radyoterapi, kemoterapi gibi antikanser tedavileri, testis torsiyonu gibi nedenlerle nonobstrüktif azospermi oluşabilir. Farklılaşma kapasiteleri ve parakrin etkileri nedeniyle erkek infertilitesinin tedavisinde MKH'lerin etkinliğini belirlemek için birçok çalışma yapılmıştır. Farklı kaynaklardan elde edilen MKH'lerin erkek germ hücrelerine farklılaşma kapasitesinin in vitro olarak belirlenmesine ek olarak, MKH'ler testise enjekte edilerek bu hücrelerin testis nişi üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Obstrüktif olmayan azosperminin nedenlerinden birkaçına değinilmiştir ve MKH'lerin testis yaralanması üzerindeki terapötik etkilerini belirlemek için mevcut çalışmalar özetlenmiştir (Büşra Çetinkaya Ün ve ark 2020).

4.6.3 Üçlü Uygulamalar

Çalışma grubu tarafından beş klinik merkezde 421 hastayı tedavi etmek için son altı yılda SVF tedavisi uygulanmıştır. Kök hücre içeren bir madde olan otolog SVF, lipoaspirattan izole edilerek, PRP ile karıştırılmıştır ve dejeneratif hastalıklar, otoimmün hastalıklar, travma, yaşlanma ve etiyolojisi bilinmeyen diğer hastalıkları olan hastalara uygulanmıştır. Bu çalışmada infüzyon, spinal ve intraartiküler enjeksiyon yoluyla verilen SVF ve PRP'nin güvenilirliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Lipoaspirat, doku ayrıştırıcı bir enzim ile işlenerek ve ardından

santrifüjleme yoluyla SVF izole edilmiştir. Ayrıca her hastadan kan alınarak PRP izole edilmiştir. Tüm deneklere intravenöz [IV] enjeksiyonla otolog PRP ve SVF uygulanmıştır. Azınlık grubu, ek bir spinal veya eklem içi enjeksiyon yapılmıştır. Müdahale tipi, her hastalık değerlendirmesi ile belirlenmiştir. Her hasta için hücre dozları ve yan etkiler belgelendi ve analiz edildi. Güvenli kabul edilen hücre dozu, IV enjeksiyon için 250 cc normal salin içinde 10 milyar SVF hücresinden az ve eklem içi ve spinal enjeksiyon için 1 milyar SVF'den azdı. Olumsuz olaylar şiddetli değildi ve başarıyla tedavi edildi. Gözlenen herhangi bir yan etki, spinal veya eklem içi enjeksiyonların bir sonucu olarak tanımlandı ve SVF veya PRP ile ilgili değildi. Sonuç olarak, infüzyon, spinal ve intraartiküler enjeksiyon yoluyla 421 hastanın çoğunluğunda 10 milyar hücreye kadar yüksek dozda SVF uygulamasının majör advers olaylara neden olmadan uygulanabilir olduğunu ve iyi tasarlanmış tedavinin güvenliğini ve etkinliğini ele alan deneme faz I-II çalışmalarının klinikte daha fazla araştırılması gerektiğini göstermiştir (Karina F. Moegni ve ark 2020).

Diyabetik ayak ülseri, diyabetes mellitusun yüksek sakatlık, mortalite ve morbidite ile karakterize ciddi bir kronik komplikasyonudur. Trombositten zengin plazma (PRP), yüksek büyüme faktörleri içeriği nedeniyle diyabetik yara iyileşmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, büyüme faktörlerinin hızlı bir şekilde bozulması nedeniyle uygulaması sınırlıdır. Bu çalışma, kombine adipoz türevli mezenkimal kök hücrelerin (ADSC'ler) ve PRP tedavisinin diyabetik yara iyileşmesini desteklemedeki etkinliğini Notch sinyal yolu ile ilgili olarak değerlendirmeyi amaçlamıştır.

Albino sıçanlar 6 gruba [kontrol (yarasız), sham (yaralı ancak diyabetik olmayan), diyabetik, PRP ile tedavi edilen, ADSC ile tedavi edilen ve PRP+ADSC ile tedavi edilen gruplar] ayrılmıştır. Bireysel ve kombine tedavinin etkisi, yara kapanma hızı, epidermal kalınlık, dermal kollajen ve anjiyogenez değerlendirilerek değerlendirildi. Ayrıca, Notch sinyal yolunun anahtar elemanlarının gen ve protein ekspresyonu (Notch1, Delta benzeri kanonik Notch ligand 4 (DLL4), Hairy Enhancer of Split-1 (Hes1), Hey1, Jagged-1), anjiyojenik işaretçinin gen ekspresyonu (vasküler endotelial büyüme faktörü ve stromal hücre kaynaklı faktör 1) ve epidermal kök hücreler (EPSC'ler) ile ilgili gen (β 1 Integrin) değerlendirilmiştir.

Kombine terapi, kollajen, epidermal kalınlık ve anjiyogenez alan yüzdesinde

belirgin bir artışla yeniden epitelizasyon ve granülasyon dokusu oluşumuna neden olduğundan, verilerde 7 ve 14 gün sonra bireysel kullanımlarına kıyasla PRP+ADSC'lerin daha iyi yara iyileşmesi göstermiştir. Ayrıca, Notch sinyali önemli ölçüde aşağı regüle edilmiştir ve diğer tedavi edilen gruplara ve diyabetik gruplara kıyasla EPSC proliferasyonu ve alımı geliştirilmiştir.

Bu veriler, PRP ve ADSC'lerin kombine tedavisinin, Notch yolunu modüle ederek, anjiyogenez ve EPSC proliferasyonunu teşvik ederek sıçanlarda deneysel olarak indüklenen diyabetik yaraların iyileşmesini önemli ölçüde hızlandırdığını göstermiştir. (Nesrine Ebrahim ve ark 2021).

İnsan adipozdan türetilen SVF hücre enjeksiyonunun mikrosirkülasyon üzerindeki faydalı etkileri, yakın zamanda in vitro ve in vivo çalışmalarda rapor edilmiştir. Bununla birlikte, intravasküler kan akışının durumuna bakılmaksızın, yaygın olarak doku perfüzyonu bozukluğu yaşayan diyabetik hastalarda etkisini bildiren hiçbir klinik çalışma yoktur. Bu çalışmada, özellikle iskemik diyabetik ayaklarda mikro dolaşımı hızlandırmak için SVF hücre enjeksiyonunun olasılığını klinik olarak incelemek için tasarlanmıştır.

Yaraların etrafına SVF hücrelerinin deri altı enjeksiyonunu almak için on diyabetik ayak dahil edildi. Transkütanöz parsiyel oksijen basıncı (TcPO₂) ve kutanöz mikrovasküler kan akışı, hücre enjeksiyonundan önce ve 12. haftaya kadar her dört haftada bir ölçülmüştür.

TcPO₂ değerleri enjeksiyon öncesi 31.3 ± 7.4 'ten SVF enjeksiyonundan 12 hafta sonra 46.4 ± 8.2 mmHg'ye yükseldi (1.5 kat, $p < 0.05$). Kutanöz mikrovasküler kan akışı seviyeleri, enjeksiyon öncesi 34.0 ± 21.1 'den SVF enjeksiyonundan 12 hafta sonra 76.1 ± 32.5 perfüzyon ünitesine yükseldi (2.2 kat, $p < 0.05$). SVF hücre enjeksiyonu ile ilgili herhangi bir yan etki olmamıştır. Bu çalışmanın sonuçları, adipoz kaynaklı SVF hücre enjeksiyonunun iskemik diyabetik ayaklarda mikro sirkülasyon üzerinde faydalı etkiler sağlama olasılığına sahip olduğunu göstermektedir. (Kyung-Chul Moon ve ark 2019).

4.6.4 Dörtlü Uygulamalar

Bir canlı hücre topluluğunun yarı geçirgen bir zar içinde tutulduğu bir strateji olan hücre kapsülleme, gelişen bir biyoteknoloji ve rejeneratif tıp dalını temsil etmektedir. Örneğin, son 20 yılda erkek ve dişi gametler ve embriyolar, in vitro gametogenez, embriyo kültürü, hücre muhafazası ve meni kontrollü salıverme gibi farklı amaçlar için somatik hücrelerle veya somatik hücreler olmadan kapsüllenmiştir. Bunun yanı sıra, hücre dışı matrisi taklit eden ve hem hücre fonksiyonlarını hem de metabolizmayı destekleyen, biyolojik olarak parçalanabilen doğal bir polimer olan aljinatta hücre kapsülleme teknolojisi, üç boyutlu (3D) kültürler elde etmek amacıyla geliştirilmiştir. Bu bağlamda, adipoz kaynaklı SVF, doku rejenerasyonundaki önemli potansiyeli nedeniyle giderek daha fazla dikkat çekmiştir. Aslında, SVF, potansiyel olarak adipositlere, kondrositlere, osteoblastlara, miyositlere, kardiyomiyositlere, hepatositlere ve nöronal, epitelyal ve endotelyal hücrelere farklılaşabilen zengin bir mezenkimal hücre (ADSC'ler) kaynağını temsil eder. Bu hücreler rejeneratif tıpta, doku mühendisliğinde, gen tedavisi ve hücre yenileme kanser tedavilerinde kullanım için ideal adaylardır. İleri tedavilere (gen tedavisi, somatik hücre tedavisi ve doku mühendisliği) yönelik büyük ölçekli hücre kapsülleme için teknolojik kaynaklar mevcut olduğu sürece, bu alandaki son gelişmeler bilimsel literatür açısından gözden geçirilmektedir (Ilaria Ghidoni ve ark 2008).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 02/06/2020 tarih ve 77.637.435 numaralı onayı ile Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2020-059 no'lu proje ile gerçekleştirilmiştir. Yüksek Lisans tez çalışmalarının tamamı Manisa Celal Bayar Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

5.1 Deney Hayvanlarının Temini ve Deney Grupları

Bu çalışma da Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (DEHAM) temin edilen 15 adet, ağırlıkları 300-400 gr arasında değişen 12 haftalık erişkin Wistar albino erkek sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar 3 gün boyunca (adaptasyon için) herhangi bir sağlık problemi belirtisine karşı bekletilmiştir. Çalışma boyunca hayvanlar stabil koşullar altında (22°C sıcaklık, %30-70 nem, aydınlık/karanlık döngüsü 12/12 saat) tutuldu. Sıçanların beslenmeleri kuru pelletler ve çeşme suyu ile sağlandı.

Deney grupları 15 adet sıçandan elde edilen spermiler ile kültür ortamında 6 gözlü flasklara alınarak 15 grup oluşturuldu. Gruplar Kontrol Grubu (KG), Sham Grubu (SG), Diyabet Grubu (DG), Diyabet+ MKH Grubu, Diyabet + Koşullu Besiyeri(KB) Grubu, Diyabet+ MKH+ KB Grubu, Diyabet+ PRP Grubu, Diyabet+ SVF Grubu, Diyabet+ MKH+PRP Grubu, Diyabet+ MKH+ SVF Grubu, Diyabet+ KB+ PRP Grubu, Diyabet+ KB+ SVF Grubu, Diyabet+MKH+ KB+ PRP Grubu, Diyabet+MKH + KB+ SVF Grubu ve Diyabet+ MKH+ KB+ PRP+SVF Grubu şeklinde ayrılmıştır (Tablo 5.1).

Deney sonunda elde edilen lam üzerinde hazırlanan sperm yaymaları morfolojik incelemeler için Diff-Quik kiti (MedionDiagnostics, Almanya) kullanılarak

değerlendirilmiştir. İmmunohistokimyasal analizler için Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz [e-NOS], İndüklenebilen Nitrik Oksit Sentaz [i-NOS], CASPAZ 3, CASPAZ 8, CASPAZ 9 primer antikorları ile boyandı. Apoptotik hücre ölümünün belirlenmesi amacı ile Terminal Transferased UTP Nick End Labeling [TUNEL] boyama yöntemi kullanılmıştır.

Tablo 5.1. Deney Grupları

Grup 1	Kontrol Grubu (KG)	N=6	- Sperm olgunlaşma besiyerine alınıp 1 saat boyunca bekletilip canlılık, hareket ve morfoloji için analiz edilmiştir.
Grup 2	Sham Grubu (SG)	N=6	- Sperm olgunlaşma besiyerine alınıp 1 saat boyunca normal glikozlu besiyeri ile bekletilip canlılık, hareket ve morfoloji için analiz edilmiştir.
Grup 3	Diyabet Grubu (DG)	N=6	- İntraperitoneal olarak 50 mg/kg tek doz olacak şekilde 0.1mol/L sodyum sitrat tamponu (pH: 4.7) ile hazırlanmış streptozotosin (STZ) enjekte edildi. - Sperm olgunlaşma besiyerine alınıp 1 saat boyunca yüksek glikozlu besiyeri ile bekletilerek canlılık, hareket ve morfoloji için analiz edilmiştir.
Grup 4	Diyabet+ MKH Grubu	N=6	- Sperm olgunlaşma besiyerine alınıp 1 saat boyunca yüksek glikozlu besiyeri+ MKH (1x10 ⁶ YKMKH) 100 µl besiyeri ile bekletilerek canlılık, hareket ve morfoloji için analiz edilmiştir.
Grup 5	Diyabet+ Koşullu Besiyeri Grubu	N=6	- Sperm olgunlaşma besiyerine alınıp 1 saat boyunca yüksek glikozlu besiyeri+ Koşullu besiyeri (100 µl 24 saat beklemiş besiyeri) ile bekletilerek canlılık, hareket ve morfoloji için analiz edilmiştir.
Grup 6	Diyabet+ MKH+ Koşullu Besiyeri Grubu	N=6	Sperm olgunlaşma besiyerine alınıp 1 saat boyunca yüksek glikozlu besiyeri+MKH (1x10 ⁶ YKMKH) + Koşullu besiyeri (100 µl 24 saat beklemiş besiyeri) ile bekletilerek canlılık, hareket ve morfoloji için analiz edilmiştir.

Grup 7	Diyabet+ PRP Grubu	N=6	- Sperm olgunlaşma besiyerine alınıp 1 saat boyunca yüksek glikozlu besiyeri+ Trombosit Zengin Plazma (PRP) %20 v/v oranında ile bekletilerek canlılık, hareket ve morfoloji için analiz edilmiştir.
Grup 8	Diyabet+ SVF Grubu	N=6	Sperm olgunlaşma besiyerine alınıp 1 saat boyunca yüksek glikozlu besiyeri+ Stromal Vasküler Fraksiyon (SVF) 1-2 mm ³ olacak şekilde bekletilerek canlılık, hareket ve morfoloji için analiz edilmiştir.
Grup 9	Diyabet+ MKH+ PRP Grubu	N=6	- Sperm olgunlaşma besiyerine alınıp 1 saat boyunca yüksek glikozlu besiyeri+ MKH (1x10 ⁶ YKMKH) + Trombosit Zengin Plazma (PRP) %20 v/v oranında ile bekletilerek canlılık, hareket ve morfoloji için analiz edilmiştir.
Grup 10	Diyabet+ MKH+ SVF Grubu	N=6	- Sperm olgunlaşma besiyerine alınıp 1 saat boyunca yüksek glikozlu besiyeri+ MKH (1x10 ⁶ YKMKH) + Stromal Vasküler Fraksiyon (SVF) 1-2 mm ³ ile bekletilerek canlılık, hareket ve morfoloji için analiz edilmiştir.
Grup 11	Diyabet+ Koşullu Besiyeri+ PRP Grubu	N=6	- Sperm olgunlaşma besiyerine alınıp 1 saat boyunca yüksek glikozlu besiyeri + Koşullu Besiyeri (100 µl 24 saat beklemiş besiyeri) + Trombosit Zengin Plazma (PRP) %20 v/v oranında ile bekletilerek canlılık, hareket ve morfoloji için analiz edilmiştir.
Grup 12	Diyabet+ Koşullu Besiyeri+ SVF Grubu	N=6	- Sperm olgunlaşma besiyerine alınıp 1 saat boyunca yüksek glikozlu besiyeri+ Koşullu Besiyeri (100 µl 24 saat beklemiş besiyeri) + Stromal Vasküler Fraksiyon (SVF) 1-2 mm ³ ile bekletilerek canlılık, hareket ve morfoloji için analiz edilmiştir.

Grup 13	Diyabet+ MKH+ Koşullu Besiyeri+ PRP Grubu	N=6	- Sperm olgunlaşma besiyerine alınıp 1 saat boyunca yüksek glikozlu besiyeri+ MKH (1x10 ⁶ YKMKH) + Koşullu Besiyeri (100 µl 24 saat beklemiş besiyeri) + Trombosit Zengin Plazma (PRP) %20 v/v oranında ile bekletilerek canlılık, hareket ve morfoloji için analiz edilmiştir.
Grup 14	Diyabet+ MKH+ Koşullu besiyeri+ SVF Grubu	N=6	- Sperm olgunlaşma besiyerine alınıp 1 saat boyunca yüksek glikozlu besiyeri+ MKH (1x10 ⁶ YKMKH) + Koşullu besiyeri (100 µl 24 saat beklemiş besiyeri) + Stromal Vasküler Fraksiyon (SVF) 1-2 mm ³ ile bekletilerek canlılık, hareket ve morfoloji için analiz edilmiştir.
Grup 15	Diyabet+ MKH+ Koşullu besiyeri+ PRP+ SVF Grubu	N=6	-Sperm olgunlaşma besiyerine alınıp 1 saat boyunca yüksek glikozlu besiyeri+ MKH (1x10 ⁶ YKMKH) + Koşullu besiyeri (100 µl 24 saat beklemiş besiyeri) + Trombosit Zengin Plazma (PRP) %20 v/v oranında+ Stromal Vasküler Fraksiyon (SVF) 1-2 mm ³ ile bekletilerek canlılık, hareket ve morfoloji için analiz edilmiştir.

5.2 Deneysel Diyabet Modelinin Oluşturulması

300-400 gr. arasında değişen Wistar Albino 15 erkek gruplara ayrılmıştır. Diyabetik gruplar için denekler, diyabet oluşturulmadan önce 12 saat aç bırakılmıştır. 50 mg/kg tek doz olacak şekilde 0.1mol/L sodyum sitrat tamponu (pH:4.7) ile hazırlanan STZ (Sigma, katalog no: 18883-66-4) intraperitoneal olacak şekilde enjekte edilmiştir (Mercan ve ark. 2020).

5.3 Mezenkimal Kök Hücrelerin ve Nişin Eldesi

5.3.1 Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Eldesi ve Karakterizasyonu

Yağ dokusu kaynaklı MKH'ler, 6-8 haftalık bir sıçanın subkutan inguinal

yağından elde edilmiştir. Sıçanlara aneztezi uygulandıktan sonra steril makaslar kullanılarak yağ dokusu çıkartılmıştır. Kandan gelebilecek herhangi bir kontaminasyon riskine karşı defalarca fosfat tamponlu salin [PBS] (Gibco, katalog no: 10010023) solüsyonunda yıkanmıştır. Daha sonra yağ dokusu steril bistürü yardımıyla küçük parçalar halinde kesilerek, 10 dk boyunca %0,1 tip 1 kollajenazla (Gibco, katalog no: 17100017) enzimatik olarak parçalanmıştır ve çöktellerin uzaklaştırılması için 800×g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında en üst beyaz tabakada toplanan yağ dokusu alınarak, ikinci kez 37 C'de eşit hacimde %0,1 kollajenaz ile enzimatik sindirimi gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivitesinin inhibisyonu için, eşit hacimde Dulbecco Modifiye Eagle: Nutrient mixture F12 [DMEM/F12] (Merck, katalog no: DF-041-B) besiyeri ve %10 sığır serumu [FBS] (Sigma Aldrich, katalog no: F4135) ilave edilmiştir ve yeniden 800 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

Çökelti, DMEM ile ikinci kez yıkandıktan sonra 10 dakika boyunca 800 x g'de tekrar santrifüj edilmiştir. Yıkanmış hücreler, besiyeri içeren 75 cm²'lik bir kültür kabına akıtarılarak 37 °C'de, %5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda flaska yapışmış olan MKH'lerin, diğer yüzen hücrelerden ayırmak için steril PBS ile yıkama yapılmıştır. Hücre çoğalması %70-80 konfluensiye ulaştığında, hücreler kültür kabından %0.25 Tripsin EDTA (Gibco, katalog no: 1797206) ile 37°C'de 1 dakika inkübe edilerek kaldırılması sağlanmıştır. DMEM/F12 besiyeri eklenerek hücreler 800 x g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Tripsini uzaklaştırmak için yeniden süspansiyon haline getirilmiştir ve %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin-amfoterisin B ve DMEM/F12 besiyeri eklenenen petri kabına ekilmiştir. Hücreler, 2. pasaja kadar pasajlama işlemi yapıldıktan sonra uygulamaya en uygun hale getirilmiştir. Kültür ortamında 4. pasajdaki MKH kültür kabında konfluent olduğunda, doğrulanmıştır. Hücrelerin mezenkimal kök hücre olduğunu ispatlamak için, CD73+, CD90+, CD105+ ve CD45-, CD34- olmak üzere negatif ve pozitif MKH belirteçleri ile immuhistokimyasal boyaması yapılmıştır. Bu hücreler kök hücre gruplarına her dozda 1x10⁶ hücre olacak şekilde 3 doz uygulanmıştır.

5.3.2 Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Nişinin Eldesi

Pasaj 7'deki %80-%90 konfluensiye ulaşan hücrelere taze besiyeri eklenmiştir. 24

saat inkübe edildikten sonra bu besiyeri toplanarak niş gruplarına uygulanmıştır.

5.4 PRP Elde Edilmesi

Anestezi altındaki deneğin kalbinden %3,8'lik sodyum sitrat ile yıkanmış tüpe 1,5 ml kan alınmıştır. Bu miktar ortalama büyüklükteki bir sıçanda hayvanı şoka sokmadan tek seferde alınabilecek maksimum kan miktarı olarak bilinmektedir. Saf PRP tekniğine uygun olarak, alınan kan santrifüj tüpüne konuldu ve 1800 devirde 8 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüpün alt kısmında kırmızı renkte kanın şekilli elemanları, en üst kısmında ise açık sarı renkte trombositten fakir plazma toplandı. Bir enjektör yardımıyla ortadaki trombositten zengin 0,2 ml'lik plazma kısmı alındı. Alınan plazmayı aktifleştirmek için içerisine 0,01 ml kalsiyum klorid eklenip karıştırılarak uygulama yapıldı.



Resim 5.1. Denekten PRP elde etmek için kan alımı



Resim 5.2. Santrifüj işlemi sonrası elde edilen PRP'nin görünümü

5.5 SVF Elde Edilmesi

Diseksiyonla her bir sıçanın inguinal bölgelerinden yağ yastıkçıkları çıkartılıp ince uçlu bir doku makası ile mekanik olarak küçük parçalara ayrıldıktan sonra içerisine %0,1'lik kollojenaz tip I (C0130, Sigma Aldrich™, St. Louis, MO) ve tip II (C6885, Sigma Aldrich™, St. Louis, MO) konularak 37 °C'de 30 dk bekletilmiştir. Üzerinde biriken triglisertiten zengin yağ tabakası uzaklaştırılmıştır. Ardından 3000 devir/dk'da 5 dk. süreyle santrifüj edilerek dipte çökmüş halde SVF matür adipositlerden ayrılmıştır. SVF, 0,2 ml doz şeklinde uygulama yapıldı.



Resim 5.3. Santrifüj ile dipte çökmüş halde bulunan SVF

5.6 Testis Dokularının Alınması

Deney sonunda sıçanlar servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edildi. Histokimyasal analizler için testisler bouin fiksatifine alındı.

5.6.1 Kan Şekerlerinin Ölçülmesi

STZ uygulamasından dört saat sonra deneklerin yiyecekleri tekrar verilmiştir. Üç gün sonra, 6 saatlik açlık sonrası kuyruk ucundan alınan kandan el glukometresi (Accu-check) ile kan şekeri değerleri ölçülerek, 250 mg/dl üzeri kan şekerine sahip

olan denekler diyabet kabul edilmiştir (Mercan ve ark. 2020).



Resim 5.4. STZ uygulaması sonrası kan şekeri ölçümü

5. 6.2 Vücut Ağırlıklarının Ölçülmesi

Deney başlangıcında her sıçanın vücut ağırlığı ölçüldü. Ölçülen ağırlıklar istatistiksel olarak değerlendirildi.

5. 7 Testis Dokularının Takibi ve Histopatolojik Değerlendirilmesi

5. 7. 1 Parafin Doku Takibi

Histokimyasal ve immunohistokimyasal değerlendirmeler için sağ testis dokuları bouin solüsyonu (Polyscience, katalog no: 1604-1) içerisine bütün halde atıldı ve 48 saat bekletilerek fikse edildi. Daha sonrasında, örnekler %70 alkol ile sarı renk kayboluncaya kadar fiksatiften arındırıldı. Bir gece %70 alkolde tutuldu ve ertesi gün derecesi giderek artan etil alkol serilerinde (%70, %80, %100) (İsolab, katalog no: 920.026) bekletilerek dehidratasyon işlemi gerçekleştirildi. Şeffaflaştırma için kademeli geçiş yapıldı. Geçiş fazında alkol-ksilenden (Merck, katalog no: 108685) eşit miktar olacak şekilde hazırlandı ve dokular alkol-ksilende 2 saat bekletildi. Ksilende 1 gece tutularak şeffaflandırma yapıldı. Bir sonraki geçiş fazında, yine eşit miktarda hazırlanan ksilen-parafinde 1 saat tutulduktan sonra parafine (Sigma Alrich, katalog no: P3558) alınıp 3 saat bekletildi. İkinci bir parafin değişimi yapıp 1 gece etüvde parafinde bekletildi. Son olarak dokular bloklar içerisinde parafine gömüldü.

5. 7. 2 Testis Dokularının Hematoksilen- Eozin (H&E) Boyaması

Parafin bloklardan Rotary mikrotom cihazı (RM 2135, Leica) ile 5µm kalınlığında kesitler rodajlı lamlara alındı. Kesitler alındıktan sonra 1 gece 60°C'lik etüvde parafinin erimesi için deparafinizasyon işlemine tabi tutuldu. Ardından parafinin uzaklaştırılması için iki değişim ksilende 30'ar dk. tutularak kimyasal deparafinizasyon işlemi uygulandı. Rehidratasyon için azalan alkol serilerinden (%95, %80, %70, %60) geçirildi. Daha sonra 5 dk akarsuda yıkanan lamalar önce hematoksilene batırıldı ve 5 dk. beklendi. Sonrasında fazla boyanın uzaklaştırılması için tekrar akarsuya alınan lamalar 5 dk. daha yıkandı. Diferansiyasyon işlemi için asit-alkol solüsyonunda 1 saniye tutulduktan sonra 2 dakika eozin solüsyonuna batırıldı. Dokular yeniden 5 dk. akarsuda tutularak yıkama işlemi gerçekleştirildi. Son olarak dokular dehidratasyon için %80 ve %95'lik artan alkol serilerinden geçirilip havada kurutuldu. 30'ar dakika iki değişim ksilende beklenip entellan ile kapatıldı.

5. 7. 3 Seminifer Tübül Çapı Ölçümü

Testisteki hasarın bir göstergesi olarak fiji/image j programı kullanılarak seminifer tübül çapları ölçüldü. Seminifer tübül çapı ölçümü, her gruptan X 20' lik objektifte 10 farklı alandan ölçülerek yapıldı ve istatistiksel olarak değerlendirildi.

5. 7. 4 Johsen Skoru

Seminifer tübüllerdeki hasarlanmanın derecesini göstermek için Johsen testis biyopsi skoru yöntemiyle değerlendirildi. Her gruptan x20 objektifte rastgele 10 farklı tübül incelendi ve her tübül kesitine 1 ile 10 arasında bir derece verildi. Gruplar arası farklılık istatistiksel olarak değerlendirildi.

5.8 Spermilerin Hazırlanması ve Analizi

5.8.1 Sperm Sayımı

Bu çalışmada sakrifikasyondan hemen sonra çıkarılan kaudal epididimis 1 mL

%10 FBS ilave edilmiş DMEM F12 besiyeri içerisine alındı ve bisturi yardımıyla kesim yapılarak çok kk parçalara ayrıldı. Ependorf içerisine alınan bu çözelti 2230 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Pellet ile süpernatant arasında spermlerin bulunduğu kısımdan 100 µL alınarak santrifüj işlemi tekrar edildi. Toplam 100 µL sıvı içerisinden süpernatantın miktarı mikropipet yardımıyla hesaplanarak atıldı ve besiyeri tamamen uzaklaştırıldı. Ependorf içerisinde kalan pellet miktarı kadar tekrar serumlu besiyeri eklenerek 1:1 oranında seyreltme yapıldı. Seyreltilmiş zeltiden bir damla (10 µl) alınıp Makler sperm sayım kamerasının merkezine damlatılarak üzerine kapak camı kapatıldı. Mikroskop altında 20X büyütme altında, referans çizginin her iki tarafından 5'er kare içerisindeki sperm başları sayıldı. İki farklı referans çizgiyle sayım yapılarak ortalamalar alındı ve bulunan sayı 2×10^6 ile çarpılarak mL'deki sperm miktarı hesaplandı (WHO, 2010).



Resim 5.5. Epididimis dokularının alınması

5.8.2 Sperm Morfolojisi

Sakrifikasyondan hemen sonra çıkarılan kaudal epididimis 1 mL %10 FBS ilave edilmiş DMEM F12 besiyeri içerisine alındı ve bisturi yardımıyla kesim yapılarak çok kk parçalara ayrıldı (IRDG, 2000; Akram ve ark., 2012; Taib ve ark., 2013).

Kültür ortamında 15 gruptaki uygulamaların ardından bir damla alınarak lam üzerine damlatıldı ve yayma yapıldı.

5.8.2.1 Diff-Quick Boyama

Yayma preparatlardan Diff-Quick boyama yapıldı ve her bir preparat için 200 sperm değerlendirildi.

5. 8. 3 Hareketlilik

Sperm hareketlilik değerlendirmeleri 1 saat olarak faz kontrast mikroskopisi ile belirlenmiştir.

5. 8. 4 Canlılık

Canlılık değerlendirmesi için lam üzerine semen örneğinden bir damla damlatıldı ve üzerine 1 damla %1'lik eozin-y eklenerek karıştırıldı ve lamel ile kapatıldı. Her örnekte farklı alanlarda totalde 100 sperm canlılık açısından değerlendirildi.

5.9 İmmunohistokimyasal Boyama

İmmünohistokimyasal boyama için polizinli lam üzerinde hazırlanan sperm yaymaları absolü metanol ile fikse edilmiştir. Daha sonra 5'şer dk. 3 kez PBS (Thermo Fisher, katalog no: 18912014) ile yıkanan numuneler buz üzerinde 10 dk. %0,1 Triton x-100 ile permeablizasyon sağlanmıştır. 5'şer dk. 3 kez PBS ile yıkamadan sonra, endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için %3'lük hidrojen peroksit çözeltisi içinde 15 dk. süreyle inkübe edilmiştir. 5'şer dk. 3 kez PBS ile yıkama yapılmıştır. Bloklama solüsyonu (Thermo Fisher, Ultra Vision, katalog no: TP-125-HL) 1 saat olacak şekilde oda sıcaklığında uygulanmıştır. Daha sonra PBS ile yıkama yapmadan spermler anti e-NOS, i-NOS, CASPAZ 3, CASPAZ 8, CASPAZ 9 primer antikorları ile 1 gece +4 derece inkübe edilmiştir. Ertesi günde 5'şer dk. 3 kez PBS ile yıkama yapıldıktan sonra biotinlenmiş sekonder antikor oda sıcaklığında 30 dk. bekletilmiştir. Tekrar yıkama yapıldıktan sonra 30 dk. straptavidin peroxidase uygulanmıştır. Bu aşamadan sonra numuneler tekrar PBS ile 3 kere yıkayıp immün reaksiyonun gözlenmesi için DAB (Thermo Scientific, katalog no: 34002) kromojeni ile belirli süre inkübe edilerek antikorların görünürlüğü sağlanmıştır. Mayers hematoksilen (Skytek) ile de çekirdek boyaması gerçekleştirilmiştir. Son kez distile su ile yıkanan lamalar

kapatma solüsyonu kullanılarak lamel ile kapatılmıştır. Işık mikroskobu ile incelenmiştir.

Sperm yaymalarından elde edilen preparatlar üzerinde rastgele seçilen 10 alanda sayılan 100 hücre üzerinde H-skor analizi yapılmıştır. Boyanmanın derecesine göre, 0- boyanma yok, 1-zayıf boyanma, 2- orta boyanma, 3-kuvvetli /şiddetli boyanma olarak skorlanmıştır. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

5. 10 TUNEL Boyaması

Apoptotik hücre ölümünün belirlenmesinde Terminal Transferase dUTP NickEnd Labeling (TUNEL-Millipore LOT: 2869035) boyama kiti kullanıldı. Alınan 5 µm'lik seri kesitler, deparafinizasyon için 1 gece 60°C etüvde bekletildikten sonra iki kez ksilen ile muamele edildi. Rehidratasyon için, azalan etil alkol serilerinden (%96-80-70-60) geçirildi. 10 dakika %3'lük hidrojen peroksit (1.08597.2500, Merck 3002, Invitrogen) ile oda ısısında yıkandı. 50µg/ml Proteinaz-K 37°C'de 15 dakika uygulandı. PBS ile 5'er dakika üç kez yıkamayı takiben Örnekler 10 dakika Equilibration buffer ile oda ısısında tutulduktan sonra TdT-reaksiyon karışımı eklenerek nemli atmosferik ortamda 37°C'de 60 dakika bekletildi. Sürenin ardından Stop Wash Buffer ile 10 dakika bekletildi. Spesik boyanmayı kaldırmak için her bir dokuya 50ul reducing buffer eklenerek 30 dakika bekletildi. Antidioksinin Peroksidad Konjugatı ile 1 saat 37°C'de nemli kutuda muamele edilen örnekler 5'er dakika üç kez PBS ile yıkandı. HRP polimeri ile 30 dk inkübe edildi ve 5'er dakika üç kez PBS ile yıkandı. Ardından DAB (Diaminobenzidin ACK125, SkyTek) ile boyama yapılarak, birkaç kez distile su ile yıkandı. Artalan boyaması için 30 saniye Mayer's Hematoksilen (HMM999, ScyTek) ile boyandı ve çeşme suyu ile yıkandı. Son olarak dehidratasyon için %95'lik ve %100'lük alkollere batırılıp çıkartıldı ve şeffaflaştırma işlemi için 30 dk. ksilende beklenip entellan ile kapatıldı.

Her gruptan x40 büyütme altında rastgele seçilen 10 farklı tübülden 100 hücre sayılarak TUNEL pozitif hücreler saptandı. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar yapıldı.

5. 11 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için Graphpad Prism 8.3.1 programı kullanıldı. Gruplardan elde edilen ortalama değerler, standart sapmalar ve istatistiksel sonuçlar tablo ve grafik şeklinde gösterildi. Kanşekeri değerlerinin ve hayvan ağırlıklarının değerlendirilmesi için two-wayanova testi yapıldı. $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Seminifer tübül çapları imaje j programıyla ölçüldü. Hematoksilen&Eosin ile boyalı preperatlardan Johnsen skorlaması yapıldı. Ayrıca, çalışmamızda TUNEL boyanan kesitlerden apoptotik indeks için hücre sayımı yapıldı. Seminifer tübül çapları, Johnsen skorlaması ve TUNEL analizin verileri Mann Whitney U testiyle değerlendirildi. IHC sonuçları için, gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak kıyaslanması için One-Way ANOVA (Tek Yönlü Varyans Analizi) kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme sonuçlarında $P \leq 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi. Çoklu karşılaştırma için Post hoc testi olarak Tukey's testi kullanıldı.

6. BULGULAR

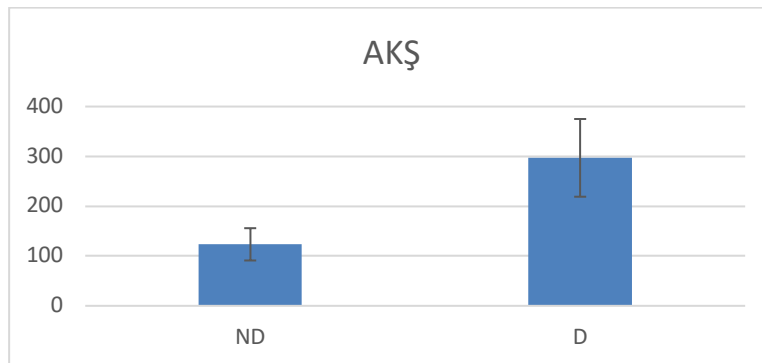
Yüksek glikozlu besiyerinde diyabetik testis epididimisinden toplanmış spermilerin üzerindeki etkisini anlamak amacıyla normal glikozlu besiyerindeki spermilerle karşılaştırmak üzere oda sıcaklığında SVF, PRP, MKH ve MKH tarafından salgılanan faktörler olarak 24 saatlik KBY niş olarak kullanılıp bunların farklı kombinasyonlarının sperm canlılığı, hareketliliği, morfolojisi, oksidatif stres ve apoptoz üzerindeki etkisi histolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerle incelendi.

6.1 Diyabet Bulguları

6.1.1 Kan Şekerleri

STZ uygulamasından dört saat sonra deneklerin yiyecekleri tekrar verildi. Üç gün sonra, 6 saatlik açlık sonrası kuyruk ucundan alınan kandan el glukometresi (Accu-check) ile kan şekeri değerleri ölçüldü ve 250 mg/dl üzeri kan şekeri olan denekler diyabet kabul edildi (Mercan et al. 2020).

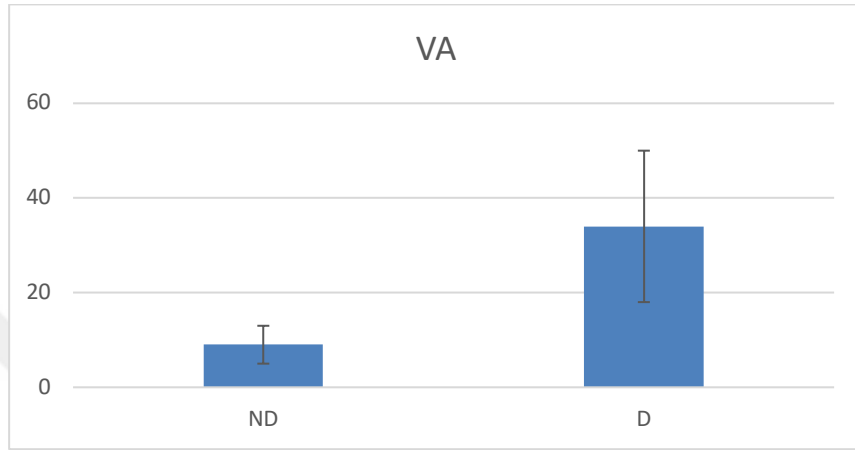
AKŞ ölçümlerinin karşılaştırılmasında D olanlarda ND ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak oldukça ($p<0,001$) anlamlılık bulundu (Şekil 6.1).



Şekil 6.1. Deney Gruplarında AKŞ değerleri.

6.1.2 Vücut Ağırlıkları

Deney başlangıcında ve bitişinde her sıçanın vücut ağırlığı ölçüldü. Ölçülen ağırlıkların farkı istatistiksel olarak karşılaştırıldığında ND örneklerinde D örneklerine göre oldukça anlamlı ($p<0,001$) bir azalma izlendi (Şekil 6.2).



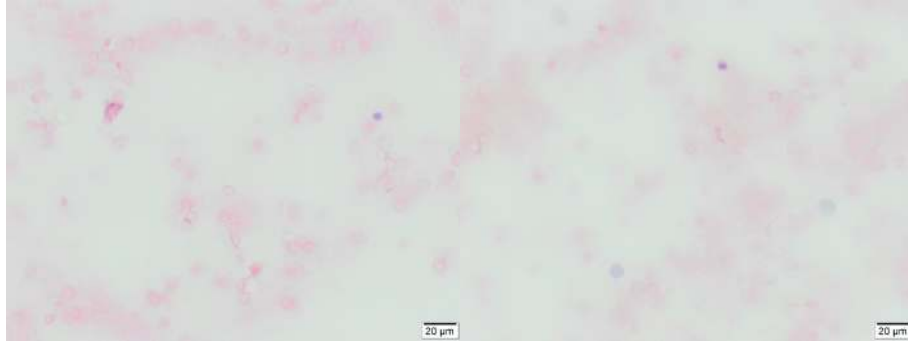
Şekil 6.2. Deney Gruplarında İlk ve Son Vücut Ağırlıkları farkı.

6.1.3 Hücresel Tedavi Belirteçleri

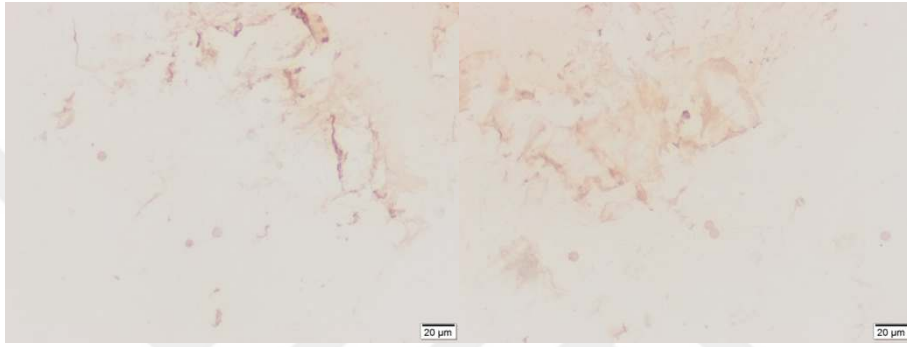
6.1.3.1 SVF Karakterizasyonu

SVF karakterizasyonu için HE ve CD90 boyaması yapıldı. İçeriğindeki MKH oranına bakılarak MKH oranı h-skor ile belirlendi (Şekil 6.3).

HE



CD90



Şekil 6.3. SVF karakterizasyonu için HE ve CD90 boyaması.

6.1.3.2 PRP Karakterizasyonu

PRP karakterizasyonu için HE boyaması yapıldı. İçeriğindeki trombosit oranına bakıldı (Şekil 6.4).

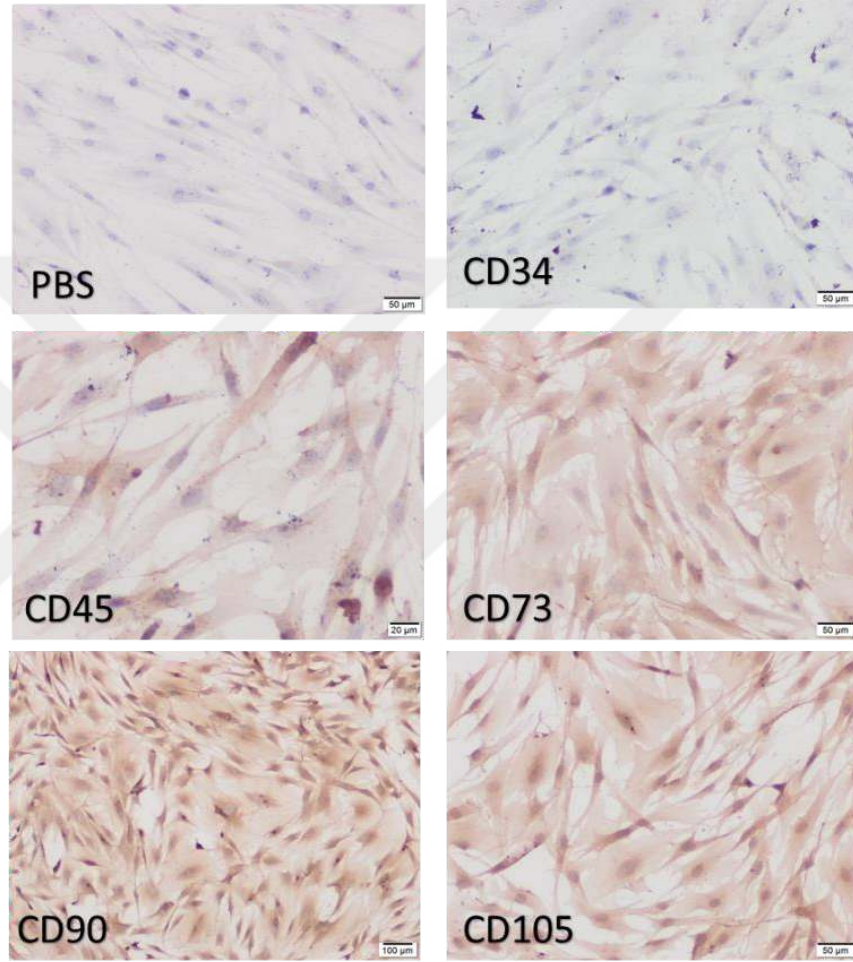
HE



Şekil 6.4. PRP karakterizasyonu için HE boyaması.

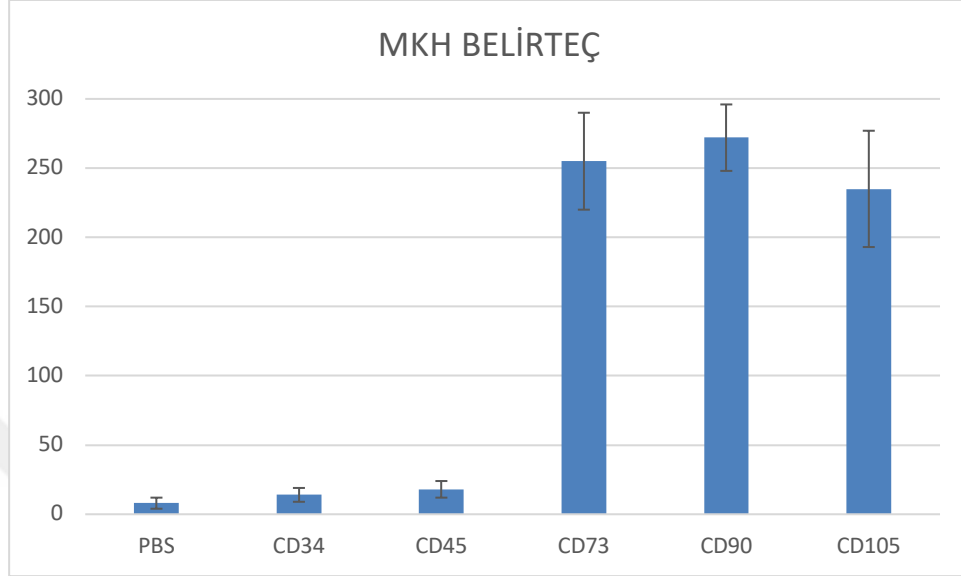
6.1.3.3 MKH Karakterizasyonu

MKH karakterizasyonu için CD73, C90, C105 ile pozitifliği, CD34 ve CD45 negatifliği ve antikor yerine PBS kullanılan boyanmamış negatif kontrol kullanılarak immunohistokimyal yöntemle doğrulandı (Şekil 6.5).



Şekil 6.5. MKH karakterizasyonu için PBS, CD45, CD34 ve CD73, C90, CD105 boyaması.

Yapılan H-skor analizinde MKH için büyük çoğunlukla CD73, C90, C105 pozitifliği ile çok az miktarda CD45 pozitifliği ve CD 34 ve negatif kontrolde işaretlemenin çok az olduğu görüldü (Şekil 6.6).



Şekil 6.6. MKH karakterizasyonu için PBS, CD45, CD34 ve CD73, C90, CD105 İmmunoreaktivitesi.

Tablo 6.1. MKH karakterizasyonu için H-skor Analizi.

Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
PBS vs CD73	-247.00	17.249 ***	P<0.001
PBS vs CD90	-267.00	18.646 ***	P<0.001
PBS vs CD105	-227.00	15.852 ***	P<0.001
CD34 vs CD73	-241.00	16.830 ***	P<0.001
CD34 vs CD90	-261.00	18.227 ***	P<0.001
CD34 vs CD105	-221.00	15.433 ***	P<0.001
CD45 vs CD73	-237.00	16.551 ***	P<0.001
CD45 vs CD90	-257.00	17.947 ***	P<0.001
CD45 vs CD105	-217.00	15.154 ***	P<0.001

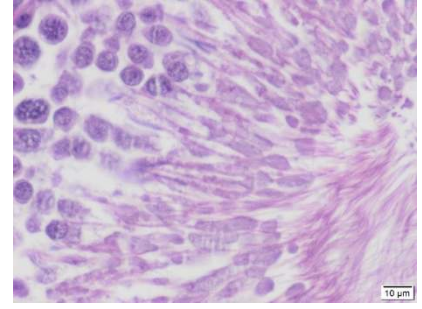
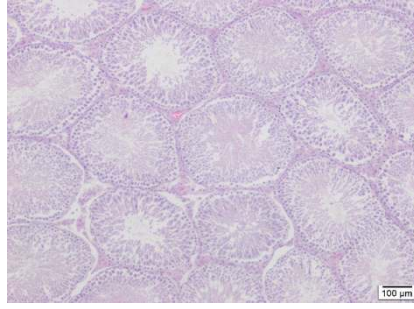
6.2 Testis Bulguları

6.2.1 HE Bulguları

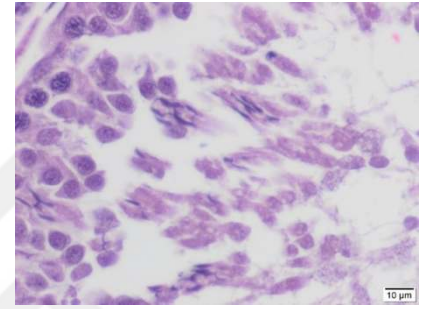
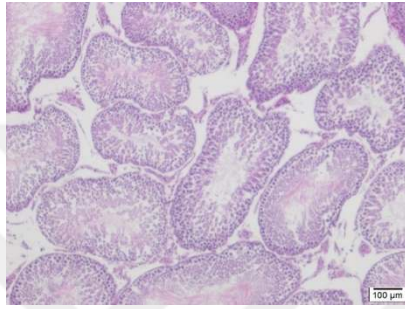
Kontrol grubu kesitlerinde, testisi saran sıkı bağ dokusu yapısındaki tunika albuginea normal görünümündeydi. Seminifer tübüllerin arasındaki gevşek bağ doku yapısındaki interstisiyel alandaki Leydig hücreleri, tübül içinde spermatogenik seriye ait hücreler ve Sertoli hücrelerinin normal histolojik yapılarını koruduğu görüldü. Seminifer tübül sınırlarının düzgün olduğu ve germ hücrelerinin gelişimsel seriye uygun olarak düzenli sıralandığı sertoli hücreleri, spermatogonyumlar, spermatositler, spermatidler ve spermatozoalar görüldü.

Diyabet grubunda, seminifer tübüllerin birçoğunun dejenere olduğu, spermatogenik seriye ait hücrelerin azaldığı ve germinal epitelin kaybı görüldü. Birçok alanda lümeninde spermlerin olmadığı atrofik tübüller tespit edildi. Hücresel kayıplarla beraber seminifer tübüllerin sınırlarının düzensiz olduğu ve lümende bazal ve adluminal kompartmanlarının ayrıldığı alanlar, spermatogenik seri hücrelerinde dağılmalar ve bazı tübüllerde lümene dökülmüş germ hücreleri saptandı. İnterstisyel alana bakıldığında bağ doku artışı, ödem ve konjesyon tespit edildi. Tübül içi sertoli hücrelerinde belirgin vakuolizasyon ve eozinofilik sitoplazmalı çok çekirdekli dev hücreler (multiveziküler cisimcikler) görüldü. Bu hücrelerin çekirdeklerinde kromatin yapısı hilal şeklindeydi (Resim 6.2).

ND

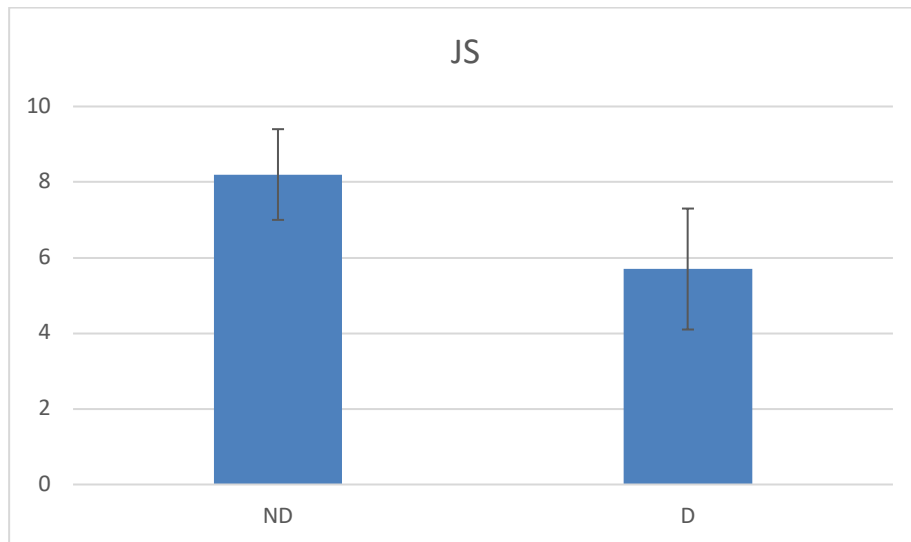


D



Resim 6.1. Testis histolojisi HE örnekleri.

HE örneklerinde Johnson skorlaması yapıldı ve ND ile D örnekler arasında anlamlı bir hasar saptandı (Şekil 6.7).

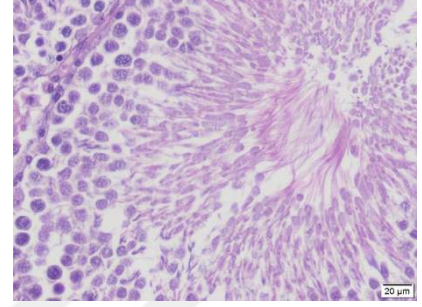
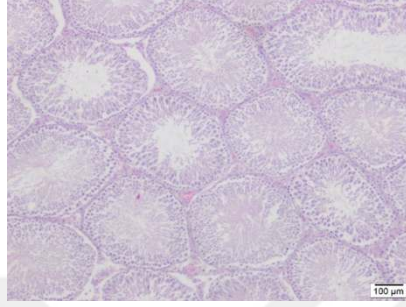


Şekil 6.7. Johnson skorlaması.

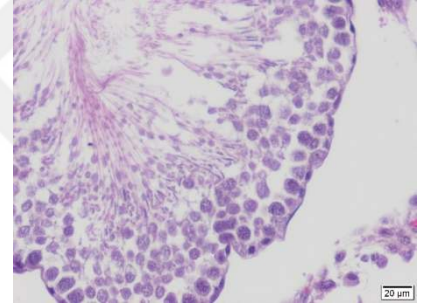
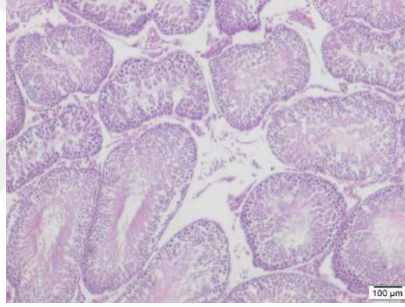
6.2.2 Seminifer Tübül Çapı

Kontrole kıyasla, diyabet grubunda, tübül çaplarının azaldığı görüldü (Resim 6.2).

ND

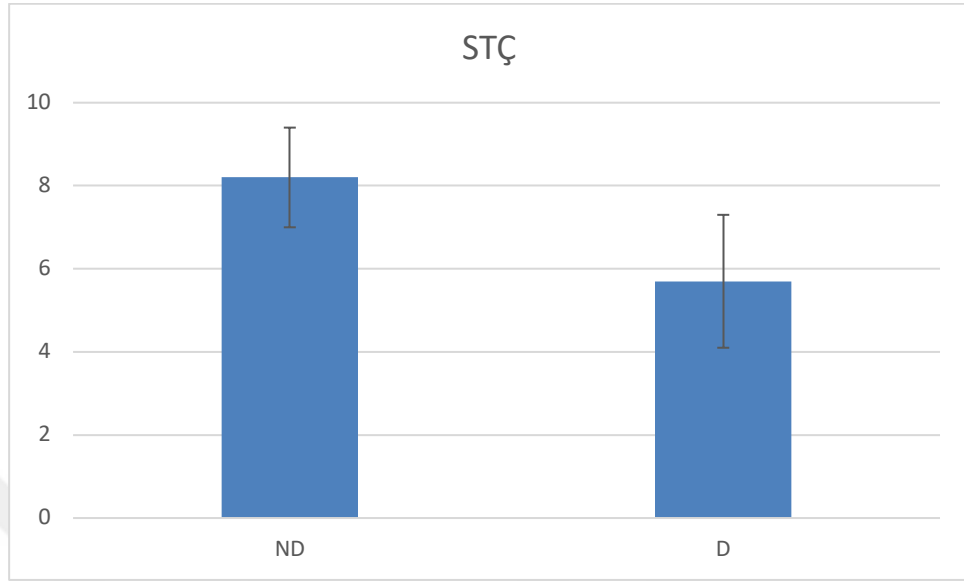


D



Resim 6.2. Seminifer Tübül Çapı

Kontrole kıyasla, diyabet grubunda, tübül çaplarının azaldığı istatistiksel olarak anlamlılık bulundu (Şekil 6.8).



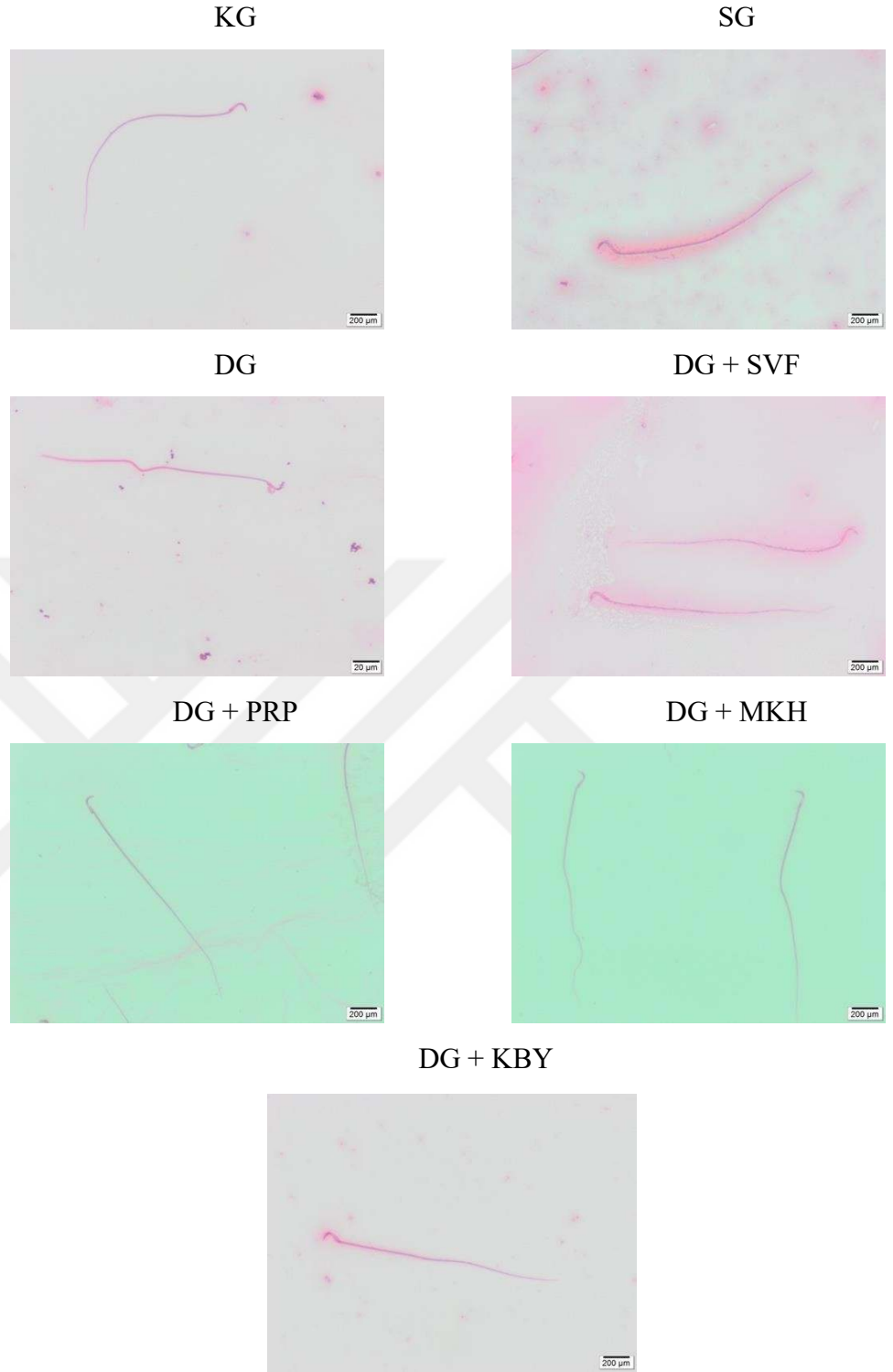
Şekil 6.8. Seminifer Tübül apı.

6.3 Tekli Uygulamaların Bulguları

Bu çalışmada sağlıklı hayvanlardan alınan spermelerde kültür ortamında yüksek glikozlu besiyeri kullanılarak DB hasar oluşturuldu. Spermilere MKH, 48 saatlik salgıladıkları faktörler olan KBY ve PRP ile desteklenmiş SVF uygulamaları yapılarak deneysel diyabetik modelde sperm hasarının azaltılması incelendi.

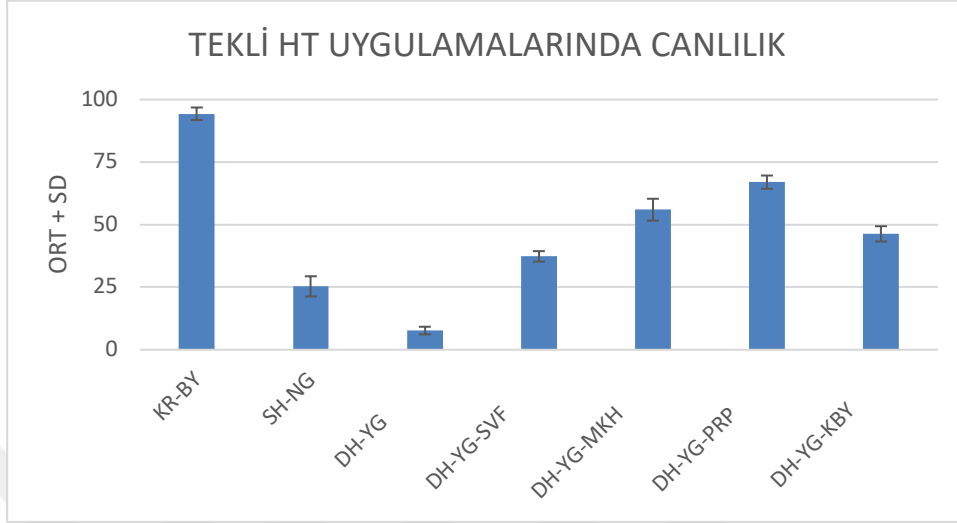
6.3.1 Tekli Uygulamaların Canlılık Bulguları

Canlılık değerlendirmesi Eozin Y ile yapıldı. KG grubuna göre DG canlılığı 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde azaldı. Tekli uygulamaların anlamlı olarak canlılığı koruduğu saptandı (Resim 6.3).



Resim 6.3. Tekli HT uygulamaları için canlılık boyaması.

Yapılan tekli uygulamaların etkinlik açısından PRP>MKH>KBY>SVF şeklinde canlılığı koruduğu saptandı (Şekil 6.9).



Şekil 6.9. Tekli HT uygulamaları için canlılık testi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DH-YG-SVF (DG-SVF), DH-YG-MKH (DG-MKH), DH-YG-PRP (DG-PRP), DH-YG-KBY (DG-KBY).

Tablo 6.2. Tekli HT uygulamaları için canlılık testi.

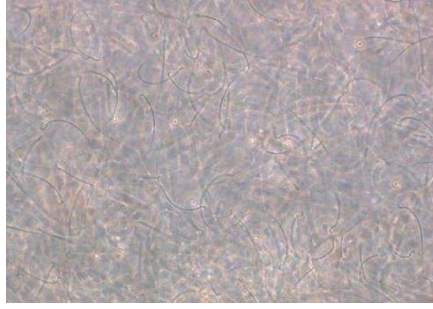
Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	69.000	39.320 ***	P<0.001
KR-BY vs DH-YG	86.667	49.388 ***	P<0.001
KR-BY vs DH-YG-SVF	57.000	32.482 ***	P<0.001
KR-BY vs DH-YG-MKH	38.333	21.845 ***	P<0.001
KR-BY vs DH-YG-PRP	27.333	15.576 ***	P<0.001
KR-BY vs DH-YG-KBY	48.000	27.353 ***	P<0.001
SH-NG vs DH-YG	17.667	10.068 ***	P<0.001
SH-NG vs DH-YG-SVF	-12.000	6.838 **	P<0.01
SH-NG vs DH-YG-MKH	-30.667	17.476 ***	P<0.001
SH-NG vs DH-YG-PRP	-41.667	23.744 ***	P<0.001
SH-NG vs DH-YG-KBY	-21.000	11.967 ***	P<0.001
DH-YG vs DH-YG-SVF	-29.667	16.906 ***	P<0.001
DH-YG vs DH-YG-MKH	-48.333	27.543 ***	P<0.001

DH-YG vs DH-YG-PRP	-59.333	33.812	***	P<0.001
DH-YG vs DH-YG-KBY	-38.667	22.035	***	P<0.001
DH-YG-SVF vs DH-YG-MKH	-18.667	10.637	***	P<0.001
DH-YG-SVF vs DH-YG-PRP	-29.667	16.906	***	P<0.001
DH-YG-SVF vs DH-YG-KBY	-9.000	5.129	*	P<0.05
DH-YG-MKH vs DH-YG-PRP	-11.000	6.268	**	P<0.01
DH-YG-MKH vs DH-YG-KBY	9.667	5.509	*	P<0.05
DH-YG-PRP vs DH-YG-KBY	20.667	11.777	***	P<0.001

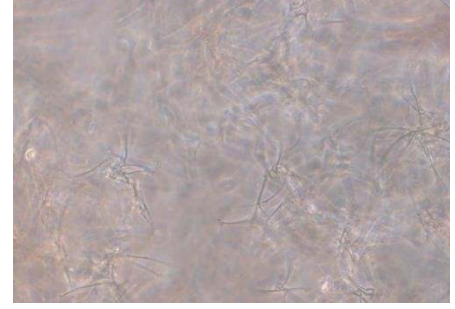
6.3.2 Tekli Uygulamaların Hareket Bulguları

Faz kontrast mikroskobu ile yapılan hareket değerlendirmesinde. KG grubuna göre DG hareketi 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde azaldı. Tekli uygulamaların anlamlı olarak hareketi koruduğu saptandı (Resim 6.4).

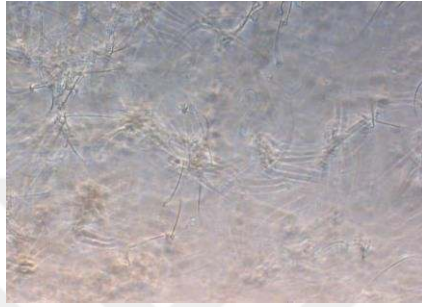
KG



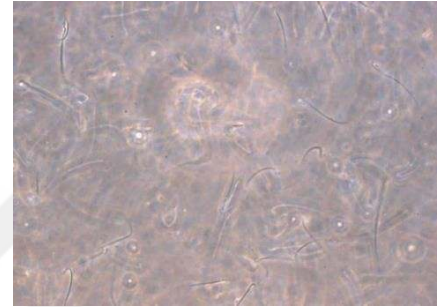
SG



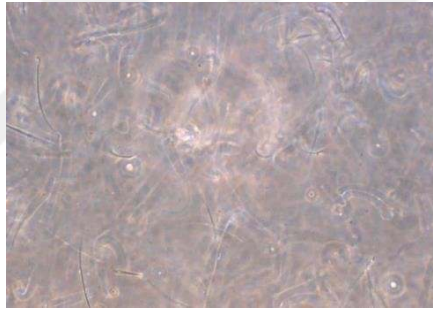
DG



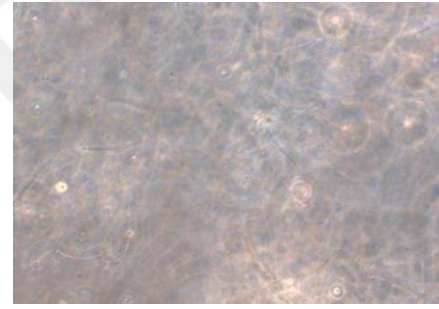
DG + SVF



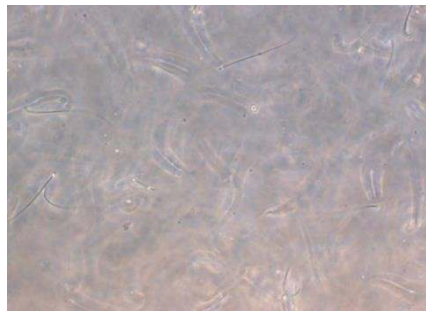
DG + PRP



DG + MKH

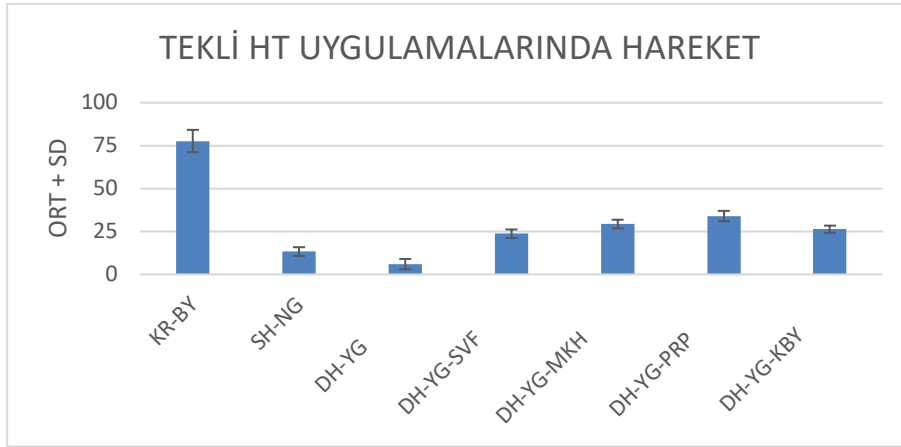


DG + KBY



Resim 6.4. Tekli HT uygulamaları için hareketliliğin faz kontrast görüntüleri.

Yapılan tekli uygulamaların etkinlik açısından PRP>MKH>SVF>KBY şeklinde hareketliliği koruduğu saptandı (Şekil 6.10).



Şekil 6.10. Tekli HT uygulamaları için hareketlilik testi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DH-YG-SVF (DG-SVF), DH-YG-MKH (DG-MKH), DH-YG-PRP (DG-PRP), DH-YG-KBY (DG-KBY).

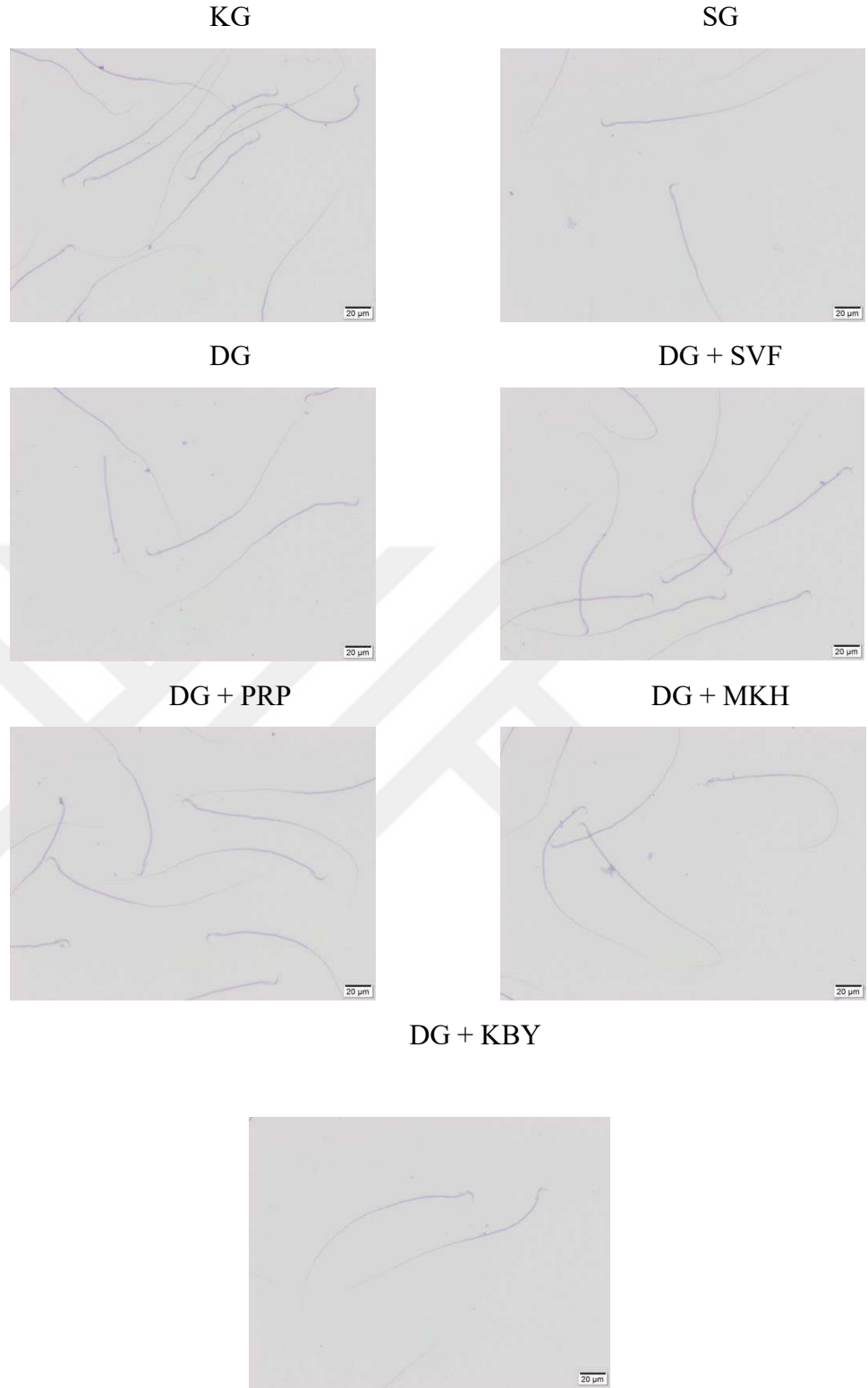
Tablo 6.3. Tekli HT uygulamaları için hareketlilik testi.

Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	64.333	32.231 ***	P<0.001
KR-BY vs DH-YG	71.667	35.905 ***	P<0.001
KR-BY vs DH-YG-SVF	54.000	27.054 ***	P<0.001
KR-BY vs DH-YG-MKH	48.333	24.215 ***	P<0.001
KR-BY vs DH-YG-PRP	43.667	21.877 ***	P<0.001
KR-BY vs DH-YG-KBY	51.333	25.718 ***	P<0.001
SH-NG vs DH-YG-SVF	-10.333	5.177 *	P<0.05
SH-NG vs DH-YG-MKH	-16.000	8.016 ***	P<0.001
SH-NG vs DH-YG-PRP	-20.667	10.354 ***	P<0.001
SH-NG vs DH-YG-KBY	-13.000	6.513 **	P<0.01
DH-YG vs DH-YG-SVF	-17.667	8.851 ***	P<0.001
DH-YG vs DH-YG-MKH	-23.333	11.690 ***	P<0.001
DH-YG vs DH-YG-PRP	-28.000	14.028 ***	P<0.001
DH-YG vs DH-YG-KBY	-20.333	10.187 ***	P<0.001
DH-YG-SVF vs DH-YG-PRP	-10.333	5.177 *	P<0.05

6.3.3 Tekli Uygulamaların Morfoloji Bulguları

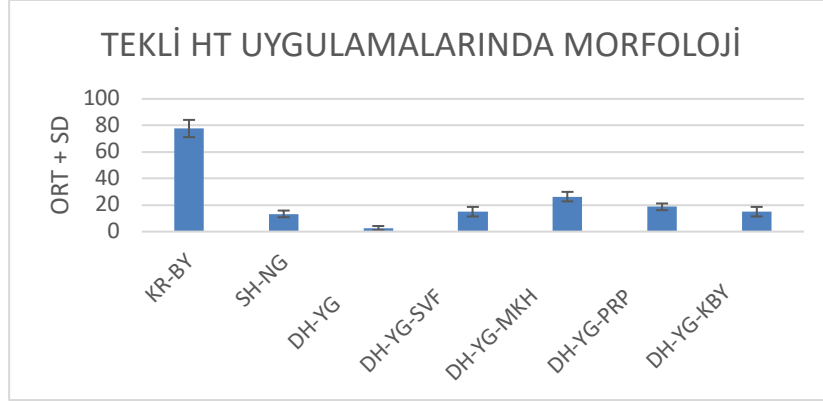
Morfoloji değerlendirmesi **Diff Quick** ile yapıldı. KG grubunda saptanan normal morfolojinin DG ile 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde bozulduğu görüldü. Tekli uygulamaların anlamlı bir şekilde morfolojiyi koruduğu saptandı (Resim 6.5).





Resim 6.5. Tekli HT uygulamalarında Diff Quick ile yapılan morfoloji değerlendirmesi.

Yapılan uygulamalarda sırası ile tekli uygulamaların MKH>KBY>PRP>SVF şekilde morfolojiyi koruduğu saptandı (Şekil 6.11). Örnekler arasında morfoloji değerlendirmesinde oldukça anlamlı($p<0,001$) farklılığın olduğu görüldü.



Şekil 6.11. Tekli HT uygulamaları için morfoloji değerlendirmesi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DH-YG-SVF (DG-SVF), DH-YG-MKH (DG-MKH), DH-YG-PRP (DG-PRP), DH-YG-KBY (DG-KBY).

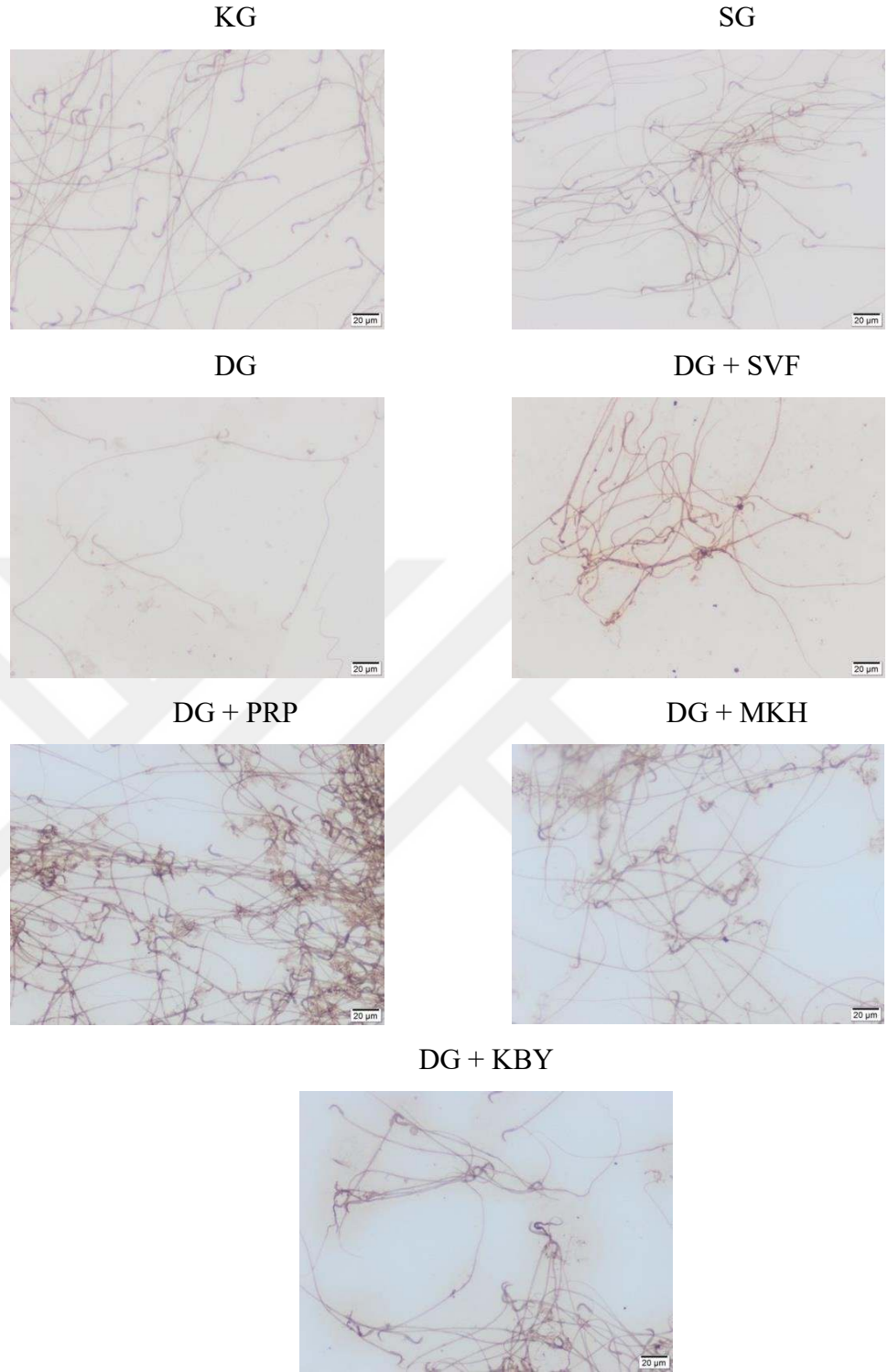
Tablo 6.4. Tekli HT uygulamaları için morfoloji değerlendirmesi

Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	64.333	31.607 ***	$P<0.001$
KR-BY vs DH-YG	75.000	36.848 ***	$P<0.001$
KR-BY vs DH-YG-SVF	62.667	30.788 ***	$P<0.001$
KR-BY vs DH-YG-MKH	51.333	25.220 ***	$P<0.001$
KR-BY vs DH-YG-PRP	59.000	28.987 ***	$P<0.001$
KR-BY vs DH-YG-KBY	55.000	27.022 ***	$P<0.001$
SH-NG vs DH-YG	10.667	5.241 *	$P<0.05$
SH-NG vs DH-YG-MKH	-13.000	6.387 **	$P<0.01$
DH-YG vs DH-YG-SVF	-12.333	6.059 *	$P<0.05$
DH-YG vs DH-YG-MKH	-23.667	11.628 ***	$P<0.001$
DH-YG vs DH-YG-PRP	-16.000	7.861 **	$P<0.01$
DH-YG vs DH-YG-KBY	-20.000	9.826 ***	$P<0.001$
DH-YG-SVF vs DH-YG-MKH	-11.333	5.568 *	$P<0.05$

6.3.4 Tekli Uygulamaların eNOS İmmunohistokimyasal Bulguları

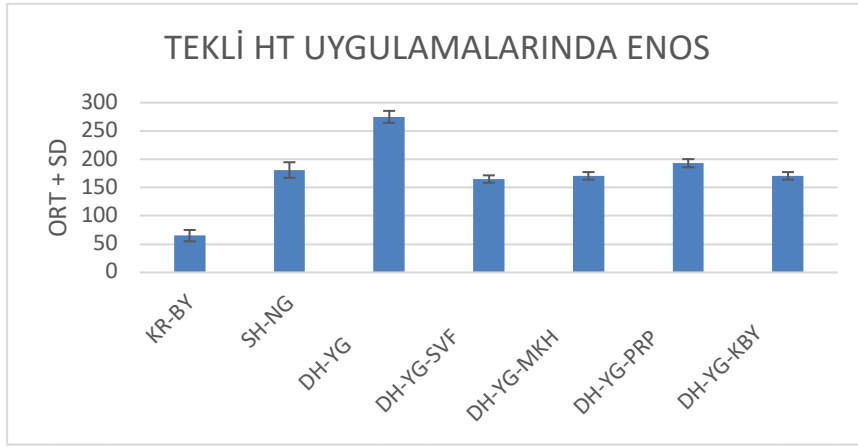
Oksidatif stres değerlendirmesi eNOS İHK ile yapıldı. KG saptanan stresin DG ile 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. Tekli uygulamaların anlamlı bir şekilde oksidatif stresten koruduğu saptandı (Resim 6.6).





Resim 6.6. Tekli HT uygulamalarında Oksidatif stresin eNOS ile değ erlendirmesi.

Yapılan h-skor ile uygulamalarda sırası ile tekli uygulamaların SVF >MKH> PRP>KBY şekilde oksidatif stresi azalttığı saptandı (Şekil 6.12).



Şekil 6.12. Tekli HT uygulamalarında h-skor ile eNOS İHK değerlendirmesi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DH-YG-SVF (DG-SVF), DH-YG-MKH (DG-MKH), DH-YG-PRP (DG-PRP), DH-YG-KBY (DG-KBY).

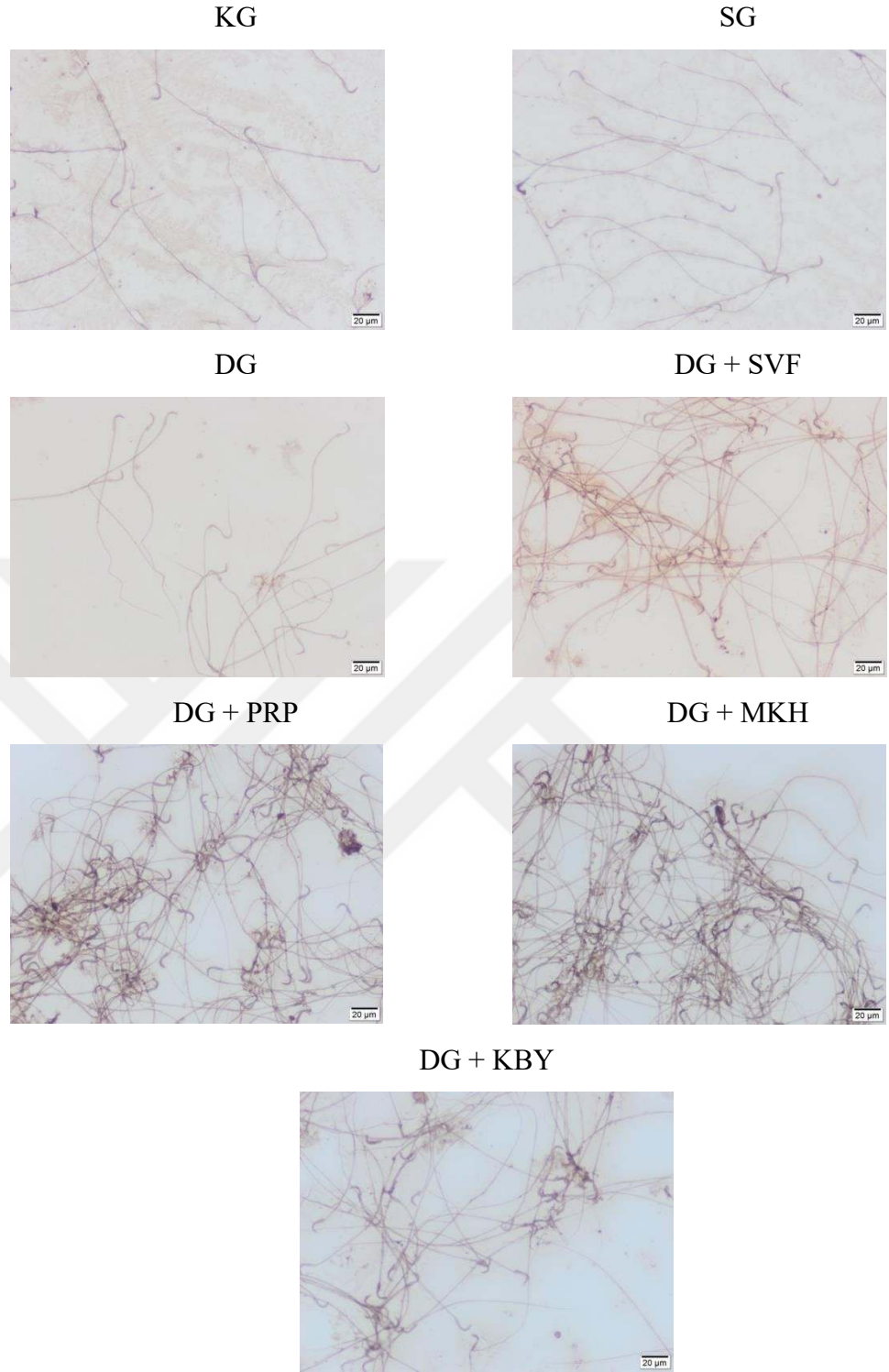
Tablo 6.5. Tekli HT uygulamalarında h-skor ile eNOS İHK değerlendirmesi.

Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	-116.00	22.041	*** P<0.001
KR-BY vs DH-YG	-210.00	39.902	*** P<0.001
KR-BY vs DH-YG-SVF	-100.00	19.001	*** P<0.001
KR-BY vs DH-YG-MKH	-116.67	22.168	*** P<0.001
KR-BY vs DH-YG-PRP	-128.00	24.321	*** P<0.001
KR-BY vs DH-YG-KBY	-105.67	20.078	*** P<0.001
SH-NG vs DH-YG	-94.000	17.861	*** P<0.001
DH-YG vs DH-YG-SVF	110.00	20.901	*** P<0.001
DH-YG vs DH-YG-MKH	93.333	17.734	*** P<0.001
DH-YG vs DH-YG-PRP	82.000	15.581	*** P<0.001
DH-YG vs DH-YG-KBY	104.33	19.824	*** P<0.001
DH-YG-SVF vs DH-YG-PRP	-28.000	5.320	* P<0.05

6.3.5 Tekli Uygulamaların iNOS İmmunohistokimyasal Bulguları

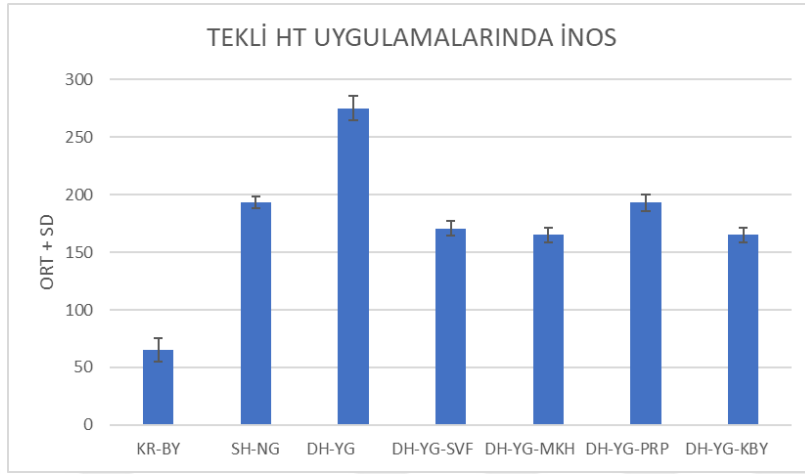
Oksidatif stres değerlendirmesi **iNOS İHK** ile yapıldı. KG saptanan stresin DG 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. Tekli uygulamaların anlamlı bir şekilde oksidatif stresten koruduğu saptandı (Resim 6.7).





Resim 6.7. Tekli HT uygulamalarında Oksidatif stresin iNOS ile değ erlendirmesi.

Yapılan h-skor ile uygulamalarda sırası ile tekli uygulamaların PRP >SVF> MKH>KBY anlamlı bir şekilde oksidatif stresi azalttığı saptandı (Şekil 6.13).



Şekil 6.13. Tekli HT uygulamalarında h-skor ile iNOS İHK değerlendirmesi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DH-YG-SVF (DG-SVF), DH-YG-MKH (DG-MKH), DH-YG-PRP (DG-PRP), DH-YG-KBY (DG-KBY).

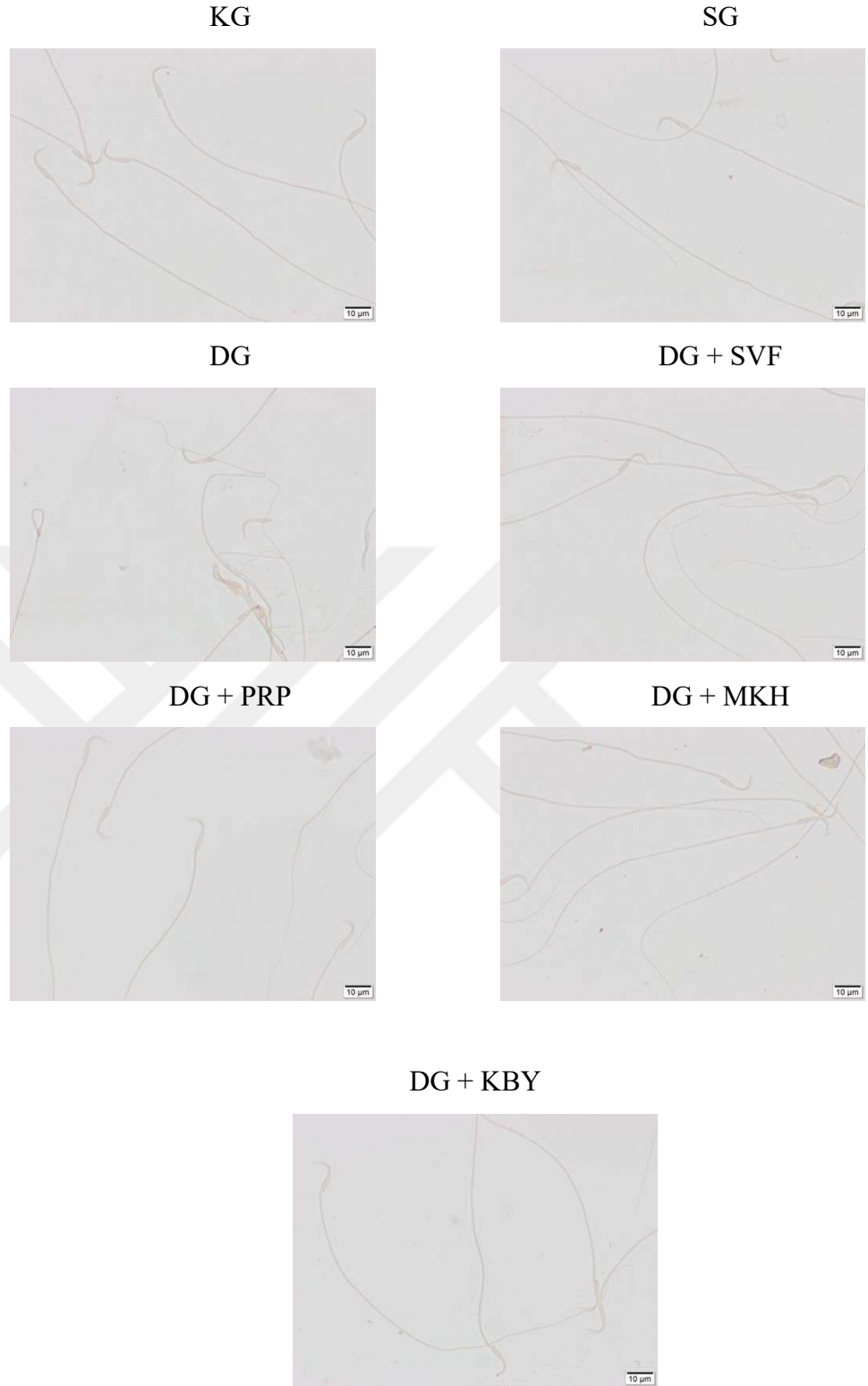
Tablo 6.6. Tekli HT uygulamalarında h-skor ile iNOS İHK değerlendirmesi.

Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	-138.33	31.006	*** P<0.001
KR-BY vs DH-YG	-220.00	49.311	*** P<0.001
KR-BY vs DH-YG-SVF	-115.67	25.926	*** P<0.001
KR-BY vs DH-YG-MKH	-126.67	28.391	*** P<0.001
KR-BY vs DH-YG-PRP	-138.00	30.931	*** P<0.001
KR-BY vs DH-YG-KBY	-110.00	24.656	*** P<0.001
SH-NG vs DH-YG	-81.667	18.305	*** P<0.001
SH-NG vs DH-YG-SVF	22.667	5.081	* P<0.05
SH-NG vs DH-YG-KBY	28.333	6.351	** P<0.01
DH-YG vs DH-YG-SVF	104.33	23.385	*** P<0.001
DH-YG vs DH-YG-MKH	93.333	20.920	*** P<0.001
DH-YG vs DH-YG-PRP	82.000	18.380	*** P<0.001
DH-YG vs DH-YG-KBY	110.00	24.656	*** P<0.001
DH-YG-SVF vs DH-YG-PRP	-22.333	5.006	* P<0.05
DH-YG-PRP vs DH-YG-KBY	28.000	6.276	** P<0.01

6.3.6 TUNEL işaretleme

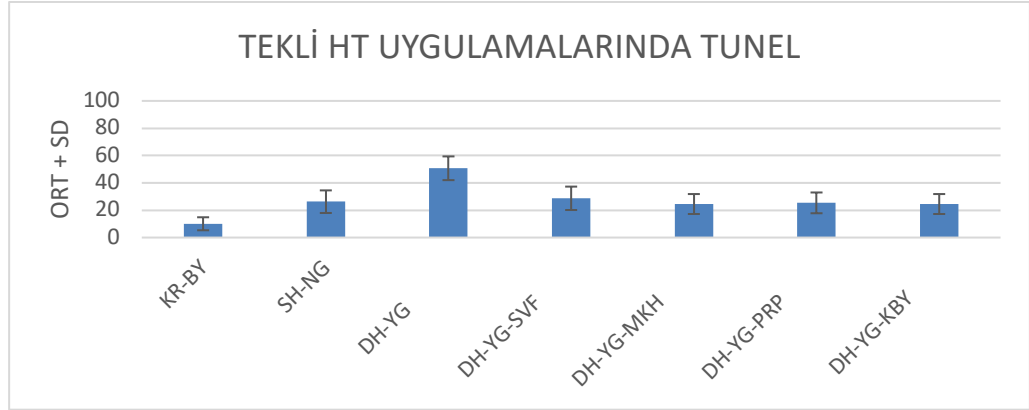
Apoptoz değerdendirmesi **TUNEL işaretleme** ile yapıldı. KG saptanan apoptozun DG ile 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. Tekli uygulamaların anlamlı bir şekilde apoptozu azalttığı saptandı (Resim 6.8).





Resim 6.8. Tekli HT uygulamalarında Apoptozun TUNEL işaretlemeesi ile değerdendirmesi.

Yapılan apoptotik indeks ile uygulamalarda sırası ile tekli uygulamaların SVF>PRP>MKH>KBY şekilde apoptozu anlamlı olarak azalttığı saptandı (Şekil 6.14).



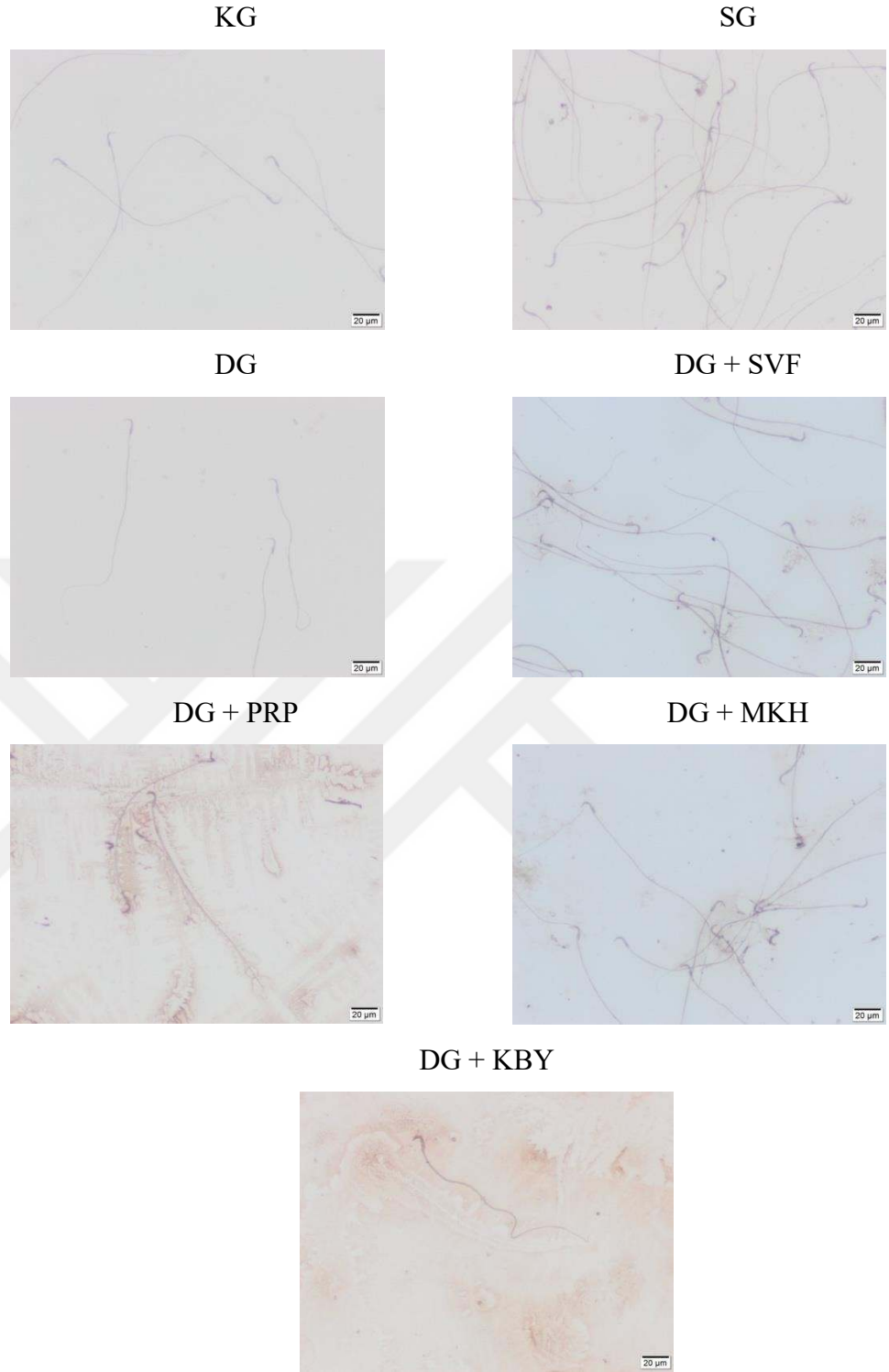
Şekil 6.14. Tekli HT uygulamalarında Apoptotik indeks ile TUNEL değerlendirmesi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DH-YG-SVF (DG-SVF), DH-YG-MKH (DG-MKH), DH-YG-PRP (DG-PRP), DH-YG-KBY (DG-KBY).

Tablo 6.7. Tekli HT uygulamalarında apoptotik indeks ile TUNEL değerlendirmesi.

Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs DH-YG	-40.617	9.122	*** P<0.001
SH-NG vs DH-YG	-24.450	5.491	* P<0.05
DH-YG vs DH-YG-SVF	21.983	4.937	* P<0.05
DH-YG vs DH-YG-MKH	23.667	5.315	* P<0.05
DH-YG vs DH-YG-PRP	25.317	5.686	* P<0.05
DH-YG vs DH-YG-KBY	26.167	5.877	* P<0.05

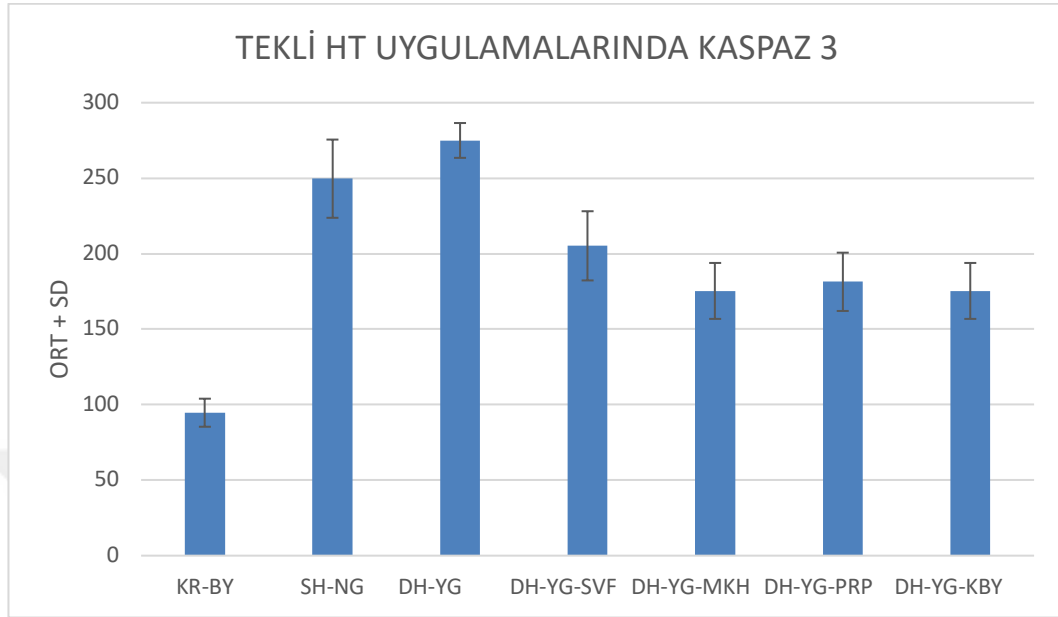
6.3.7 Tekli Uygulamaların Caspase 3 İmmunohistokimyasal Bulguları

Apoptoz değerlendirmesi **Caspase 3 İHK** ile yapıldı. KG grubunda saptanan apoptozun DG ile 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. Tekli uygulamaların anlamlı bir şekilde apoptozu azalttığı saptandı (Resim 6.9).



Resim 6.9. Tekli HT uygulamalarında Apoptozun kaspaz 3 ile değ erlendirmesi.

Yapılan h-skor ile uygulamalarda sırası ile tekli uygulamaların SVF> PRP MKH>KBY olacak şekilde apoptozu azalttığı saptandı (Şekil 6.15).



Şekil 6.15. Tekli HT uygulamalarında kaspaz 3 İHK değerlendirmesi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DH-YG-SVF (DG-SVF), DH-YG-MKH (DG-MKH), DH-YG-PRP (DG-PRP), DH-YG-KBY (DG-KBY).

Tablo 6.8. Tekli HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 3 İHK değerlendirmesi.

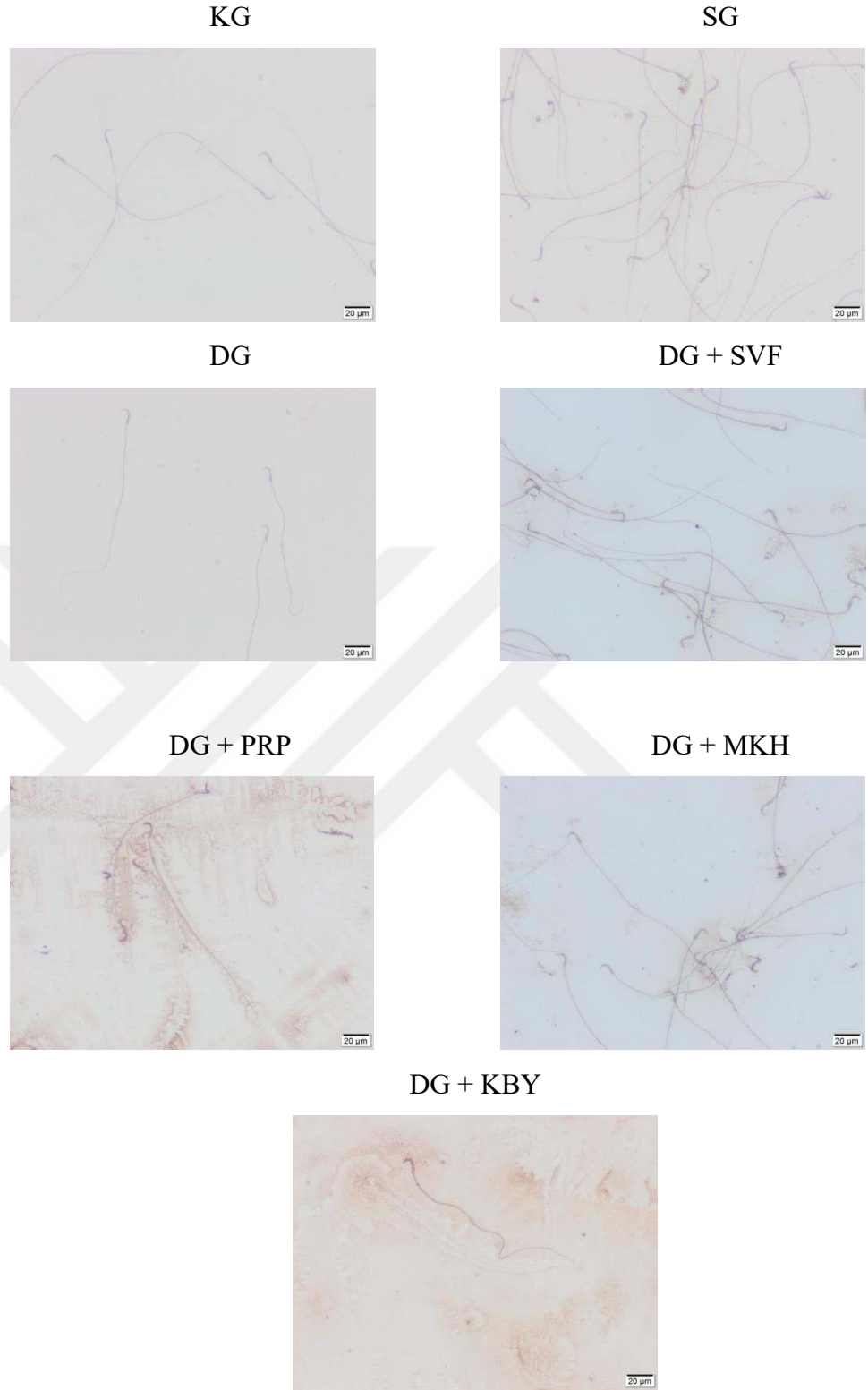
Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	-155.00	13.971	*** P<0.001
KR-BY vs DH-YG	-180.33	16.254	*** P<0.001
KR-BY vs DH-YG-SVF	-110.53	9.963	*** P<0.001
KR-BY vs DH-YG-MKH	-98.467	8.875	*** P<0.001
KR-BY vs DH-YG-PRP	-86.700	7.815	** P<0.01
KR-BY vs DH-YG-KBY	-80.667	7.271	** P<0.01
SH-NG vs DH-YG-MKH	56.533	5.096	* P<0.05
SH-NG vs DH-YG-PRP	68.300	6.156	** P<0.01
SH-NG vs DH-YG-KBY	74.333	6.700	** P<0.01
DH-YG vs DH-YG-SVF	69.800	6.291	** P<0.01
DH-YG vs DH-YG-MKH	81.867	7.379	** P<0.01

DH-YG vs DH-YG-PRP	93.633	8.440 ***	P<0.001
DH-YG vs DH-YG-KBY	99.667	8.983 ***	P<0.001

6.3.8 Tekli Uygulamaların Caspase 8 İmmunohistokimyasal Bulguları

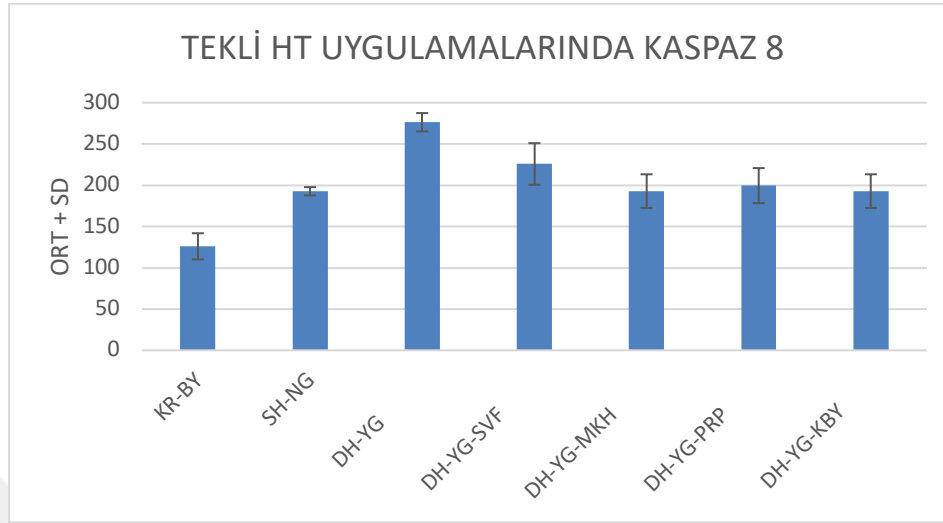
Apoptoz değerlendirmesi **Caspase 8 İHK** ile yapıldı. KG grubunda saptanan apoptozun DG ile 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. Tekli uygulamaların anlamlı bir şekilde apoptozu azalttığı saptandı (Resim 6.10).





Resim 6.10. Tekli HT uygulamalarında Apoptozun kaspaz 8 ile yapılan değerlendirmesi.

Yapılan h-skor ile uygulamalarda sırası ile tekli uygulamaların SVF> PRP MKH> >KBY olacak şekilde apoptozu azalttığı saptandı (Şekil 6.16).



Şekil 6.16. Tekli HT uygulamalarında kaspaz 8 İHK değerlendirmesi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DH-YG-SVF (DG-SVF), DH-YG-MKH (DG-MKH), DH-YG-PRP (DG-PRP), DH-YG-KBY (DG-KBY).

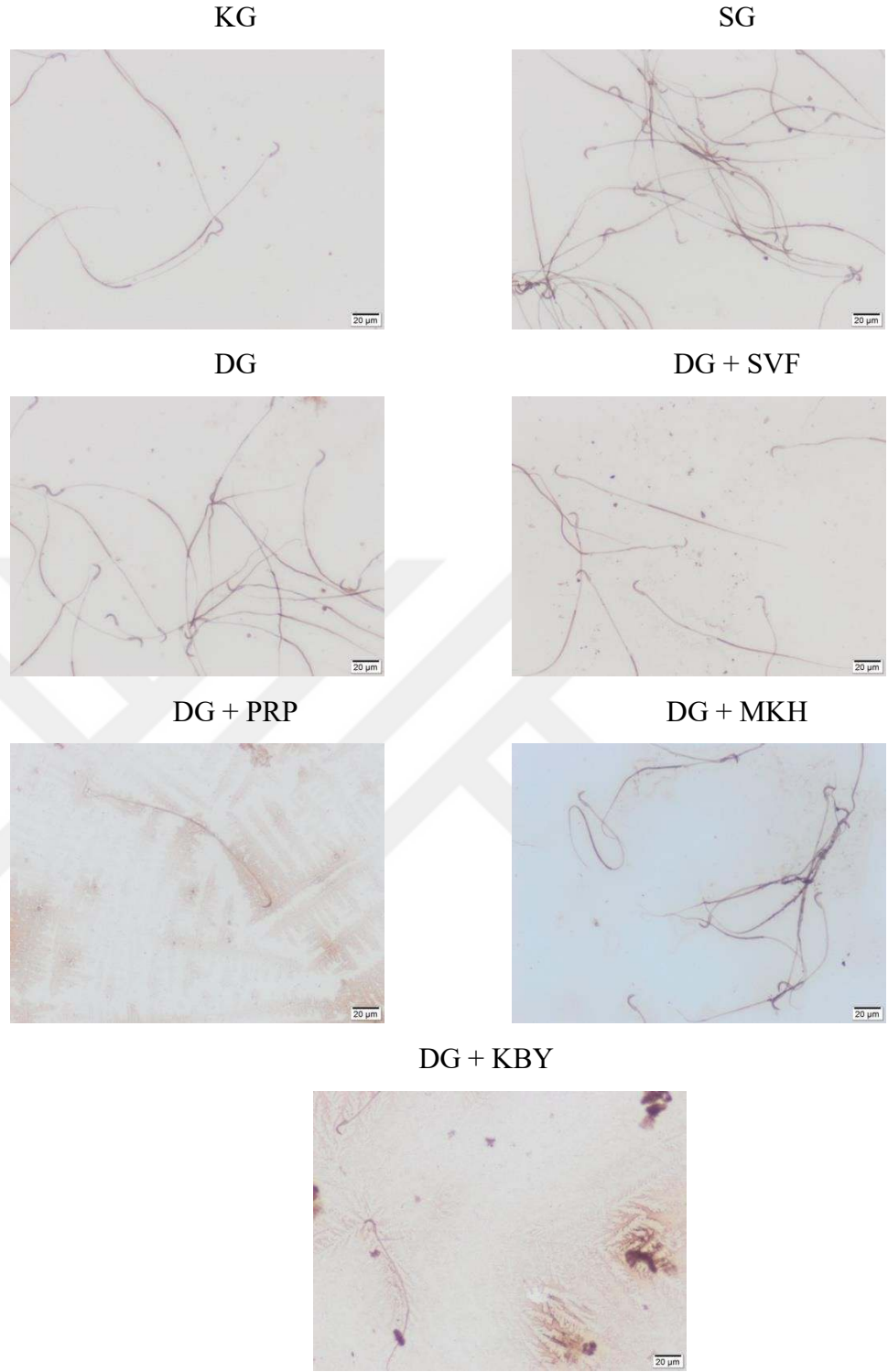
Tablo 6.9. Tekli HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 8 İHK değerlendirmesi.

Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	-66.717	6.178	** P<0.01
KR-BY vs DH-YG	-150.38	13.925	*** P<0.001
KR-BY vs DH-YG-SVF	-99.770	9.238	*** P<0.001
KR-BY vs DH-YG-MKH	-86.497	8.009	*** P<0.001
KR-BY vs DH-YG-PRP	-73.553	6.811	** P<0.01
KR-BY vs DH-YG-KBY	-66.917	6.196	** P<0.01
SH-NG vs DH-YG	-83.667	7.747	** P<0.01
DH-YG vs DH-YG-MKH	63.887	5.916	* P<0.05
DH-YG vs DH-YG-PRP	76.830	7.114	** P<0.01
DH-YG vs DH-YG-KBY	83.467	7.729	** P<0.01

6.3.9 Tekli Uygulamaların Caspase 9 İmmunohistokimyasal Bulguları

Apoptoz değerlendirmesi **Caspase 9 İHK** ile yapıldı. KG grubunda saptanan apoptozun DG ile 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. Tekli uygulamaların anlamlı bir şekilde apoptozu azalttığı saptandı (Resim 6.11).

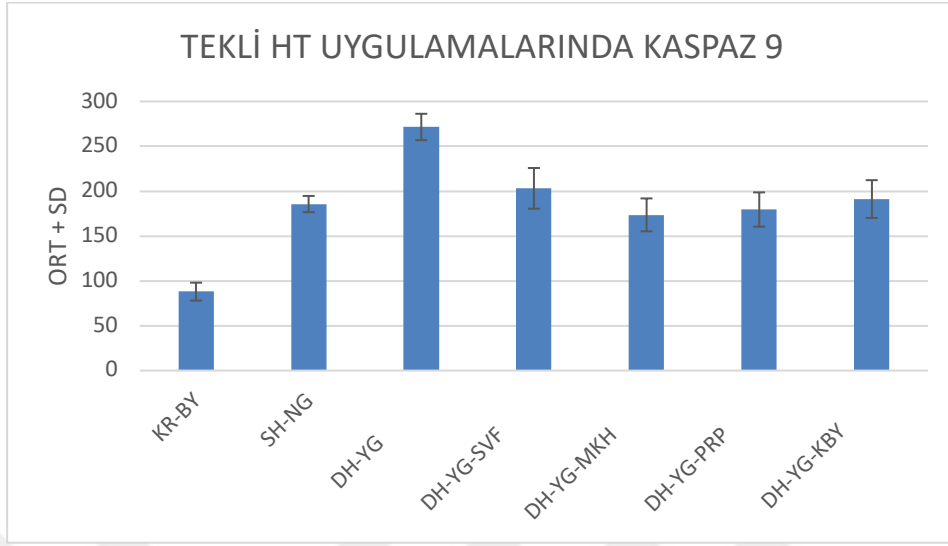




Resim 6.11. Tekli HT uygulamalarında Apoptozun kaspaz 9 ile değ erlendirmesi.

Yapılan h-skor ile uygulamalarda sırası ile tekli uygulamaların SVF> PRP

MKH> >KBY olacak şekilde apoptozu azalttığı saptandı (Şekil 6.17).



Şekil 6.17. Tekli HT uygulamalarında kaspaz 9 İHK değerlendirilmesi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DH-YG-SVF (DG-SVF), DH-YG-MKH (DG-MKH), DH-YG-PRP (DG-PRP), DH-YG-KBY (DG-KBY).

Tablo 6.10. Tekli HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 9 İHK değerlendirilmesi

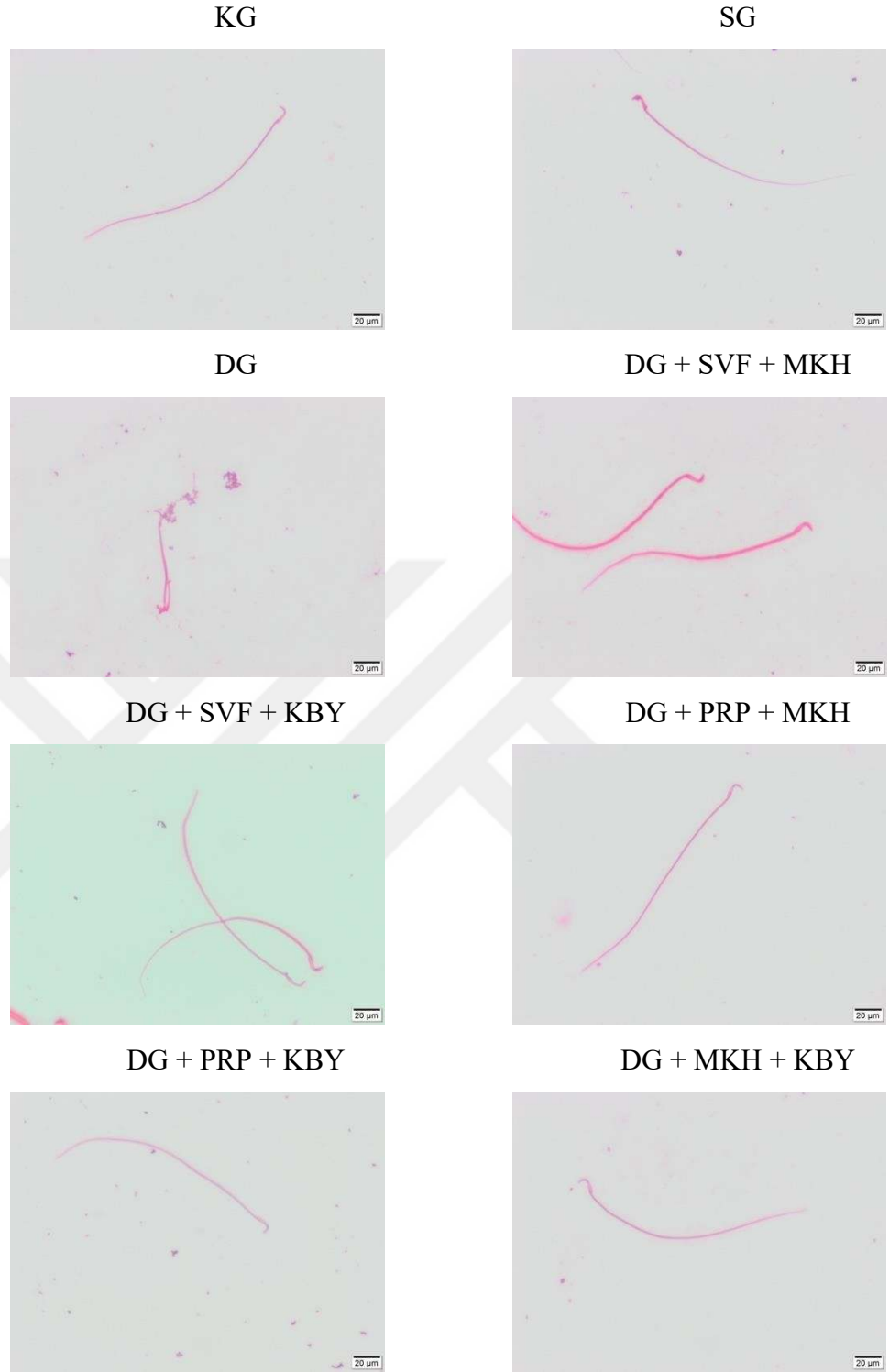
Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	-97.667	9.867 ***	P<0.001
KR-BY vs DH-YG	-183.61	18.550 ***	P<0.001
KR-BY vs DH-YG-SVF	-115.15	11.634 ***	P<0.001
KR-BY vs DH-YG-MKH	-85.580	8.646 ***	P<0.001
KR-BY vs DH-YG-PRP	-91.553	9.250 ***	P<0.001
KR-BY vs DH-YG-KBY	-103.20	10.427 ***	P<0.001
SH-NG vs DH-YG	-85.942	8.683 ***	P<0.001
DH-YG vs DH-YG-SVF	68.461	6.917 **	P<0.01
DH-YG vs DH-YG-MKH	98.029	9.904 ***	P<0.001
DH-YG vs DH-YG-PRP	92.056	9.301 ***	P<0.001
DH-YG vs DH-YG-KBY	80.407	8.124 ***	P<0.001

6.4 İkili Uygulamaların Bulguları

Bu çalışmada sağlıklı hayvanlardan alınan spermelerde kültür ortamında yüksek glikozlu besiyeri kullanılarak DB hasar oluşturuldu. Spermere MKH, 48 saatlik salgıladıkları faktörler olan KBY ve PRP ile desteklenmiş SVF uygulamaları yapılarak deneysel diyabetik modelde sperm hasarının azaltılması amaçlandı.

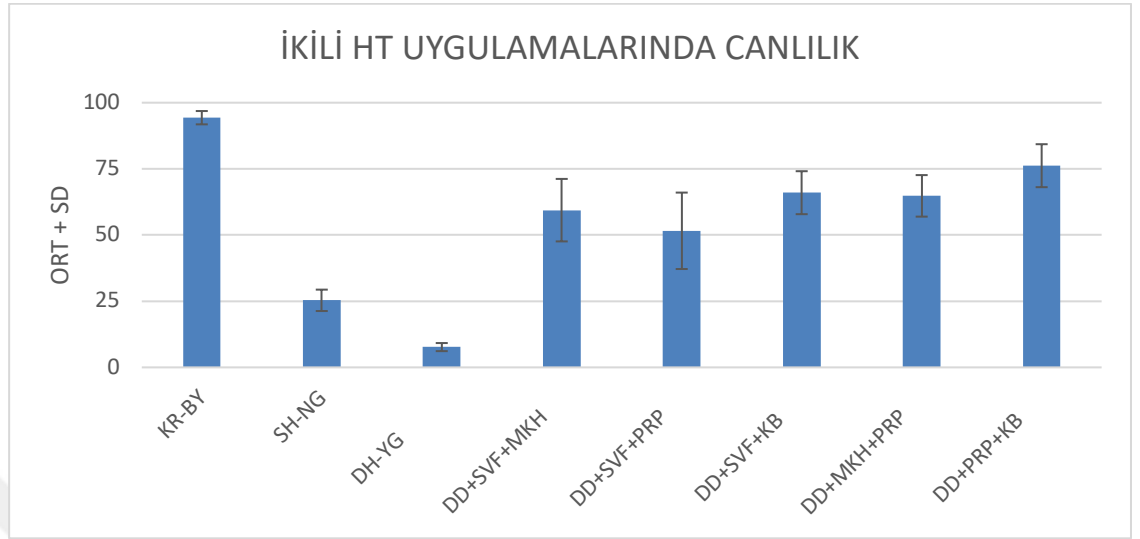
6.4.1 İkili Uygulamaların Canlılık Bulguları

Canlılık değerlendirmesi Eozin Y ile yapıldı. KG grubuna göre DG canlılığı 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde azaldı. İkili uygulamaların anlamlı olarak canlılığı koruduğu saptandı (Resim 6.12).



Resim 6.12. İkili HT uygulamaları için canlılık boyaması.

Yapılan ikili uygulamaların etkinlik açısından PRP>MKH>SVF>KBY şeklinde canlılığı koruduğu saptandı (Şekil 6.18).



Şekil 6.18. İkili HT uygulamaları için canlılık testi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DD-SVF (DG+SVF), DD+SVF+MKH (DG+SVF+MKH), DD+SVF+MKH+PRP (DG+ SVF+MKH+PRP), DD+SVF+MKH+PRP+KBY (DG+ SVF+MKH+PRP+KBY), DD+PRP+KBY (DG+PRP+KBY).

Tablo 6.11. İkili HT uygulamaları için canlılık testi.

Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	69.000	32.230 ***	P<0.001
KR-BY vs DH-YG	86.667	40.482 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SVF+MKH	16.000	7.474 **	P<0.01
KR-BY vs DD+SVF+PRP	20.667	9.653 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SVF+KB	27.333	12.767 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+MKH+PRP	11.667	5.449 *	P<0.05
SH-NG vs DH-YG	17.667	8.252 ***	P<0.001
SH-NG vs DD+SVF+MKH	-53.000	24.756 ***	P<0.001
SH-NG vs DD+SVF+PRP	-48.333	22.576 ***	P<0.001
SH-NG vs DD+SVF+KB	-41.667	19.462 ***	P<0.001
SH-NG vs DD+MKH+PRP	-57.333	26.780 ***	P<0.001
SH-NG vs DD+PRP+KB	-58.667	27.403 ***	P<0.001

DH-YG vs DD+SVF+MKH	-70.667	33.008	***	P<0.001
DH-YG vs DD+SVF+PRP	-66.000	30.829	***	P<0.001
DH-YG vs DD+SVF+KB	-59.333	27.715	***	P<0.001
DH-YG vs DD+MKH+PRP	-75.000	35.032	***	P<0.001
DH-YG vs DD+PRP+KB	-76.333	35.655	***	P<0.001
DD+SVF+KB vs DD+MKH+PRP	-15.667	7.318	**	P<0.01
DD+SVF+KB vs DD+PRP+KB	-17.000	7.941	***	P<0.001

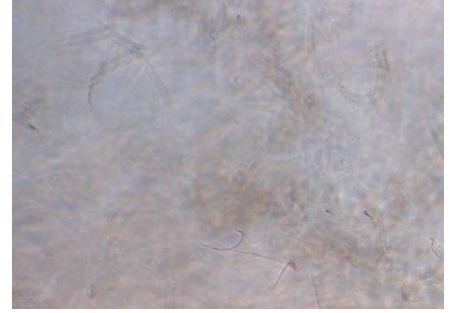
6.4.2 İkili Uygulamaların Hareket Bulguları

Faz kontrast mikroskobu ile yapılan hareket değerlendirmesinde. KG grubuna göre DG hareketi 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde azaldı. İkili uygulamaların anlamlı olarak hareketi koruduğu saptandı (Resim 6.13).

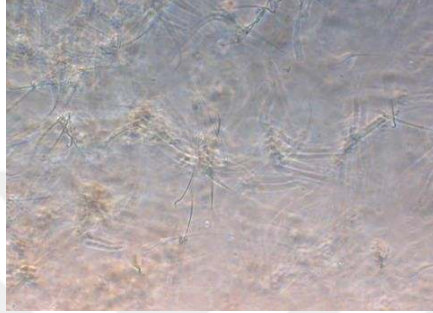
KG



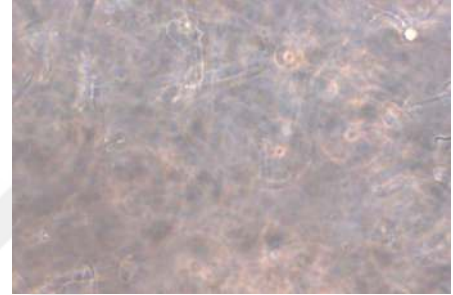
SG



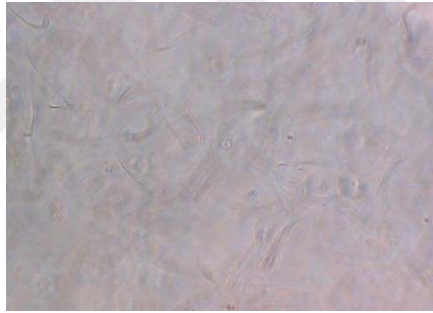
DG



DG + SVF + MKH



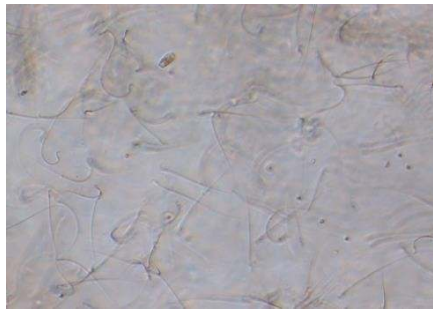
DG + SVF + KBY



DG + PRP + MKH



DG + PRP + KBY

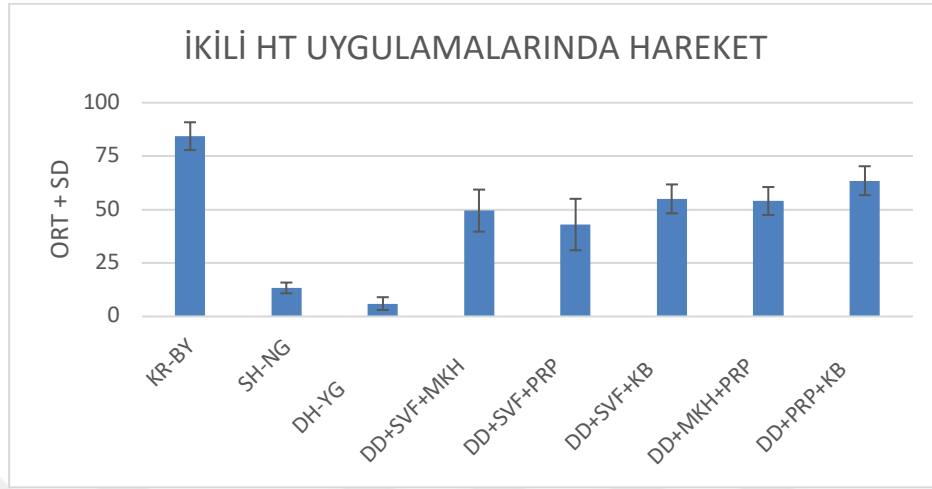


DG + MKH + KBY



Resim 6.13. İkili HT uygulamaları için hareketliliğin faz kontrast görüntüleri.

Yapılan ikili uygulamaların etkinlik açısından PRP>MKH>SVF>KBY şeklinde hareketliliği koruduğu saptandı (Şekil 6.19).



Şekil 6.19. İkili HT uygulamaları için hareket testi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DD+SVF+MKH (DG+SVF+MKH), DD+SVF+PRP (DG +SVF+PRP), DD+SVF+KBY (DG+SVF+KBY), DD+MKH+PRP (DG+MKH+PRP), DD+PRP+KBY (DG+PRP+KBY).

Tablo 6.12. İkili HT uygulamaları için hareketlilik testi.

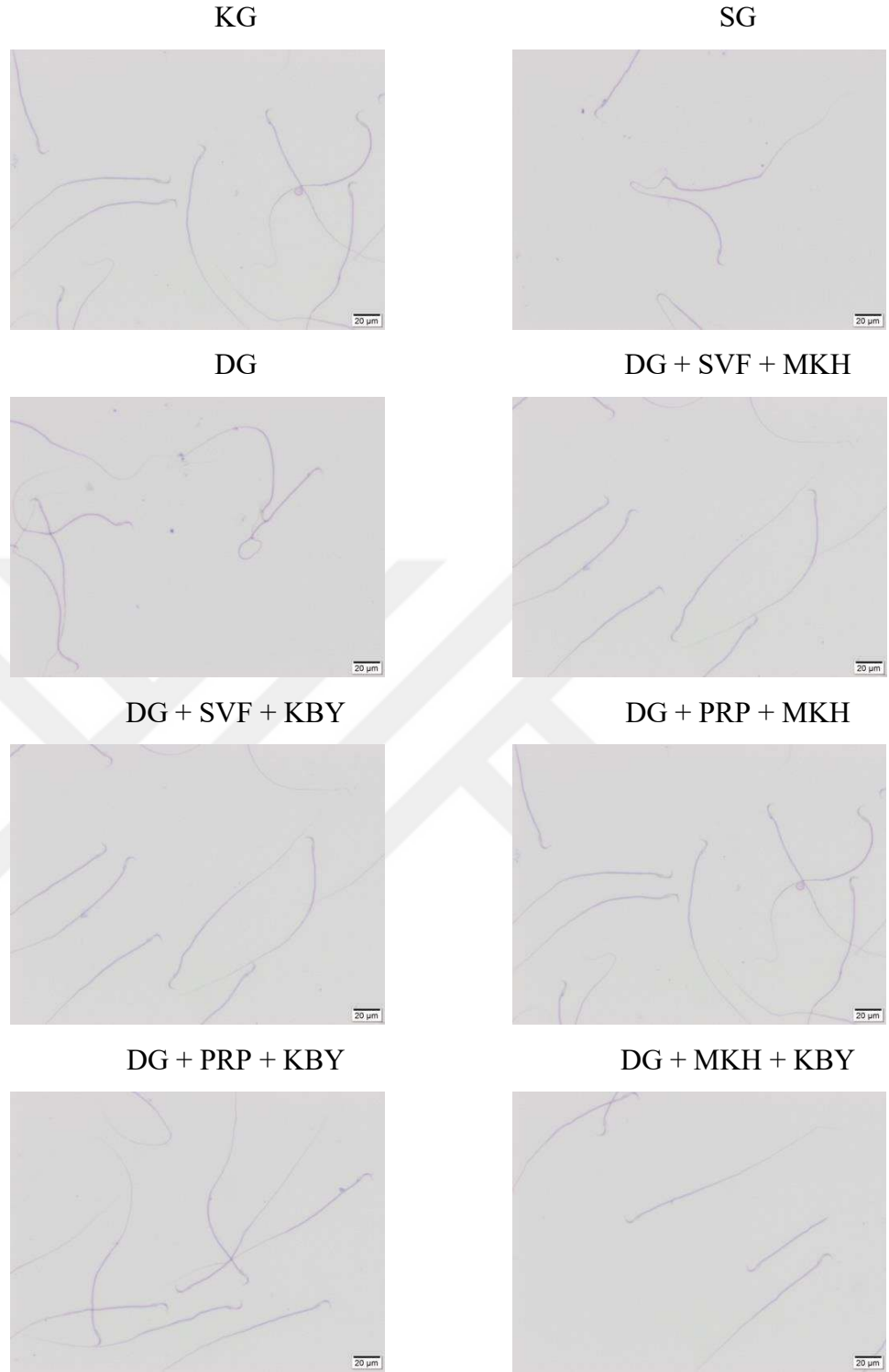
Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	71.000	16.707 ***	P<0.001
KR-BY vs DH-YG	78.333	18.433 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SVF+MKH	34.833	8.197 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SVF+PRP	41.333	9.726 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SVF+KB	29.333	6.903 **	P<0.01
KR-BY vs DD+MKH+PRP	30.333	7.138 **	P<0.01
KR-BY vs DD+PRP+KB	20.833	4.902 *	P<0.05
SH-NG vs DD+SVF+MKH	-36.167	8.511 ***	P<0.001
SH-NG vs DD+SVF+PRP	-29.667	6.981 **	P<0.01
SH-NG vs DD+SVF+KB	-41.667	9.805 ***	P<0.001
SH-NG vs DD+MKH+PRP	-40.667	9.570 ***	P<0.001
SH-NG vs DD+PRP+KB	-50.167	11.805 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+SVF+MKH	-43.500	10.236 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+SVF+PRP	-37.000	8.707 ***	P<0.001

DH-YG vs DD+SVF+KB	-49.000	11.531	***	P<0.001
DH-YG vs DD+MKH+PRP	-48.000	11.295	***	P<0.001
DH-YG vs DD+PRP+KB	-57.500	13.531	***	P<0.001

6.4.3 İkili Uygulamaların Morfoloji Değerlendirmesi

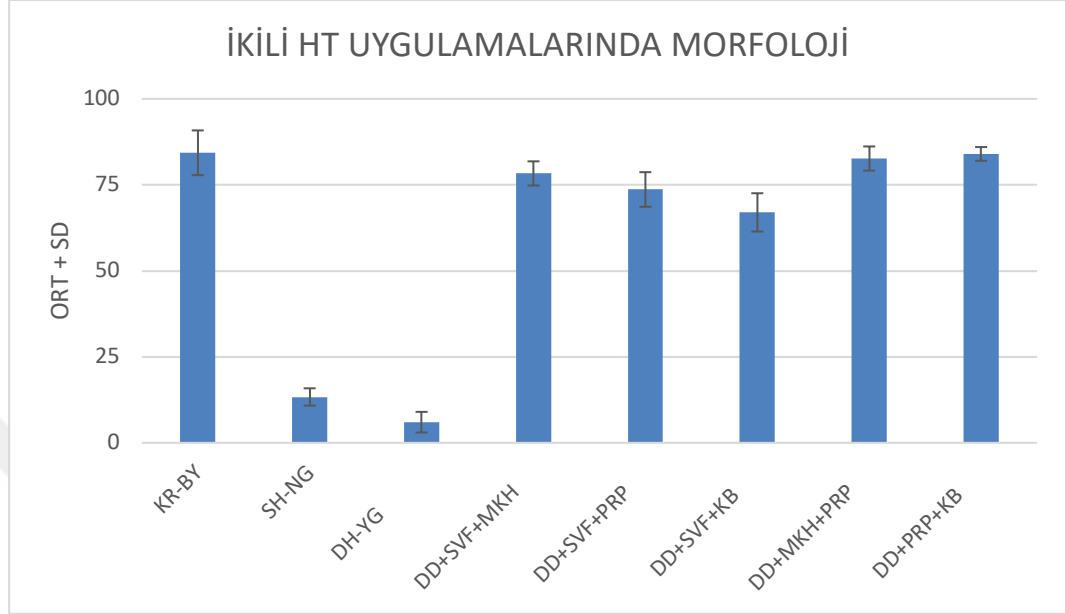
Morfoloji değerlendirmesi **Diff Quick** ile yapıldı. KG grubunda saptanan normal morfolojinin DG ile 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde bozulduğu görüldü. İkili uygulamaların anlamlı bir şekilde morfolojiyi koruduğu saptandı (Resim 6.14).





Resim 6.14. İkili HT uygulamalarında Diff Quick ile morfoloji değerlendirmesi.

Yapılan uygulamalarda sırası ile ikili uygulamaların PRP>MKH>SVF>KBY şeklinde morfolojiyi koruduğu saptandı (Şekil 6.20). Örnekler arasında morfoloji değerlendirmesinde oldukça anlamlı($p<0,001$) farklılığın olduğu görüldü.



Şekil 6.20. İkili HT uygulamaları için morfoloji değerlendirmesi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DD+SVF+MKH (DG+SVF+MKH), DD+SVF+PRP (DG+SVF+PRP), DD+SVF+KBY (DG+SVF+KBY), DD+MKH+PRP (DG+MKH+PRP), DD+PRP+KBY (DG+PRP+KBY).

Tablo 6.13. İkili HT uygulamaları için morfoloji değerlendirmesi.

Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	64.333	15.717 ***	$P<0.001$
KR-BY vs DH-YG	75.000	18.323 ***	$P<0.001$
KR-BY vs DD+SVF+MKH	29.817	7.284 **	$P<0.01$
KR-BY vs DD+SVF+PRP	36.100	8.819 ***	$P<0.001$
KR-BY vs DD+SVF+KB	24.500	5.985 *	$P<0.05$
KR-BY vs DD+MKH+PRP	25.467	6.222 **	$P<0.01$
SH-NG vs DD+SVF+MKH	-34.517	8.433 ***	$P<0.001$
SH-NG vs DD+SVF+PRP	-28.233	6.897 **	$P<0.01$
SH-NG vs DD+SVF+KB	-39.833	9.731 ***	$P<0.001$

SH-NG vs DD+MKH+PRP	-38.867	9.495 ***	P<0.001
SH-NG vs DD+PRP+KB	-48.050	11.739 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+SVF+MKH	-45.183	11.038 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+SVF+PRP	-38.900	9.503 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+SVF+KB	-50.500	12.337 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+MKH+PRP	-49.533	12.101 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+PRP+KB	-58.717	14.345 ***	P<0.001

6.4.4 İkili Uygulamaların eNOS İmmunohistokimyasal Bulguları

Oksidatif stres değerlendirmesi **eNOS İHK** ile yapıldı. KG saptanan stresin DG ile 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. İkili uygulamaların anlamlı bir şekilde oksidatif stresten koruduğu saptandı (Resim 6.15).

KG



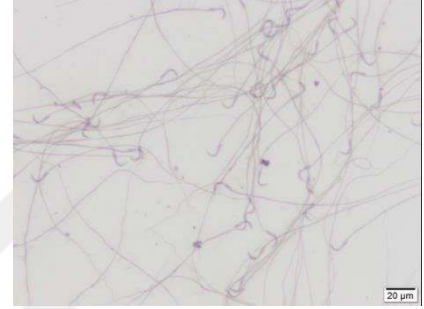
SG



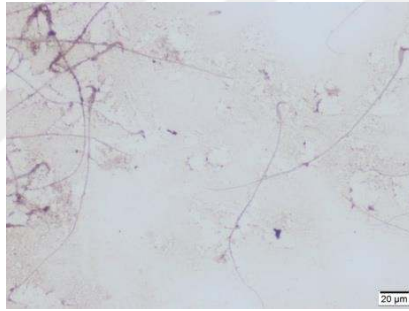
DG



DG + SVF + MKH



DG + SVF + KBY



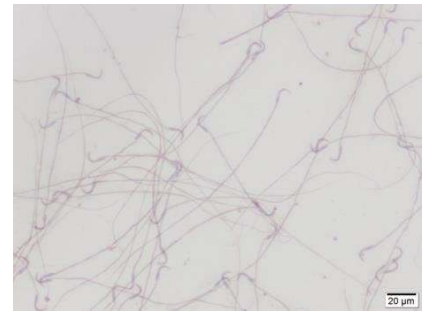
DG + PRP + MKH



DG + PRP + KBY

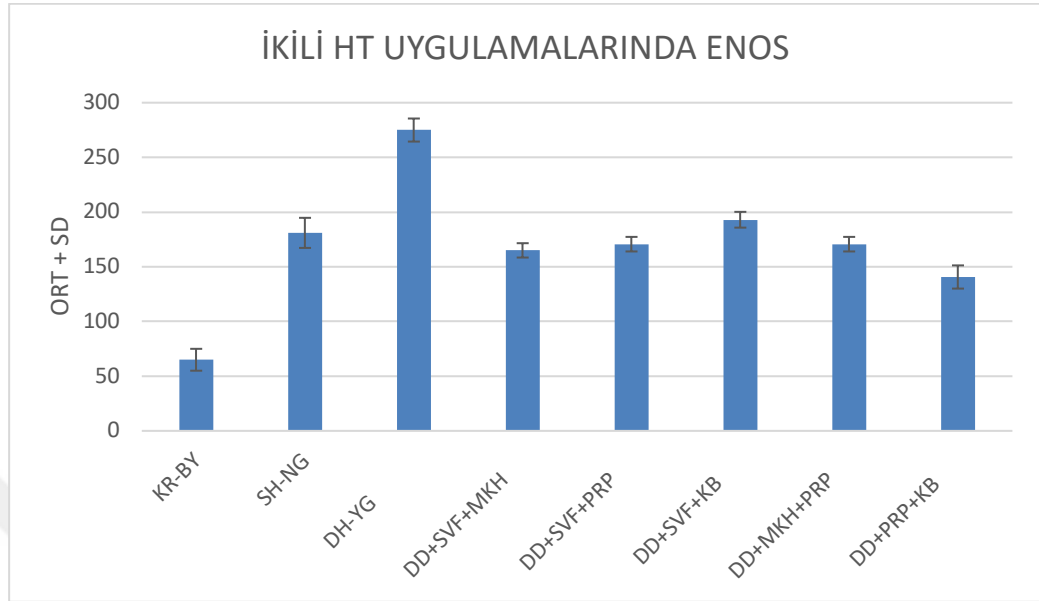


DG + MKH + KBY



Resim 6.15. İkili HT uygulamalarında Oksidatif stresin eNOS ile değerlendirilmesi.

Yapılan h-skor ile uygulamalarda sırası ile ikili uygulamaların PRP>MKH>SVF>KBY şeklinde oksidatif stresi azalttığı saptandı (Şekil 6.21).



Şekil 6.21. İkili HT uygulamaları için e-NOS İHK değerlendirmesi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DD+SVF+MKH (DG+SVF+MKH), DD+SVF+PRP (DG+SVF+PRP), DD+SVF+KBY (DG+SVF+KBY), DD+MKH+PRP (DG+MKH+PRP), DD+PRP+KBY (DG+PRP+KBY).

Tablo 6.14. İkili HT uygularında h-skor ile eNOS İHK değerlendirmesi

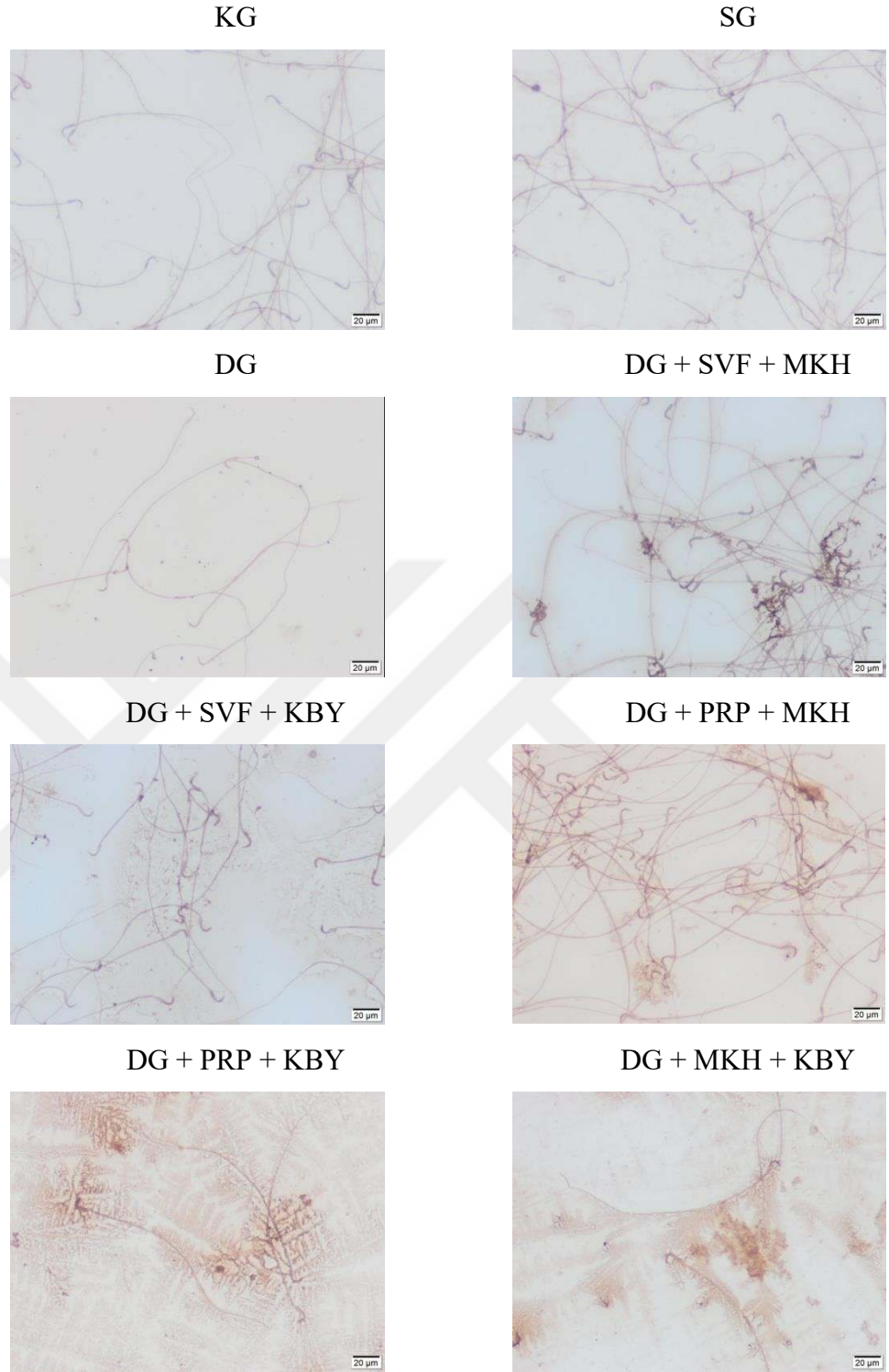
Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	-116.00	21.572 ***	P<0.001
KR-BY vs DH-YG	-210.00	39.052 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SVF+MKH	-100.00	18.596 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SVF+PRP	-116.67	21.696 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SVF+KB	-128.00	23.803 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+MKH+PRP	-105.67	19.650 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+PRP+KB	-75.667	14.071 ***	P<0.001
SH-NG vs DH-YG	-94.000	17.480 ***	P<0.001
SH-NG vs DD+PRP+KB	40.333	7.500 **	P<0.01
DH-YG vs DD+SVF+MKH	110.00	20.456 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+SVF+PRP	93.333	17.357 ***	P<0.001

DH-YG vs DD+SVF+KB	82.000	15.249 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+MKH+PRP	104.33	19.402 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+PRP+KB	134.33	24.981 ***	P<0.001
DD+SVF+KB vs DD+PRP+KB	52.333	9.732 ***	P<0.001
DD+MKH+PRP vs DD+PRP+KB	30.000	5.579 *	P<0.05

6.4.5 İkili Uygulamaların iNOS İmmunohistokimyasal Bulguları

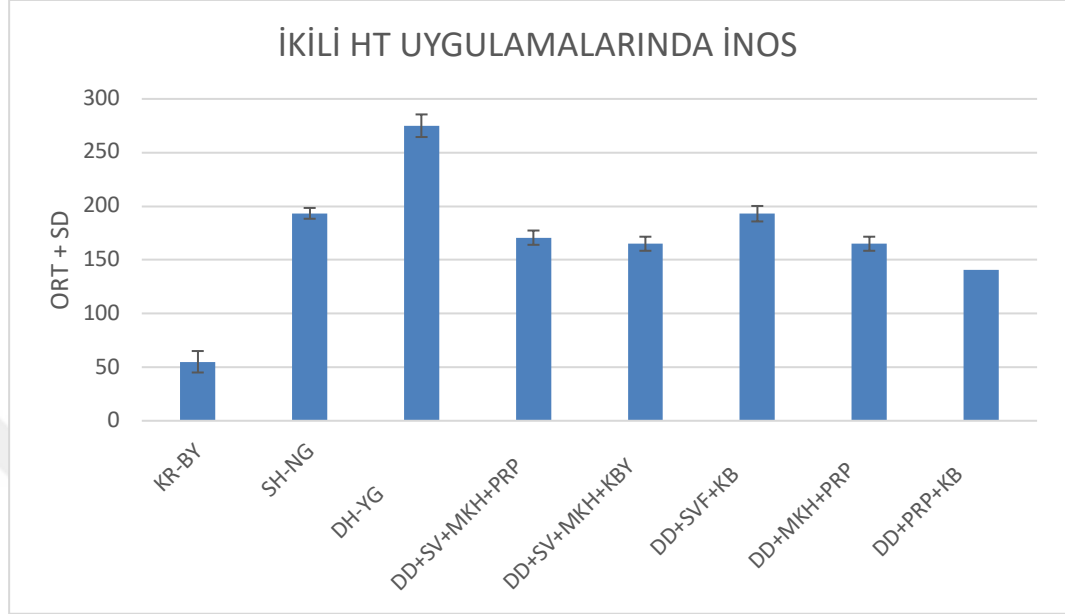
Oksidatif stres değerlendirmesi **iNOS İHK** ile yapıldı. KG saptanan stresin DG ile 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. İkili uygulamaların anlamlı bir şekilde oksidatif stresten koruduğu saptandı (Resim 6.16).





Resim 6.16. İkili HT uygulamalarında Oksidatif stresin iNOS ile değerdendirmesi.

Yapılan h-skor ile uygulamalarda sırası ile ikili uygulamaların PRP>MKH>SVF>KBY şeklinde oksidatif stresi azalttığı saptandı (Şekil 6.22).



Şekil 6.22. İkili HT uygulamaları için iNOS İHK değerlendirmesi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DD+SVF+MKH (DG+SVF+MKH), DD+SVF+PRP (DG+SVF+PRP), DD+SVF+KBY (DG+SVF+KBY), DD+MKH+PRP (DG+MKH+PRP), DD+PRP+KBY (DG+PRP+KBY),.

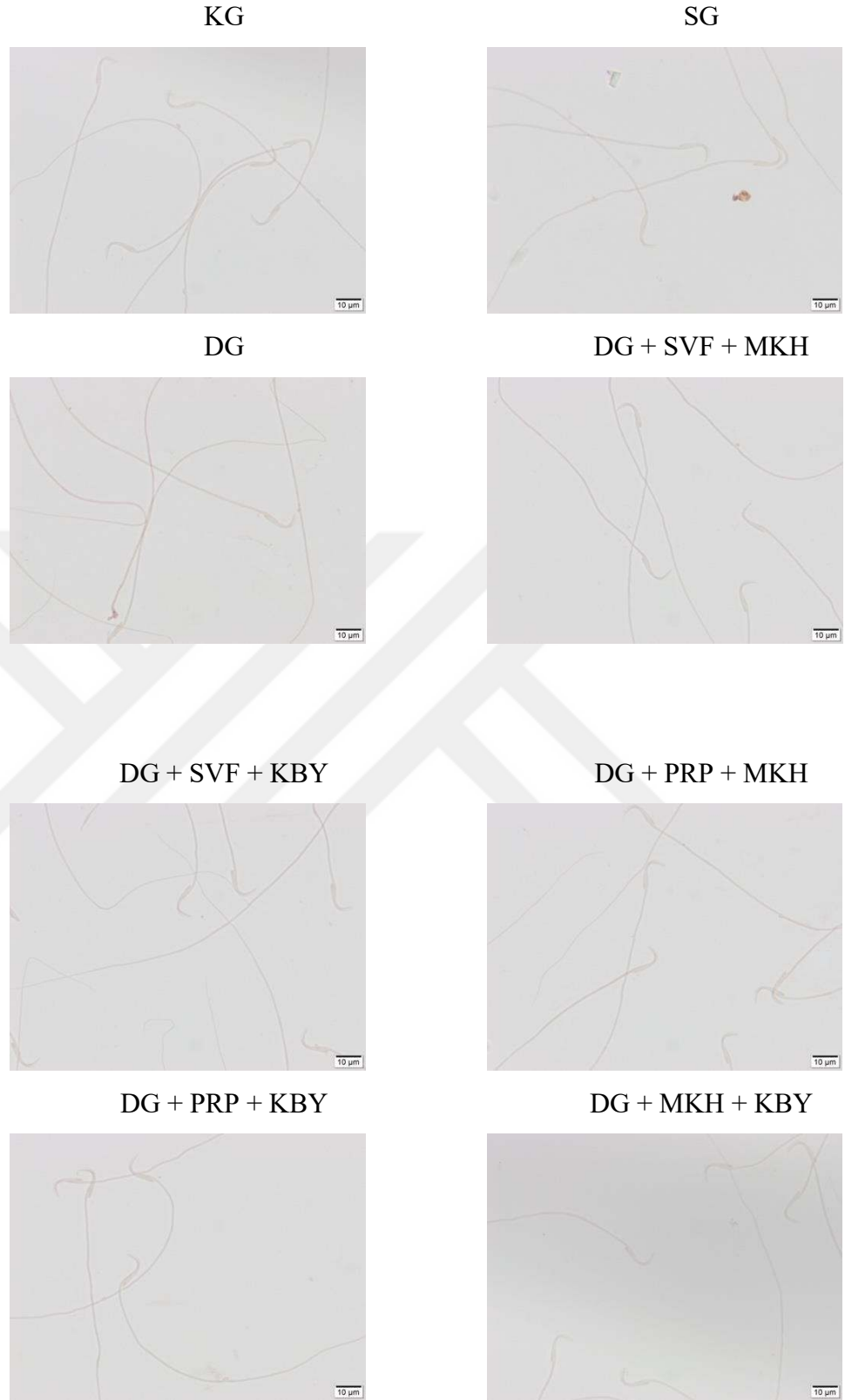
Tablo 6.15. İkili HT uygulamalarında h-skor ile iNOS İHK değerlendirmesi.

Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	-138.33	29.428	*** P<0.001
KR-BY vs DH-YG	-220.00	46.801	*** P<0.001
KR-BY vs DD+SVF+MKH	-115.67	24.606	*** P<0.001
KR-BY vs DD+SVF+PRP	-126.67	26.946	*** P<0.001
KR-BY vs DD+SVF+KB	-138.00	29.357	*** P<0.001
KR-BY vs DD+MKH+PRP	-110.00	23.400	*** P<0.001
KR-BY vs DD+PRP+KB	-85.667	18.224	*** P<0.001
SH-NG vs DH-YG	-81.667	17.373	*** P<0.001
SH-NG vs DD+MKH+PRP	28.333	6.027	* P<0.05

SH-NG vs DD+PRP+KB	52.667	11.204	***	P<0.001
DH-YG vs DD+SVF+MKH	104.33	22.195	***	P<0.001
DH-YG vs DD+SVF+PRP	93.333	19.855	***	P<0.001
DH-YG vs DD+SVF+KB	82.000	17.444	***	P<0.001
DH-YG vs DD+MKH+PRP	110.00	23.400	***	P<0.001
DH-YG vs DD+PRP+KB	134.33	28.577	***	P<0.001
DD+SVF+PRP vs DD+PRP+KB	41.000	8.722	***	P<0.001
DD+SVF+KB vs DD+MKH+PRP	28.000	5.956	*	P<0.05
DD+SVF+KB vs DD+PRP+KB	52.333	11.133	***	P<0.001
DD+MKH+PRP vs DD+PRP+KB	24.333	5.176	*	P<0.05

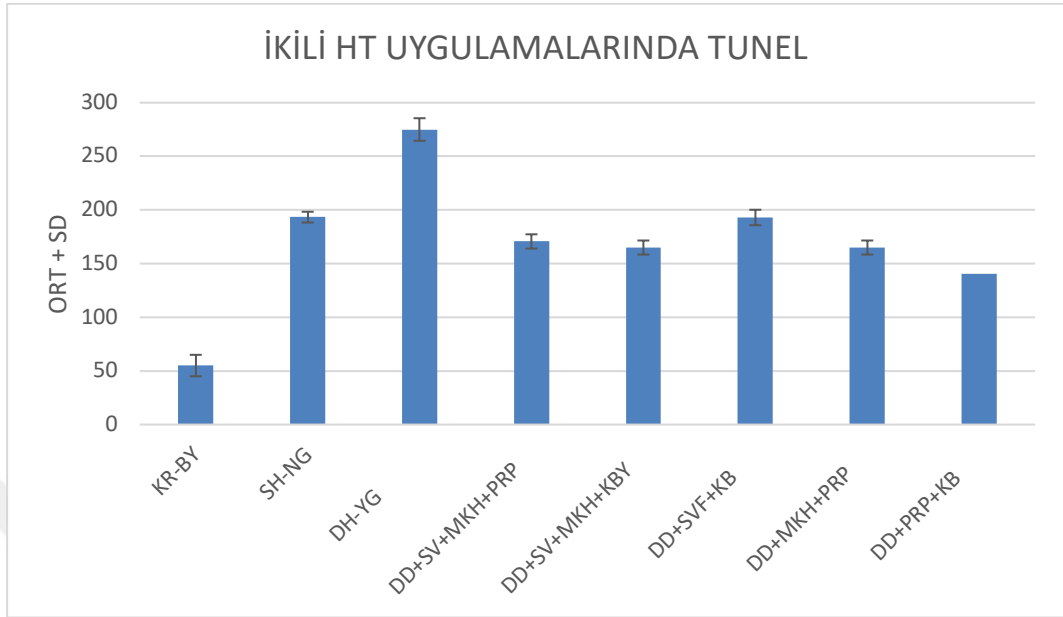
4.4.6 TUNEL işaretleme

Apoptoz değerlendirmesi **TUNEL işaretleme** ile yapıldı. KG saptanan apoptozun DG ile 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. İkili uygulamaların anlamlı bir şekilde apoptozu azalttığı saptandı (Resim 6.17).



Resim 6.17. İkili HT uygulamalarında Apoptozun TUNEL işaretlemeesi ile değerdendirmesi.

Yapılan apoptotik indeks ile uygulamalarda sırası ile ikili uygulamaların PRP>MKH>SVF>KBY şeklinde apoptozu azalttığı saptandı (Şekil 6.23).



Şekil 6.23. İkili HT uygulamalarında Apoptotik indeks ile TUNEL değerlendirmesi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DD+SVF+MKH+PRP (DG+SVF+MKH+PRP), DD+SVF+MKH+KBY (DG +SVF+MKH+KBY), DD+SVF+KB (DG+SVF+KBY), DD+MKH+PRP (DG+MKH+PRP), DD+PRP+KBY (DG+PRP+KBY).

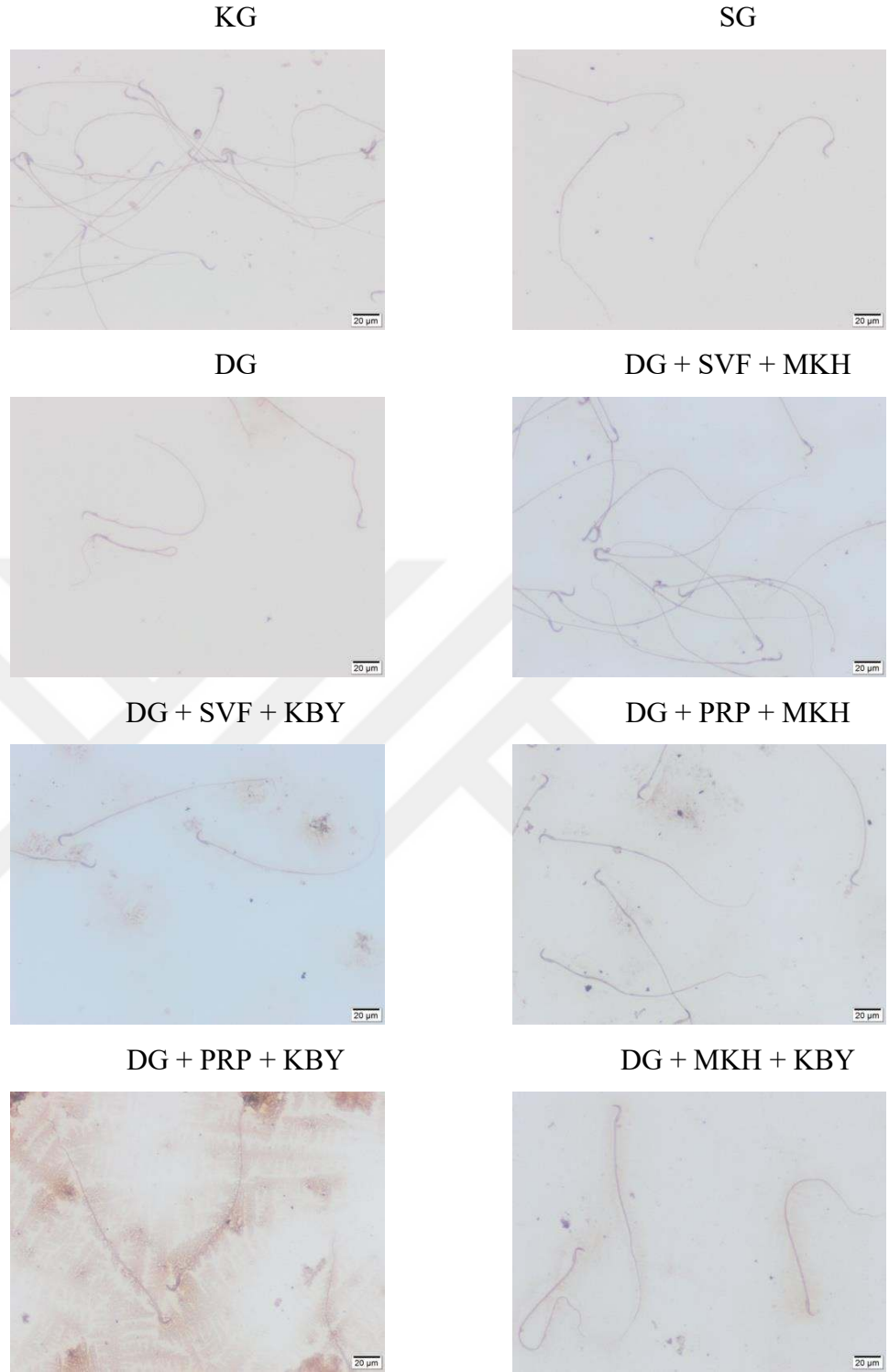
Tablo 6.16. İkili HT uygulamalarında apoptotik indeks ile **TUNEL** değerlendirmesi.

Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs DH-YG	-40.617	9.727 ***	P<0.001
SH-NG vs DH-YG	-24.450	5.856 *	P<0.05
DH-YG vs DD+SVF+MKH	21.983	5.265 *	P<0.05
DH-YG vs DD+SVF+PRP	23.667	5.668 *	P<0.05
DH-YG vs DD+SVF+KB	25.317	6.063 *	P<0.05
DH-YG vs DD+MKH+PRP	26.167	6.267 **	P<0.01
DH-YG vs DD+PRP+KB	29.652	7.102 **	P<0.01

6.4.7 İkili Uygulamaların Caspase 3 İmmunohistokimyasal Bulguları

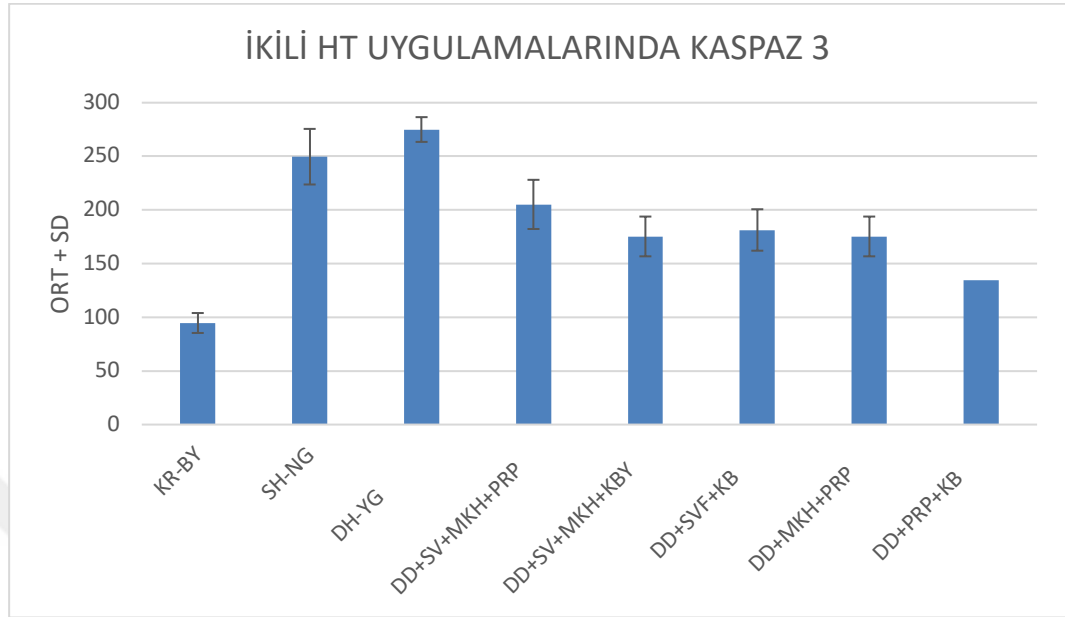
Apoptoz değerlendirmesi **Caspase 3 İHK** ile yapıldı. KG grubunda saptanan apoptozun DG ile 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. İkili uygulamaların anlamlı bir şekilde apoptozu azalttığı saptandı (Resim 6.18).





Resim 6.18. İkili HT uygulamalarında Apoptozun kaspaz 3 ile değerdirmesi.

Yapılan h-skor ile uygulamalarda sırası ile ikili uygulamaların PRP>MKH>SVF>KBY şeklinde apoptozu azalttığı saptandı (Şekil 6.24).



Şekil 6.24. İkili HT uygulamalarında kaspaz 3 İHK değerlendirmesi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DD+SVF+MKH+PRP (DG+SVF+MKH+PRP), DD+SVF+MKH+KBY (DG +SVF+MKH+KBY), DD+SVF+KBY (DG+SVF+KBY), DD+MKH+PRP (DG+MKH+PRP), DD+PRP+KBY (DG+PRP+KBY).

Tablo 6.17. İkili HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 3 İHK değerlendirmesi.

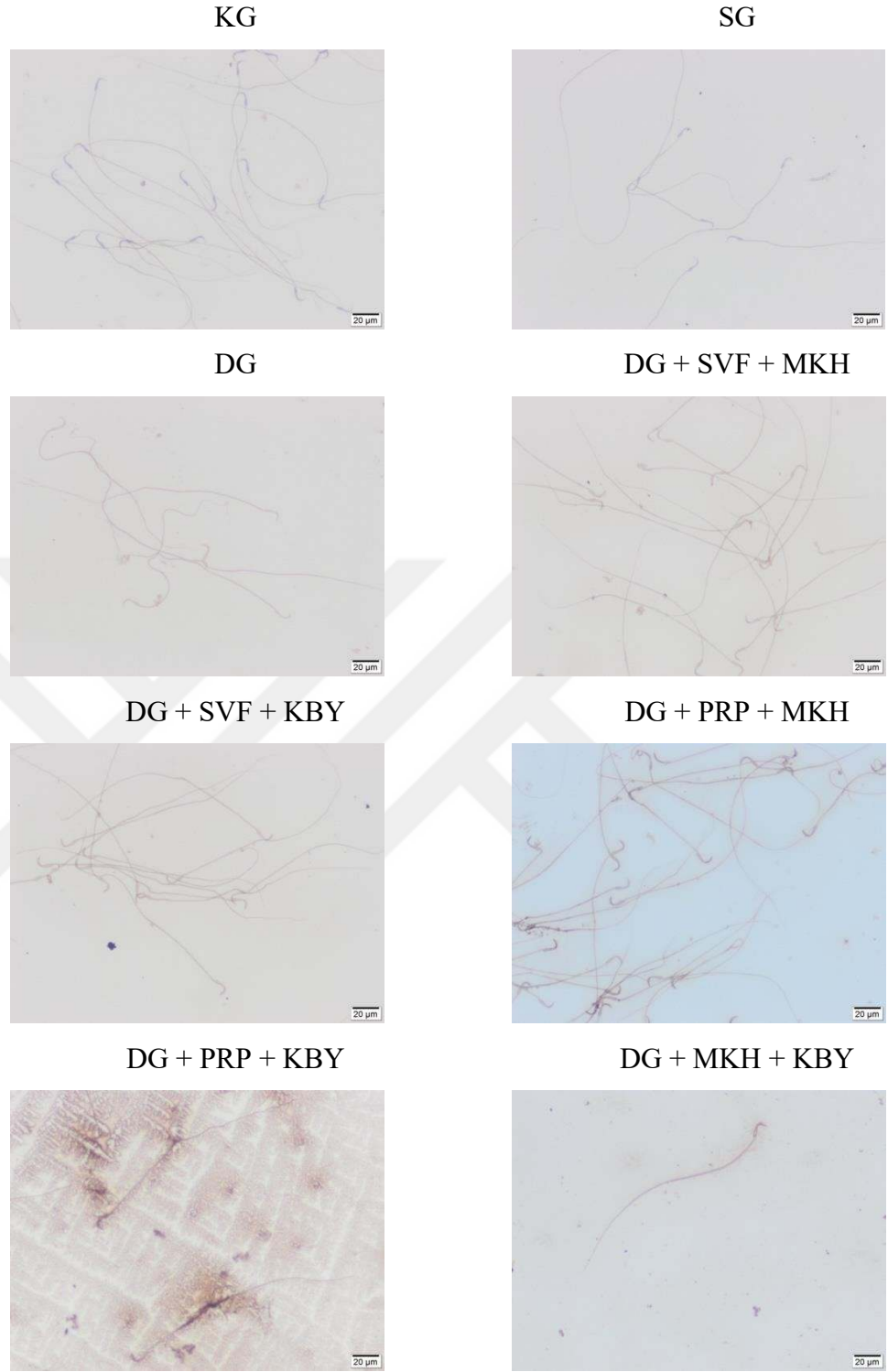
Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	-155.00	14.304 ***	P<0.001
KR-BY vs DH-YG	-180.33	16.642 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SVF+MKH	-110.53	10.200 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SVF+PRP	-98.467	9.087 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SVF+KB	-86.700	8.001 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+MKH+PRP	-80.667	7.444 **	P<0.01
SH-NG vs DD+SVF+PRP	56.533	5.217 *	P<0.05
SH-NG vs DD+SVF+KB	68.300	6.303 **	P<0.01
SH-NG vs DD+MKH+PRP	74.333	6.860 **	P<0.01
SH-NG vs DD+PRP+KB	115.33	10.643 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+SVF+MKH	69.800	6.441 **	P<0.01

DH-YG vs DD+SVF+PRP	81.867	7.555	**	P<0.01
DH-YG vs DD+SVF+KB	93.633	8.641	***	P<0.001
DH-YG vs DD+MKH+PRP	99.667	9.197	***	P<0.001
DH-YG vs DD+PRP+KB	140.67	12.981	***	P<0.001

6.4.8 İkili Uygulamaların Caspase 8 İmmunohistokimyasal Bulguları

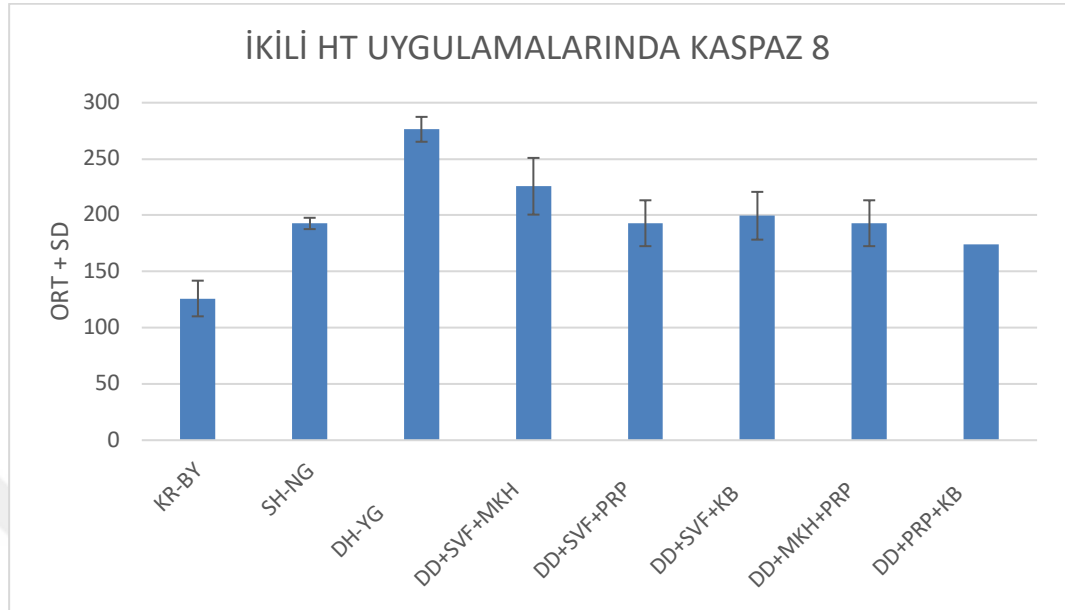
Apoptoz değerlendirmesi **Caspase 8 İHK** ile yapıldı. KG grubunda saptanan apoptozun DG ile 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. İkili uygulamaların anlamlı bir şekilde apoptozu azalttığı saptandı (Resim 6.19).





Resim 6.19. İkili HT uygulamalarında Apoptozun kaspaz 8 ile değerdirmesi.

Yapılan h-skor ile uygulamalarda sırası ile ikili uygulamaların PRP>MKH>SVF>KBY şeklinde apoptozu azalttığı saptandı (Şekil 6.25).



Şekil 6.25. İkili HT uygulamalarında kaspaz 8 İHK değerlendirmesi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DD+SVF+MKH (DG+SVF+MKH), DD+SVF+PRP (DG+SVF+PRP), DD+SVF+KBY (DG+SVF+KBY), DD+MKH+PRP (DG+MKH+PRP), DD+PRP+KBY (DG+PRP+KBY).

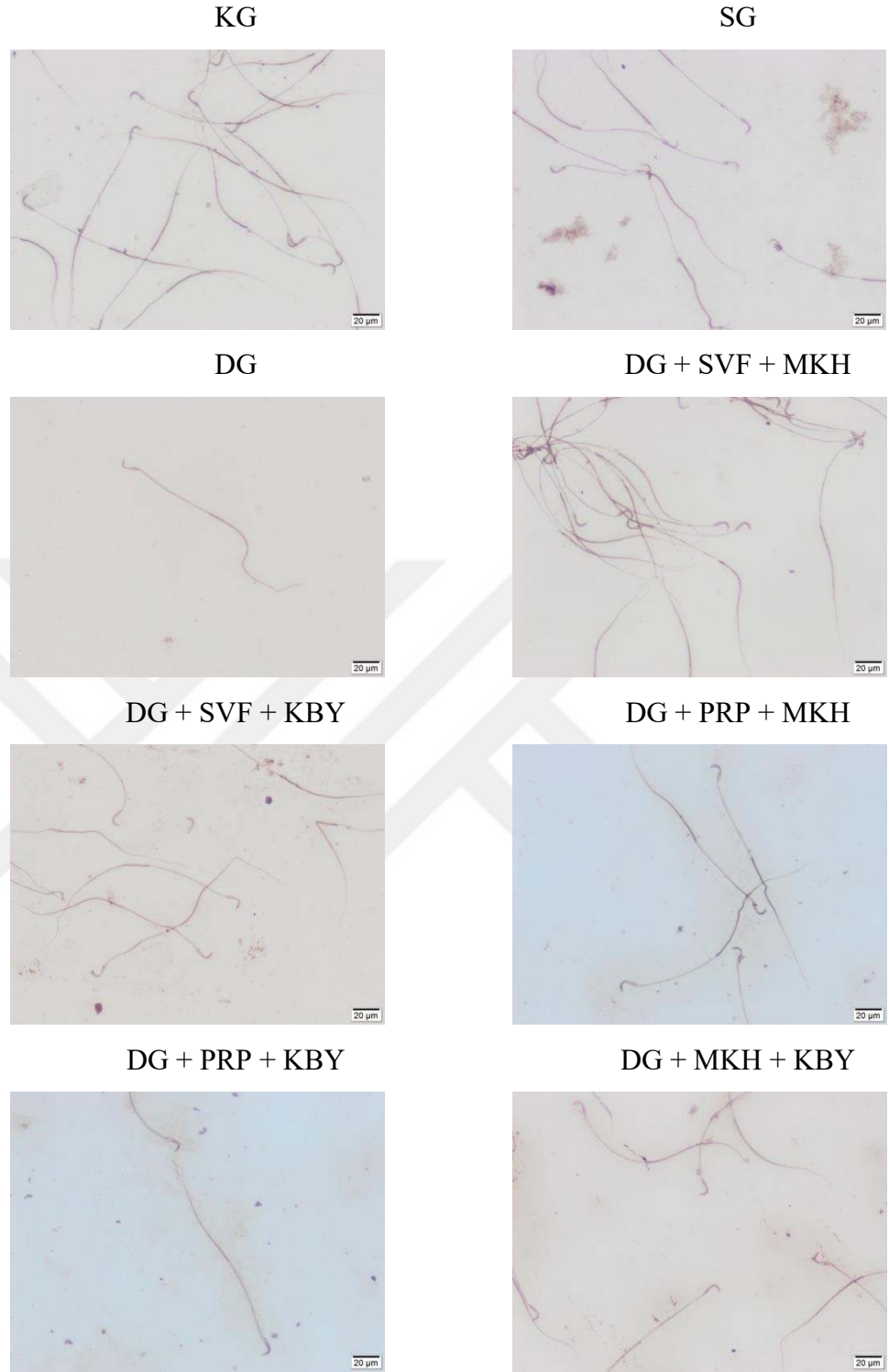
Tablo 6.18. İkili HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 8 İHK değerlendirmesi.

Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	-66.717	6.310	** P<0.01
KR-BY vs DH-YG	-150.38	14.224	*** P<0.001
KR-BY vs DD+SVF+MKH	-99.770	9.437	*** P<0.001
KR-BY vs DD+SVF+PRP	-86.497	8.181	*** P<0.001
KR-BY vs DD+SVF+KB	-73.553	6.957	** P<0.01
KR-BY vs DD+MKH+PRP	-66.917	6.329	** P<0.01
SH-NG vs DH-YG	-83.667	7.914	*** P<0.001
DH-YG vs DD+SVF+PRP	63.887	6.043	* P<0.05
DH-YG vs DD+SVF+KB	76.830	7.267	** P<0.01
DH-YG vs DD+MKH+PRP	83.467	7.895	*** P<0.001
DH-YG vs DD+PRP+KB	102.00	9.648	*** P<0.001

6.4.9 İkili Uygulamaların Caspase 9 İmmunohistokimyasal Bulguları

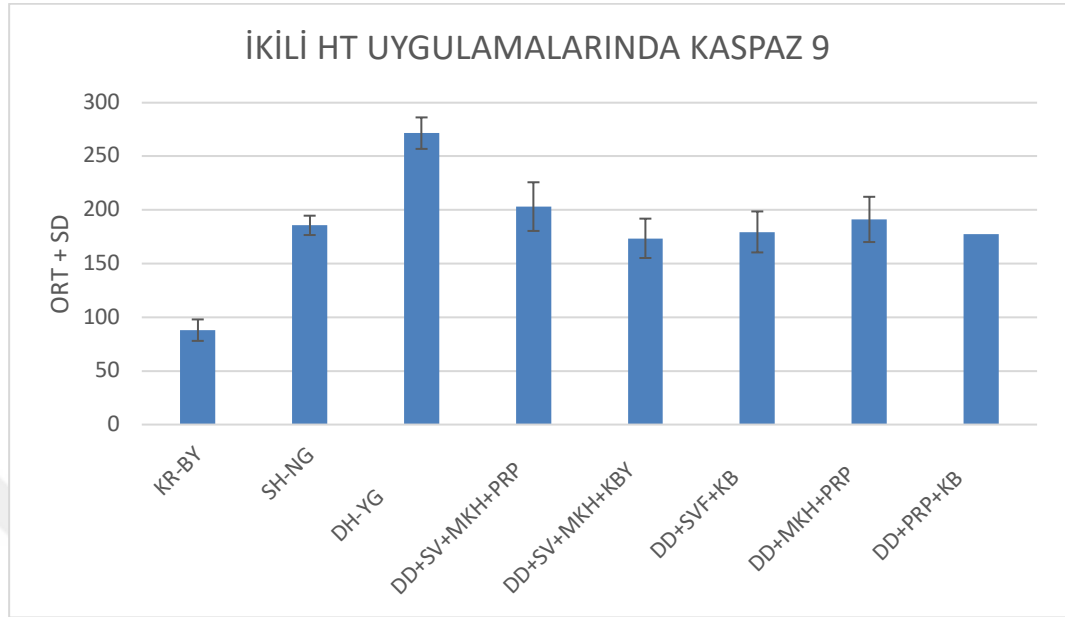
Apoptoz değerlendirmesi **Caspase 9 İHK** ile yapıldı. KG grubunda saptanan apoptozun DG ile 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. İkili uygulamaların anlamlı bir şekilde apoptozu azalttığı saptandı (Resim 6.20).





Resim 6.20. Üçlü HT uygulamalarında Apoptozun kaspaz 9 ile değerlendirmesi.

Yapılan h-skor ile uygulamalarda sırası ile ikili uygulamaların anlamlı bir şekilde apoptozun azalttığı saptandı (Şekil 6.26).



Şekil 6.26. İkili HT uygulamalarında kaspaz 9 İHK değerlendirmesi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DD+SVF+MKH+PRP (DG+SVF+MKH+PRP), DD+SVF+MKH+KBY (DG +SVF+MKH+KBY), DD+SVF+KBY (DG+SVF+KBY), DD+MKH+PRP (DG+MKH+PRP), DD+PRP+KBY (DG+PRP+KBY).

Tablo 6.19. Üçlü HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 9 İHK değerlendirmesi.

Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	-97.667	9.997 ***	P<0.001
KR-BY vs DH-YG	-183.61	18.794 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SVF+MKH	-115.15	11.786 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SVF+PRP	-85.580	8.760 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SVF+KB	-91.553	9.371 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+MKH+PRP	-103.20	10.564 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+PRP+KB	-89.667	9.178 ***	P<0.001
SH-NG vs DH-YG	-85.942	8.797 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+SVF+MKH	68.461	7.008 **	P<0.01
DH-YG vs DD+SVF+PRP	98.029	10.034 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+SVF+KB	92.056	9.423 ***	P<0.001

DH-YG vs DD+MKH+PRP	80.407	8.230 *** P<0.001
DH-YG vs DD+PRP+KB	93.942	9.616 *** P<0.001

6.5 Üçlü Uygulamaların Bulguları

Bu çalışmada sağlıklı hayvanlardan alınan spermelerde kültür ortamında yüksek glikozlu besiyeri kullanılarak DB hasar oluşturuldu. Spermere MKH, 48 saatlik salgıladıkları faktörler olan KBY ve PRP ile desteklenmiş SVF uygulamaları yapılarak deneysel diyabetik modelde sperm hasarının azaltılması incelendi.

6.5.1 Üçlü Uygulamaların Canlılık Bulguları

Canlılık değerlendirmesi Eozin Y ile yapıldı. KG grubuna göre DG canlılığı 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde azaldı. Üçlü uygulamaların anlamlı olarak canlılığı koruduğu saptandı (Resim 6.21).

KG



SG



DG



DG + SVF + MKH + KBY

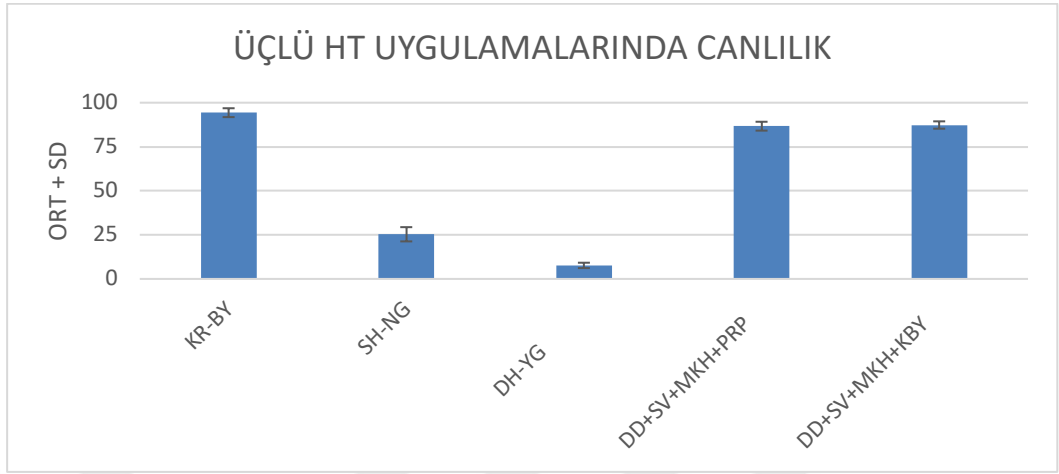


DG + PRP + MKH + KBY



Resim 6.21. Üçlü HT uygulamaları için canlılık boyaması.

Yapılan üçlü uygulamaların etkinlik açısından $PRP > MKH > SVF > KBY$ şeklinde canlılığı koruduğu saptandı (Şekil 6.27).



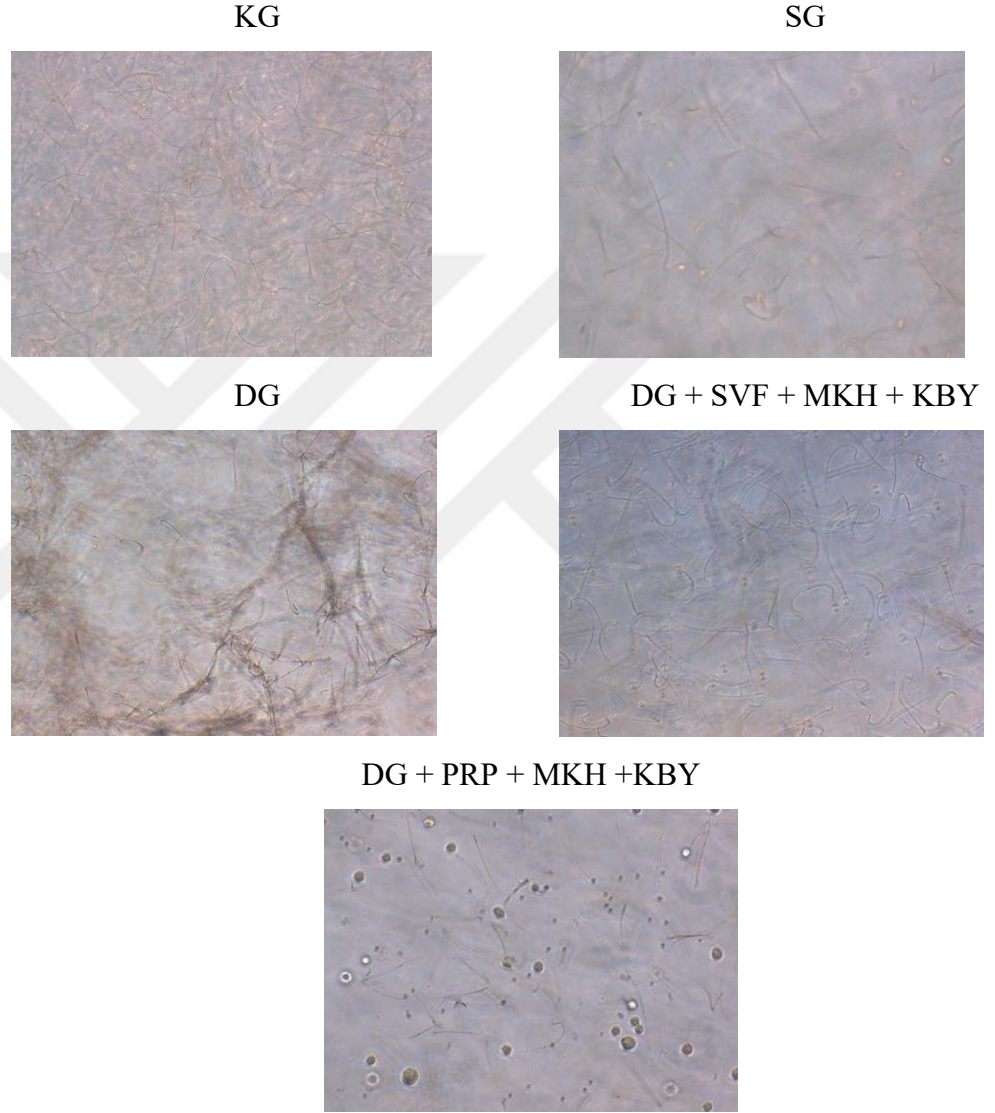
Şekil 6.27. Üçlü HT uygulamaları için canlılık testi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DD-YG+SVF+MKH+PRP (DG+SVF+MKH+PRP), DD-YG+SVF+MKH+KBY (DG+ SVF+MKH+KBY).

Tablo 6.20. Üçlü HT uygulamaları için canlılık testi.

Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	-97.667	10.709 ***	P<0.001
KR-BY vs DH-YG	-183.61	20.133 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SV+MKH+PRP	-115.15	12.626 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SV+MKH+KBY	-85.580	9.384 ***	P<0.001
SH-NG vs DH-YG	-85.942	9.424 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+SV+MKH+PRP	68.461	7.507 **	P<0.01
DH-YG vs DD+SV+MKH+KBY	98.029	10.749 ***	P<0.001

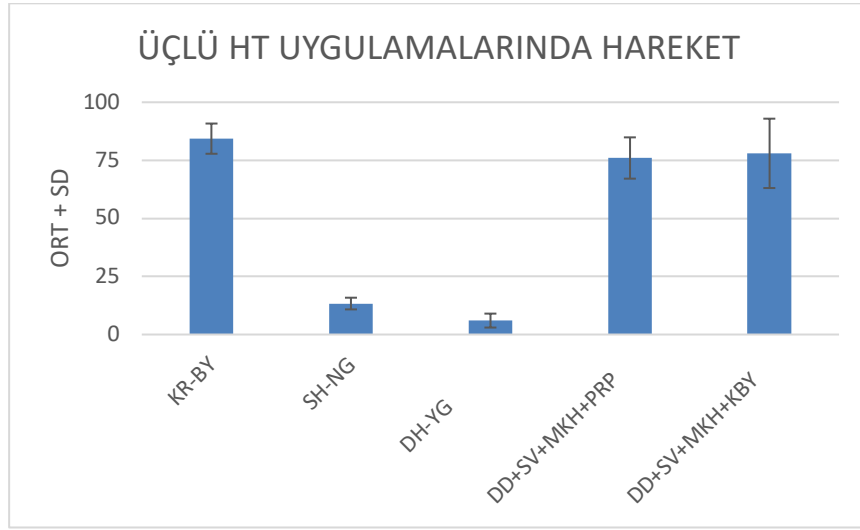
6.5.2 Üçlü Uygulamaların Hareket Bulguları

Faz kontrast mikroskobu ile yapılan hareket değerlendirmesinde. KG grubuna göre DG hareketi 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde azaldı. Üçlü uygulamaların anlamlı olarak hareketi koruduğu saptandı. (Resim 6.22).



Resim 6.22. Üçlü HT uygulamaları için hareketliliğin faz kontrast görüntüleri.

Yapılan üçlü uygulamaların etkinlik açısından $PRP > MKH > SVF > KBY$ şeklinde hareketliliği koruduğu saptandı (Şekil 6.28).



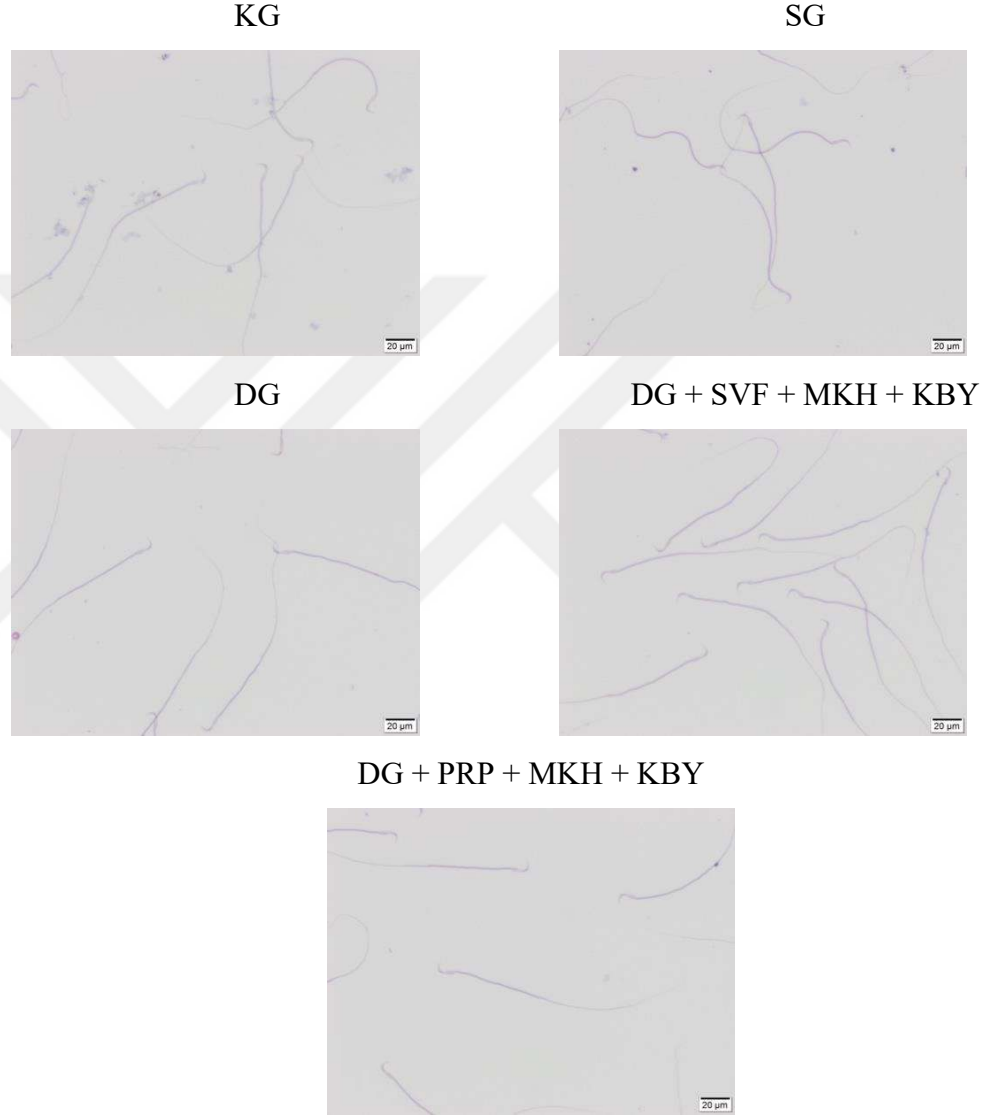
Şekil 6.28. Üçlü HT uygulamaları için hareketlilik testi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DD+SVF+MKH+PRP (DG+SVF+MKH+PRP), DD+SVF+MKH+KBY (DG+SVF+MKH+KBY).

Tablo 6.21. Üçlü HT uygulamaları için hareketlilik testi.

Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	71.000	14.500 ***	P<0.001
KR-BY vs DH-YG	78.333	15.997 ***	P<0.001
SH-NG vs DD+SV+MKH+PRP	-62.667	12.798 ***	P<0.001
SH-NG vs DD+SV+MKH+KBY	-64.667	13.206 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+SV+MKH+PRP	-70.000	14.295 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+SV+MKH+KBY	-72.000	14.704 ***	P<0.001

6.5.3 Üçlü Uygulamaların Morfoloji Değerlendirmesi

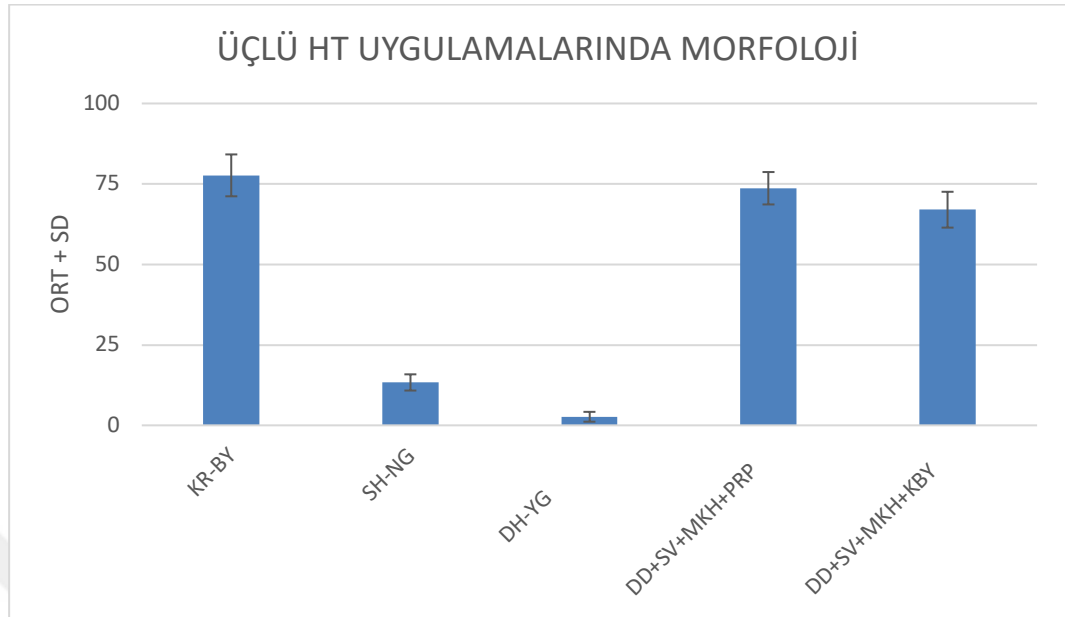
Morfoloji değerlendirme **Diff Quick** ile yapıldı. KG grubunda saptanan normal morfolojinin DG ile 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde bozulduğu görüldü. Üçlü uygulamaların anlamlı bir şekilde morfolojiyi koruduğu saptandı (Resim 6.23).



Resim 6.23 Üçlü HT uygulamalarında Diff Quick ile morfoloji değerlendirme.

Yapılan uygulamalarda sırası ile üçlü uygulamaların PRP>MKH>SVF>KBY şeklinde morfolojiyi koruduğu saptandı (Şekil 6.29). Örnekler arasında morfoloji

değerlendirmesinde oldukça anlamlı($p<0,001$) farklılığın olduğu görüldü.



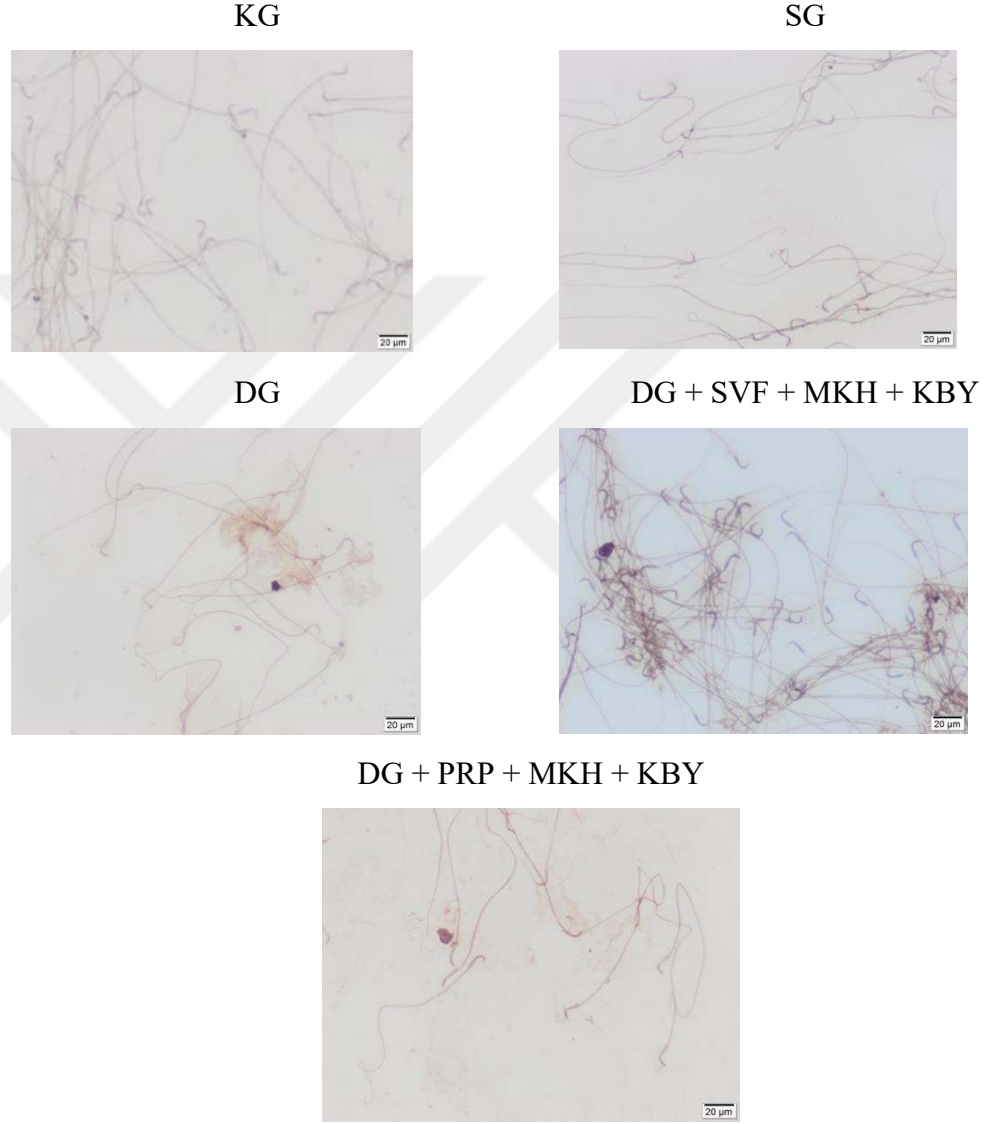
Şekil 6.29. Üçlü uygulamalar için morfoloji değerlendirme. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DH-YG+SVF+MKH+PRP (DG+SVF+MKH+PRP), DH-YG+SVF+MKH+KBY (DG+SVF+MKH+KBY).

Tablo 6.22. Üçlü uygulamalar için morfoloji değerlendirme.

Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	64.333	24.050 ***	$P<0.001$
KR-BY vs DH-YG	75.000	28.038 ***	$P<0.001$
SH-NG vs DD+SV+MKH+PRP	-60.333	22.555 ***	$P<0.001$
SH-NG vs DD+SV+MKH+KBY	-53.667	20.062 ***	$P<0.001$
DH-YG vs DD+SV+MKH+PRP	-71.000	26.542 ***	$P<0.001$
DH-YG vs DD+SV+MKH+KBY	-64.333	24.050 ***	$P<0.001$

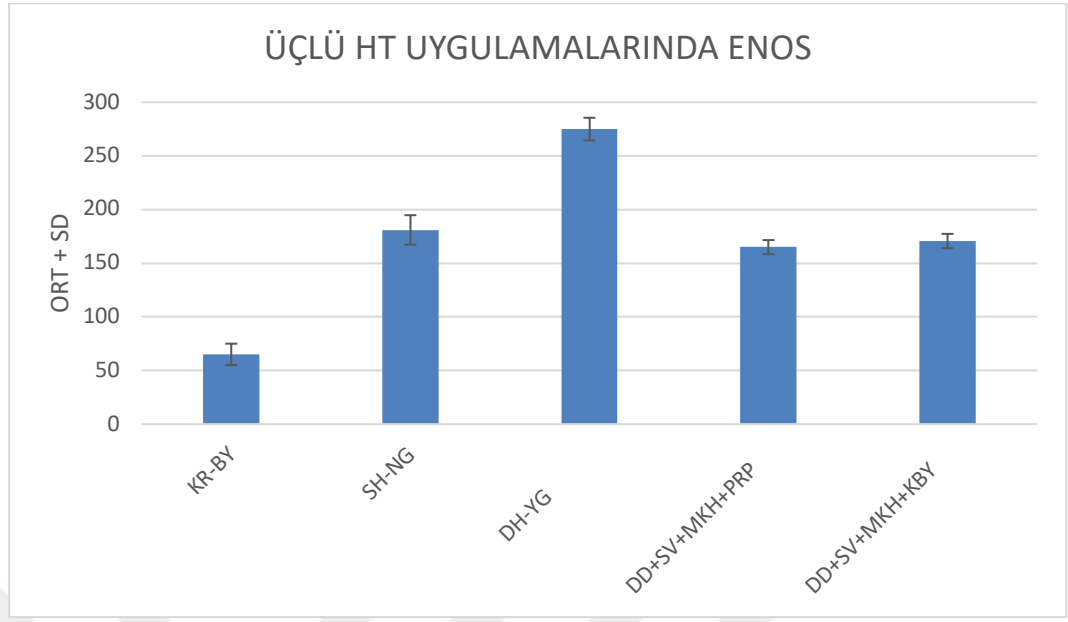
6.5.4 Üçlü Uygulamaların eNOS İmmunohistokimyasal Bulguları

Oksidatif stres değerlendirmesi **eNOS İHK** ile yapıldı. KG saptanan stresin DG ile 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. Üçlü uygulamaların anlamlı bir şekilde oksidatif stresten koruduğu saptandı (Resim 6.24).



Resim 6.24. Üçlü HT uygulamalarında Oksidatif stresin eNOS ile değerlendirmesi.

Yapılan h-skor ile uygulamalarda sırası ile üçlü uygulamaların PRP>MKH>SVF>KBY şeklinde oksidatif stresi azalttığı saptandı (Şekil 6.30).



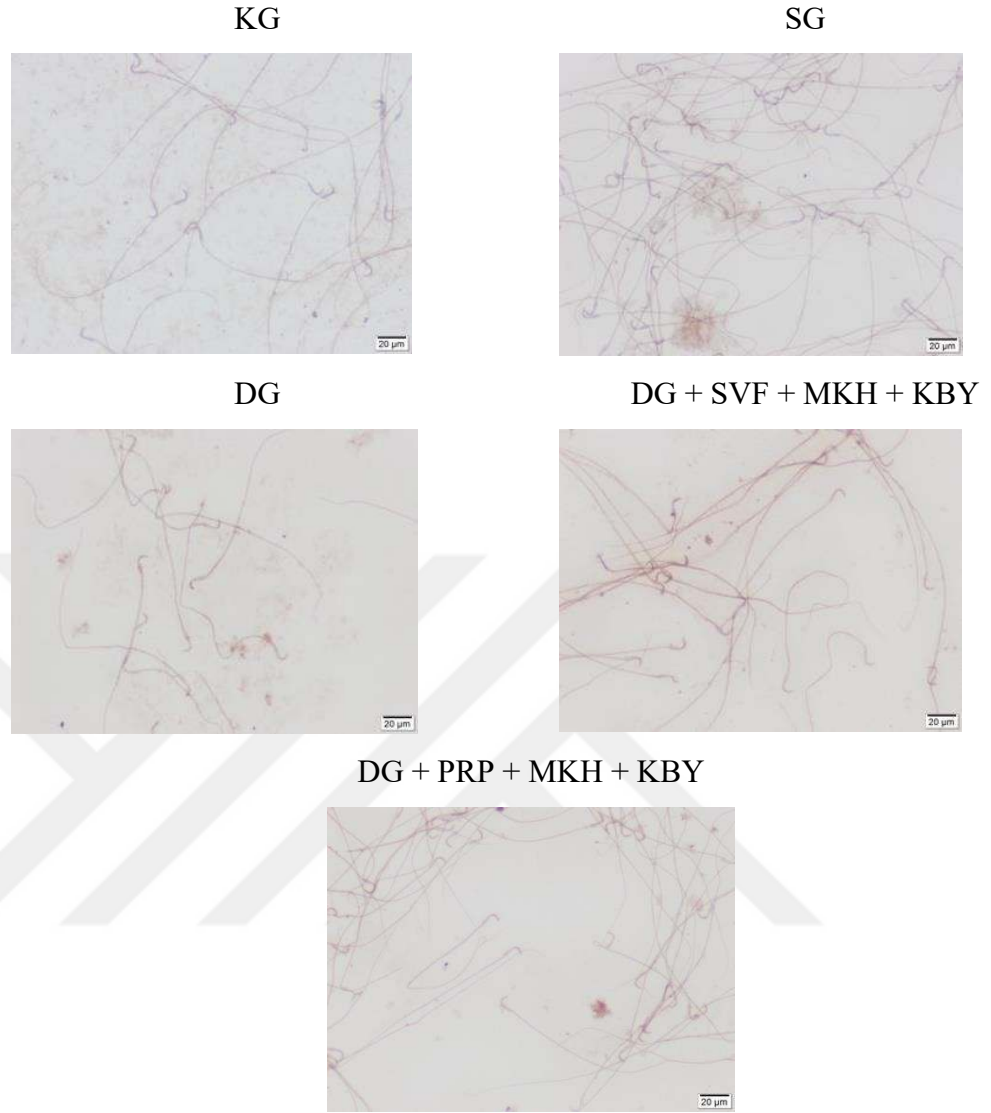
Şekil 6.30. Üçlü uygulamalar için e-NOS İHK değerlendirmesi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DH-YG+SVF+MKH+PRP (DG+SVF+MKH+PRP), DH-YG+SVF+MKH+KBY (DG+SVF+MKH+KBY).

Tablo 6.23. Üçlü HT uygulamalarında h-skor ile eNOS İHK değerlendirmesi.

Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	-116.00	20.393 ***	P<0.001
KR-BY vs DH-YG	-210.00	36.919 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SV+MKH+PRP	-100.00	17.580 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SV+MKH+KBY	-116.67	20.510 ***	P<0.001
SH-NG vs DH-YG	-94.000	16.525 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+SV+MKH+PRP	110.00	19.338 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+SV+MKH+KBY	93.333	16.408 ***	P<0.001

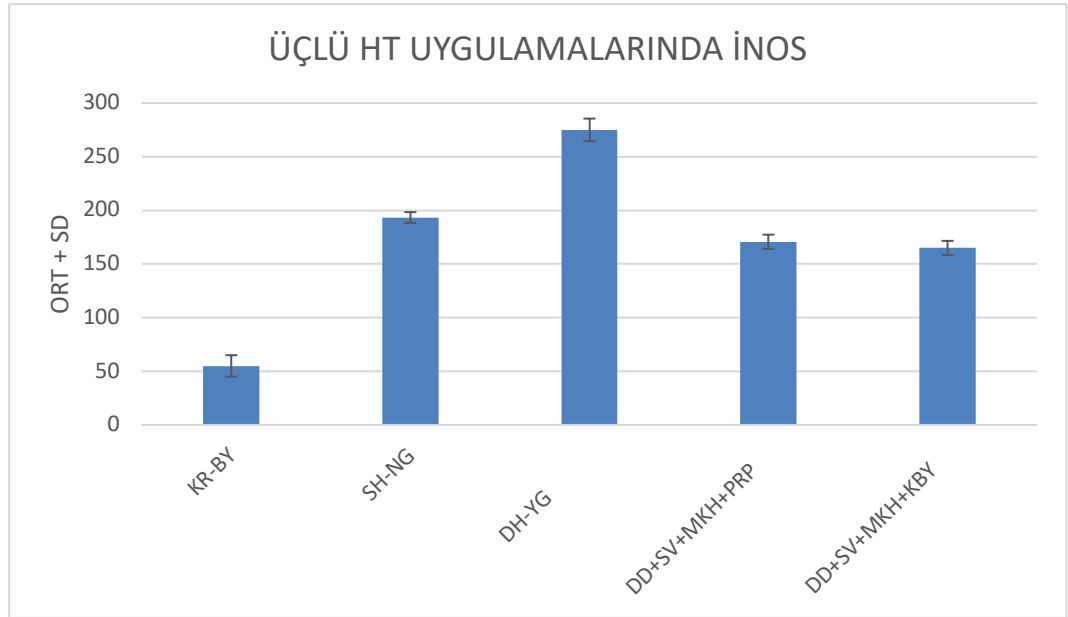
6.5.5 Üçlü Uygulamaların iNOS İmmunohistokimyasal Bulguları

Oksidatif stres değerlendirmesi iNOS İHK ile yapıldı. KG saptanan stresin DG 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. Üçlü uygulamaların anlamlı bir şekilde oksidatif stresten koruduğu saptandı (Resim 6.25).



Resim 6.25. Üçlü HT uygulamalarında Oksidatif stresin iNOS ile değerlendirmesi.

Yapılan h-skor ile uygulamalarda sırası ile üçlü uygulamaların PRP>MKH>SVF>KBY şeklinde oksidatif stresi azalttığı saptandı (Şekil 6.31).



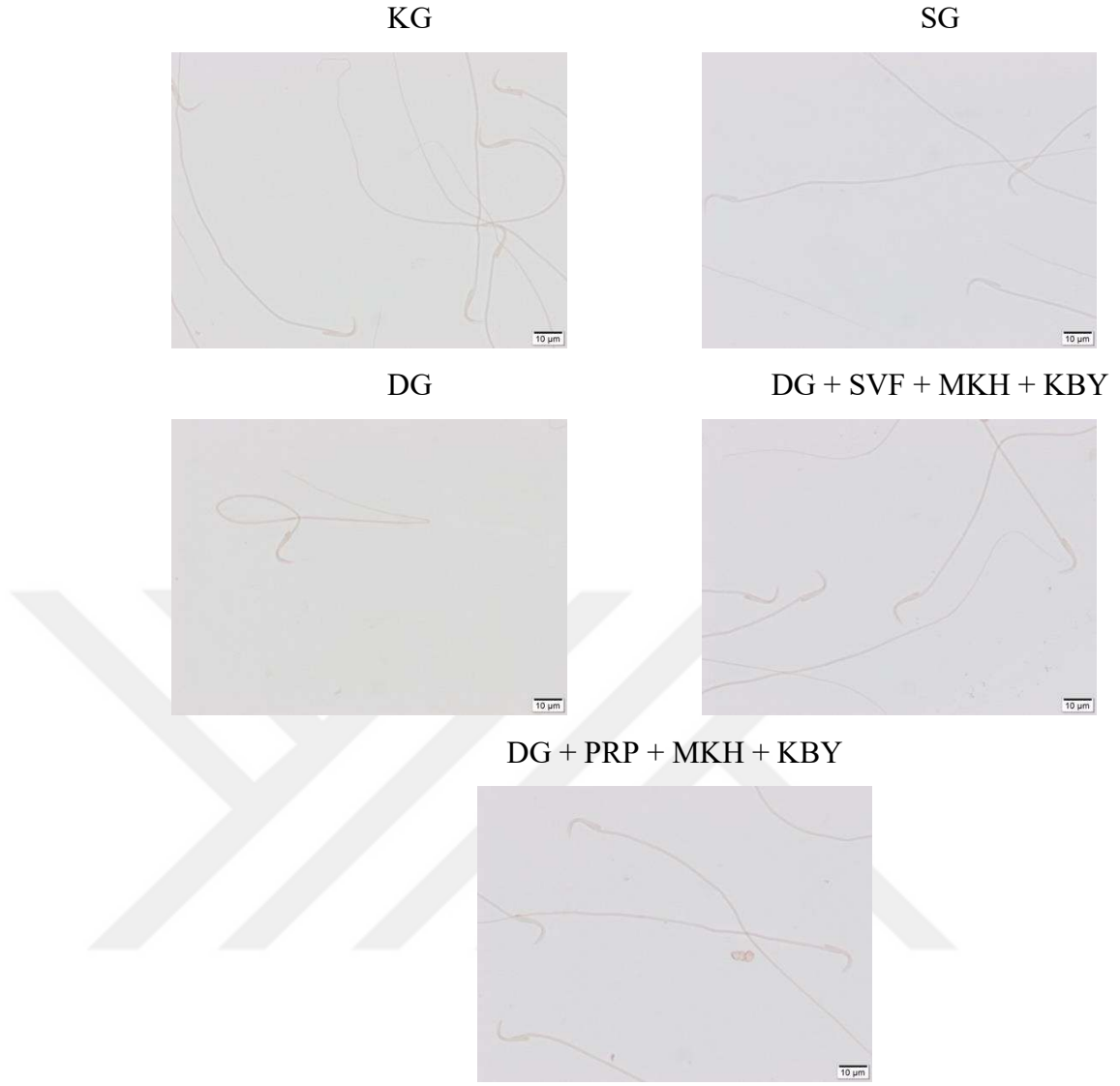
Şekil 6.31. Üçlü uygulamalar için i-NOS İHK değerlendirmesi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DH-YG+SVF+MKH+PRP (DG+SVF+MKH+PRP), DH-YG+SVF+MKH+KBY (DG+SVF+MKH+KBY).

Tablo 6.24. Üçlü HT uygulamalarında h-skor ile iNOS İHK değerlendirmesi.

Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	-138.33	29.811	*** P<0.001
KR-BY vs DH-YG	-220.00	47.410	*** P<0.001
KR-BY vs DD+SV+MKH+PRP	-115.67	24.926	*** P<0.001
KR-BY vs DD+SV+MKH+KBY	-126.67	27.296	*** P<0.001
SH-NG vs DH-YG	-81.667	17.599	*** P<0.001
SH-NG vs DD+SV+MKH+PRP	22.667	4.885	* P<0.05
DH-YG vs DD+SV+MKH+PRP	104.33	22.484	*** P<0.001
DH-YG vs DD+SV+MKH+KBY	93.333	20.113	*** P<0.001

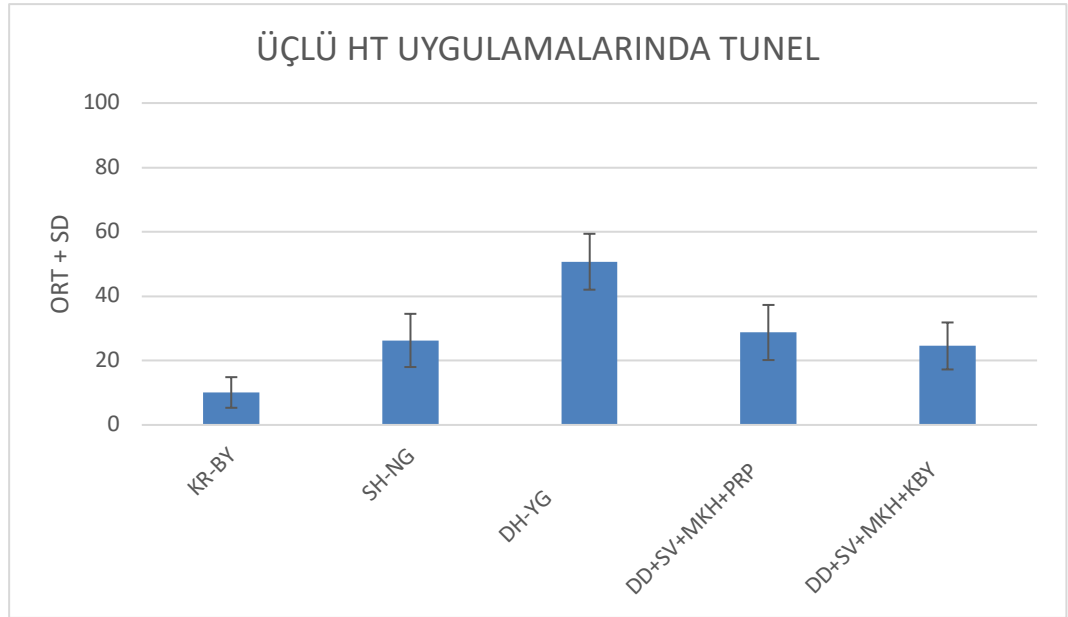
6.5.6 TUNEL işaretlemesi

Apoptoz değerlendirmesi **TUNEL işaretlemesi** ile yapıldı. KG saptanan apoptozun DG ile 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. Üçlü uygulamaların anlamlı bir şekilde apoptozu azalttığı saptandı (Resim 6.26).



Resim 6.26. Üçlü HT uygulamalarında Apoptozun TUNEL işaretlemesi ile değerlendirmesi.

Yapılan apoptotik indeks ile uygulamalarda sırası ile üçlü uygulamaların PRP>MKH>SVF>KBY şeklinde apoptozu azalttığı saptandı (Şekil 6.32).



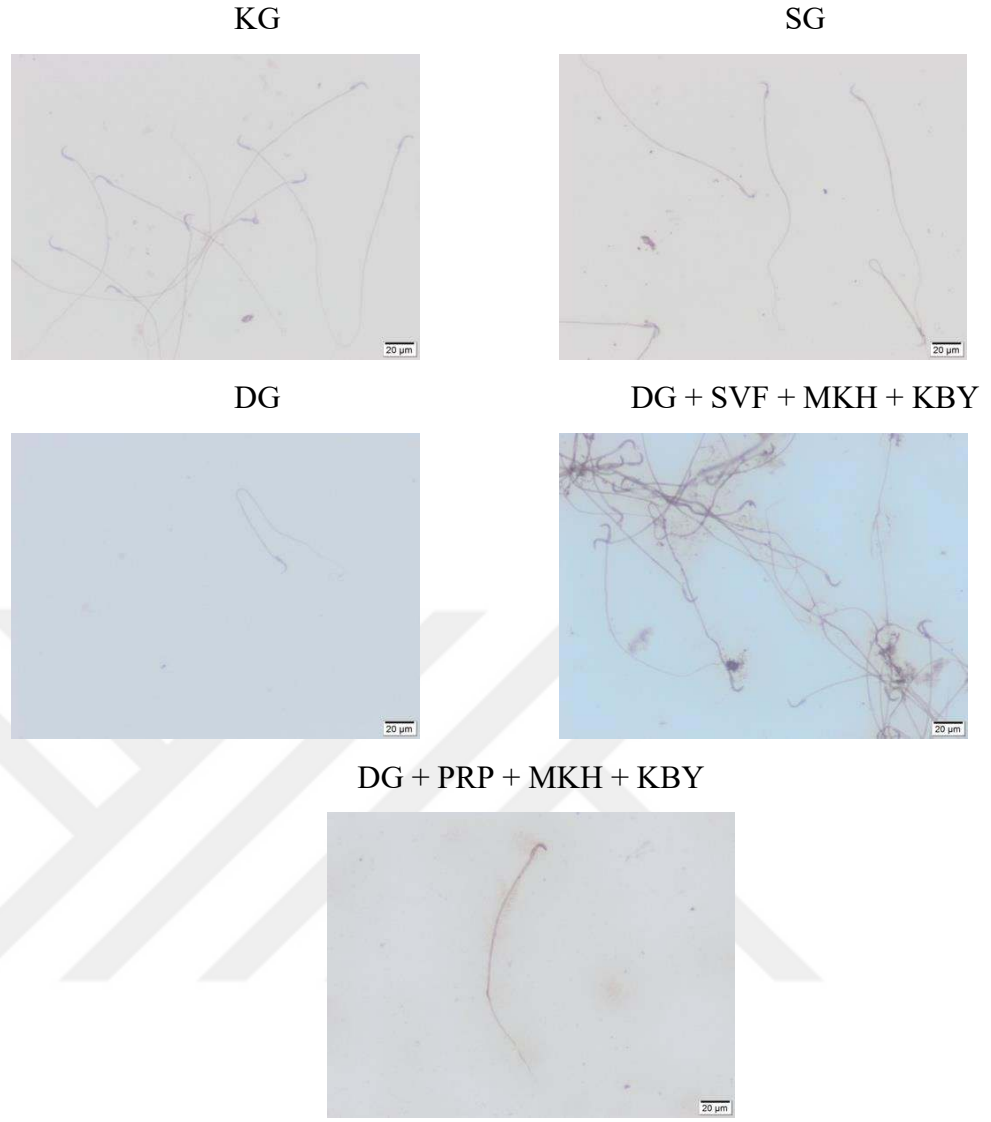
Şekil 6.32. Üçlü HT uygulamalarında Apoptotik indeks ile TUNEL değerlendirmesi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DH-YG+SVF+MKH+PRP (DG+SVF+MKH+PRP), DH-YG+SVF+MKH+KBY (DG+SVF+MKH+KBY).

Tablo 6.25. Üçlü HT uygulamalarında apoptotik indeks ile TUNEL değerlendirmesi.

Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs DH-YG	-40.617	9.003 ***	P<0.001
SH-NG vs DH-YG	-24.450	5.419 *	P<0.05
DH-YG vs DD+SV+MKH+PRP	21.983	4.873 *	P<0.05
DH-YG vs DD+SV+MKH+KBY	23.667	5.246 *	P<0.05

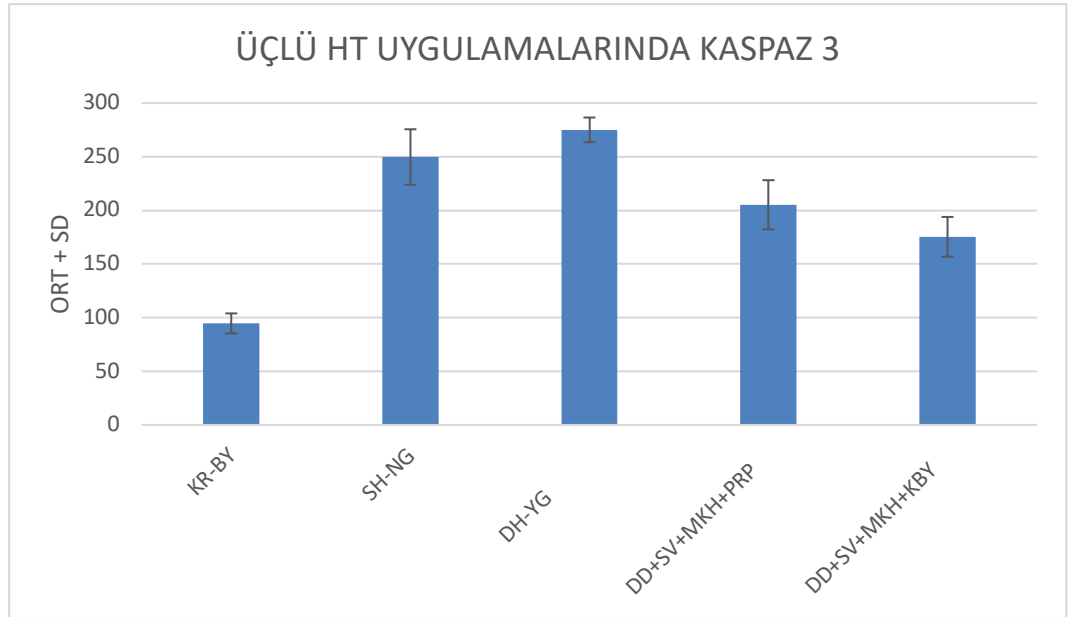
6.5.7 Üçlü Uygulamaların Caspase 3 İmmunohistokimyasal Bulguları

Apoptoz değerlendirmesi **Caspase 3 İHK** ile yapıldı. KG grubunda saptanan apoptozun DG ile 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. Üçlü uygulamaların anlamlı bir şekilde apoptozu azalttığı saptandı (Resim 6.27).



Resim 6.27. Üçlü HT uygulamalarında Apoptozun kaspaz 3 ile değerlendirmesi.

Yapılan h-skor ile uygulamalarda sırası ile üçlü uygulamaların anlamlı bir şekilde PRP>MKH>SVF>KBY şeklinde apoptozu azalttığı saptandı (Şekil 6.33).



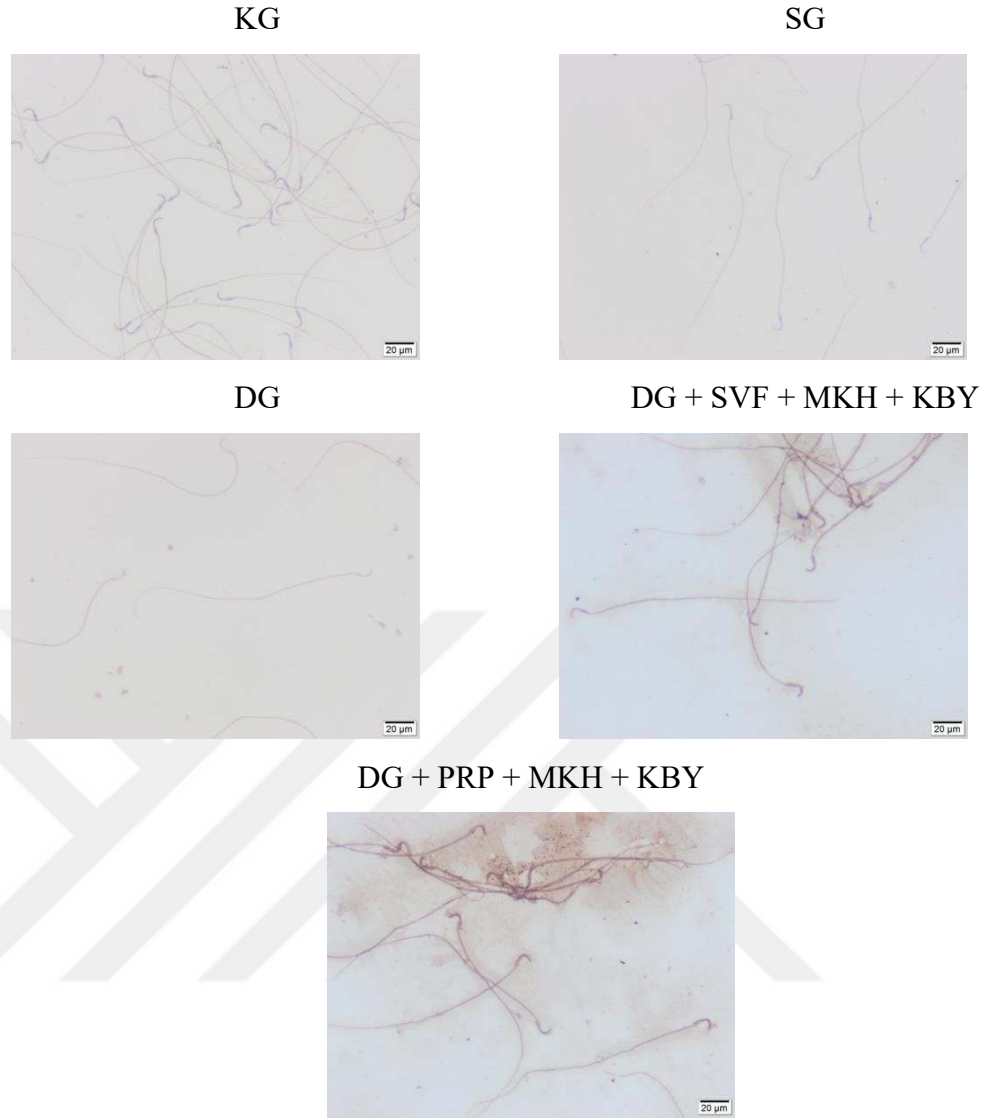
Şekil 6.33. Üçlü HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 3 İHK değerlendirmesi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DH-YG+SVF+MKH+PRP (DG+SVF+MKH+PRP), DH-YG+SVF+MKH+KBY (DG+SVF+MKH+KBY).

Tablo 6.26. Üçlü HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 3 İHK değerlendirmesi.

Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	-155.00	13.886	*** P<0.001
KR-BY vs DH-YG	-180.33	16.155	*** P<0.001
KR-BY vs DD+SV+MKH+PRP	-110.53	9.902	*** P<0.001
KR-BY vs DD+SV+MKH+KBY	-98.467	8.821	*** P<0.001
SH-NG vs DD+SV+MKH+KBY	56.533	5.065	* P<0.05
DH-YG vs DD+SV+MKH+PRP	69.800	6.253	** P<0.01
DH-YG vs DD+SV+MKH+KBY	81.867	7.334	** P<0.01

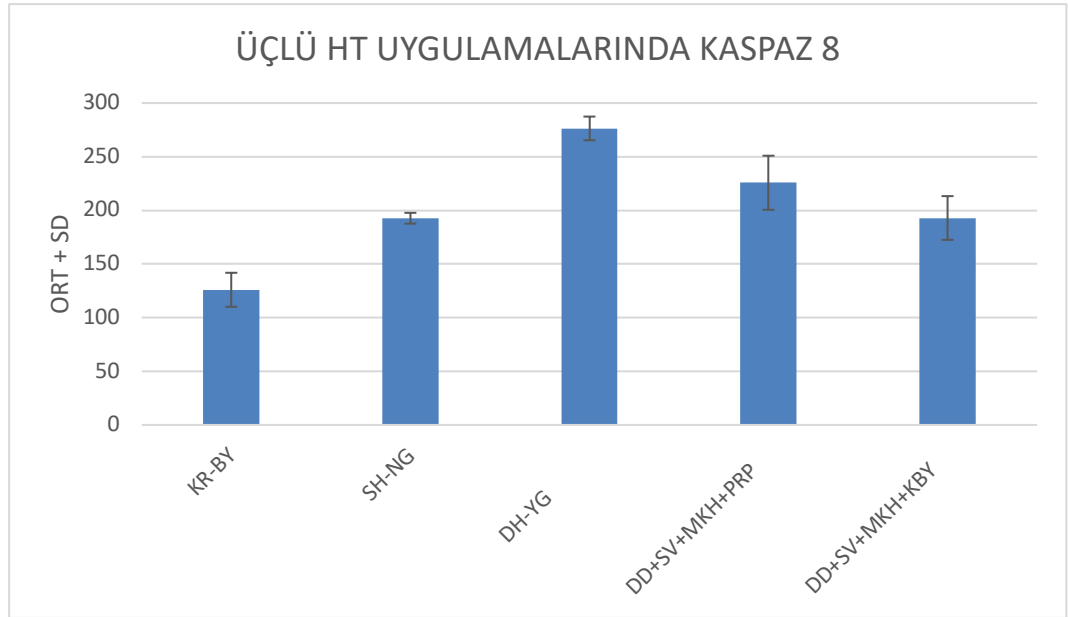
6.5.8 Üçlü Uygulamaların Caspase 8 İmmunohistokimyasal Bulguları

Apoptoz değerlendirmesi **Caspase 8 İHK** ile yapıldı. KG grubunda saptanan apoptozun DG ile 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. Üçlü uygulamaların anlamlı bir şekilde apoptozu azalttığı saptandı (Resim 6.28).



Resim 6.28. Üçlü HT uygulamalarında Apoptozun kaspaz 8 ile değerlendirmesi.

Yapılan h-skor ile uygulamalarda sırası ile üçlü uygulamaların PRP>MKH>SVF>KBY şeklinde apoptozu azalttığı saptandı (Şekil 6.34).



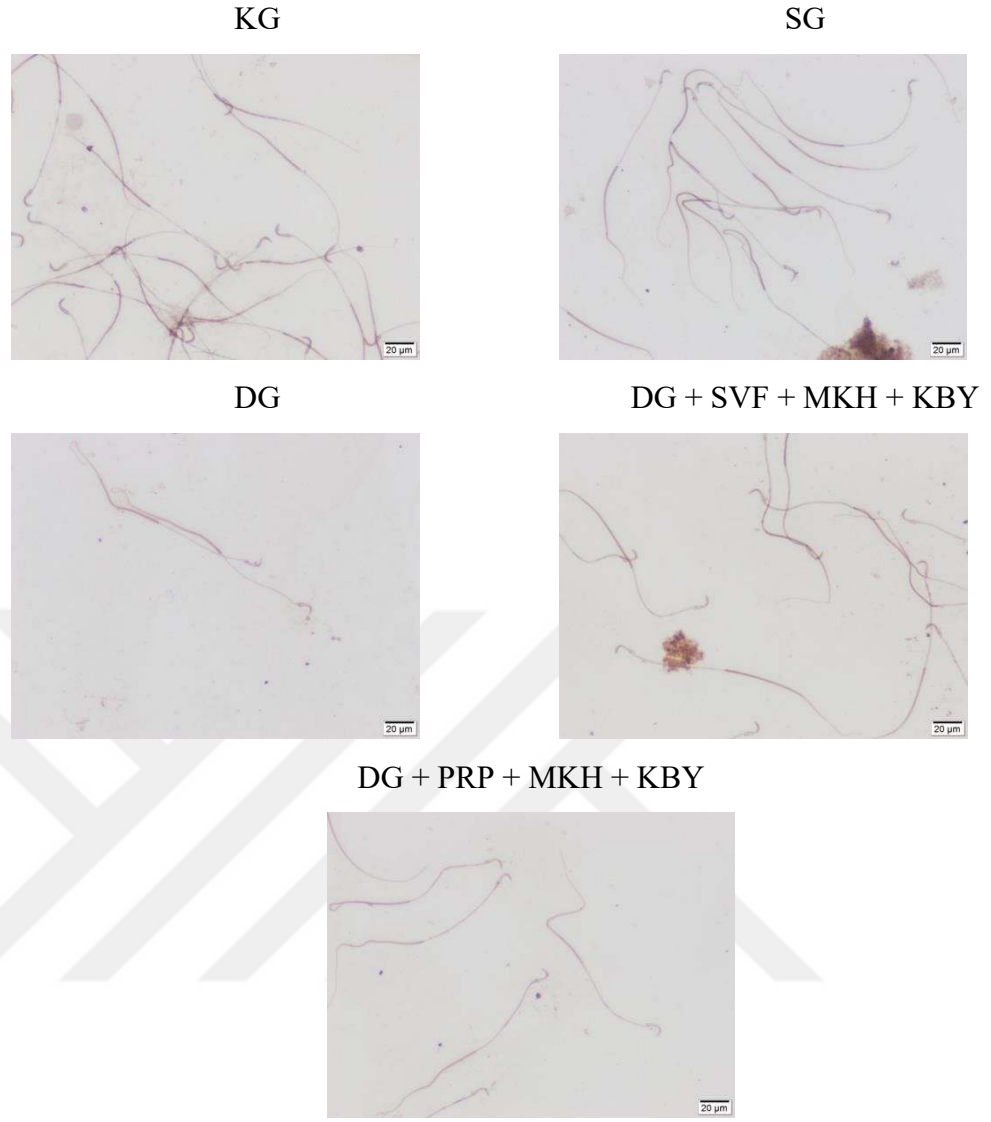
Şekil 6.34. Üçlü HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 8 İHK değerlendirmesi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DH-YG+SVF+MKH+PRP (DG+SVF+MKH+PRP), DH-YG+SVF+MKH+KBY (DG+SVF+MKH+KBY).

Tablo 6.27. Üçlü HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 8 İHK değerlendirmesi.

Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	-66.717	6.494	** P<0.01
KR-BY vs DH-YG	-150.38	14.638	*** P<0.001
KR-BY vs DD+SV+MKH+PRP	-99.770	9.712	*** P<0.001
KR-BY vs DD+SV+MKH+KBY	-86.497	8.420	** P<0.01
SH-NG vs DH-YG	-83.667	8.144	** P<0.01
DH-YG vs DD+SV+MKH+PRP	50.613	4.927	* P<0.05
DH-YG vs DD+SV+MKH+KBY	63.887	6.219	** P<0.01

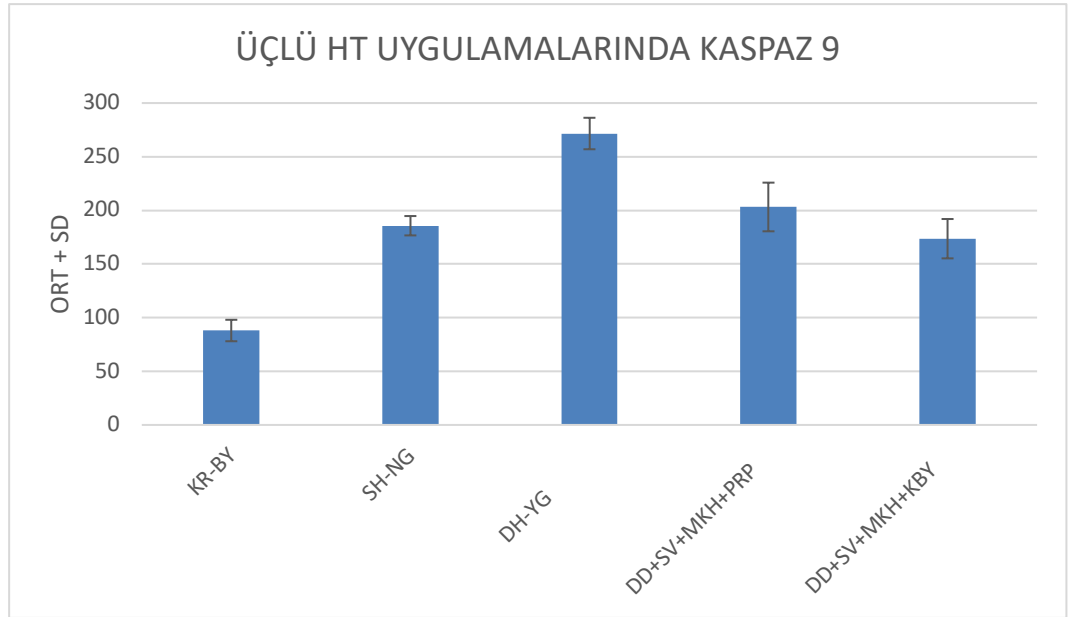
6.5.9 Üçlü Uygulamaların Caspase 9 İmmunohistokimyasal Bulguları

Apoptoz değerlendirmesi **Caspase 9 İHK** ile yapıldı. KG grubunda saptanan apoptozun DG ile 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. Üçlü uygulamaların anlamlı bir şekilde apoptozu azalttığı saptandı (Resim 6.29).



Resim 6.29. Üçlü HT uygulamalarında Apoptozun kaspaz 9 ile değerlendirmesi.

Yapılan h-skor ile uygulamalarda sırası ile üçlü uygulamaların PRP>MKH>SVF>KBY şeklinde apoptozu azalttığı saptandı (Şekil 6.35).



Şekil 6.35. Üçlü HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 9 İHK değerlendirmesi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DH-YG+SVF+MKH+PRP (DG+SVF+MKH+PRP), DH-YG+SVF+MKH+KBY (DG+SVF+MKH+KBY).

Tablo 6.28. Üçlü HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 9 İHK değerlendirmesi.

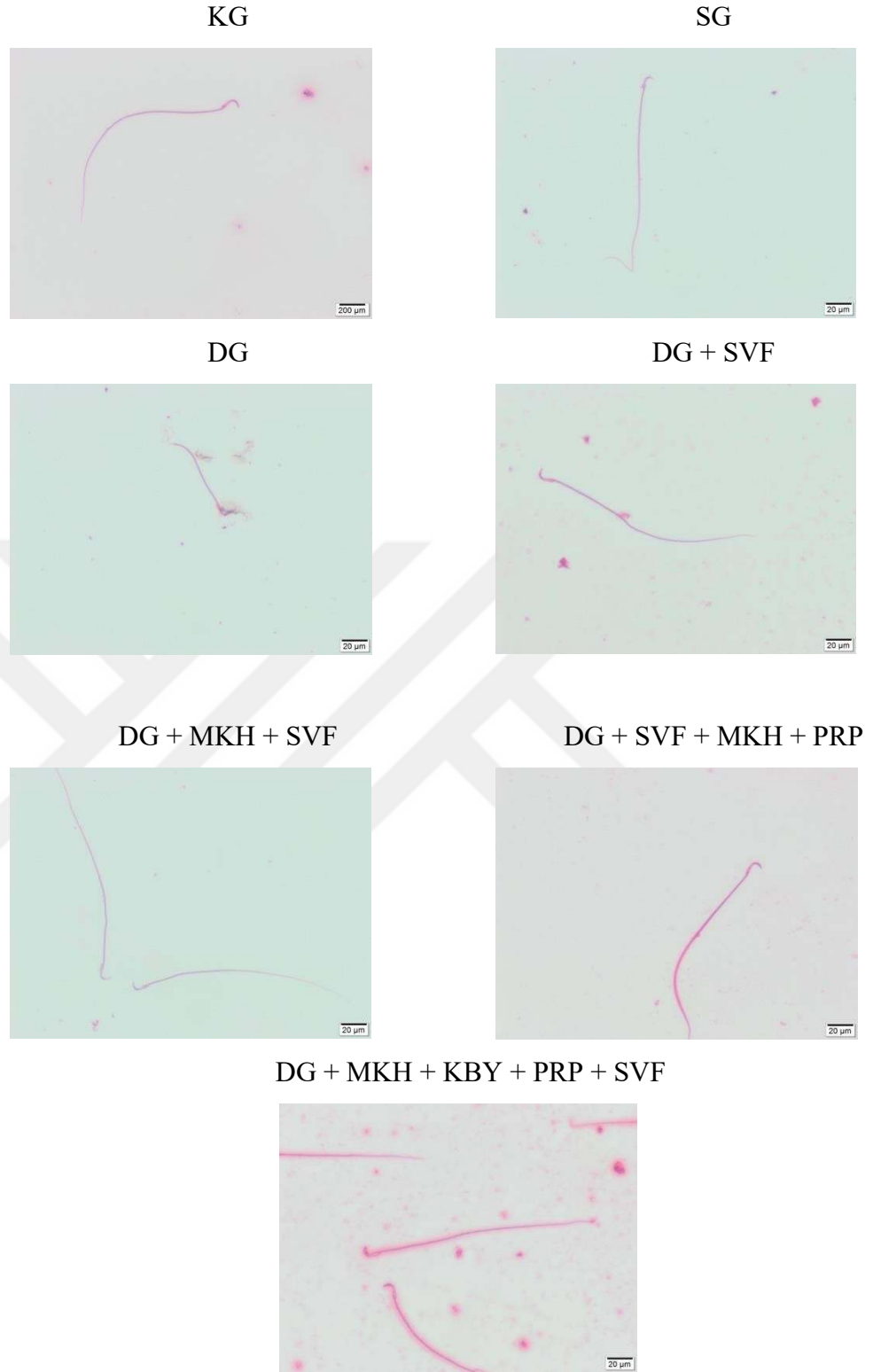
Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	-97.667	10.709	*** P<0.001
KR-BY vs DH-YG	-183.61	20.133	*** P<0.001
KR-BY vs DD+SV+MKH+PRP	-115.15	12.626	*** P<0.001
KR-BY vs DD+SV+MKH+KBY	-85.580	9.384	*** P<0.001
SH-NG vs DH-YG	-85.942	9.424	*** P<0.001
DH-YG vs DD+SV+MKH+PRP	68.461	7.507	** P<0.01
DH-YG vs DD+SV+MKH+KBY	98.029	10.749	*** P<0.001

6.6 Dörtlü Uygulama Bulguları

Diyabet ortamının sperme verdiği hasar tarafından üretilen morfolojik, canlılık ve hareket anormalliklerinin, daha yüksek apoptotik belirteç seviyelerinin yanı sıra daha yüksek eNOS ve iNOS seviyeleri ile bağlantılı olduğu keşfedildi. Tedavilerin, sperm morfolojisini, canlılığını ve hareketliliğini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde korurken oksidatif stresi ve apoptozu en aza indirdiği bulunmuştur. Bireysel uygulamalar umut vaat ederken, DG + SVF + PRP + MKH + KBY kombinasyonunun çok daha başarılı olduğu bulunmuştur.

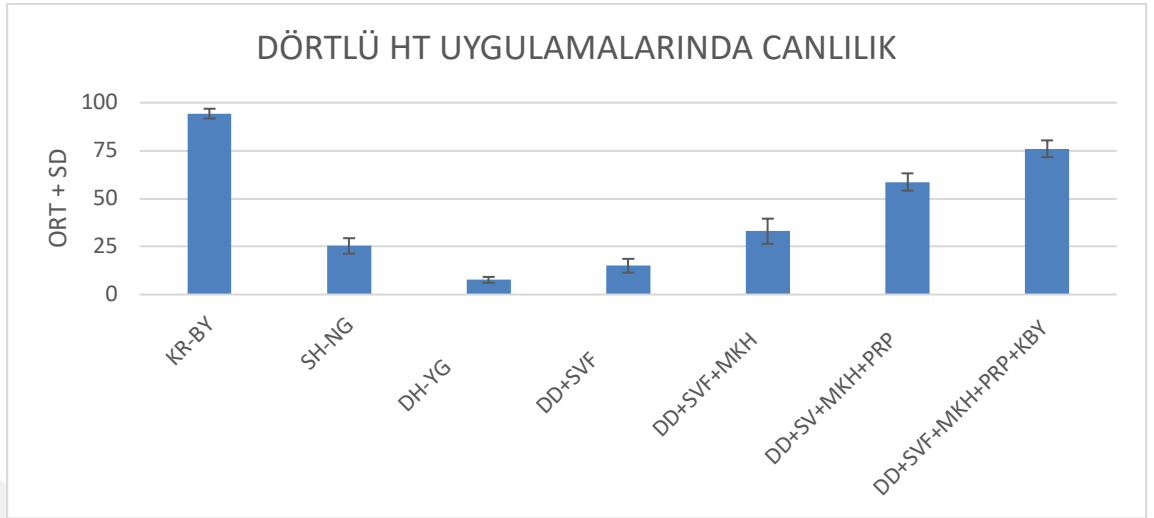
6.6.1 Dörtlü Uygulamaların Canlılık Bulguları

Canlılık değerlendirmesi Eozin Y ile yapıldı. KG grubuna göre DG canlılığı 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde azaldı. Dörtlü uygulamaların anlamlı olarak canlılığı koruduğu saptandı (Resim 6.30).



Resim 6.30. Dörtlü HT uygulamaları için canlılık boyaması.

Yapılan dörtlü uygulamaların etkinlik açısından PRP>MKH>SVF>KBY şeklinde canlılığı koruduğu saptandı (Şekil 6.36).



Şekil 6.36. Dörtlü HT uygulamaları için canlılık testi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DH-YG+SVF (DG+SVF), DH-YG+SVF+MKH (DG+SVF+MKH), DH-YG+SVF+MKH+PRP (DG+SVF+MKH+PRP).

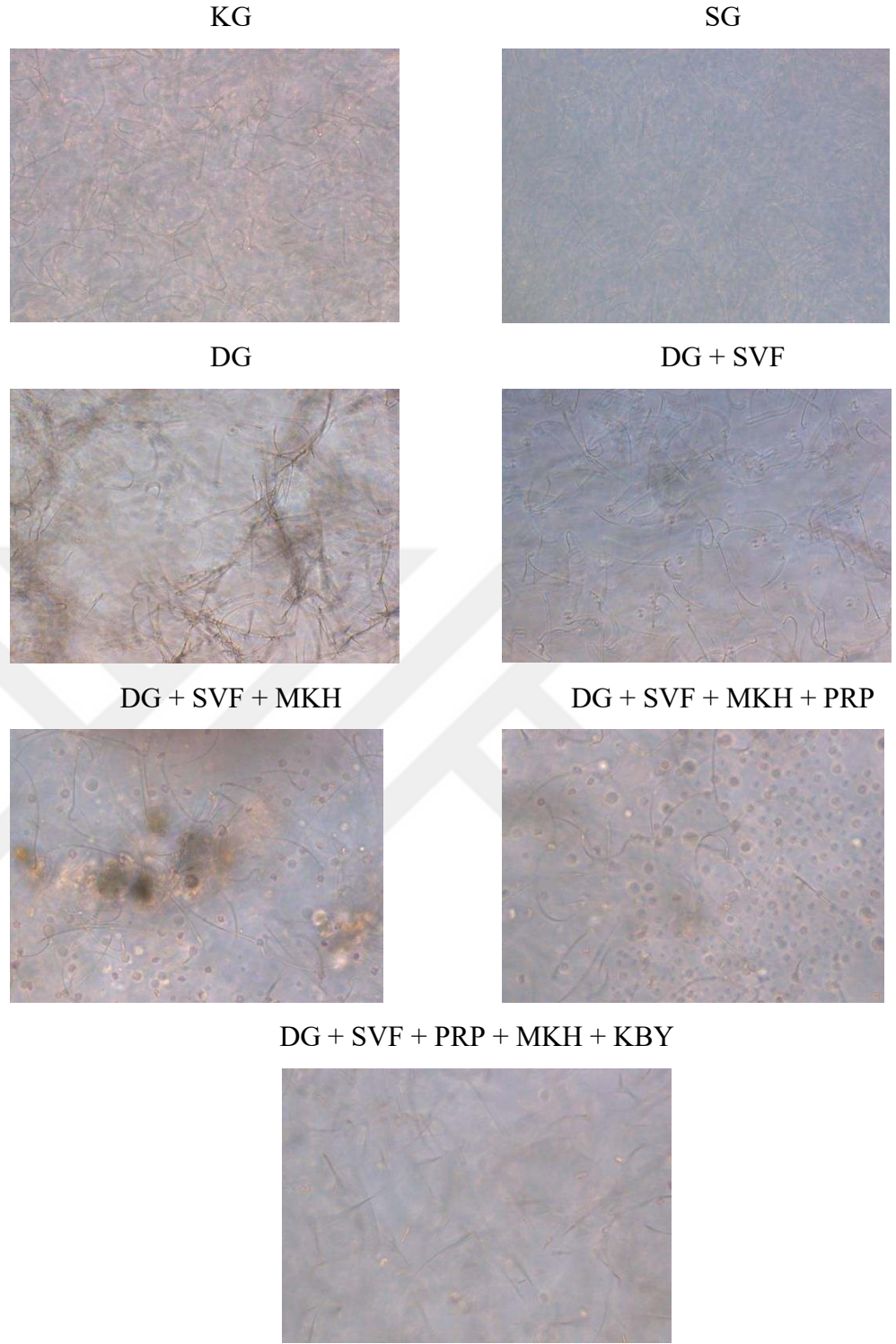
Tablo 6.29. Dörtlü HT uygulamaları için canlılık testi.

Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	69.000	28.825 ***	P<0.001
KR-BY vs DH-YG	86.667	36.205 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SVF	79.333	33.142 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SVF+MKH	61.333	25.622 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SV+MKH+PRP	35.667	14.900 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	18.333	7.659 **	P<0.01
SH-NG vs DH-YG	17.667	7.380 **	P<0.01
SH-NG vs DD+SV+MKH+PRP	-33.333	13.925 ***	P<0.001
SH-NG vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	-50.667	21.166***	P<0.001
DH-YG vs DD+SVF+MKH	-25.333	10.583 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+SV+MKH+PRP	-51.000	21.305 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	-68.333	28.546***	P<0.001
DD+SVF vs DD+SVF+MKH	-18.000	7.520 **	P<0.01
DD+SVF vs DD+SV+MKH+PRP	-43.667	18.242 ***	P<0.001

6.6.2 Dörtlü Uygulamaların Hareket Bulguları

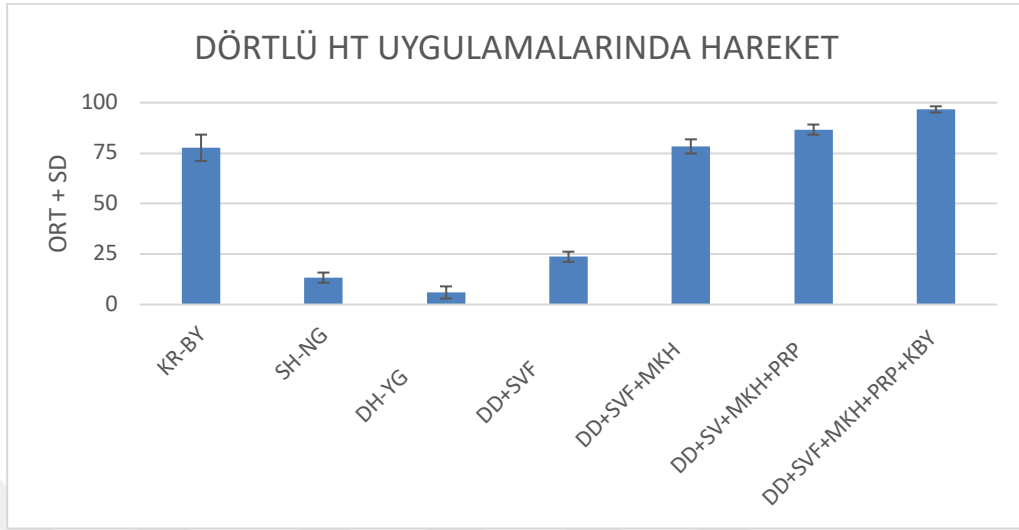
Faz kontrast mikroskobu ile yapılan hareket değerlendirmesinde. KG grubuna göre DG hareketi 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde azaldı. Dörtlü uygulamaların anlamlı olarak hareketi koruduğu saptandı. (Resim 6.31).





Resim 6.31. Dörtlü HT uygulamaları için hareketliliğin faz kontrast görüntüleri.

Yapılan dörtlü uygulamaların etkinlik açısından PRP>MKH>SVF>KBYeklinde hareketliliği koruduğu saptandı (ekil 6.37).



Şekil 6.37. Dörtlü HT uygulamaları için hareketlilik testi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DH-YG+SVF (DG+SVF), DH-YG+SVF+MKH (DG+SVF+MKH), DH-YG+SVF+MKH+PRP (DG+SVF+MKH+PRP), DH-YG+SVF+MKH+PRP+KBY (DG+SVF+MKH+PRP+KBY).

Tablo 6.30. Dörtlü HT uygulamaları için hareketlilik testi.

Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	69.000	43.709 ***	P<0.001
KR-BY vs DH-YG	86.667	54.900 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SVF	70.667	44.765 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SVF+MKH	16.000	10.135 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SV+MKH+PRP	7.667	4.857 *	P<0.05
SH-NG vs DH-YG	17.667	11.191 ***	P<0.001
SH-NG vs DD+SVF+MKH	-53.000	33.573 ***	P<0.001
SH-NG vs DD+SV+MKH+PRP	-61.333	38.852 ***	P<0.001
SH-NG vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	-71.333	45.187***	P<0.001
DH-YG vs DD+SVF	-16.000	10.135 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+SVF+MKH	-70.667	44.765 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+SV+MKH+PRP	-79.000	50.043 ***	P<0.001

DH-YG vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	-89.000 56.378*** P<0.001
DD+SVF vs DD+SVF+MKH	-54.667 34.629 *** P<0.001
DD+SVF vs DD+SV+MKH+PRP	-63.000 39.908 *** P<0.001
DD+SVF vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	-73.000 46.243*** P<0.001
DD+SVF+MKH vs DD+SV+MKH+PRP	-8.333 5.279 * P<0.05
DD+SVF+MKH vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	-18.333 11.613*** P<0.001
DD+SV+MKH+PRP vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	-10.000 6.335 ** P<0.01

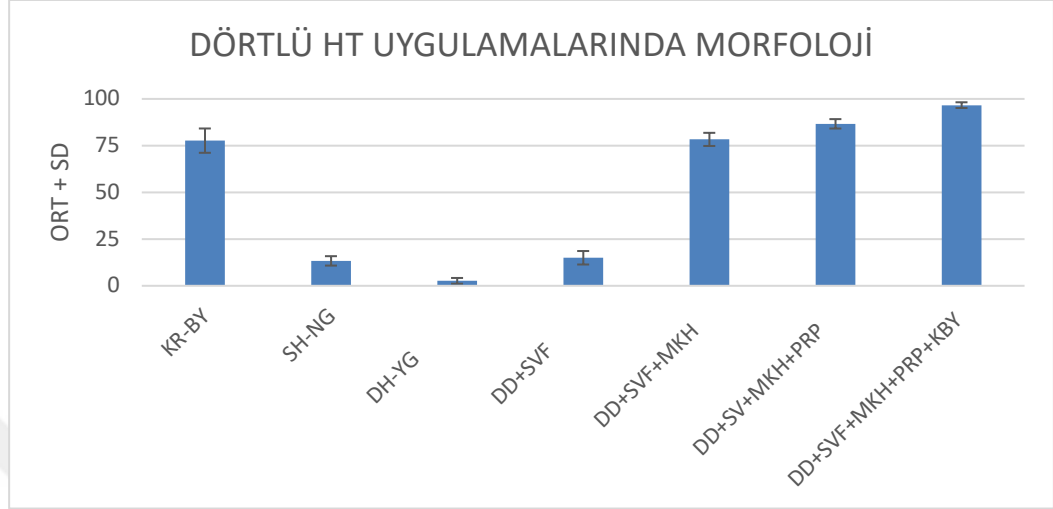
6.6.3 Dörtlü Uygulamaların Morfoloji Değerlendirmesi

Morfoloji değerlendirmesi **Diff Quick** ile yapıldı. KG grubunda saptanan normal morfolojinin DG ile 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde bozulduğu görüldü. Dörtlü uygulamaların anlamlı bir şekilde morfolojiyi koruduğu saptandı (Resim 6.32).



Resim 6.32. Dörtlü HT uygulamalarında Diff Quick ile morfoloji değeriendirme.

Yapılan uygulamalarda sırası ile dörtlü uygulamaların PRP>MKH>SVF>KBY Şeklinde morfolojiyi koruduğu saptandı (Şekil 6.38). Örnekler arasında morfoloji değerlendirmesinde oldukça anlamlı($p<0,001$) farklılığın olduğu görüldü.



Şekil 6.38. Dörtlü HT uygulamalar için morfoloji değerlendirmesi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DH-YG+SVF (DG+SVF), DH-YG+SVF+MKH (DG+SVF+MKH), DH-YG+SVF+MKH+PRP (DG+SVF+MKH+PRP), DH-YG+SVF+MKH+PRP+KBY (DG+SVF+MKH+PRP+KBY).

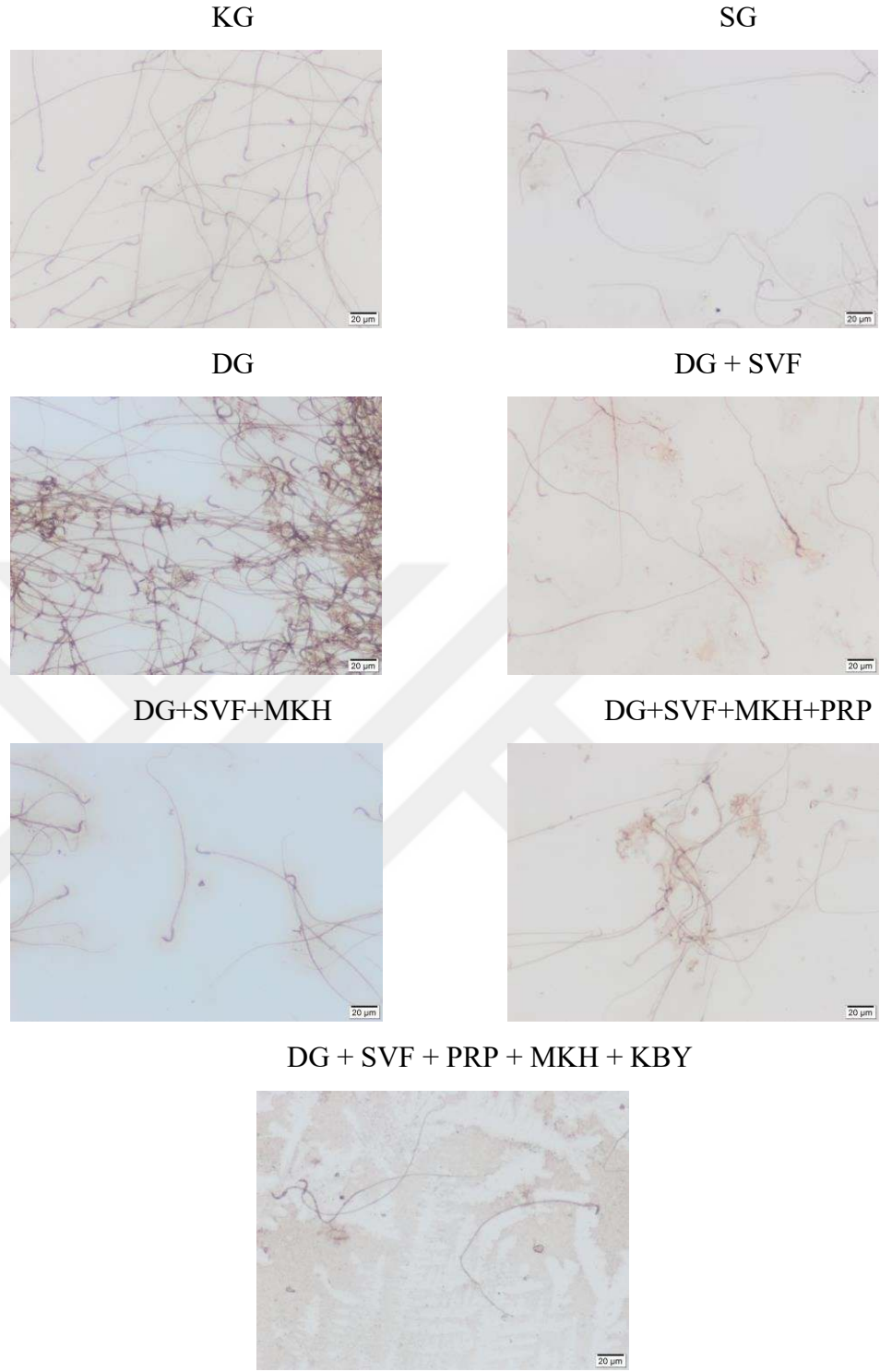
Tablo 6.31. Dörtlü HT uygulamaları için morfoloji değerlendirmesi.

Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değer
KR-BY vs SH-NG	69.000	41.165 ***	$P<0.001$
KR-BY vs DH-YG	86.667	51.705 ***	$P<0.001$
KR-BY vs DD+SVF	79.333	47.330 ***	$P<0.001$
KR-BY vs DD+SVF+MKH	16.000	9.546 ***	$P<0.001$
KR-BY vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	-2.333	1.392 ns	$P>0.05$
SH-NG vs DH-YG	17.667	10.540 ***	$P<0.001$
SH-NG vs DD+SVF	10.333	6.165 **	$P<0.01$
SH-NG vs DD+SVF+MKH	-53.000	31.620 ***	$P<0.001$
SH-NG vs DD+SVF+MKH+PRP	-61.333	36.591 ***	$P<0.001$
SH-NG vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	-71.333	42.558 ***	$P<0.001$
DH-YG vs DD+SVF+MKH	-70.667	42.160 ***	$P<0.001$

DH-YG vs DD+SV+MKH+PRP	-79.000 47.131 *** P<0.001
DH-YG vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	-89.000 53.097*** P<0.001
DD+SVF vs DD+SVF+MKH	-63.333 37.785 *** P<0.001
DD+SVF vs DD+SV+MKH+PRP	-71.667 42.756 *** P<0.001
DD+SVF vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	-81.667 48.722*** P<0.001
DD+SVF+MKH vs DD+SV+MKH+PRP	-8.333 4.972 * P<0.05
DD+SVF+MKH vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	-18.333 10.938*** P<0.001
DD+SV+MKH+PRP vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	-10.000 5.966 * P<0.05

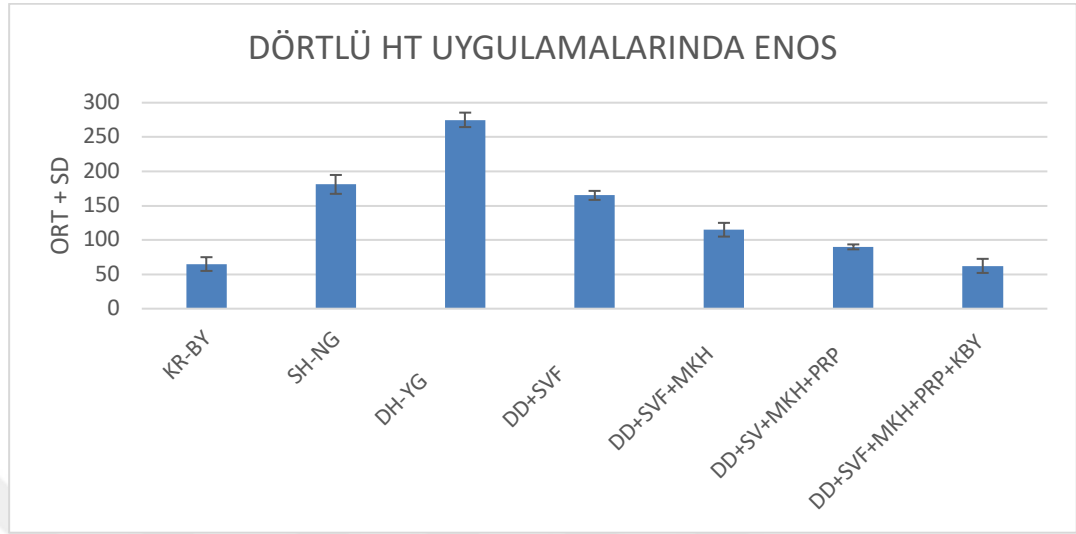
6.6.4 Dörtlü Uygulamaların eNOS İmmunohistokimyasal Bulguları

Oksidatif stres değerlendirmesi eNOS İHK ile yapıldı. KG saptanan stresin DG ile 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. Dörtlü uygulamaların anlamlı bir şekilde oksidatif stresten koruduğu saptandı (Resim 6.33).



Resim 6.33. Dörtlü HT uygulamalarında Oksidatif stresin eNOS ile değerlendirmesi.

Yapılan h-skor ile uygulamalarda sırası ile dörtlü uygulamaların PRP>MKH>SVF>KBY şeklinde oksidatif stresi azalttığı saptandı (Şekil 6.39).



Şekil 6.39. Dörtlü uygulamalar için e-NOS İHK değerlendirmesi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DH-YG+SVF (DG+SVF), DH-YG+SVF+MKH (DG+SVF+MKH), DH-YG+SVF+MKH+PRP (DG+SVF+MKH+PRP), DH-YG+SVF+MKH+PRP+KBY (DG+SVF+MKH+PRP+KBY).

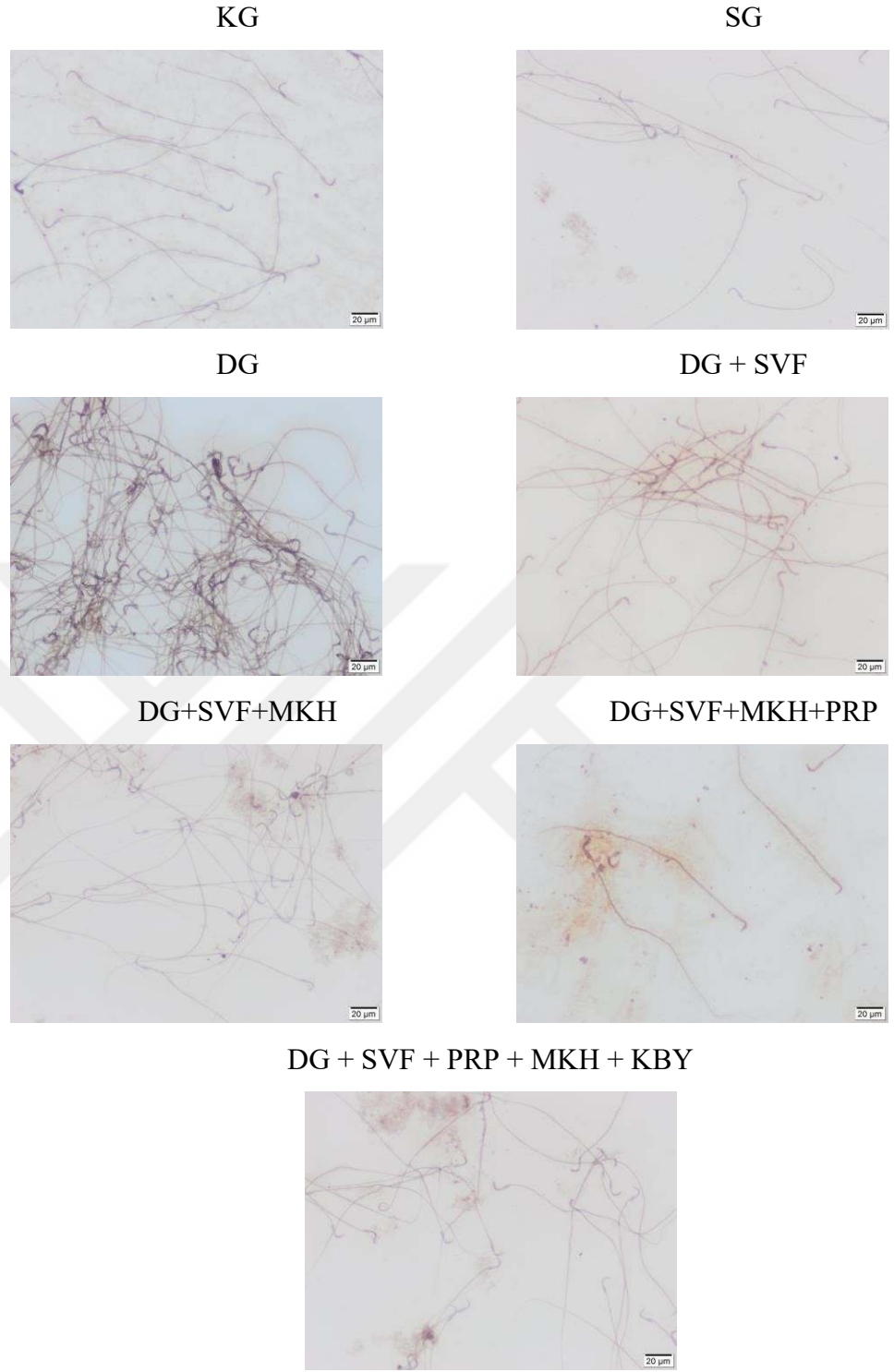
Tablo 6.32. Dörtlü HT uygulamalarında h-skor ile eNOS İHK değerlendirmesi.

Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	-116.00	20.671	*** P<0.001
KR-BY vs DH-YG	-210.00	37.421	*** P<0.001
KR-BY vs DD+SVF	-100.00	17.820	*** P<0.001
KR-BY vs DD+SVF+MKH	-50.000	8.910	*** P<0.001
SH-NG vs DH-YG	-94.000	16.750	*** P<0.001
SH-NG vs DD+SVF+MKH	66.000	11.761	*** P<0.001
SH-NG vs DD+SV+MKH+PRP	91.000	16.216	*** P<0.001
SH-NG vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	118.67	21.146	*** P<0.001
DH-YG vs DD+SVF	110.00	19.602	*** P<0.001
DH-YG vs DD+SVF+MKH	160.00	28.511	*** P<0.001
DH-YG vs DD+SV+MKH+PRP	185.00	32.966	*** P<0.001

DH-YG vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	212.67	37.896***	P<0.001
DD+SVF vs DD+SVF+MKH	50.000	8.910 ***	P<0.001
DD+SVF vs DD+SV+MKH+PRP	75.000	13.365 ***	P<0.001
DD+SVF vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	102.67	18.295***	P<0.001
DD+SVF+MKH vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	52.667	9.385***	P<0.001
DD+SV+MKH+PRP vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	27.667	4.930 *	P<0.05

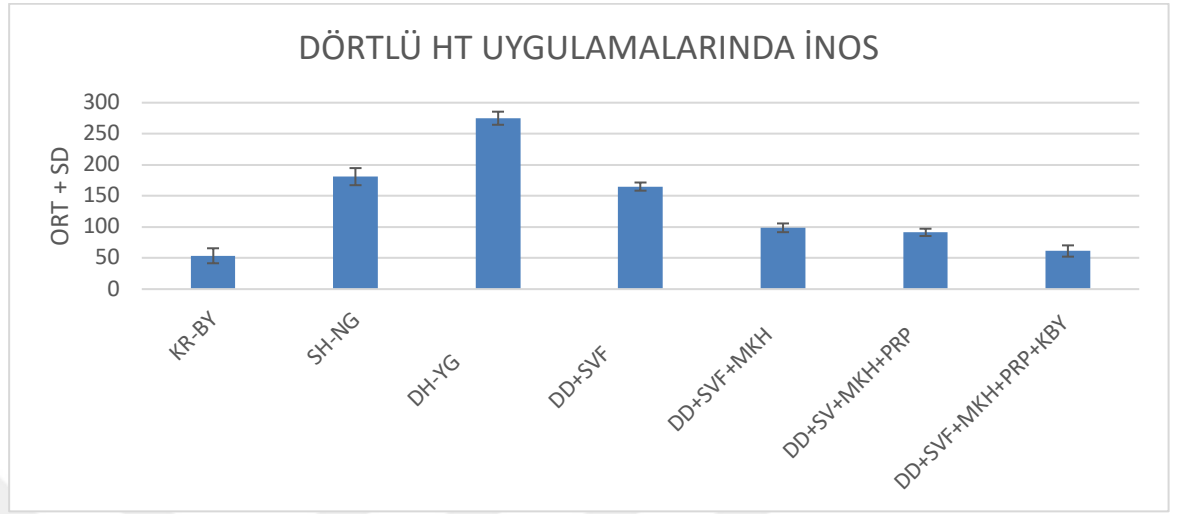
6.6.5 Dörtlü Uygulamaların iNOS İmmunohistokimyasal Bulguları

Oksidatif stres değerlendirmesi iNOS İHK ile yapıldı. KG saptanan stresin DG ile 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. Dörtlü uygulamaların anlamlı bir şekilde oksidatif stresten koruduğu saptandı (Resim 6.34).



Resim 6.34. Dörtlü HT uygulamalarında Oksidatif stresin iNOS ile yapılan değerlendirmesi.

Yapılan h-skor ile uygulamalarda sırası ile dörtlü uygulamaların PRP>MKH>SVF>KBYeklinde oksidatif stresi azalttığı saptandı (ekil 6.40).



Şekil 6.40. Dörtlü HT uygulamalar için i-NOS İHK değerlendirmesi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DH-YG+SVF (DG+SVF), DH-YG+SVF+MKH (DG+SVF+MKH), DH-YG+SVF+MKH+PRP (DG+SVF+MKH+PRP), DH-YG+SVF+MKH+PRP+KBY (DG+SVF+MKH+PRP+KBY).

Tablo 6.33. Dörtlü HT uygulamalarında h-skor ile iNOS İHK değerlendirmesi.

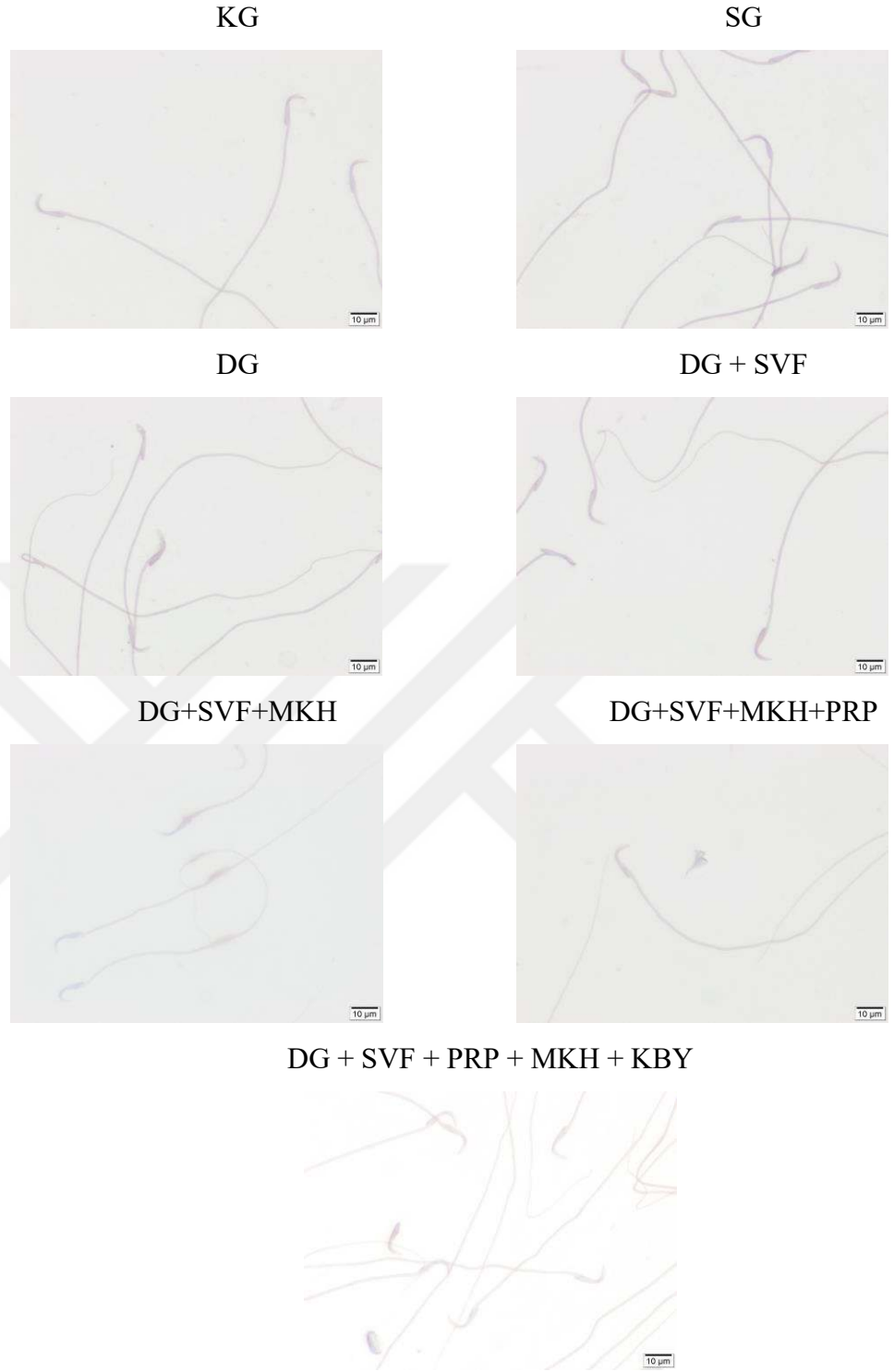
Ortalamaların karılatırılması	Fark	q	P değerı
KR-BY vs SH-NG	-127.33	22.811 ***	P<0.001
KR-BY vs DH-YG	-221.33	39.651 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SVF	-111.33	19.945 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SVF+MKH	-45.000	8.062 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SV+MKH+PRP	-37.667	6.748 **	P<0.01
SH-NG vs DH-YG	-94.000	16.840 ***	P<0.001
SH-NG vs DD+SVF+MKH	82.333	14.750 ***	P<0.001
SH-NG vs DD+SV+MKH+PRP	89.667	16.064 ***	P<0.001
SH-NG vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	119.67	21.438***	P<0.001
DH-YG vs DD+SVF	110.00	19.706 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+SVF+MKH	176.33	31.590 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+SV+MKH+PRP	183.67	32.903 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	213.67	38.278***	P<0.001

DD+SVF vs DD+SVF+MKH	66.333	11.883	***	P<0.001
DD+SVF vs DD+SV+MKH+PRP	73.667	13.197	***	P<0.001
DD+SVF vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	103.67	18.572	***	P<0.001
DD+SVF+MKH vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	37.333	6.688	**	P<0.01
DD+SV+MKH+PRP vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	30.000	5.374	*	P<0.05

6.6.6 TUNEL işaretleme

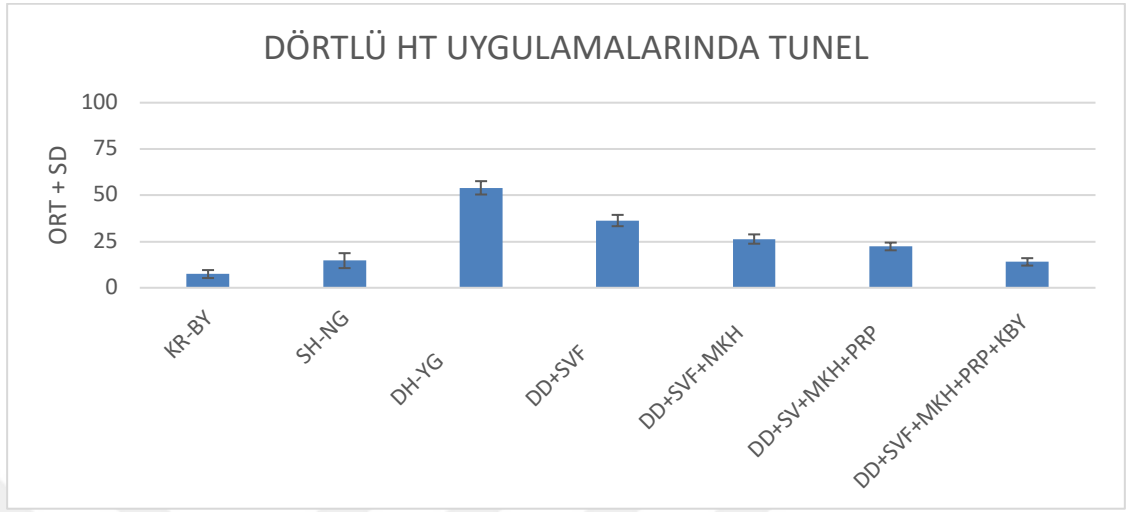
Apoptoz değerlendirmesi **TUNEL işaretleme** ile yapıldı. KG saptanan apoptozun DG ile 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. Dörtlü uygulamaların anlamlı bir şekilde apoptozu azalttığı saptandı (Resim 6.35).





Resim 6.35. Dörtlü HT uygulamalarında Apoptozun **TUNEL** işaretlemeşi değerlendirilmesi.

Yapılan apoptotik indeks ile uygulamalarda sırası ile dörtlü uygulamaların anlamlı bir şekilde apoptozun azalttığı saptandı (Şekil 6.41).



Şekil 6.41. Dörtlü HT uygulamalarında Apoptotik indeks ile TUNEL değerlendirmesi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DH-YG+SVF (DG+SVF), DH-YG+SVF+MKH(DG+SVF+MKH),DH-YG+SVF+MKH+PRP (DG+SVF+MKH+PRP), DH-YG+SVF+MKH+PRP+KBY (DG+SVF+MKH+PRP+KBY).

Tablo 6.34. Dörtlü HT uygulamalarında apoptotik indeks ile TUNEL değerlendirmesi.

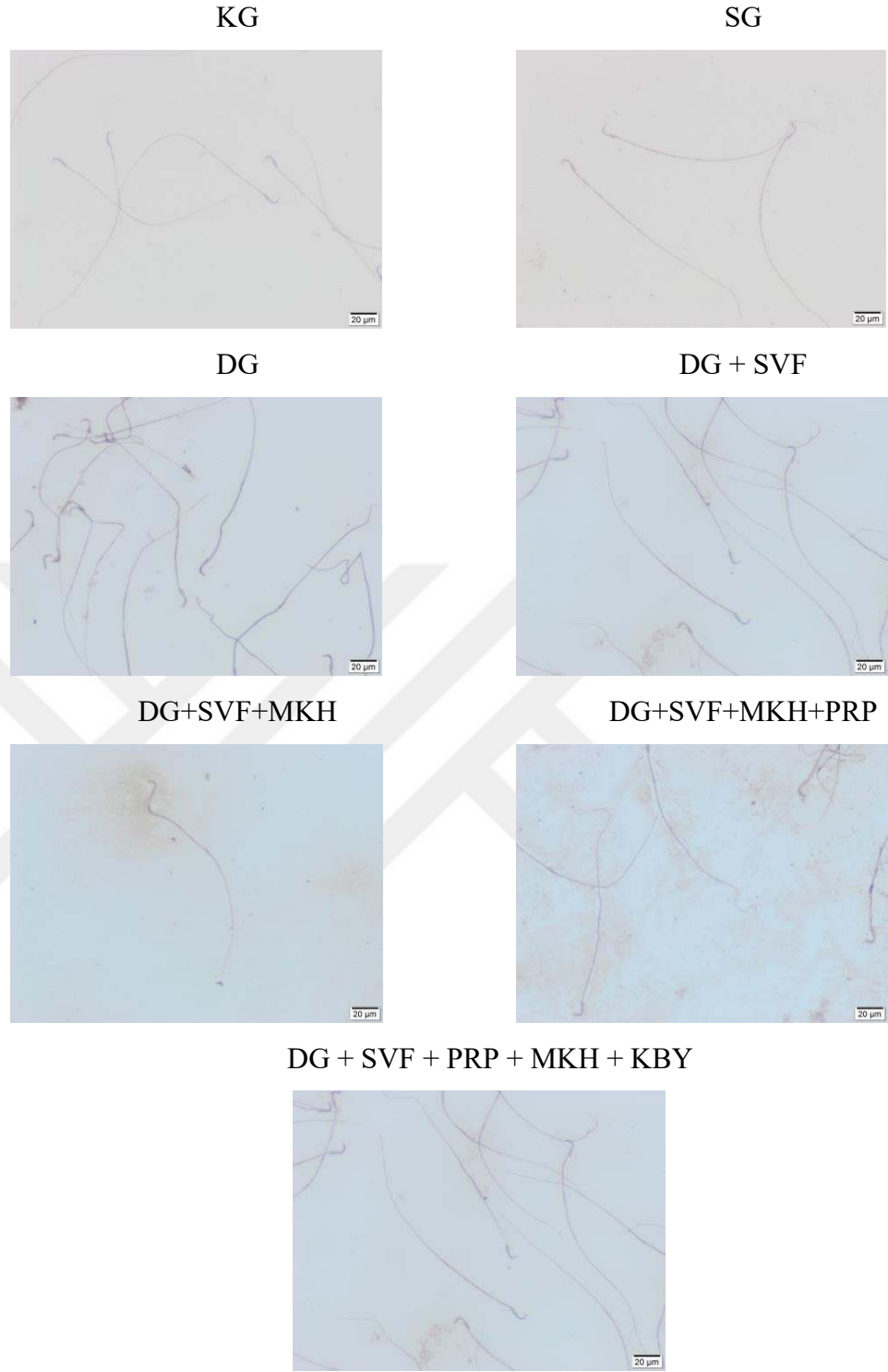
Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs DH-YG	-46.583	28.035	*** P<0.001
KR-BY vs DD+SVF	-28.917	17.403	*** P<0.001
KR-BY vs DD+SVF+MKH	-18.917	11.385	*** P<0.001
KR-BY vs DD+SV+MKH+PRP	-14.917	8.977	*** P<0.001
SH-NG vs DH-YG	-39.333	23.672	*** P<0.001
SH-NG vs DD+SVF	-21.667	13.040	*** P<0.001
SH-NG vs DD+SVF+MKH	-11.667	7.021	** P<0.01
DH-YG vs DD+SVF	17.667	10.632	*** P<0.001
DH-YG vs DD+SVF+MKH	27.667	16.651	*** P<0.001
DH-YG vs DD+SV+MKH+PRP	31.667	19.058	*** P<0.001
DH-YG vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	40.000	24.073	*** P<0.001
DD+SVF vs DD+SVF+MKH	10.000	6.018	* P<0.05

DD+SVF vs DD+SV+MKH+PRP 14.000 8.426 *** P<0.001
DD+SVF vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY 22.333 13.441*** P<0.001
DD+SVF+MKH vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY 12.333 7.423 ** P<0.01
DD+SV+MKH+PRP vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY 8.333 5.015 * P<0.05

6.6.7 Dörtlü Uygulamaların Caspase 3 İmmunohistokimyasal Bulguları

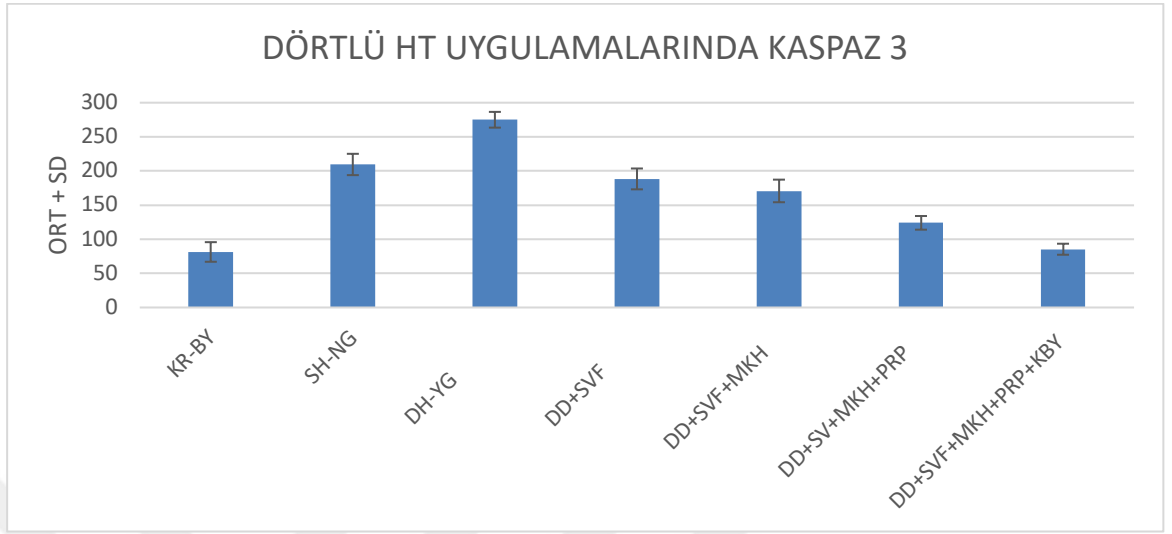
Apoptoz değerlendirmesi **Caspase 3 İHK** ile yapıldı. KG grubunda saptanan apoptozun DG ile 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. Dörtlü uygulamaların anlamlı bir şekilde apoptozu azalttığı saptandı (Resim 6.36).





Resim 6.36. Dörtlü HT uygulamalarında Apoptozun kaspaz 3 ile değerlendirmesi.

Yapılan h-skor ile uygulamalarda sırası ile dörtlü uygulamaların PRP>MKH>SVF>KBY şeklinde apoptozu azalttığı saptandı (Şekil 6.42).



Şekil 6.42. Dörtlü HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 3 İHK değerlendirmesi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DH-YG+SVF (DG+SVF), DH-YG+SVF+MKH (DG+SVF+MKH), DH-YG+SVF+MKH+PRP (DG+SVF+MKH+PRP), DH-YG+SVF+MKH+PRP+KBY (DG+SVF+MKH+PRP+KBY).

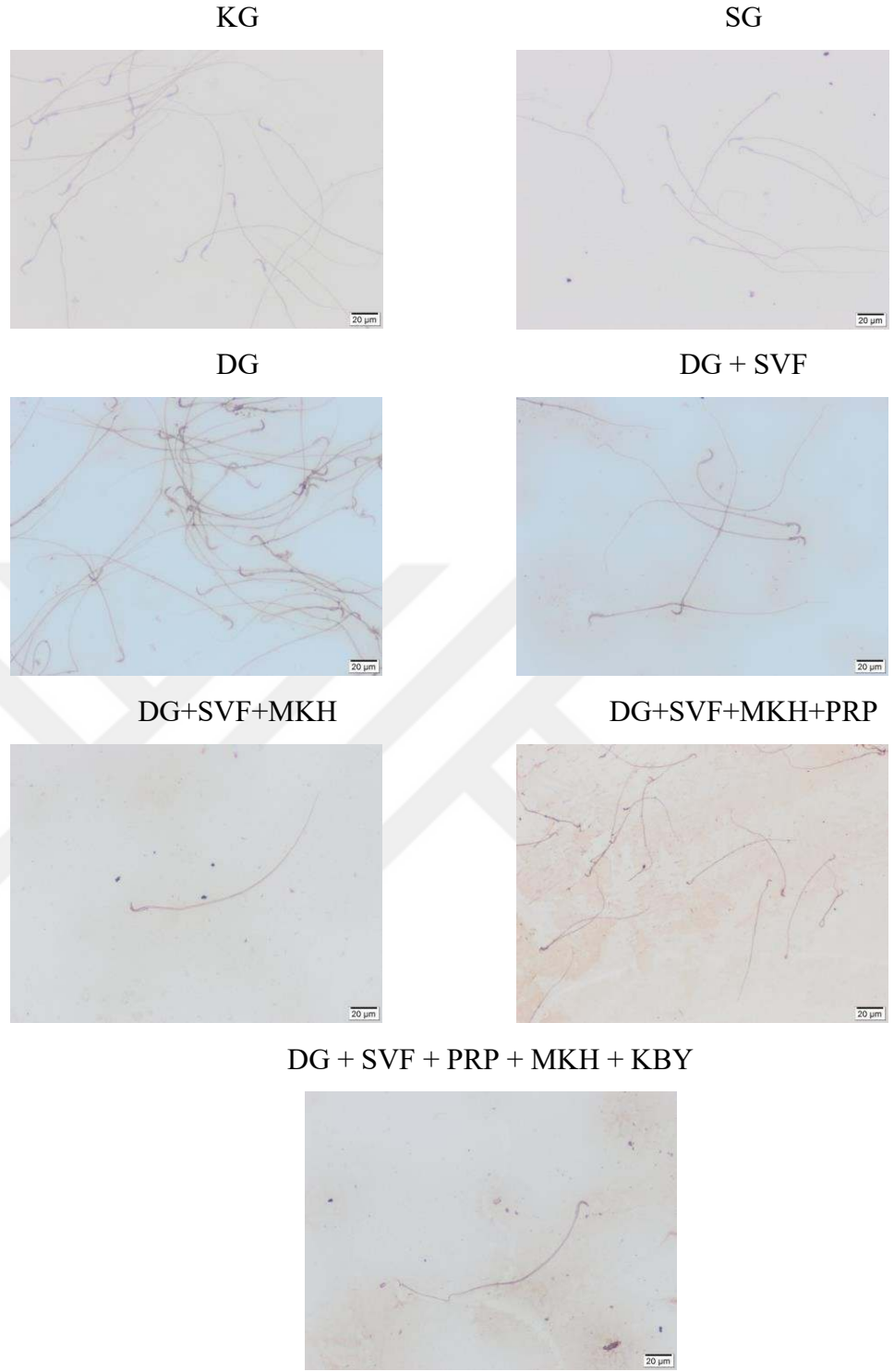
Tablo 6.35. Dörtlü HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 3 İHK değerlendirmesi.

Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	-128.17	16.574 ***	P<0.001
KR-BY vs DH-YG	-193.67	25.044 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SVF	-107.00	13.837 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SVF+MKH	-89.400	11.561 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SV+MKH+PRP	-42.667	5.518 *	P<0.05
SH-NG vs DH-YG	-65.500	8.470 ***	P<0.001
SH-NG vs DD+SVF+MKH	38.767	5.013 *	P<0.05
SH-NG vs DD+SV+MKH+PRP	85.500	11.057 ***	P<0.001
SH-NG vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	124.17	16.057 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+SVF	86.667	11.207 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+SVF+MKH	104.27	13.483 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+SV+MKH+PRP	151.00	19.527 ***	P<0.001

DH-YG vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY 189.67 24.527*** P<0.001
DD+SVF vs DD+SV+MKH+PRP 64.333 8.319 *** P<0.001
DD+SVF vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY 103.00 13.320*** P<0.001
DD+SVF+MKH vs DD+SV+MKH+PRP 46.733 6.043 * P<0.05
DD+SVF+MKH vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY 85.400 11.044*** P<0.001
DD+SV+MKH+PRP vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY 38.667 5.000 * P<0.05

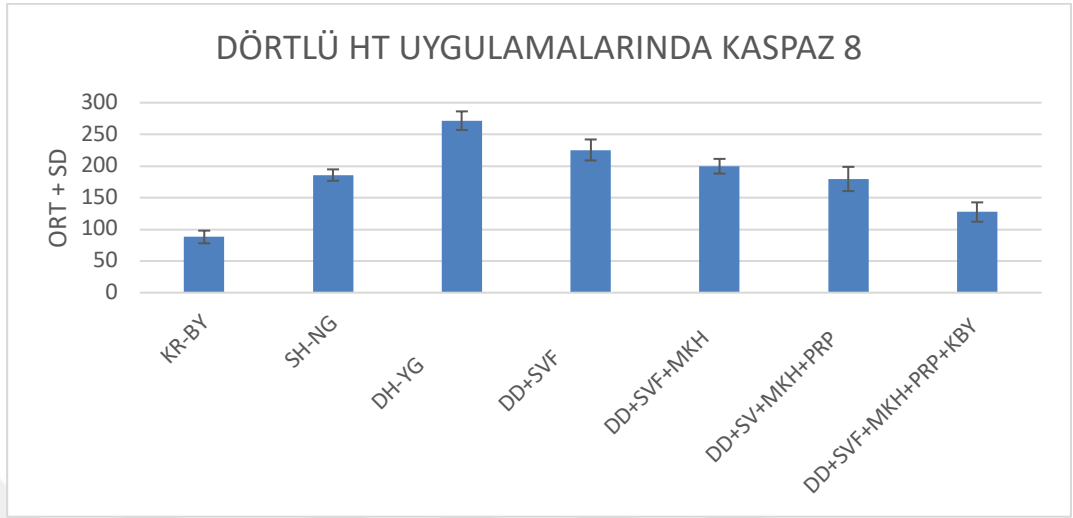
6.6.8 Dörtlü Uygulamaların Caspase 8 İmmunohistokimyasal Bulguları

Apoptoz değerlendirmesi **Caspase 8 İHK** ile yapıldı. KG grubunda saptanan apoptozun DG ile 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. Dörtlü uygulamaların anlamlı bir şekilde apoptozu azalttığı saptandı (Resim 6.37).



Resim 6.37. Dörtlü HT uygulamalarında Apoptozun kaspaz 8 ile değerlendirmesi.

Yapılan h-skor ile uygulamalarda sırası ile dörtlü uygulamaların PRP>MKH>SVF>KBY şeklinde apoptozu azalttığı saptandı (Şekil 6.43).



Şekil 6.43. Dörtlü HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 8 İHK değerlendirmesi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DH-YG+SVF (DG+SVF), DH-YG+SVF+MKH (DG+SVF+MKH), DH-YG+SVF+MKH+PRP (DG+SVF+MKH+PRP), DH-YG+SVF+MKH+PRP+KBY (DG+SVF+MKH+PRP+KBY).

Tablo 6.36. Dörtlü HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 8 İHK değerlendirmesi.

Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	-69.800	10.749 ***	P<0.001
KR-BY vs DH-YG	-153.47	23.634 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SVF	-113.18	17.431 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SVF+MKH	-84.207	12.968 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SV+MKH+PRP	-57.467	8.850 ***	P<0.001
SH-NG vs DH-YG	-83.667	12.885 ***	P<0.001
SH-NG vs DD+SVF	-43.383	6.681 **	P<0.01
SH-NG vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	50.000	7.700 **	P<0.01
DH-YG vs DD+SVF	40.283	6.204 **	P<0.01
DH-YG vs DD+SVF+MKH	69.260	10.666 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+SV+MKH+PRP	96.000	14.784 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	133.67	20.585 ***	P<0.001
DD+SVF vs DD+SV+MKH+PRP	55.717	8.581 ***	P<0.001

DD+SVF vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY 93.383 14.381*** P<0.001

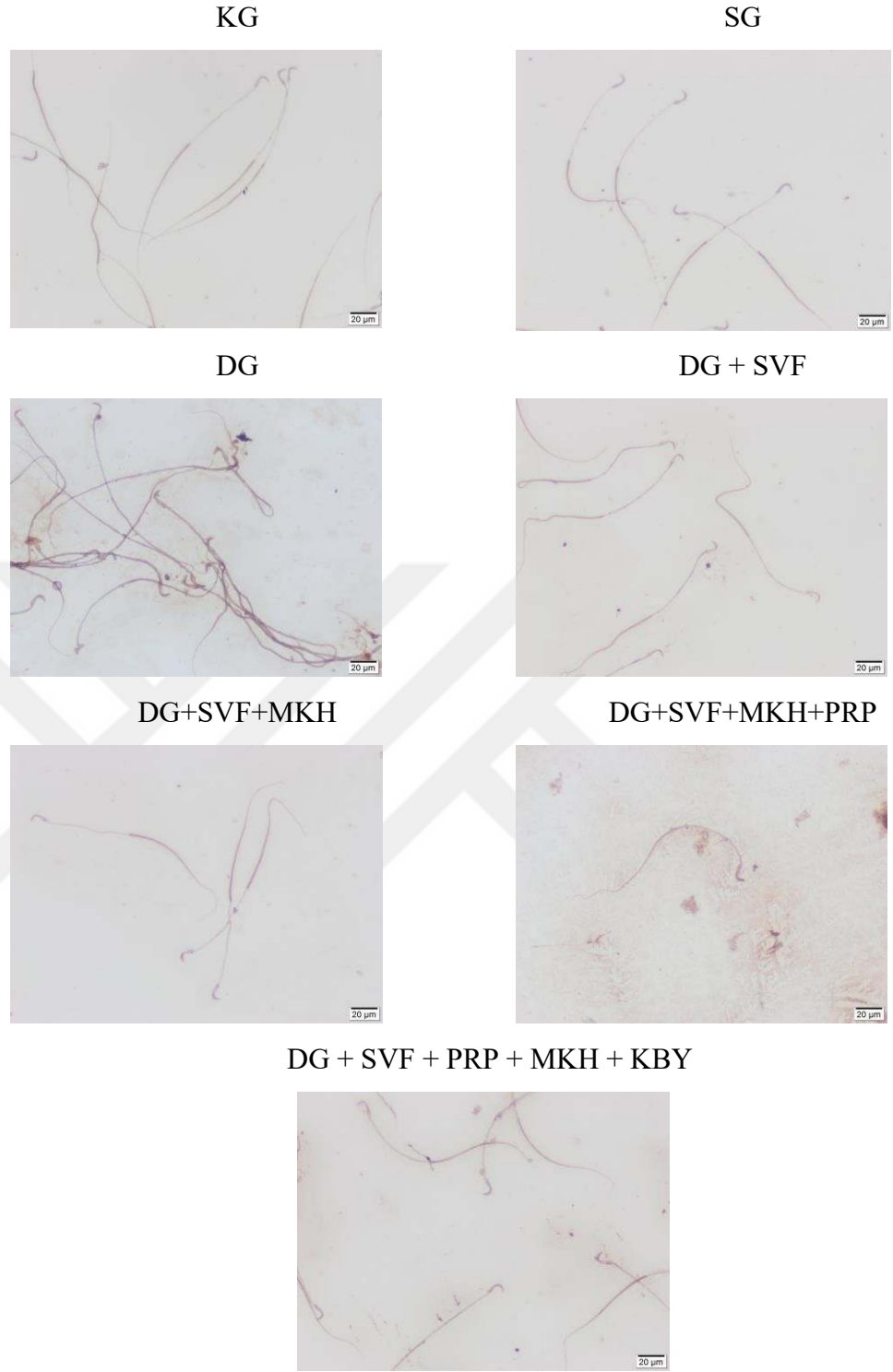
DD+SVF+MKH vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY 64.407 9.919*** P<0.001

DD+SV+MKH+PRP vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY 37.667 5.801 * P<0.05

6.6.9 Dörtlü Uygulamaların Caspase 9 İmmunohistokimyasal Bulguları

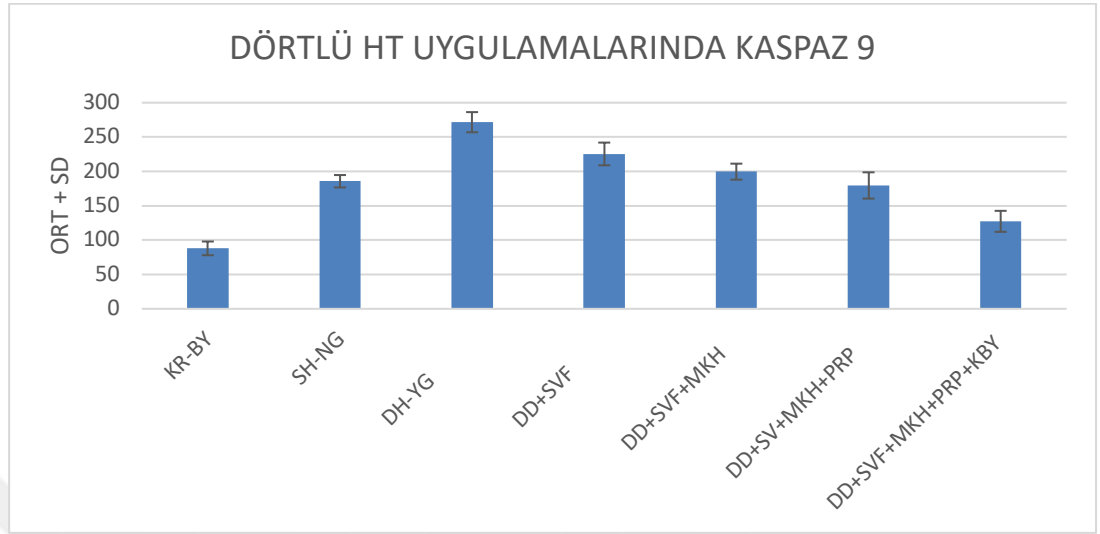
Apoptoz değerlendirmesi **Caspase 9 İHK** ile yapıldı. KG grubunda saptanan apoptozun DG ile 1 saat sonunda oldukça anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. Dörtlü uygulamaların anlamlı bir şekilde apoptozu azalttığı saptandı (Resim 6.38).





Resim 6.38. Dörtlü HT uygulamalarında Apoptozun kaspaz 9 ile değ erlendirmesi.

Yapılan h-skor ile uygulamalarda sırası ile dörtlü uygulamaların PRP>MKH>SVF>KBY şeklinde apoptozu azalttığı saptandı (Şekil 6.44).



Şekil 6.44. Dörtlü HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 9 İHK değerlendirmesi. KR-BY (KG), SH-NG (SG), DH-YG (DG), DH-YG+SVF (DG+SVF), DH-YG+SVF+MKH (DG+SVF+MKH), DH-YG+SVF+MKH+PRP (DG+SVF+MKH+PRP), DH-YG+SVF+MKH+PRP+KBY (DG+SVF+MKH+PRP+KBY).

Tablo 6.37. Dörtlü HT uygulamalarında h-skor ile kaspaz 9 İHK değerlendirmesi.

Ortalamaların karşılaştırılması	Fark	q	P değeri
KR-BY vs SH-NG	-97.667	11.943 ***	P<0.001
KR-BY vs DH-YG	-183.61	22.452 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SVF	-137.38	16.799 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SVF+MKH	-111.63	13.650 ***	P<0.001
KR-BY vs DD+SV+MKH+PRP	-91.553	11.195 ***	P<0.001
SH-NG vs DH-YG	-85.942	10.509 ***	P<0.001
SH-NG vs DD+SVF	-39.712	4.856 *	P<0.05
SH-NG vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	58.333	7.133 **	P<0.01
DH-YG vs DD+SVF	46.230	5.653 *	P<0.05
DH-YG vs DD+SVF+MKH	71.978	8.801 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+SV+MKH+PRP	92.056	11.257 ***	P<0.001
DH-YG vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY	144.28	17.642 ***	P<0.001
DD+SVF vs DD+SV+MKH+PRP	45.825	5.604 *	P<0.05

DD+SVF vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY 98.045 11.989*** P<0.001

DD+SVF+MKH vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY 72.297 8.840*** P<0.001

DD+SV+MKH+PRP vs DD+SVF+MKH+PRP+KBY 52.220 6.385 ** P<0.01



7. TARTIŞMA

Çalışmamızda, STZ ile ağır diyabete maruz kalmış sıçanların spermlerine in vitro ortamda, tedavi amaçlı SVF, PRP, MKH ve KBY uygulanarak, histopatolojik, immünohistokimyal ve TUNEL yöntemleriyle incelendi. DB in vitro modelinin sperm hasarına neden olduğu ve bu hasarın diğer tedavi seçenekleri için bir model olarak kullanılarak önlenebileceği kanıtlanmıştır. Bu durum hücre sayısını ve büyüme faktörlerini artırmanın ayrıca sinyal mekanizmalarını güçlendirmenin bir sonucudur. Bu çalışmada SVF, PRP, MKH ve KBY kombinasyonunun hücresel tedavi olarak oldukça etkili olabileceği bulundu. SVF, PRP, MKH ve KBY gibi hücre tedavilerinin in vivo ve in vitro diyabetik hasarı azaltabildiğini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda, önemli ölçüde başarılı hücre tedavilerinin tek bir uygulaması kullanılmıştır. Amacımız, her uygulamanın sinerjisini elde etmek için bu uygulamaların bir kombinasyonunu kullanmaktır. SVF uygulaması, PRP ve KBY den gelen yeterli MKH ve büyüme faktörüne bunun yanında sitokine sahiptir. Sonuçlarımız, kombinasyonun yararının diyabetik ve oksidatif hasara karşı büyük bir başarı olduğunu gösterdi. Tekli veya ikili uygulamaları üçlü uygulamalarla karşılaştırdığımızda çok daha iyiydi. En iyi sonuçları dört uygulamanın hepsinin kombinasyonu ile aldık. DB, sperm için önemli ölçüde azalmış canlılığa ve hareketsizliğe neden oldu.

Bu çalışmada sağlıklı hayvanlardan alınan spermelerde kültür ortamında yüksek glikozlu besiyeri kullanılarak diyabetik hasar oluşturulmuştur. Spermere MKH, 48 saatlik salgıladıkları faktörler olan KBY ve PRP ile desteklenmiş SVF uygulamaları yapılarak deneysel diyabetik modelde sperm hasarının azaltılması amaçlanmıştır.

12 haftalık Wistar Albino cinsi 15 adet erkek sıçandan elde edilen sperm kültür ortamında 6 gözlü flasklara alınarak 15 farklı grup olacak şekilde belirlendi. Kontrol (KG), Sham (SG), DB, DB+ MKH, DB + KB, DB+MKH+ KB, DB+ PRP, DB+ SVF, DB+ MKH+PRP, DB+ MKH+ SVF, DB+ KB+ PRP, DB+ KB+ SVF, DB+MKH+ KB+ PRP, DB+ MKH + KB+ SVF ve DB+ MKH+ KB+ PRP+SVF olarak grupları ayrıldı. Bir saatlik uygulamada morfoloji, canlılık ve hareket değerlendirilmeleri

yapılarak yaymaları hazırlanan örnekler oksidatif stres için e-NOS ve i-NOS ile apoptoz için TUNEL, CASPAZ 3, CASPAZ 8 ve CASPAZ 9 ile immünohistokimyasal olarak analiz edildi.

DB besiyeri ortamının sperme verdiği hasarda oluşan morfolojik, canlılık ve hareket bozukluklarının artan eNOS ve iNOS ile artan apoptotik belirteçler ile ilişkili olduğu belirlendi. Uygulamaların istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde sperm morfoloji, canlılık ve hareketini koruyarak oksidatif stres ve apoptozu azalttığı görüldü. Tekli uygulamalarda olumlu etki varken SVF, PRP, MKH ve KBY kombinasyonunun anlamlı bir şekilde daha etkin olduğu saptandı.

DB invitro modelin, sperm hasarı yapması ve uygulamalar ile bu hasarın önlenmesi, diğer tedavi olasılıkları için önemli olabileceğini gösterdi. SVF, PRP, MKH ve KBY kombinasyonunun ilk defa kullanıldığı bu çalışma ile hücresel tedavi olarak hücre sayısının artırılması, büyüme faktörlerinin çoğaltılması ve sinyal mekanizmalarının güçlendirilmesi sonucunda oldukça yararlı olabileceği belirlendi. Toplumda yüksek prevalansta görülen ve giderek artan erkek infertilitesine yönelik hücresel tedavi gibi maliyetleri az ve etkinliği çok yeni rejeneratif yöntemin gelişmesine katkı sağlayacak sonuçlarımız çocuk sahibi olmak isteyen ailelere ümit olacaktır. Deney hayvanı ve insan çalışmaları ile bulguların doğrulanması ve mekanizmaların aydınlatılması klinikte kullanımlarını sağlayacaktır.

Önceki bir çalışmada, kültür ortamının ve serumun in vitro sıçan spermlerinin hayatta kalması üzerindeki etkisini incelemek için tasarlanmıştır. 2004 ve 2005 yılları arasında in vitro olarak, %10 fetal bovin serumu (FBS) içeren veya içermeyen farklı kültür ortamlarının; Gamete-20, RPMI-1640, alpha MEM (AMEM), Dulbecco'nun değiştirilmiş Eagle ortamı (DMEM) ve Eagle's MEM (MEM) Wistar sıçanlarının spermatidleri ve spermiumları üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Hücrelerin sayısı ve morfolojisi 4. ve 24. saatlerde kaydedilmiştir. Tüm koşullar altında hücrelerin sayısı ve canlılığı zamanla azalmış, ancak parametreler FBS' nin varlığından olumlu etkilenmiştir. 24 saatlik kültürde spermatidlerin ve spermatozoanın canlılık oranları azalmıştır. Canlılık ve morfoloji, serumlu RPMI' de en iyisi ve serumsuz MEM' de en

kötü olarak bildirilmiştir. Bu sonuçlar, farklı kültür ortamı ve FBS kompozisyonunun spermatozoanın olgunlaşması ve hayatta kalması için önemli olduğunu göstermektedir. Özenle seçilmiş kültür besiyerleri, in vitro fertilizasyon (IVF) prosedürlerinin başarısında olduğu kadar fonksiyonel spermilerin üretilmesinde de önemli roller oynayabilir (Cezayirli ve ark. 2009). Literatürdeki başka bir çalışmada ise sulandırıcı tipinin kriyosurvival üzerinde önemli etkisi ($p<0.05$) olduğu bildirilmiştir. Çözülme sonrası en yüksek motilite (%27,5), TES/Tris (TES) sulandırıcı varlığında dondurulan sperm örneklerinden elde edilmiştir ($p<0.05$). Sonuç olarak, soğutma hızı kriyoprezervasyonu önemli ölçüde etkilemese de sulandırıcıların çözülme sonrası sperm parametrelerini etkilediği ve TES epididimal Lewis sıçan spermının dondurulabilirliğini önemli ölçüde iyileştirdiği bildirilmiştir (Varışlı ve ark. 2015). Bir başka çalışmada ise, sıçan epididimal sperm kriyoprezervasyonu için ideal bir dondurma sulandırıcı ve yöntemi geliştirmek amaçlanmıştır. 30 Wistar erkek sıçandan toplanan epididimal spermier dondurularak, rafinoz içermeyen tampon veya damıtılmış ve deiyonize su, PBS veya modifiye Krebs-Ringer içinde çözülmüş çeşitli rafinoz ve yumurta sarısı konsantrasyonları ile dondurulduğunda çözülme sonrası özelliklerini incelemek için deneyler yapılmıştır. Bikarbonat mKRB bazlı genişletici, PBS veya mKRB içeren yumurta sarısı içinde çözülen farklı gliserol, Equex STM veya sodyumdodesil sülfat (SDS) konsantrasyonları da test edilmiştir. Bu deneylerden elde edilen verilere dayanarak, Equex STM, SDS ve yumurta sarısı takviyesi ile mKRB' de çözünen rafinoz, trehaloz, laktoz, fruktoz ve glikoz gibi farklı şekerlerin, dondurularak saklanan spermierin çözülme sonrası özelliklerini nasıl etkilediği daha sonraki deneylerde test edilmiştir. Dondurulmuş çözülmüş spermierin kriyo-sağkalımı, sperm motilite indeksinin (SMI) mikroskopik değerlendirmesi ile değerlendirilerek akrozom bütünlüğü FITC-PNA boyaması ile ölçülmüştür. Spermier 3 saatlik bir termal direnç testine tabi tutulmuştur. mKRB' de 0.1M rafinoz %0.75 Equex STM, %0.05 SDS ve %20 yumurta sarısı ile kullanıldığında, spermierin çözülme sonrası hayatta kalması üzerinde faydalı etkiler elde edilmiştir. Bu işlemle dondurularak saklanan sperm, diğer kriyoprotektanlar ve trehaloz, laktoz, fruktoz, glukozun çeşitli konsantrasyonlarında dondurulan sperm ile karşılaştırıldığında, inkübasyon boyunca daha yüksek bir motilite indeksi sergileyerek, daha yüksek SMI ve akrozom bütünlüğünü korumuştur. Sonuç olarak, Equex STM, SDS ve yumurta sarısı içeren mKRB içinde çözülmüş rafinozun sulandırıcı bir solüsyonunda kriyoprezervasyon, sıçan epididimal spermierin dondurulabilirliğini büyük ölçüde artırdığı bildirilmiştir (Yamashiro ve ark. 2007).

Fare testis dokuları ile hava-sıvı interfaz organ kültürü yöntemi kullanılarak in vitro spermatogenez (IVS) mümkündür. Bununla birlikte, aynı yöntem, fareler dışındaki hayvanlara pek uygulanamamıştır, yalnızca spermatogenezde ilerleme kaydedilmemekte veya sınırlı ilerleme kaydedilmektedir. Literatürde yapılan bir çalışmada, hormonlar, antioksidanlar ve lizofosfolipidler dahil olmak üzere kimyasal maddeler ekleyerek, kültür ortamının modifikasyonları ile sıçanların IVS'sini meydana çıkarmaktadır. Ek olarak, dokuları daha düşük oksijen konsantrasyonuna sahip bir inkübatöre yerleştirerek veya doku üzerine silikon örtü tavanı uygulayarak oksijen gerilimini azaltmak, spermatojenik verimliliği arttırmada etkili olmuştur. Kültür koşulunun bu modifikasyonları yoluyla, kültürlenmiş dokuda 70 gün boyunca yuvarlak spermatidlere kadar sıçan spermatogenezini muhafaza edilmiştir. Mevcut sonuçlar, sıçan IVS'inde önemli bir ilerleme olduğunu göstermiştir. Ayrıca fareler ve sıçanlar için yaygın olarak uygun olan koşulları ortaya çıkararak, sıçana özgü optimizasyonlar bulunmuştur. Bu, insanlar da dahil olmak üzere birçok hayvan türünde başarılı IVS'ye doğru önemli bir adımdır (Matsumura ve ark. 2021). Küresel sağlık için en büyük endişelerden birini temsil etmektedir ve üreme işlev bozukluğu dahil olmak üzere çeşitli klinik komplikasyonlarla ilişkilidir. Hipergliseminin hastalık patofizyolojisinin önemli bir etkeni olarak tanımlandığı göz önüne alındığında, yüksek glikoz koşullarının insan sperm fonksiyonu üzerindeki izole etkisini ele almak için in vitro bir yaklaşım kullanılmıştır. Yüksek glikozun sperm fonksiyonu üzerindeki etkisine yönelik in vitro olarak spermilerin bu koşullardan etkilendiğini gösteren birçok çalışmayapılmıştır. Genellikle in vitro sperm hazırlığı için optimal konsantrasyon için 5 mM, diyabetik durumu taklit etmek için 25 mM veya yüksek dozlarda glukoza hücre tepkisini değerlendirmek için 50 mM kullanmışlardır. Diyabetik durumu taklit etmek için 25 mM kullanılmıştır ama aynı zamanda oksidatif stres nedeniyle çoğunlukla 3 saatin sonunda ölen spermeleri inkübatör dışında ölmeleri beklenmiştir (Mahadevan ve ark. 1997, Amaral ve ark. 2011).

Diabetes mellitus glukoz homeostazının bozulması sonucu oluşan metabolik bir hastalıktır. İmmünolojik kaynaklı ortaya çıkan Tip 1 diyabet ve insülin direnci, bozulmuş insülin sekresyonu, glukoz üretimindeki artış sonucu oluşan Tip 2 diyabet olmak üzere iki farklı formu bulunmaktadır. Genetik ve çevresel faktörlerle oluşan diabetes mellitusa bağlı komplikasyonların araştırılmasında ve tedavisinde diyabetik

hayvan modelleri kullanılmaktadır (Akça ve Çeltik 2010). İnfertilite, üreme organlarında veya gametlerde, cinsiyete özgü faktörler, genital enfeksiyonlar, endokrin anormallikleri, immünolojik ve anatomik faktörler, tütün, esrar, alkol kullanımı gibi multifaktöriyel koşulların sonucunda üremenin biyolojik başarısızlığıdır (Teixeira ve ark. 2019). Bugüne kadar çeşitli incelemelerde diyabetle ilişkili infertilite konusu ele alınmıştır ancak diyabetin neden olduğu hipergliseminin infertilite üzerindeki mekanizmasının aydınlatılmasına hala ihtiyaç duyulmaktadır. Hiperglisemi, özellikle üreme çağındaki erkekleri de etkileyen ve hızla artan prevalansı göz önüne alındığında, bireylerin sağlığına yönelik büyük tehdit oluşturmaktadır. Sonuç olarak, diyabet prevalansının yüksek olduğu toplumlarda infertilitenin ve doğum oranlarındaki düşüşün önlenmesi için tedavi amaçlı kapsamlı çalışmalara gereksinim bulunmaktadır (Maresch ve ark. 2018).

Yapılan AKŞ ve VA sonuçlarının önceki çalışmalarla uyumlu olup benzer bulgular elde edilmiştir (Bhansali ve ark. 2015, Maresch ve ark. 2018, Jato ve ark. 2018). Diyabet grubunda testiste oluşan hasar için intertisyel alanda ödem, konjesyon, bağ doku artışı, germ ve sertoli hücrelerinde kayıp, vakualizasyon, tübül lümeninde residüel cisimcikler ve seminifer tübül çapında azalma öne çıkan bulgular olup bunlarda önceki çalışmalarla uyumlu olarak kullanılan tüm parametrelerle benzer bulgular elde edilmiştir.

Sıçan epididimal spermilerin bilgisayar destekli sperm analizi [CASA] ile incelendiği bir çalışmada distal kauda epididimisten izole edilen sperm, proksimal kauda epididimisten izole edilen spermlerden önemli ölçüde daha yüksek hareketli sperm yüzdeleri ve yüzme hızları sergilediği görülmüştür (Slott VL ve ark 1991). Çalışmamızda kullanılan besiyeri ile çok daha verimli canlı, hareketli ve düzgün morfolojisi olan sperm elde edilmiştir.

Hücre tedavilerinin eNOS ve iNOS boyaması ile oksidatif stresi azalttığını gösterdik. Oksidatif stres tarafından germ hücre hasarı, sperm apoptozu, DNA hasarı ve reaktif oksijen radikalleri [ROS] oluşumunu içerir. Oksidatif stres altında, ROS hücresel bileşenlerde ciddi hasara neden olabilir ve apoptozu artırabilir. Tekli veya ikili uygulamaları üçlü uygulamalarla karşılaştırdığımızda çok daha iyiydi. En iyi

sonuçları dört uygulamanın hepsinin kombinasyonu ile aldık. Hücre tedavilerinin eNOS ve iNOS boyaması ile oksidatif stresi azalttığını gösterdik. Oksidatif stres tarafından germ hücre hasarı, sperm apoptozu, DNA hasarı ve ROS oluşumunu içerir. Oksidatif stres altında, ROS hücresel bileşenlerde ciddi hasara neden olabilir ve apoptozu artırabilir. Tekli veya ikili uygulamaları üçlü uygulamalarla karşılaştırdığımızda çok daha iyiydi. En iyisonuçları dört uygulamanın hepsinin kombinasyonu ile aldık.

Stromal kök hücre in vitro çoğalır ve birkaç soy boyunca farklılaşabilir. Taze izole edilmiş bu hücreler, tam olarak karakterize edilemeyecek kadar az veya yeterincesaf değildir. Burada, CD31 ekspresyonuna göre ayrılabilen insan yağ dokusundan iki CD45-CD34+CD105+ hücre popülasyonu izole edilmiştir. CD31+ hücreleri ile karşılaştırıldığında, CD31- hücreleri, hücre döngüsü durgunluğu ve kök hücre olma ile ilişkili transkriptleri ve kıkırdak, kemik, yağ, kas ve nöral dokuların biyolojisi ile ilgili transkriptleri aşırı eksprese edilmiştir. Buna karşılık, CD31+ hücreleri, endotel ve ana doku uygunluk kompleksi sınıf II kompleksi ile bağlantılı transkriptleri aşırı ifade etmiştir. CD31- hücrelerinin klonları, in vitro olarak genişletilebilir ve kemik, yağ ve nöral benzeri doku özelliklerine sahip hücrelere farklılaştırılabilir. Kültürde, hücre döngüsü durgunluğu, gövde, belirli sitokinler ve organa özgü genlerle ilişkili transkriptler down regüle edilirken, sinyal iletimi, hücre yapışması ve hücre iskeleti bileşenleri ile ilişkili transkriptler up regüle edilmiştir. CD31+ hücreleri in vitro olarak çoğalmamıştır. İnsan yağ dokusundan elde edilen CD45-CD34+CD105+CD31- hücreleri, onları doku mühendisliği için yararlı hale getirebilecek stromal kök hücre özelliklerine sahip olduğu bildirilmiştir (Boquest ve ark. 2005). Dithiothreitol etkinliğinin araştırıldığı bir insan sperm çalışmasında apoptoz TUNEL ile oksidatif stres 8OHdG ile incelenmiş ve yüzde dördlük bir oranda sağlıklı bireyler artmış stres ve apoptoza rastlanmıştır (Townsend 2016). Köpek spermalarında MKH+KBY kulanmanın ortamdaki antioksidanların ve büyüme faktörlerinin arttırmasından dolayı donmuş çözölmüş sperm hücrelerinin kalite ile ilgili parametrelerini geliştirdiği gösterilmiş ve en iyi konsantrasyonun yüzde on olduğu saptanmıştır (Mahiddine ve ark. 2020). Bir antioksidan olarak safran, kadmiyuma maruz bırakılan sıçanlarda sperm parametreleri üzerinde olumlu etkileri olduğu saptanmıştır (Asadi ve ark. 2013). Sadece omentumdan türetilen AKMKH 'ler, RA ile farklılaşma tedavisinden sonra

erkek germ hücre soyları ile ilgili önemli bir gen işaretçisini ifade etmiştir. Bu bulgular, yağ dokusunun multipotent stromal kök hücrelerin bir kaynağı olarak ve ayrıca farklılaşma amacına ilişkin MKH 'lerin kaynağı olarak önemini bir kez daha göstermektedir (Bräunig ve ark. 2018). Kurşunun hayvanların semen özelliklerini ve testosteron düzeylerini baskılama eğilimi olan bir gonadotoksik olduğu sonucuna varılmış, MKH'lerin varlığının kurşunun toksik etkilerini hafiflettiği bulunmuştur. Sıçanların kemik iliğinden elde edilen MKH 'lerin LN kaynaklı gonado toksisitesinin etkili bir tedavisi olabileceği ve dolayısıyla infertilite tedavisine katkıda bulunabileceği sonucuna varılmıştır (Hassan ve Alam 2014).

KBY 'nin toplam sperm sayısını ve spermatogonia, birincil spermatositler, yuvarlak spermatidler, Sertoli Hücreleri 'ler ve Leydig hücreleri gibi testis hücrelerinin sayısını kontrol, DMSO ve busulfan gruplarıyla karşılaştırıldığında belirgin şekilde artırdığını göstermiştir. Ayrıca sonuçlar, son enjeksiyondan 8 hafta sonra busulfan ve busulfan/SH gruplarında c-kit ve STRA8 ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığını ($p < 0.001$) ancak kontrol ve DMSO ile karşılaştırıldığında PCNA için anlamlı bir fark bulunmadığını ($p < 0.05$) saptanmıştır. Bu bulgular, Sertoli hücre koşullu ortamın üreme ve rejeneratif tıpta terapötik stratejiler için pratik bir yaklaşım olarak faydalı olabileceğini düşündürmektedir (Panahi ve ark. 2020). Literatürdeki yapılan çalışmada, kısıraklarda mezenkimal kök hücre şartlandırılmış ortamın MKH-KBY sperm parametreleri, intrauterin polimorfonükleer nötrofiller (PMN), intrauterin sıvı birikimi (IUF) ve fertilite üzerindeki etkilerini değerlendirmesi amaçlanmıştır. Deney 1'de, on aygırdan alınan iki ejakülat, süt bazlı bir sulandırıcı kullanılarak 50 milyon sperm/mL'ye ayarlanmıştır. Daha sonra, MKH-KBY den 20 mL hazırlanarak semene 0, 5, 10, 15 ve 20 mL olacak şekilde eklenmiştir. Sperm kinetiği ve plazma membran bütünlüğü seyreltmeden hemen sonra (T0) ve 37 °C'de (T2) inkübasyondan 2 saat sonra değerlendirilmiştir. Deney 2' de, dirençli ($n = 13$) veya endometrite duyarlı ($n = 7$) olarak karakterize edilen kısıraklar, iki (Kontrol ve CM-1) ve üç (Kontrol, CM-1 ve CM-2) yumurtlamanın indüklenmesinden 24 saat sonra taze semen ile döllenmiştir. Gruplar: kontrol, farmakolojik müdahale yok; CM-1, semen döllenme dozunun 3:4'te eklenmesi (v:v,MKH-KBY:semen); CM-2, 30 mL MKH-KBY , döllenmeden 24 saat önce uterusu infüze edilmiştir. PMN'lerin sayısını ve interlökin IL6, IL10 ve TNF α konsantrasyonlarını değerlendirmek için tohumlamadan döllenmeden 6 ve 24 saat

sonra endometriyal sitoloji ve rahim sıvısı toplanmıştır. IUF, tohumlamadan 24 ve 48 saat sonra ultrasonografi ile belirlenmiştir. Hamilelik durumu, yumurtlamadan 14 gün sonra teşhis edilmiştir. Semene MKH-KBY eklenmesi, dirençli kısıraklarda tohumlamadan döllenmeden 6 saat sonra T0 ve T2'de ($P > 0.05$) sperm parametrelerini etkilememiştir ve (CM-1; $P < 0.05$) PMN sayısını azaltmıştır (CM-1; $P < 0.05$). Duyarlı kısıraklarda, tohumlamadan döllenmeden 6 ve 24 saat sonra PMN'ler ve ayrıca IUF, tedavi edilen her iki döngüde (CM-1 ve CM-2) azalmıştır ($P < 0.05$). Ek olarak, MKH-KBY tohumlamadan döllenmeden sonra duyarlı kısırakların uterusunda IL6'yı upregüle ederek, IL10 konsantrasyonlarını up regüle etmiştir. Hem dirençli (Kontrol, %77, 10/13; CM-1, %62, 8/13) hem de duyarlı kısıraklarda (Kontrol, %42,8, 3/7; CM-1, %57,1, 4/7; CM-2, %85,7,6/7) dir. Sonuç olarak, MKH-KBY seyreltilmiş semen ile karıştırıldığında sperm parametrelerini etkilemeyerek, kısıraklarda tohumlama sonrası inflamatuvar yanıtları azaltmıştır (Eriky Akio de Oliveira Tongu ve ark 2021). Seminal sıvı faktörleri, embriyo implantasyonunu ve üreme başarısını kolaylaştırmak için gebe kalma sırasında dişi bağışıklık tepkisini modüle eder. Spermin bu yanıtı etkileyip etkilemediği açık değildir. Bozulmamış veya vazektomize erkeklerle çiftleştikten sonra fare rahminde mikrodizi ile global gen ekspresyonu değerlendirilmiştir. Sağlam erkekler, gen transkripsiyonunda daha büyük değişikliklere neden olduğu, belirgin bir şekilde pro- inflamatuvar sitokini ve immün düzenleyici genleri etkileği ve TLR4 sinyalleme en üst sıradaki yukarı akış sürücüsü olarak tanımlandığı bildirilmiştir. Nötrofillerin toplanması ve periferik düzenleyici T hücrelerinin genişlemesi, sağlam erkeklerin seminal sıvısı tarafından yükseltilmiştir. In vitro, epididimal sperm, wild tipteki uterus epitel hücrelerinde IL6, CXCL2 ve CSF3'ü indüklemektedir, ancak Tlr4 gebe olmayan dişilerde indüklenmemektedir. Toplu olarak bu deneyler, spermin TLR4'e bağlı sinyalleme yoluyla uterus sitokin ekspresyonunu ortaya çıkararak kadın bağışıklık toleransını arttırmaya yardımcı olduğunu göstermektedir. Bulgular, üreme yatırımının dişi kontrolünde yer alan bağışıklık mekanizmalarını modüle etmede, oosit döllenmesinin ötesinde sperm için biyolojik bir role işaret ettiği belirtilmiştir (Schjenken ve ark. 2021).

Nonobstrüktif azosperminin tedavisinde mezenkimal stromal/kök hücreler MKH 'ler yerine hücre dışı vezikül içeren şartlandırılmış ortamın KBY etkisini göstermektedir. Bir sonraki adımda, MKH 'lerin farelerin seminiifer tübüllerine enjeksiyonundan sonra MKH 'lerin spermatositlere farklılaşma potansiyelini incelenmesi amaçlanmıştır.

Yapılan çalışmada, hayvan modellerinde adipoz doku kaynaklı AK-MKH 'ler ve kemik iliği kaynaklı MKH 'ler ve kemik iliği KBY kullanılarak busulfan kaynaklı azospermi için uygulamalı bir tedavigerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda, sırasıyla 30 erkek yetişkin Balb/C faresi (30 ± 5 g) veiki dişi eGFP+/+ Balb/C faresi (30 ± 5 g) deney gruplarını belirlemek ve kök hücreleri kültürlemek için kullanılmıştır. Daha sonra intakt kontrol, azospermi, AKMKH tedavisi, Kİ-MKH tedavisi, Kİ-KBY tedavisi ve spontan iyileşme grupları olmak üzere altı grupta incelenmiştir. Sağlam kontrol dışındaki tüm gruplara 21 gün ara ile iki dozbusulfan (10 mg/kg) enjekte edilerek azospermi oluşturulmuştur. Tüm farelerin testisleri çıkarılmıştır ve tedaviden 60 gün sonra histomorfometri ve akış sitometrisi analizi ile incelenmiştir. Testislerin histomorfometri ve akış sitometrisi değerlendirmesi, tedavi gruplarının seminifer tübüllerinin çoğunun normal morfolojisinin yanı sıra spermatogenezin başarılı bir şekilde geri kazanıldığını göstermiştir, ancak azospermi grubunda spermatogenez gözlenmemiştir. Kİ-MKH tedavi grubunun sonuçlarının diğer tedavi gruplarına göre daha olumlu olması dikkatedeğerdir. Sonuç olarak, AK-MKH, Kİ-MKH ve Kİ-KBY azospermi tedavisinde adayolarak şiddetle önerilebilir (Tongu ve ark. 2021). Testis torsiyonu-detorsiyonu, sperm miktarını önemli ölçüde azaltarak, motiliteyi inhibe edip, F-aktin ekspresyonunu azalmıştır ve bunun sonucunda spermdeki ATP içeriğini azalmıştır MKH' lerin lokal enjeksiyonu, özellikle sperm motilitesinde, sperm fonksiyonunu iyileştirmiştir. MKH' ler ile, testistorsiyon-detorsiyonundan sonra ATP içeriği ve F-aktin korunmuştur. MKH' ler, fosfoglisarat kinaz 2 ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz-spermatojenik ekspresyonunu artırarak, Akt'yi aktive ederek ve glikojen sentaz kinaz 3'ü (GSK3) artırarak kanıtlandığı gibi, testis torsiyon-detorsiyonu tarafından indüklenen sperm vetestisteki glikoliz dengesizliğini önemli ölçüde tersine çevirmiştir. Bu da glikoliz kaskadlarında ve ATP üretiminde artışa neden olmuştur. Sperm testis torsiyonu- detorsiyonu ile indüklenen germ hücre hasarından muzdarip olduğunda insan kök hücre faktörü Akt/GSK3 ekseninin aktivasyonuna katkıda bulunmuştur. Sonuç olarak testis torsiyonu-detorsiyonu ile hasar görmüş bir testise MKH' lerin lokal enjeksiyonu, esas olarak sperm hareketliliğini ve enerjisini geliştirerek sperm fonksiyonunu eski haline getirmektedir. MKH' ler, Akt/GSK3 eksenini düzenleyerek spermdeki glikojenez ve glikoliz dengesizliğini tersine çevirmektedir. Bu nedenle, MKH' ler, lokal enjeksiyon yoluyla torsiyon-detorsiyonun neden olduğu infertiliteyi potansiyel olarak kurtarabilir (Tongu ve ark. 2021).

Literatürdeki bir başka çalışmada ise, MKH' lerle tedavi edilen testisler morfolojik olarak normal görünüme sahip olduğu, ancak seminifer tübüllerin boş olduğu kök hücre tedavisi uygulanmayan sıçanlar atrofik görünüme sahip olduğu bildirilmiştir. Spermatogenez, hücre ile tedavi edilen testislerin tüm tübüllerinde değil, bazılarında tespit edilmiştir. Testislerdeki GFP+/VASA+ ve GFP+/SCP1+ hücreleri, uygun mikroçevrede MKH' lerin spermatogenetik hücrelere farklılaşmasını göstermiştir. Hücre tedavisi ile sıçanlar, spermatogenezin tam olarak geri kazanıldığını göstermek için çiftleştirilerek sürekli nesiller elde edilmiştir. GFP ekspresyonu, yağ dokusu ve kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerde ve ayrıca yavruların spermalarında tespit edilmiştir. Sonuç olarak, gelecekte MKH' ler insanlarda aynı amaç için kullanılabilir (Cakici ve ark. 2013). In vitro çalışmalara dayalı olarak, farklı doku kaynaklarından gelen MKH' ler hem erkek hem de dişide basit yöntemlerle germ hücrelerine veya gamet progenitor hücrelere farklılaştırılmıştır. Öte yandan, MKH'lerin terapötik etkileri, kimyasal veya cerrahi bileşiklerle oluşturulan NOA hayvan modellerinin tedavisi için değerlendirilmiştir. Bu çalışmaların sonuçları, seminifer tübüllerde MKH'lerin başarılı allotransplantasyonunu veya ksenotransplantasyonunu doğrulanmıştır. Ayrıca, MKH'ler tarafından salgılanan eksozomların, infertil hayvan modellerinin testislerinde spermatogenez sürecini indükleyebildiği bildirilmiştir. Erkeklerde ve kadınlarda üreme hastalıklarının MKH' ler veya eksozomları yardımıyla tedavisinde sayısız ilerlemeye rağmen, NOA tedavisine ilişkin hiçbir klinik çalışma sonlandırılmamıştır. Yapılan çalışmada erkeklerde NOA için MKH tedavisi olasılığını araştırmaya çalışmaktadır. MKH'lerin kurşun kaynaklı üreme toksisitesi üzerindeki etkileri henüz bildirilmemiştir. Bu çalışma, MKH'lerin oksidatif stresi ve erkek sıçanlarda kurşun tarafından indüklenen bastırılmış üremeyi değiştirme yeteneğini araştırmak için yapılmıştır (Zhankina ve ark. 2021). MKH'lerle tedaviyi takiben testosteron seviyelerinin ve semen kalitesinin iyileştiğini göstermiştir. Ayrıca süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz seviyeleri, MKH'lerin tedavisinden 21, 30 ve 60 gün sonra artmıştır. Ayrıca, MKH tedavisinden sonra genomik DNA değişikliğinde bir azalma ve parçalanmış DNA yüzdesi kaydedilmiştir. Kurşun nitrat bazı seminifer tübüllerde dejenerasyon, nekroz, interstisyel ödem ve spermatojenik aktivitede azalmaya neden olmuştur. Testisin histopatolojik bulgularında LN'nin neden olduğu değişiklikler, MKH' lerle tedavi ile

kısmen tersine çevrilmiştir. Testisin histolojik incelemesi, Kurşun nitrat grubundaki seminifer tübüllerde büyük hasarlı test hayvanlarında testis morfolojisinde deformiteler göstermiştir. Testisin histopatolojik bulgularında LN' ninneden olduğu değişiklikler, MKH'lerin tedavisi ile kısmen tersine çevrilmiştir. Kurşunun hayvanların semen özelliklerini ve testosteron seviyelerini baskılama eğilimi olan bir gonadotoksik olduğu sonucuna varılmış, MKH' lerin varlığının kurşunun toksik etkilerini hafiflettiği bulunmuştur. Sıçanların kemik iliğinden elde edilen MKH 'lerin LN kaynaklı gonado toksisitesinin etkili bir tedavisi olabileceği ve dolayısıyla infertilite tedavisine katkıda bulunabileceği sonucuna varılmıştır (Hassan ve Alam 2017).

Literatürdeki diğer bir çalışmada, PRP anjiyogenezin mRNA ekspresyonu üzerindeki potansiyel olarak yararlılığını araştırmak için yapılmıştır. 14 günlük kültürde sıçan kemik iliği stromal hücre farklılaşması için tip I kollajen, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF) için ek tahlil ve ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizi yapılmıştır. PRP, kontrole kıyasla PRP ile 5. günden sonra alkalın fosfataz aktivitesini önemli ölçüde yükselmiştir ($P < .05$) ve DNA ve protein içeriği kültür 1, 3 ve 5. günlerde ($P < .01$) artmıştır. RT-PCR, tip I kollajenin tüm substratlarda eksprese edildiğini ve 14 günlük kültür sırasında PRP ile yüksek kaldığını ve VEGF ve PDGF'nin mRNA ekspresyonunun zaman içinde daha yüksek olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmada, PRP' nin muhtemelen anjiyogenez sürecini başlatması, kan damarlarını oluşturan endotel hücrelerini toplaması ve kemik rejenerasyonunu başlatması gibi potansiyel bir katkısını göstermektedir (Hu ve ark. 2008). PRP, doku progenitör hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması yoluyla doku onarımı üzerinde potansiyel bir etkiye sahiptir. Yapılan çalışmanın amacı, infertil sıçan modelinde PRP'nin testis yapısı ve fonksiyonu üzerindeki etkisini stereolojik yöntemle değerlendirmektir. Otuziki erkek sıçan dört gruba ayrılmıştır. İnfertilite, busulfan (BUS) (10mg/kg, I.P., tek doz) uygulamasıyla indüklenmiştir. Olgulara PRP (80µl, testis lokal enjeksiyon, tek doz) uygulanmıştır. 48 gün sonra semen analizi yapılmış ve testosteronu ölçmek için kalpten kan örnekleri alınmıştır. Daha sonra sol testis çıkarılarak, fikse edilip, gömüldükten sonra, kesit alınıp ve H&E ile boyandıktan; sonra testisler analiz edilmiştir. Sonuç olarak, BUS'un kontrol grubuna kıyasla sperm sayısını, hareketliliğini, normal morfolojisini, spermatozoon kuyruğunun uzunluğunu,

testis hacmini, seminifer tübülleri, germinal epitel yüksekliğini ve spermatogenez soy h cresayısını azaltabildiğini göstermiştir (p <0.01). PRP, BUS uygulanan hayvanda spermatojenik kök hücre sayısını, sperm sayısını, hareketliliğini ve kuyruk uzunluğunu ve testosteron seviyesini önemli ölçüde artırmıştır ancak testis hacmi, germinal epitel yüksekliği, Sertoli ve Leydig hücre sayısı ve seminifer tübüllerin uzunluğu üzerinde herhangi bir etkisi olmamıştır. PRP'nin BUS ile tedavide testisin yapısal ve fonksiyonel bozukluğunu iyileştirebileceği sonucuna varılmıştır (Dehghani ve ark. 2018).

Yapılan bir başka çalışmada, infüzyon, spinal ve intraartiküler enjeksiyon yoluyla verilen SVF ve PRP' nin güvenilirliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Lipoaspirat, doku ayrıştırıcı bir enzim ile işlendikten sonra santrifüjleme yoluyla SVF izole edilmiştir. Ayrıca her hastadan kan alınarak PRP izole edilmiştir Tüm deneklere intravenöz (IV) enjeksiyon yoluyla otolog PRP ve SVF uygulanmıştır. Deney grubu içindeki azınlık bir grubu, ek bir spinal veya eklem içi enjeksiyon yapılmıştır. Deney tipi, her hastalık değerlendirmesi ile belirlenmiştir. Her hasta için hücre dozları ve yan etkiler saptanarak analiz edilmiştir. Güvenli olduğu düşünülen hücre dozu, IV enjeksiyon için 250 cc normal salin içinde 10 milyar SVF hücresinden az ve eklem içi ve spinal enjeksiyon için 1 milyar SVF'den azdır. Olumsuz vakalar şiddetli olmadığı ve başarıyla tedavi edildiği bildirilmiştir. Gözlenen herhangi bir yan etki, spinal veya eklem içi enjeksiyonların bir sonucu olarak tanımlanarak SVF veya PRP ile ilgili olmadığı belirtilmiştir. Sonuç olarak, 421 hastanın çoğunda infüzyon, spinal ve intra-artiküler enjeksiyon yoluyla 10 milyar hücreye kadar yüksek dozda SVF uygulamasının majör olumsuz vakalara neden olmadan uygulanabilir olduğunu ve iyi tasarlanmış faz I-II'de daha fazla araştırılması gerektiğini göstermiştir (Karina ve ark. 2020). Torsiyon-detorsiyon (T/D) kaynaklı testis hasarı, erkek subfertilitesine ve hatta infertiliteye neden olabilir. Kök hücre tedavisi, testis hasarını hafifletmek ve spermatogenez i teşviketmek için bir alternatif sağlar. Adipoz kaynaklı SVF, hücre kültürü sırasında potansiyel mikrobiyal kontaminasyon, ksenojenik beslenme kaynakları vb. risklerini önleyebilen in vitro genişleme olmadan uygun bir şekilde elde edilebilir. Literatürdeki çalışmada, bir sıçan T/D modelinde otolog kültürlenmemiş SVF' nin testis hasarı ve spermatogenez üzerindeki koruyucu etkileri araştırılmıştır. Hayvanlar rastgele sham, T/D+ fosfat tamponlu salin ve T/D + SVF gruplarına (her

grupta 18 sıçan) ayrılmıştır. SVF izole edilerek, lipofilik florokrom klorometilbenzamido dialkylkarbosiyanin ile etiketlendikten sonra lokal enjeksiyonla T/D testise gerçekleştirilmiştir. 3, 7, 14 ve 28günlerde F cerrahisinde, histopatolojik, immünohistokimyasal, Western blot ve enzime bağlı immünosorbent testleri için testis dokusu ve serum örnekleritoplanmıştır. Histopatolojik bulgular, T/D'nin öncülük ettiği düşük Johnsen skoru ile testiste ciddi hasarlanma gösterirken, kültürlenmemiş SVF testis hasarını azaltarak ve düşük skoru yükseltmiştir. Enjekte edilen SVF hücreleri esas olarak interstisyel bölgeye ve seminifer tübüllere verilerek, testiste temel fibroblast büyüme faktörü ve kök hücre faktörünün salgılanmasını arttırmıştır, malondialdehit seviyesinin düşmesine ve hormonal homeostazın düzenlenmesine katkıda bulunarak, Leydig hücrelerinin hasarlanmasını azaltmış, germ hücrelerinin yanı sıra spermatogenezi teşvik etmiştir. Son bulgular, otolog kültürlenmemiş SVF'nin testisleri testiküler iskemi-reperfüzyon hasarından koruyabildiğini ve testiküler T/D'nin neden olduğu infertilitenin önlenmesi için önemli klinik çıkarımlar sağlayan spermatogenezi teşvik edebileceğini göstermiştir (Zhou ve ark. 2018).

DD 'nin, germ hücrelerinde ve olgun spermelerde DNA hasarı ve düşük kaliteli spermatozoa dahil olmak üzere testis üzerinde zararlı etkileri var olup hücre ölümüne yol açmaktadır. Bazı çalışmalar, mitokondriye bağlı apoptotik yolun, DD' nin neden olduğu germ hücre ölümünde başlatıcı kaspaz-9 ve yürütücü kaspaz-3'ün aktivasyonunda yer aldığına dair kanıtlar sağlamıştır. Fertil erkeklerde, DD sırasında, sperm motilitesi, sayısı ve normal morfolojisi azalırken, oksidatif stres, anormal kromatin yoğunlaşması ve kaspaz-3 aktivitesi oranları artmıştır. Kaspaz 8 ve 9'un aktiviteleri de önemli ölçüde yükselmiştir. Bu gözlemler, sperm hasarı ile yapılan birkaç çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmalardan birinde Erkek Balb/c farelerde ısıtmadan (42 °C, 30 dakika) sonra, TUNEL-pozitif hücre sayısı (spermatojenik hücrelerin apoptotik indeksi) ve kaspaz 3, 8, 9 ekspresyonları artarken ekspresyon mRNA seviyesindeki Bcl-2 AKT azaldığı saptanmıştır (Tongu ve ark. 2021).

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada sağlıklı hayvanlardan alınan spermelerde kültür ortamında yüksek glikozlu besiyeri kullanılarak DH hasar oluşturulmuştur. Bir model olarak birçok çalışmada kullanılan bu yöntem ilk defa sperm kültürü için denendi ve başarılı oldu.

Spermlere MKH, 48 saatlik salgıladıkları faktörler olan KBY ve PRP ile desteklenmiş SVF uygulamaları yapılarak deneysel diyabetik modelde sperm hasarının azaltılması amaçlandı. HT yapılan tüm uygulamalarda anlamlı bir başarı sağlamakla beraber KBY, PRP ve MKH ile desteklenen SVF dördü kombinasyonunun daha etkili olduğu saptandı.

Gruplar tekli, ikili, üçlü ve dördü olarak karşılaştırıldığında uygun optimizasyonda birlikte kullanımlarının artan hücre, büyüme faktörü ve sinyal mekanizması ile daha anlamlı bir etki yarattığı anlaşıldı.

Bir saatlik uygulamada morfoloji, canlılık ve hareket değerlendirilmeleri yapılması HT uygulamalarının etkinliğinin anlaşılması için optimum süre olarak görüldü. DB besiyeri ortamının sperme verdiği hasarda oluşan morfolojik, canlılık ve hareket bozukluklarının bu model ile başarılı bir şekilde ortaya konulduğu ve HT ile anlamlı bir şekilde azaltıldığı izlendi.

Yaymaları hazırlanan örnekler oksidatif stres için e-NOS ve i-NOS ile incelendiğinde bu model ile etkin bir stresin sağlandığı ve HT ile azaltıldığı bulundu.

Apoptoz için TUNEL, CASPAZ 3, CASPAZ 8 ve CASPAZ 9 ile immünohistokimyasal olarak analiz edildiğinde bu modelin tüm belirteçler için anlamlı bir başarı sağladığı ve HT ile bunun azaltıldığı saptandı. Model olarak interensek ve ekstrensek apoptatik yolağın kullanıldığı anlaşıldı.

DB invitro modelin sperm hasarı yapması ve uygulamalar ile bu hasarın önlenmesi model olarak diğer tedavi olasılıkları için önemli olabileceğini gösterdi. SVF+PRP+MKH+KBY kombinasyonunun ilk defa kullanıldığı bu çalışma ile HT olarak hücre sayısının artırılması, büyüme faktörlerinin çoğaltılması ve sinyal

mekanizmalarının güçlendirilmesi sonucunda oldukça yararlı olabileceği belirlendi.

Toplumda yüksek prevalansta görülen ve giderek artan erkek infertilitesine yönelik hücresel tedavi gibi maliyetleri az ve etkinliği çok yeni rejeneratif yöntemin gelişmesine katkı sağlayacak sonuçlarımız çocuk sahibi olmak isteyen ailelere ümit olacaktır. Deney hayvanı ve insan çalışmaları ile bulguların doğrulanması ve mekanizmaların aydınlatılması klinikte kullanımlarını sağlayacaktır.

Toplumda yaygınlığı yüksek olan ve giderek yaygınlaşan erkek infertilitesi için hücresel tedavi gibi düşük maliyetli, yüksek verimli yeni bir rejeneratif tedavinin oluşturulmasına yardımcı olacak sonuçlarımız, dileyen ailelere umut olacaktır.

Bulguları doğrulamak ve mekanizmaları aydınlatmak için deneysel hayvan ve insan araştırmaları kullanılacak ve klinikte kullanılmasına izin verecektir.

Gelecekte, bu model üzerinde HT etkisine eksozom katkısı ve programlanmış hücre ölümünde özellikle otofaji olmak üzere diğer mekanizmaların ilişkisine bakarak optimal model ve tedavi etkinliğini araştıracağız.

9. KAYNAKLAR

Abd El-Salam S, Faruk E, Manawy S, Nafie N. Microscopic Structural Alterations in Response to Mesenchymal Stem Cells Injection in Experimentally Induced Oligospermia in Adult Rat Testis(Histological and Immunohistochemical Study). Eypatian Journal of Histoogy. 2019;42(4):826-837

Ahn C, Shin DH, Lee D, Kang SM, Seok JH, Kang HY, Jeung EB. Expression of claudins, occludin, junction adhesion molecule A and zona occludens 1 in canine organs. Molecular Medicine Reports. 2016;14(4):3697-3703.

Akca M, Çeltik MN. Kemirgenlerde Diabetes Mellitus Modelleri. Journalism. 2010; 11(3):369–73.

Altun A, Canillioğlu YE, Ünsal E, Karabulut S, Hürdağ C. Ultrastructural Examination of Testicular Tissues and Evaluation of ZO-1 Protein Levels Obtained from Azoospermic Cases. Journal of Experimental and Clinical Medicine. 2021; 38(3):272–76.

Alves MG, Martins AD, Rato L, Moreira PI, Socorro S, Oliveira PF. Molecular mechanisms beyond glucose transport in diabetes-related male infertility. Biochimica et Biophysica Acta. 2013;1832(5):626-635.

American Diabetes Association (ADA). Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. Diabetes Care. 2021;44(1):15–33.

American Diabetes Association (ADA).Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 2014;37(1):81–90.

Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 7. basım. Güneş Kitabevi: 2020.

Asghari A, Akbari G, Meghdadi A, Mortazavi P. Protective effect of metformin on testicular ischemia/reperfusion injury in rats. Acta Cirurgica Brasileira. 2016;

31:411-416.

Aydın S, Billur D, Özkavukçu S, Topal F, Kızıl Ş, Aydos K, Erdemli E. TESE Materyalinde Kan Testis Bariyeri Bütünlüğünün İnfertiliteye Etkisi. 2014.

Ayhan C, Aras D. Anatomi Histoloji Embriyoloji. Nobel Tıp Kitabevleri. 1998.

Aziz NM, Kamel MY, Mohamed MS, Ahmed SM. Antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects of zinc supplementation in testes of rats with experimentally induced diabetes. *Applied Physiology, Nutrition Metabolism*. 2018 ;43(10):1010-1018.

Bauer H, Zweimueller-Mayer J, Steinbacher P, Lametschwandtnr A, Bauer HC. The dual role of zonula occludens (ZO) proteins. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010; 2010:402593.

Baynest HW. Classification, Pathophysiology, Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes & Metabolism*. 2015; 06(05).

Benoit J. Recherches anatomiques, cytologiques et histo- physiologiques sur les voies excrétrices du testicule chez les mammifères. *Arch. Anat. Histol. Embryol.* (Strasb). 1926, 5: 173–412

Bhansali S, Kumar V, Saikia UN, Medhi B, Jha V, Bhansali A, Dutta P. Effect of mesenchymal stem cells transplantation on glycaemic profile & their localization in streptozotocin induced diabetic Wistar rats. *Indian Journal Medical Research*. 2015;142(1):63-71.

Bishop AE, Buttery LD, Polak JM. Embryonic stem cells. *Journal Pathology*. 2002;197(4):424-9.

Cakici C, Buyrukcu B, Duruksu G, Haliloglu AH, Aksoy A, Isik A, Uludag O, Ustun H, Subası C, Karaoz E. Recovery of fertility in azoospermia rats after injection of adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells: the sperm generation. *Biomed*

Research International. 2013; 2013:529589.

Cakici, C., Buyrukcu, B., Duruksu, G., Haliloglu, A. H., Aksoy, A., Isık, A., ... & Karaoz, E. (2013). Recovery of fertility in azoospermia rats after injection of adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells: the sperm generation. *BioMed research international*, 2013.

Cameron DF, Murray FT, Drylie DD. Interstitial compartment pathology and spermatogenic disruption in testes from impotent diabetic men. *The Anatomical Record*. 1985;213(1):53-62.

Can A. A Concise Review on the Classification and Nomenclature of Stem Cells. *Turkish Journal of Hematology*. 2008; 25(2):57–59.

Can A. Kök Hücre: biyolojisi, türleri ve tedavide kullanımları. *Akademisyen Tıp*
Carlsion BM. *Human Embryology and Developmental Biology*. 5.basım. Elsevier: 2014.

Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells Journal*. 2007;25(11):2739-2749

Chiba K, Kondo Y, Yamaguchi K, Miyake H, Fujisawa M. Inhibition of claudin-11 and occludin expression in rat Sertoli cells by mono-(2-ethylhexyl) phthalate through p44/42 mitogen-activated protein kinase pathway. *Journal of Andrology*. 2012;33(3):368-374.

Chu DT, Nguyen Thi Phuong T, Tien NLB, Tran DK, Minh LB, Thanh VV, Gia Anh P, Pham VH, Thi Nga V. Adipose Tissue Stem Cells for Therapy: An Update on the Progress of Isolation, Culture, Storage, and Clinical Application. *Journal of Clinical Medicine*. 2019;8(7):917.

Chung NP, Mruk D, Mo MY, Lee WM, Cheng CY. A 22-amino acid synthetic peptide corresponding to the second extracellular loop of rat occludin perturbs the

blood-testis barrier and disrupts spermatogenesis reversibly in vivo. *Biology of Reproduction*. 2001; (5):1340-51.

Condorelli RA, La Vignera S, Mongioi LM, Alamo A, Calogero AE. Diabetes Mellitus and Infertility: Different Pathophysiological Effects in Type 1 and Type 2 on Sperm Function. *Frontiers in Endocrinology*. 2018; 9:268.

Coşansu G, Erdogan S. Diyabet 21 St Century 's Health Crises : Diabetes. *Florence Nightingale Journal of Nursing*. 2009; 17: 115-122

Creasy D, Bube A, Rijk E, Kandori H, Kuwahara M, Masson R, Nolte T, Reams R, Regan K, Rehm S, Rogerson P, Whitney K. Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Male Reproductive System. *Toxicologic Pathology*. 2012;40(6), 40-121

Creasy DM. Evaluation of testicular toxicity in safety evaluation studies: the appropriate use of spermatogenic staging. *Toxicologic Pathology*. 1997;25(2):119-131.

Dağışan S, Erbaş O. Insulin Structure, Function and Diabetes Models in Animals. *Journal of Experimental and Basic Medical Sciences*. 2021;1(3):96-101

Ding GL, Liu Y, Liu ME, Pan JX, Guo MX, Sheng JZ, Huang HF. The effects of diabetes on male fertility and epigenetic regulation during spermatogenesis. *Asian Journal Andrology*. 2015;17(6):948-953.

Dolati P, Khodabandeh Z, Zamiri MJ, Jamhiri I, Mehrabani D. The Effect of Lead Acetate and Quercetin on the Tight and Gap Junctions in the Mouse Testis. *Biological Trace Element Research*. 2020;198(2):535-543.

Drake RL. *Gray's Atlas of Anatomy*. 1. basım. Elsevier Health Sciences: 2008.

Dudek WR. *BRS Embryology*. 6. basım. Lippincott Williams and Wilkins: 2014.

Ebrahim, N., Dessouky, A., Mostafa, O., Yousef, M., Seleem, Y., El Gebaly, E., ... & Salim, R. (2021). Adipose Mesenchymal Stem Cells Combined with Platelet Rich Plasma Accelerate Diabetic Wound Healing by Modulating Notch Pathway.

Effects of Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cell Therapy on Diabetic Rats. Al-Azhar Medical Journal. 2017;46(1):193-210

Eizirik DL, Pasquali L, Cnop M. Pancreatic β -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure. Nature Reviews Endocrinology. 2020;16(7):349-362.

Erbaş O. Experimental Diabetes Model. Istanbul Bilim University Florence Nightingale Journal of Medicine. 2015;1(1):40–42.

Erkanli G, Canillioğlu Y, Umay C, Demiralp EE, Ercan F. Distribution of Zonula Occludens-1 and Occludin and Alterations of Testicular Morphology after in Utero Radiation and Postnatal Hyperthermia in Rats. International Journal of Experimental Pathology. 2012;93(6):438–49.

Eroschenko VP. diFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations. 11 basım. Lippincott Williams & Wilkins: 2015

Ezquer F, Marcelo EE, Daniela BP, Daniel C, Alejandro JY, Paulette AC. Systemic Administration of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Reverts Hyperglycemia and Prevents Nephropathy in Type 1 Diabetic Mice. Biology of Blood and Marrow Transplantation. 2008;14(6):631–40.

Fathy El Mongy N, El-Arab Ali El-Arab S, Kamal Ramadan B, Yousef El- Saeed M.

Fietz D, Pilatz A, Diemer T, Wagenlehner F, Bergmann M, Schuppe HC. Excessive Unilateral Proliferation of Spermatogonia in a Patient with Non-Obstructive Azoospermia- Adverse Effect of Clomiphene Citrate Pre-Treatment. Basic and Clinical Andrology. 2020;30(1):1–11.

Fink C, Weigel R, Hembes T, Lauke-Wettwer H, Kliesch S, Bergmann M, Brehm RH. Altered expression of ZO-1 and ZO-2 in Sertoli cells and loss of blood-testis barrier integrity in testicular carcinoma in situ. *Neoplasia*. 2006;8(12):1019-1027.

Florin A, Maire M, Bozec A, Hellani A, Chater S, Bars R, Chuzel F, Benahmed M. Androgens and postmeiotic germ cells regulate claudin-11 expression in rat Sertoli cells. *Endocrinology*. 2005;146(3):1532-1540

França LR, Avelar GF, Almeida FFL. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*. 2005;110:300-318

Gartner LP, Hiatt JL, Strum JM. *Cell Biology and Histology*. 6. basım. Lippincott Williams & Wilkins: 2010.

Gaskell T, Englund MCO, Hyllner J. Human Embryonic Stem Cells. İçinde: Steinhoff G. *Regenerative Medicine- from Protocol to Patient*. Springer. 2016; S:27-49.

Gavin J, Alberti KMM, Mayer B, Davidson, DeFronzo RA, Drash A, Gabbe SV, Genuth S, Harris MI, Kahn R, Keen H, Knowler WC, Lebovitz H, Maclaren NK, Gavrilov S, Landry DW. Ethics in Regenerative Medicine. *Regenerative Nephrology*. 2011 s: 401-408

Ghidoni, I., Chlapanidas, T., Bucco, M., Crovato, F., Marazzi, M., Vigo, D., ... & Faustini, M. (2008). Alginate cell encapsulation: new advances in reproduction and cartilage regenerative medicine. *Cytotechnology*, 58(1), 49-56.

Gilbert SF. *Developmental Biology*. 6.basım. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.

Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation research*. 2007;100(9):1249-60.

Gokmen GF. Sistematik Anatomi. Guven Kitabevi: İzmir; 2003.

Gundala NKV, Naidu VGM, Das UN. Amelioration of streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus in Wistar rats by arachidonic acid. Biochemica Biophysical Research Communications. 2018;496(1):105-113.

Guneli E, Tugyan K, Ozturk H, Gumustekin M, Cilaker S, Uysal N. Effect of melatonin on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats. European Surgical Research. 2008;40(4):354-360.

Gümüş E, Çelik H, Özkan S, Keskinçilic B, Satman İ, Yetkin İ, Hatun Ş, Çakır B, Gündoğdu S, Yılmaz T, Cinaz P, Yılmaz C, Özdemir D, Yardım N. Türkiye Diyabet Programı. 2020.

Gye MC, Ohsako S. Effects of flutamide in the rat testis on the expression of occludin, an integral member of the tight junctions. Toxicology Letters. 2003;143(2):217-222.

Hackett E, Jacques N, Gallagher A. Pathophysiology and Diagnosis of Type 1 Diabetes. Clinical Pharmacists. 2013;5(4):69–72.

Hall JE, Guyton AC. Insulin, Glucagon, and Diabetes Mellitus. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. 12. Basım. 2011.

Hamada A, Esteves SC, Nizza M, Agarwal A. Unexplained male infertility: diagnosis and management. International Brazilian Journal of Urology. 2012;38(5):576-94.

Hamilton DW. Structure and function of the epithelium lining the ductuli efferentes, ductus epididymidis and ductus deferens in the rat. In Handbook of Physiology. 1975, 215:259–301.

Hansen DK, Inselman AL. Applications of stem cells in developmental toxicology. Reproductive and Developmental Toxicology. 2011;783–792

Hassa H. İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve Ivf Laboratuvar Uygulamaları. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Yayınları. 2003.

Hassan AI, Alam SS. Evaluation of mesenchymal stem cells in treatment of infertility in male rats. Stem cell research & Therapy. 2014;5(6): 1-15.

Hermo L, Dworkin J and Oko R. Role of epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa. Am. J. Anat. 1988, 183:107–124.

Hsiao CH, Ji AT, Chang CC, Chien MH, Lee LM, Ho JH. Mesenchymal stem cells restore the sperm motility from testicular torsion-detorsion injury by regulation of glucose metabolism in sperm. Stem cell research & Therapy. 2019;10(1):270

Hsiao, C. H., Ji, A. T. Q., Chang, C. C., Chien, M. H., Lee, L. M., & Ho, J. H. C. (2019). Mesenchymal stem cells restore the sperm motility from testicular torsion-detorsion injury by regulation of glucose metabolism in sperm. Stem cell research & therapy, 10(1), 1-10.

Hu L, Yin C, Zhao F, Ali A, Ma J, Qian A. Mesenchymal Stem Cells: Cell Fate Decision to Osteoblast or Adipocyte and Application in Osteoporosis Treatment. International Journal of Molecular Sciences. 2018;19(2):360.

Islam R, Yoon H, Kim B, Bae H, Shin H, Kim W, Yoon W, Lee Y, Woo K, Baek J, Ryoo H. Blood-testis barrier integrity depends on Pin1 expression in Sertoli cells. Scientific Reports. 2017;7(1):1–12.

Jato JA, Bawa I, Onyezili FN. Diabetes induction with streptozotocin and insulin action on blood glucose levels in albino rats. International Journal of Modern Science and Techonlogy. 2018;3(10):208-212.

Javeed N, Matveyenko AV. Circadian Etiology of Type 2 Diabetes Mellitus. Physiology (Bethesda). 2018;33(2):138-150

Jiang XH, Bukhari I, Zheng W, Yin S, Wang Z, Cooke HJ, Shi QH. Blood-testis barrier and spermatogenesis: lessons from genetically-modified mice. *Asian Journal Andrology*. 2014;16(4):572-80

Jiang YP, Yang JM, Ye RJ, Liu N, Zhang WJ, Ma L, Zheng P, Niu JG, Liu P, Yu JQ. Protective effects of betaine on diabetic induced disruption of the male mice blood-testis barrier by regulating oxidative stress-mediated p38 MAPK pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019; 120:109474.

K Kanter M, Aktas C, Erboga M. Protective effects of quercetin against apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Food Chemical Toxicology*. 2012;50(3-4):719-725.

Kalra K, Tomar P. Stem Cell: Basics, Classification and Applications. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*. 2014;919-930.

Karaca T, Demirtaş S, Karaboğa İ, Ayvazz S. Protective effects of royal jelly against testicular damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2015;45(1):27-32.

Karimaghai N, Tamadon A, Rahmanifar F, Mehrabani D, Raayat Jahromi A, Zare S, Khodabandeh Z, Razeghian Jahromi I, Koohi-Hoseinabadi O, Dianatpour M. Spermatogenesis after transplantation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in busulfan-induced azoospermic hamster. *Iran Journal of Basic Medical Sciences*. 2018;21(7):660-667.

Karina, K., Rosliana, I., Rosadi, I., Schwartz, R., Sobariah, S., Afini, I., ... & Pawitan, J. A. (2020). Safety of technique and procedure of stromal vascular fraction therapy: from liposuction to cell administration. *Scientifica*, 2020.

Keshtkar S, Azarpira N, Ghahremani MH. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Research & Therapy*. 2018;9(1):63.

Khaki A, Fathiazad F, Nouri M, Khaki A, Maleki NA, Khamnei HJ, Ahmadi P. B Beneficial effects of quercetin on sperm parameters in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Phytotherapy Research*. 2010;24(9):1285-1291.

Khamis T, Abdelalim AF, Abdallah SH, Saeed AA, Edress NM, Arisha AH. Early intervention with breast milk mesenchymal stem cells attenuates the development of diabetic-induced testicular dysfunction via hypothalamic Kisspeptin/Kiss1r-GnRH/GnIH system in male rats. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*. 2020;1866(1):165577.

Khan RMM, Chua ZJY, Tan JC, Yang Y, Liao Z, Zhao Y. From Pre-Diabetes to Diabetes: Diagnosis, Treatments and Translational Research. *Medicina*. 2019;55(9):546.

Kianifard D, Sadrkhanlou RA, Hasanzadeh S. The ultrastructural changes of the sertoli and leydig cells following streptozotocin induced diabetes. *Iran Journal Basic Medical Sciences*. 2012;15(1):623-635.

Kierszenbaum AL, Tres LL. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*. 4 basım. 2013.

Kierszenbaum AL. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Patolojiye Giriş*. Palme Yayıncılık. 2006

Kılarkaje N, Al-Hussaini H, Al-Bader MM. Diabetes-induced DNA damage and apoptosis are associated with poly (ADP ribose) polymerase 1 inhibition in the rat testis. *European Journal of Pharmacology*. 2014; 737:29-40.

Kirchhoff C. Gene expression in the epididymis. *Int. Rev. Cytol*. 1999, 188:133–202.

Kitabevleri, Ankara. 2014.

Kopera IA, Bilinska B, Cheng CY, Mruk DD. Sertoli-germ cell junctions in the testis: a review of recent data. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*.

2010;365(1546):1593-1605.

Korejo NA, Quanwei WEI, Kaizhi Z, Dagan MAO, Rashid AK, Atta HS, Fangxiong SHI. Contemporaneous effects of diabetes mellitus and hypothyroidism on spermatogenesis and immunolocalization of Claudin-11 inside the seminiferous tubules of mice. *BMC Developmental Biology*. 2018;18(1).

Kosova F, Ari Z. The Relationship between Prostate Cancer and Apoptosis. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*. 2011; 2 (1): 124-131

Kwitny S, Klaus AV, Hunnicutt GR. The annulus of the mouse sperm tail is required to establish a membrane diffusion barrier that is engaged during the late steps of spermiogenesis. *Biology of Reproduction*. 2010;82(4):669-678.

Lenzen S. The Mechanisms of Alloxan- and Streptozotocin-Induced Diabetes. *Diabetologia*. 2008;51(2):216–226.

Los MJ, Hudecki A, Wiehac E, editors. Stem cells and biomaterials for regenerative medicine. Academic Press. 2018:5-16.

Lui W, Lee WM, Cheng C. Transforming Growth Factor- β 3 Perturbs the Inter-Sertoli Tight Junction Permeability Barrier in Vitro Possibly Mediated via Its Effects on Occludin, Zonula Occludens-1 and Claudin-11. *Endocrinology*. 2001;142(5):1865-1877.

Lui WY, Mruk D, Lee WM, Cheng CY. Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. *Biology of Reproduction*. 2003;68(4):1087-97.

Maresch CC, Stute DC, Alves MG, Oliveira PF, de Kretser DM, Linn T. Diabetes-induced hyperglycemia impairs male reproductive function: a systematic review. *Human Reproductive Update*. 2018;24(1):86-105.

Matsumura, T., Sato, T., Abe, T., Sanjo, H., Katagiri, K., Kimura, H., ... & Ogawa, T. (2021). Rat in vitro spermatogenesis promoted by chemical supplementations and

oxygen-tension control. Scientific reports, 11(1), 1-13.

Maurya MK, Varma RK, Chaurasia IC, Vishwakarma R, Yadav N. A Review Literature on Science of Diabetes Mellitus. International Journal of Research and Analytical Reviews. 2019;6(2)

MAYO CLINIC. 2019. Infertility [Online]. Available: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/infertility/symptoms-causes/syc-20354317> [Accessed Eylül 27,2019]

McCabe MJ, Foo CF, Dinger ME, Smooker PM, Stanton PG. Claudin-11 and occludin are major contributors to Sertoli cell tight junction function, in vitro. Asian J Androl. 2016;18(4):620-6.

McCabe MJ, Tarulli GA, Meachem SJ, Robertson DM, Smooker PM, Stanton PG. Gonadotropins regulate rat testicular tight junctions in vivo. Endocrinology. 2010;151(6):2911-2922.

McLaughlin D, Stamford J, White D. BIOS Instant Notes in Human Physiology. 1. basım. 2006.

Meligy FY, Abo Elgheed AT, Alghareeb SM. Therapeutic effect of adipose-derived mesenchymal stem cells on Cisplatin induced testicular damage in adult male albino rat. Ultrastruct Pathology. 2019;43(1):28-55.

Mercan N, Toros P, Söyler G, Hanoglu A, Kükner A. Effects of Corchorus Olitorius and Protocatechuic Acid on Diabetic Rat Testis Tissue. International Journal of Morphology. 2020; 38(5):1330–35.

Mescher L. Junqueira's Basic Histology Text & Atlas. 15. basım. 2017.

Monsefi M, Fereydouni B, Rohani L, Talaei T. Mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous tubules of sterile rats. Iran Journal of Reproductive Medicine. 2013 ;11(7):537-544

Moon, K. C., Chung, H. Y., Han, S. K., Jeong, S. H., & Dhong, E. S. (2019). Possibility of injecting adipose-derived stromal vascular fraction cells to accelerate microcirculation in ischemic diabetic feet: a pilot study. *International journal of stem cells*, 12(1), 107.

Moore K. L, Persaud T. V. N. (Çeviri Edt; Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H. Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi. Nobel Tıp Kitabevi. 2009;8. Baskı

Moore KL, Dailey AF, Agur Anne MR. Temel Klinik Anatomisi. 6. basım. Ankara Nobel Tıp Kitabevi. 2020.

Morrow CMK, Mruk D, Cheng CY, Hess RA. Claudin and occludin expression and function in the seminiferous epithelium. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2010;365(1546):1679-1696.

Mruk DD, Cheng CY. The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation. *Endocrin Reviews*. 2015;36(5):564-91.

Murray FT, Cameron DF, Orth JM. Gonadal dysfunction in the spontaneously diabetic BB rat. *Metabolism*. 1983;32(1):141-147.

Nah WH, Lee JE, Park HJ, Park NC, Gye MC. Claudin-11 expression increased in spermatogenic defect in human testes. *Fertility and Sterility*. 2011;95(1):385-388.

Necati Gürbüz. İnfertilite: Testisin Vasküler Anatomisi. *Androloji Bülteni*. 2004; (19):333.

Okur ME, Karantas ID, Siafaka P. Diabetes Mellitus: A Review on Pathophysiology, Current Status of Oral Medications and Future Perspectives. *Acta Pharmaceutica Scientia*. 2017;55(1):61-82

Orhan İ, Onur R, Yüzgeç V, Semerciöz A, Fırdolaş F. Subinguinal Varikoselektomide Anatomik Vasküler Varyasyonlar. *Fırat Tıp Dergisi*. 2004; 9(1): 18-20.

Ovalle WK, Patrick CN. Netter: Netter's Essential Histology. 2. basım. 2014.

Ozougwu JC, Obimba KC, Belonwu CD, Unakalamba CB. The Pathogenesis and Pathophysiology of Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Physiology and Pathophysiology*. 2013; 4(4):46–57.

Ören H. Stem cells. *Journal of Dokuz Eylül University Medical Faculty*. 2019;33(3):271–80.

Özcan Ö. Streptozotosin (STZ) ile Diyabet Oluşturulmuş Sıçanlarda Kuersetin'in Testis Dokusuna Etkisi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Prof.Dr. Cengiz Bayçu). Eskişehir, 2017.

Palmer JP, Raskin P, MD, Rizza RA, Stern MP. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2003; 26(1):5–20.

Pan J, Zhu Z, Xu G, Niu L, Yu L, Luo Z, Yan J. Expression of claudin 11 in a rat model of varicocele and its effects on the blood testis barrier. *Molecular Medicine Reports*. 2018;18(6):5647-5651.

Pennings S, Liu KJ, Qian H. The Stem Cell Niche: Interactions between Stem Cells and Their Environment. *Stem Cells International*. 2018; 4879379.

Qamar, A. Y., Hussain, T., Rafique, M. K., Bang, S., Tanga, B. M., Seong, G., ... & Cho, J. (2021). The Role of Stem Cells and Their Derived Extracellular Vesicles in Restoring Female and Male Fertility. *Cells*, 10(9), 2460.

Qiu, X., Fandel, T. M., Ferretti, L., Albersen, M., Zhang, H., Lin, G., ... & Lue, T. F. (2012). Both immediate and delayed intracavernous injection of autologous adipose-derived stromal vascular fraction enhances recovery of erectile function in a rat model of cavernous nerve injury. *European urology*, 62(4), 720-727.

Qomi, R. T., & Sheykhasan, M. (2017). Adipose-derived stromal cell in

regenerative medicine: a review. World journal of stem cells, 9(8), 107.

Qu N, Itoh M, Sakabe K. Effects of Chemotherapy and Radiotherapy on Spermatogenesis: The Role of Testicular Immunology. International Journal of Molecular Sciences.2019;20(4):957.

Rato L, Alves MG, Dias TR, Cavaco JE, Oliveira PF. Testicular Metabolic Reprogramming in Neonatal Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetic Rats Impairs Glycolytic Flux and Promotes Glycogen Synthesis. Journal of Diabetes Research. 2015;2015:973142.

Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. Diabetic Medicine. 2005; 22(4):359-370.

Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. Circulation. 2004 Mar 16;109(10):1292-8.

Ricci G, Catizone A, Esposito R, Pisanti FA, Vietri MT, Galdieri M. Diabetic rat testes: morphological and functional alterations. Andrologia. 2009;41(6):361-8

Robaire B, Syntin P, Jervis K. The coming of age of the epididymis. In Testis, Epididymis and Technologies in the Year 2000 2000,143: 229–262

Ross MH, Wojciech P. Histology: A Text and Atlas, with Correlated Cell and Molecular Biology. 6. basım. 2011.

Roxo DF, Arcaro CA, Gutierrez VO, Costa MC, Oliveira JO, Lima TFO, Assis RP, Brunetti IL, Baviera AM. Curcumin combined with metformin decreases glycemia and dyslipidemia, and increases paraoxonase activity in diabetic rats. Diabetology and Metabolic Syndrome. 2019;11:33.

Sadler TW (Çeviri: AC. Başaklar). Langman's medikal embriyoloji. 7. Baskı. Ankara Palme Yayıncılık. 2011; Baskı 11

Sadler TW. Lagman's Medical Embryology. Journal of Chemical Information and Modeling. 2019

Sancak B, Cumhur M. Fonksiyonel Anatomi Baş Boyun ve İç Organlar. 4. Odtü Yayıncılık. 2008.

Sargon MF. Kısa Anatomi. 1. Basım. Nobel Tıp Kitabevleri. 2012.

Scarano WR, Messias AG, Oliva SU, Klinefelter GR, Kempinas WG. Sexual behaviour, sperm quantity and quality after short-term streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats. International Journal of Andrology. 2006(4):482-8.

Serre V, Robaire, B. Segment specific morpho- logical changes in the aging brown Norway rat epididymis. Biol. Reprod. 1998,58:497–513.

Sherif IO, Sabry D, Abdel-Aziz A, Sarhan OM. The Role of Mesenchymal Stem Cells in Chemotherapy-Induced Gonadotoxicity. Stem Cell Research and Therapy. 2018;9(1):1–9.

Si Z, Wang X, Sun C, Kang Y, Xu J, Wang X, Hui Y. Adipose-derived stem cells: Sources, potency, and implications for regenerative therapies. Biomedicine and Pharmacotherapy. 2019; 114:108765.

Siregar S, Noegroho BS, Ricky A, Mustafa A. The Effect of Intratesticular Injection of Human Adipose-Derived Stem Cell (HADSC) on Testicular Oxidative Stress and Spermatogenesis Process in the Varicocele Rat Model. Research Square Preprints. 2021; 1–11.

Sisman AR, Kiray M, Camsari UM, Evren M, Ates M, Baykara B, Aksu I, Guvendi G, Uysal N. Potential novel biomarkers for diabetic testicular damage in streptozotocin-induced diabetic rats: nerve growth factor Beta and vascular endothelial growth factor. Disease Markers. 2014; 2014:108106.

Snell R.S. Structures of the Anterior Abdominal Wall: Scrotum, Testis, and Epididymides. Clinical Anatomy for Medical Students. 6.basım. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2000;s:153-157.

Sofikitis N, Pappas E, Kawatani A, Baltogiannis D, Loutradis D, Kanakas N, Giannakis D, Dimitriadis F, Tsoukanelis K, Georgiou I, Makrydimas G, Mio Y, Tarlatzis V, Melekos M, Miyagawa I. Efforts to create an artificial testis: culture systems of male germ cells under biochemical conditions resembling the seminiferous tubular biochemical environment. *Human Reproductive Update*. 2005;11(3):229-59.

Spees JL, Lee RH, Gregory CA. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Research and Therapy*. 2016;7(1):125.

Stanton PG. Regulation of the Blood-Testis Barrier. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2016; 59:166–73.

Sun C, Lin H, Yu W, Li X, Chen Y, Qiu X, Wang R, Dai Y. Neurotrophic effect of bone marrow mesenchymal stem cells for erectile dysfunction in diabetic rats. *International Journal of Andrology*. 2012;35(4):601-7.

Swartz MH. Male Genitalia and Hernias. *Textbook of Physical Diagnosis*. 2009.

Takehara, Y., Yabuuchi, A., Ezoe, K., Kuroda, T., Yamadera, R., Sano, C., ... & Kato, O. (2013). The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function. *Laboratory Investigation*, 93(2), 181-193.

Teixeira TA, Pariz JR, Dutra RT, Saldiva PH, Costa E, Hallak J. Cut-off values of the Johnsen score and Copenhagen index as histopathological prognostic factors for postoperative semen quality in selected infertile patients undergoing microsurgical correction of bilateral subclinical varicocele. *International Journal of Andrology*. 2019;8(4):346-355.

Tekeli S, Arısu Naghavi E, Gökçe B, Sır G, Yiğittürk G, Çavuşoğlu T, Uyanıkgil Y. Kök hücreler; mezenkimal kök hücreler ve güncel klinik uygulamaları. *İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Transplantasyon Dergisi*. 2016; 1(2): 72-83.

Trasler JM, Hermo L, Robaire B. Morphological changes in the testis and epididymis of rats treated with cyclophosphamide: a quantitative approach. *Biol.*

Reprod. 1988, 38:463–479.

Trounson A. The Production and Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *Endocrine Reviews*. 2006; 27(2):208–219.

Tsuji W, Rubin JP, Marra KG. Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration. *World Journal of Stem Cells*. 2014;6(3):312-321.

Tunalı S, Başar R. Vascular Anatomy of the Testis. *Turkiye Klinikleri Journal Urology-Special Topics*. 2012;5(3):1–5.

Turner TT, Gleavy JL, Harris JM. Fluid movement in the lumen of the rat epididymis: effect of vasectomy and subsequent vasovasostomy. *J. Androl*. 1990, 11: 422–428.

Ün, B. Ç., Akpolat, M., & Ün, B. (2020). Can mesenchymal stem cells ameliorate testicular damage? Current researches. *J Surg Med*, 4(7), 603-607.

Vander Borgh, M., & Wyns, C. (2018, December 1). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical Biochemistry*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012>

Vivian AG, Ferreira LB, Duarte CA, Lima IL, Ferreira ER, Oliveira BC, Vargas LN, Moraes DD, Silva IB, Faria RO, Souza AG, Castro-Filice L. Mesenchymal Stem Cells from Human Adipose Tissue and Bone Repair: A Literature Review. *Biotechnology Research and Innovation*. 2018; 2(1):74–80.

Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(9):1852.

Wang CY, Neil DL, Home P. 2020 vision - An overview of prospects for diabetes management and prevention in the next decade. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2018; 143:101-112.

Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units

in evolution. *cell*. 2000; 100(1): 157-168.

Widmaier EP, Hershel Raff, Kevin TS. Vander's Human Physiology: The Mechanisms Of Body Function. 11. basım. 2008.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004;27(5):1047-1053.

Wobus, Anna M. Potential of Embryonic Stem Cells. *Molecular Aspects of Medicine*. 2001 22(3):149–164.

Wright JR, Yates AJ, Sharma HM, Shim C, Tigner RL, Thibert P. Testicular atrophy in the spontaneously diabetic BB Wistar rat. *The American Journal of Pathology*. 1982;108(1):72-79.

Yeung CH, Cooper TG, Bergmann M, Schulze H. Organization of tubules in the human caput epididymidis and the ultrastructure of their epithelia. *Am. J. Anat*. 1991;191:261–279

Yıldırım Mehmet. Resimli Sistematiik Anatomi. 1 basım. Nobel Tıp Yayınları. 2013.

Young B, O'Dowd G, Phillip Woodford. Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas. 2006.

Youssef A, Aboalola D, Han VK. The Roles of Insulin-Like Growth Factors in Mesenchymal Stem Cell Niche. *Stem Cells International*. 2017; 2017:9453108.

Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., de Mouzon, J., Sokol, R., ... van der Poel, S. (2017). The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertility and Sterility*, 108(3), 393–406. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.06.005>

Zhang, E., Zhang, Y., Fang, L., Li, Q., & Gu, J. (2014). Combined

Hysterolaparoscopy for the Diagnosis of Female Infertility: a Retrospective Study of 132 Patients in China. *Materia Socio Medica*, 26(3), 156.
<https://doi.org/10.5455/msm.2014.26.156-157>

Zheng Y, Sylvia H, Frank BH. Global Aetiology and Epidemiology of Type 2 Diabetes Mellitus and Its Complications. *Nature Reviews Endocrinology* 2018;14(2):88–98.

Zhong L, Yang M, Zou X, Du T, Xu H, Sun J. Human umbilical cord multipotent mesenchymal stromal cells alleviate acute ischemia-reperfusion injury of spermatogenic cells via reducing inflammatory response and oxidative stress. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020 ;11(1):294.

Zhou L, Song K, Xu L, Zhao F, Tian H, Zhou C, Xu Z, Ge Y, Wu R, Jia R. Protective Effects of Uncultured Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction on Testicular Injury Induced by Torsion-Detorsion in Rats. *Stem Cells Translational Medicine*. 2019;8(4):383-391.

10. EKLER

EK 1.

T.C. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu							
KARAR TARİH / NQ	26/ 10 / 2021 / 77.637.435 / 205						
ARAŞTIRMANIN ADI	Yüksek Glikozlu Besiyeri İle DeneySEL Diyabetik Modelde Hasara Uğramış Spermlele Kök Hücre Ve Niş İle Desteklenmiş Trombosit Zengin Plazma (PRP) Ve Stromal Vasküler Fraksiyon (SVF) Etkisi						
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Doç.Dr. Erdoğan Kocamaz- Histoloji - Embriyoloji						
ARAŞTIRMA EKİBİ	Rabia Duruşma						
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	UZMANLIK TEZİ ☐ YÜKSEK LİSANS-DOKTORA TEZİ ☒ AKADEMİK AMAÇLI ☐ Eğitim ☐						
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	01 / 10 / 2021 / Tarih ve 162362 sayılı; dilekçe						
KARAR BİLGİLERİ	Araştırma dosyası incelenmiş, bilimsel ve etik açıdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir						
Unvanı/Adı/Soyadı		Araştırma İle İlişkisi Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye	Unvanı/Adı/Soyadı		Araştırma İle İlişkisi Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye
Prof. Dr. Ercüment ÖLMEZ		☐	☐	Prof. Dr. Gökhan TEMELTAŞ		☐	☐
Prof. Dr. İsmet TOPÇU Anestezi ve Reanimasyon AD		☐	☐	Prof. Dr. Özge YILMAZ Çocuk Hastalıkları AD.		☐	☒
Prof. Dr. Ertuğrul TATLISUMAK Anatomi AD		☐	☐	Dr. Öğr. Üyesi Fulya OCAK – Veteriner Hekim		☐	☐
Prof. Dr. Kivanç GÜNHAN (DEHAM MD)		☐	☒	Saime ÖZKARA Sivil Toplum Üyesi		☐	☒
Levent ÖDEMiŞ Sivil Üye		☐	☐				
Etik Kurulumuzun kararı yukarıda belirtilmiştir. Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda ederim.							

EK 2.



T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÖNETİM KURULU KARAR ÖRNEĞİ

Karar Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
07.05.2020	15	24

Karar 11- Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı 191350001 numaralı öğrencisi Rabia DURUŞMA'nın tez konusunun, etik kurul onayı alınması kaydı ile **"Yüksek Glikozlu Besiyeri ile Deneysel Diyabetik Modelde Hasara Uğramış Spermilere Kök Hücre ve Niş ile Desteklenmiş Trombosit Zengin Plazma (PRP) ve Stromal Vasküler Fraksiyon (SVF) Etkisi"** olarak belirlenmesine **OY BİRLİĞİ** ile karar verildi.

e-imzalıdır Prof. Dr. Ömer TETİK Enstitü Müdürü		
e-imzalıdır Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER Müdür Yardımcısı		e-imzalıdır Dr. Öğr. Üyesi Süheyla RAHMAN Müdür Yardımcısı
e-imzalıdır Prof. Dr. Necip KUTLU Üye	e-imzalıdır Dr. Öğr. Üyesi Nursen BOLSOY Üye	e-imzalıdır Prof. Dr. Murat TAŞ Üye
e-imzalıdır Aynur PALAMUTÇUOĞLU Enstitü Sekreteri		

Aslı Gibidir

Dr. Öğr. Üyesi Süheyla RAHMAN
Müdür Yardımcısı

4TH INTERNATIONAL HEALTH SCIENCES AND INNOVATION CONGRESS

**YÜKSEK GLİKOZLU BESİYERİ İLE INVITRO DENEYSEL DİYABETİK
MODELDE HASARA UĞRAMIŞ SPERMLERE MEZENKİMAL KÖK HÜCRE,
KOŞULLU BESİYERİ VE TROMBOSİT ZENGİN PLAZMA İLE DESTEKLENMİŞ
STROMAL VASKÜLER FRAKSİYON ETKİSİ**

EFFECT OF STROMAL VASCULAR FRACTION SUPPLEMENTED WITH
MESENCHYMAL STEM CELLS, CONDITIONED MEDIUM AND PLATELET RICH
PLASMA ON DAMAGED SPERM BY INVITRO EXPERIMENTAL DIABETIC MODEL
WITH HIGH GLUCOSE MEDIUM

Rabia DURUŞMA

Yüksek Lisans Öğrencisi, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,

ORCID NO: 0000-0002-5521-9267

(Sorumlu Yazar)

Erdoğan KOCAMAZ

Doç. Dr. Öğr. Üyesi, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji
Anabilim Dalı,

ORCID NO:0000-0002-5508-0461

ÖZET

Bu çalışmada sağlıklı hayvanlardan alınan spermelerde kültür ortamında yüksek glikozlu besiyeri kullanılarak diyabetik (DB) hasar oluşturuldu. Spermere mezenkimal kök hücre (MKH), 48 saatlik salgıladıkları faktörler olan koşullu besiyeri (KB) Niş ve Trombosit Zengin Plazma (PRP) ile desteklenmiş Stromal Vasküler Fraksiyon (SVF) uygulamaları yapılarak deneysel diyabetik modelde sperm hasarının azaltılması amaçlandı.

12 haftalık Wistar Albino cinsi 15 adet sıçandan elde edilen spermeler kültür ortamında 6 gözlü flasklara alınarak 15 farklı grup olacak şekilde belirlendi. Kontrol (KG), Sham (SG), DB, DB+ MKH, DB + KB, DB+MKH+ KB, DB+ PRP, DB+ SVF, DB+ MKH+PRP, DB+ MKH+ SVF, DB+ KB+ PRP, DB+ KB+ SVF, DB+MKH+ KB+ PRP, DB+ MKH + KB+ SVF ve DB+ MKH+ KB+ PRP+SVF olarak grupları ayrıldı. Üç saatlik uygulamada morfoloji, canlılık ve hareket değerlendirilmeleri yapılarak yaymaları hazırlanan örnekler oksidatif stres için e-NOS ve i-NOS ile apoptoz için Terminal Transferased UTP Nick End Labeling (TUNEL), Caspas 3, 8 ve 9 ile immünohistokimyasal olarak analiz edildi. DB

EK 5.

ID-215 / OP: “Deneyisel Diyabetik Modelde Kültürde Hasara Uğramış Spermilere Hücresel Tedavinin Etkisi”

Rabia Duruşma*, Erdoğan Kocamaz*, Mustafa Öztatlıcı*, Tuna Önal*, Müge Karakayalı**, İbrahim Tuğlu*

*Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Celal Bayar University, Manisa, Turkey

**Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Izmir Democracy University, Izmir, Turkey

Contact Author: Erdoğan Kocamaz

E-mail: erdogan.kocamaz@cbu.edu.tr

Özet (ID-215)

Diyabete bağlı erkek infertilitesi giderek artan önemli bir sorundur. Hücresel tedaviler son zamanlarda klinik karşılık bulan önemli tedavi yöntemleridir. Bu çalışmada sağlıklı hayvanlardan alınan spermelerde kültür ortamında yüksek glikozlu besiyeri kullanılarak diyabetik (DH) hasar oluşturuldu. Aynı ortamda spermilere mezenkimal kök hücre (MKH), 48 saatlik salgıladıkları faktörler olan koşullu besiyeri (KBY), Trombosit Zengin Plazma (PRP) ile Stromal Vasküler Fraksiyon (SVF) uygulamaları yapılarak hasarının azaltılması ve etkinliklerinin karşılaştırılması amaçlandı.

12 haftalık Wistar Albino cinsi erkek sıçandan elde edilen spermeler kültür ortamında 6 gözlü flasklara alınarak Kontrol 0 saat (KG0S), Kontrol 3 saat (KG0S), DH, DH+PBS, DH+ MKH, DH + KBY, DH+ PRP ve DH+ SVF, uygulamaları yapıldı. Üç saatlik uygulamada morfoloji, canlılık ve hareket değerlendirilmeleri yapılarak yaymaları hazırlanan örnekler oksidatif stres için endotel Nitroz Oksit Sentaz (e-NOS) ve indüklenebilir (i) NOS ile apoptoz için Terminal Transferased UTP Nick End Labeling

EK 6.

ID-216 / OP: “Hücresel Tedavinin Diyabetik Kültür Ortamında Sperm Ölümüne Etkisi”

Erdoğan Kocamaz*, Rabia Duruşma*, Tuna Önal*, Mustafa Öztatlıcı*, Müge Karakayalı**, İbrahim Tuğlu*

*Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Celal Bayar University, Manisa, Turkey

**Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Izmir Democracy University, Izmir, Turkey

Contact Author: Erdoğan Kocamaz

E-mail: erdogan.kocamaz@cbu.edu.tr

Abstract (ID-216)

Apoptoz, oksidatif saldırı ve kromatin olgunlaşmasındaki kusurlar sonucu oluşan sperm DNA fragmantasyonu, erkek doğurganlığı, insan üremesi ve yavruların sağlığı için bir tehdit oluşturur. Diyabete bağlı erkek infertilitesi için önemli bir mekanizmadır. Apoptozun en erken ve sık görülen özelliği sitozolik sistein proteaz olan kaspazların (KP) aktifleşmesi özellikle yürütücü olan KP3, Fas/CD95 yolak için KP9 ve mitokondriyal yolak için KP9 üzerinden gerçekleşmesidir. Kök hücre ve hücresel tedaviler (HT) son zamanlarda klinik karşılık bulan önemli tedavi yöntemleri olup bu çalışmada sperm ölümüne etkileri incelendi.

Sıçan epididiminden alınan spermiler kültür ortamında yüksek glikozlu besiyeri kullanılarak diyabetik (DH) hasar ve apoptoza yönlendirildi. Spermilere mezenkimal kök hücre (MKH), 48 saatlik salgıladıkları faktörler olan koşullu besiyeri (KBY), Trombosit Zengin Plazma (PRP) ile Stromal Vasküler Fraksiyon

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı	RABİA	Soyadı	DURUŞMA
------------	-------	---------------	---------

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Eskişehir Anadolu Üniversitesi	2019
Lisans	Ege Üniversitesi	2018
Lise	Havva Özişbakan Lisesi	2013

İş/ Staj Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl – Yıl)
Erasmus+	Universita Politecnica delle Marche	2015-2016
Biyolog stajyer	Özel Tınaztepe Hastanesi	2017 (1 ay)
Biyolog	Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi	2019-2020
Erasmus Staj	George Emil Palade University of Medicine, Pharmacy, Science and Technology of Targu Mureş	2021 (2,5 ay)

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Orta	Orta	Orta

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi