



**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TESTİKÜLER TORSİYONUN İNDÜKLEDİĞİ KISIRLIĞA
MEZENKİMAL KÖK HÜCRENİN ve MELATONİNİN
KORUYUCU ETKİSİ**

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

NAZİRE GÜL NEŞET

**Temmuz, 2021
DENİZLİ**

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TESTİKÜLER TORSİYONUN İNDÜKLEDİĞİ KISIRLIĞA
MEZENKİMAL KÖK HÜCRENİN ve MELATONİNİN
KORUYUCU ETKİSİ**

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

Nazire Gül NEŞET

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Nazlı ÇİL

Denizli, 2021

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

Öğrencinin Adı Soyadı : Nazire Gül NEŞET

İmza :

ÖZET

Testiküler Torsiyonun İndüklediği Kısırlığa Mezenkimal Kök Hücrenin Ve Melatoninin Koruyucu Etkisi

Nazire Gül NEŞET

Yüksek Lisans Tezi, Histoloji ve Embriyoloji AD

Tez Yöneticisi: Dr. Öğr. Üyesi Nazlı ÇİL

Temmuz 2021, 61 Sayfa

Bu çalışmada akut tek taraflı testis torsiyonu oluşturulan sıçanlarda melatonin ve kök hücre uygulamasının etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Wistar-Albino cinsi, 8 haftalık 40 adet erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar 5 gruba ayrıldı. Sham grubu (S) (n=8), torsiyon/detorsiyon grubu (T/D) (n=8) torsiyon/detorsiyon oluşturulduktan sonra 25 mg/kg melatonin verilen grup (M) (n=8); torsiyon/detorsiyon oluşturulduktan sonra kök hücre verilen grup (KH), torsiyon/detorsiyon oluşturulduktan sonra melatonin ve kök hücre birlikte verilen grup (KH+M) (n=8). MDA, Testosteron, FSH ve LH seviyeleri ELİZA yöntemiyle belirlenmiştir. Testislerde histopatolojik analizler yapılmıştır. Gruplar arasında testosteron, FSH, LH, değerlerinde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Modifiye Johnson skorlaması yapılan gruplarda sağ ve sol testis sham grubunda (9.93 ± 0.1), diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksek olarak bulunmuştur. Torsiyon detorsiyon grubunda sağ testiste Johnson skoru en düşük olarak bulunurken (4.9 ± 1.07) sham grubundan sonra en yüksek melatonin grubunda (7.83 ± 1.4) hesaplanmıştır. Testis torsiyon grubunda dejeneratif seminifer tübüller anormal spermatogenez ve maturasyon arresti gözlenmiştir. KH, KH+M ve M gruplarında dejeneratif görünümün bazı tübüllerde devam ettiği bazı tübüllerde ise dejenerasyon çok azaldığı belirlendi. İmmühistokimyasal sonuçlarına göre Kaspaz-3 ekspresyonu en yüksek T/D grubunda rastlandı. SOX-9 ekspresyonu tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı yüksekti. VASA ekspresyonu KH gruplarında düşük saptanması dikkat çekiciydi. KH, KH+M ve M uygulaması torsiyonun testis dokusunda oluşturduğu dejenerasyonu düzeltmekle birlikte bu tedavilerin birbirine üstünlüğünün olmadığı belirlendi.

Anahtar kelimeler: Testiküler Torsiyon-Detorsiyon, Kök hücre, Melatonin, Apoptoz

Bu çalışmada PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası: 2019SABE008)

ABSTRACT**Protective Effect of Mesenchymal Stem Cells and Melatonin on Testicular
Torsion-Induced Infertility****NEŞET NAZİRE GÜL**

MSC Thesis in Histology and Embryology

Supervisor: Ast. Prof. Nazlı ÇİL

July 2021, 61 Pages

The aim of this study is to investigate the effect of melatonin and stem cell in rats with acute unilateral testicular torsion. 40 male Wistar-Albino rats, 8 weeks old were used. The rats were divided into five groups such as sham group (n=8), torsion/detorsion group (T/D)(n=8), 25 mg/kg melatonin given group (M) after torsion/detorsion (n=8), stem cells given group (SC) after torsion/detorsion (n=8), Melatonin and stem cell co-treated group (SCM) after torsion/detorsion creation. MDA, Testosterone, FSH, LH levels were determined by ELISA. Histopathological analyses were performed on the testicles. There was no significant difference in Testosterone, FSH, LH values between the groups. In the modified Johnson scoring, the right and left testis in the sham group (9.93 ± 0.1) were found to be significantly higher than the other groups. The lowest Johnson score was found in the right testis of the T/D group (4.9 ± 1.07). the highest Johnson scoring was calculated in the M group (7.83 ± 1.4) after the sham group. Degenerative seminiferous tubules, abnormal spermatogenesis and maturation arrest were observed in T/D group. It was observed that the degenerative appearance continued in some tubules, and degeneration decreased in some tubules in SC, M and SCM groups. According to the immunohistochemical results, the highest caspase-3 expression was found in the T/D group. SOX-9 expression was statistically significantly higher in the treatment groups. It was remarkable that VASA expression was low in the SC groups. Although SC, SCM and M treatment corrected the degeneration caused by torsion in the testicular tissue, it was determined that this treatment was not at the desired level.

Keywords: Testicular Torsion-Detorsion, Stem cell, Melatonin, Apoptosis**This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects
Coordination Unit through project numbers 2019SABE008**

TEŞEKKÜRLER

Çalışmamın tüm süreçlerinde desteğini, önerilerini ve deneyimlerini benden esirgemeyen tez danışmanım Dr.Öğr.Ü. Nazlı ÇİL ve Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Gülçin ABBAN METE 'ye, eğitimim sürecinde destekleri ve emekleri için değerli bölüm hocalarım Prof.Dr. Saim ÖZDAMAR, Prof.Dr. Hülya ÇETİN, Doç.Dr. Nazan KESKİN, Dr.Öğr.Ü. Serkant ÜNAL ; asistanlığım boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan ve ekip arkadaşlarıma uzaktan mesafe dinlemeden hep yanımda olan canım arkadaşlarım Ferda APA, Burçin ÇABUK, Gülsün GÜLTEN, Burcu SEVİCİ, Kübra ATA, Taylan ÇİL'e, tez sürecimde sabır, ilgi ve anlayışlarıyla her ihtiyacım olduğunda yanımda olan tüm arkadaşlarıma, maddi manevi beni destekleyen sabır ve sevgileriyle bugünlere getiren canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	II
ABSTRACT.....	III
TEŞEKKÜRLER.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Amaç:.....	2
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	3
2.1. Testis:	3
2.1.1. Testis gelişimi:.....	3
2.1.2. Testis histolojisi:.....	4
2.1.2.1. Semifer tübüller:	4
2.1.2.2. Sertoli Hücreleri:.....	5
2.1.2.3. Spermatogenik hücreler:	6
2.1.2.3.1. İnterstisyel Doku:	6
2.1.2.3.2. Spermatogenez:.....	6
2.1.2.3.3. Spermin yapısı:.....	7
2.2. Testis Torsiyonu:	8
2.3. Kök Hücre:	10
2.3.1:Kök hücre çeşitleri ve kaynakları	10
2.3.2:Mezankimal kök hücre	11
2.3.3:Kök Hücre kullanım alanları.....	11
2.4:Melatonin ve Kullanımı	12
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER:.....	13
3.1. Hayvan modeli ve Testis torsiyonunun oluşturulması:	13

3.2.:Kök hücre elde edilmesi ve transplantasyonu	15
3.3:Sperm sayımı ve morfolojik değerlendirilmesi	15
3.4.:Kimyasalların hazırlanması.....	15
3.4.1.ELİSA yöntemi	16
3.5.:Histopatoloji.....	16
3.5.1.:Doku Takibi.....	17
3.5.2.:Hematoksilen Eosin boyama protokolü.....	18
3.5.3.:Seminifer tübül alanlarının ve seminifer epitel kalınlığının hesaplanması....	18
3.5.4.:Modifiye Johnson Skorlaması.....	19
3.5.5.:İmmunohistokimyasal boyama yöntemleri.....	19
3.5.6.: Tunal boyama yöntemi.....	21
3.6.: İstatiksel analiz:.....	22.
4. BULGULAR:.....	23
4.1. Mezankimal kök hücre çoğaltılması:.....	23
4.2.Sıçan ağırlıklarının, sperm sayımının ve morfolojik olarak değerlendirilmesinin istatistiksel sonuçları.....	24
5.TARTIŞMA	34
6.SONUÇ	40
7. KAYNAKLAR	41
8. ÖZGEÇMİŞ	45
9. EKLER	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.2.1 Seminifer tübüllerin genel görünümü.....	5
Şekil 2.1.2.2 H&E ile boyanmış seminifer tübüllerde; a) leydig hücreleri b) seminifer tübüllerde spermatogenez gösterilmiştir.....	6
Şekil 3.1.3 Deneysel cerrahi yapılarak testis torsiyonu oluşturulması.....	14
Şekil 4.1.4 Mezenkimal kök hücre flow sitometri sonuçları.....	23
Şekil 4.1.5 ADMSC' nin üçüncü pasajda farklılaşması.....	24
Şekil 4.2.6 Sham, T/D, Melatonin Grupları morfolojik boyanma.....	25
Şekil 4.2.7 Grupların kan MDA değerlerinin karşılaştırılması.....	26
Şekil 4.2.8 Grupların kan Testosteron değerlerinin karşılaştırılması.....	27
Şekil 4.2.9 Grupların kan FSH değerlerinin karşılaştırılması.....	27
Şekil 4.2.10 Grupların kan LH değerlerinin karşılaştırılması.....	28
Şekil 4.2.11 Grupların Modifiye Johnson skorlaması.....	29
Şekil 4.2.12 H&E sham grubu görünümü.....	30
Şekil 4.2.13 H&E T/D grubu görünümü.....	30
Şekil 4.2.14 H&E M grubu görünümü.....	30
Şekil 4.2.15 H&E KH grubu görünümü.....	31
Şekil 4.2.16 H&E KH+M grubu görünümü.....	31
Şekil 4.2.17 Hemotoksilen immünoperoksidaz yapılan SOX-9 gruplarının görüntüsü	32
Şekil 4.2.18 Hemotoksilen immünoperoksidaz yapılan Vasa gruplarının görüntüsü	33
Şekil 4.2.19 Hemotoksilen immünoperoksidaz yapılan Kaspaz-3 gruplarının görüntüsü.....	35
Şekil 4.2.20 TUNEL yapılmış grupların görünümü.....	36
Şekil 4.2.21 Gruplardan alınan testis dokusunda TUNEL, KASPAZ-3, SOX-9, VASA ekspresyonunun H skor analizi sonuçlarının grafik görüntüsü.....	38

TABLolar DİZİNİ

Tablo 4.2.1. FSH, Testosteron, MDA, seviyelerinin gruplar arasındaki karşılaştırılmaları.....	26
Tablo 4.2.2: Gruplardan alınan testis dokusunda TUNEL, KASPAZ-3, SOX-9, VASA ekspresyonunun H skor analizi sonuçları.....	33

SİMGELER VE KISALTMALAR

SVF.....	Stromal vasküler fraksiyon
MDA.....	Malondialdeyde
ELİSA.....	Enziyme-linked immuno Sorbet assay
FSH.....	Folikül stimüle eden hormon
IVF.....	İn vitra fertilizasyon
LH.....	Lüteinizan hormon
ABP.....	Androjen bağlayıcı protein
MSC.....	Mezenkimal kök hücre
KH.....	Kök hücre
M.....	Melatonin
TD.....	Torsiyon
ADMSC.....	Adipojenik kök hücre
İ/R.....	İskemi/Reperfüzyon
PBS.....	Fosfat buffer salin
PR.....	Progresif hareketli
SRY.....	Y kromozomu üzerindeki cinsiyet belirleyici bölge
TDF.....	Testis belirleyici faktör
TUNEL.....	Terminal Deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling
WHO.....	Dünya sağlık örgütü
MJS.....	Mojifiye Johnson Skorlaması

1. GİRİŞ

İnfertilite, 12 ay boyunca düzenli korumasız cinsel ilişkiye rağmen gebeliğin oluşmaması olarak tanımlanır. İnfertilite dünya üzerindeki yaklaşık çiftlerin dörtte birini etkilemektedir. Bu vakaların %30'u erkek faktörlerinden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte erkek kaynaklı infertilite nedenlerinin %50'si hala daha tam olarak belirlenememiştir. Bu alanda yapılan çalışmalar daha kaliteli spermelerin eldesine yöneliktir. Daha kaliteli sperm eldesi için günümüzde uygulanan yöntemler olmasına karşın bunlar yeterli değildir ve yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır ve yapılan çalışmalar dünya nüfusunun %15'inin infertiliteden etkilendiğini göstermektedir (Singh, 2011).

Testis torsiyonu spermatik kordun kendi eksenini etrafında dönmesine bağlı olarak testis ve ilgili yapılara kan akışının azalması ya da tamamen durmasıdır. Özellikle çocukluk çağında ve genç ergenlerde hızlı bir şekilde teşhis edilmeli ve cerrahi olarak tedavi edilmelidir (Gül ve Gürgül, 2018). Testis torsiyonundaki ana tedavi manuel veya cerrahi olarak testisin detorsiyonudur.

Testis torsiyonu antioksidanların toplam miktarını azaltır ve toplam oksidanların miktarını ve oksidatif stres indeksini artırır (Abasiyanik, 2004). İskemi reperfüzyon (İ/R) hasarı sonucu oluşan serbest oksijen radikalleri testis yaralanmasına yol açar (Sekmenli, 2017).

Melatonin pineal bez, retina, gastrointestinal sistem, testis gibi dokular tarafından sentezlenir (Sekmenli, 2017) ve serbest radikalleri de temizleyici özelliği sayesinde, eksojen melatonin kullanımı oksidatif stresi ve inflamasyonu azaltır. Melatoninin erkek üreme sisteminde ve hayvanlarda direkt etkisi Leydig hücrelerinden testosteron sentezinde olduğu saptanmıştır (RJ Reiter, 1996). Bazı çalışmalarda melatoninin, testiste iskemi-reperfüzyon kaynaklı oksidatif hasar üzerinde iyileştirici etkisinin olduğu belirtilmektedir (Öner, 2001).

Kök hücreler, kendileri ile benzer hücreler üretme kabiliyetine ve çeşitli spesifik somatik hücrelere farklılaşma kabiliyetine sahip farklılaşmamış hücreler olarak bilinir. Mezenkimal kök hücreler (MSC' ler), çoğalma, kendini yenileme ve farklılaşma potansiyeli dahil olmak üzere benzer birçok özelliğe sahiptir (Karimaghai, 2018).

Adipoz dokudan türetilmiş mezenkimal kök hücrelerin, testiküler torsiyon kaynaklı germ hücre hasarını kurtarma ve busulfan ile indüklenmiş azospermik sıçanın seminifer tübüllerinde spermatogenezi indükleyebildiği gösterilmiştir (Hsiao,2015).

Melatoninin MSC' lerin proliferasyon kapasitesini arttırdığını ve MSC' lerin apoptozisini in vitro ve in vivo olarak ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (Hsiao,2015).

1.1. Amaç:

Testis torsiyonu sonucunda oluşan iskemik hasar infertilite nedenlerinden biridir. Melatonin ve kök hücrenin testis torsiyonundaki etkisi ayrı ayrı incelenmiştir. Melatoninin mezenkimal kök hücre proliferasyonunu arttırdığı ve mezenkimal kök hücre apoptozunu engellediği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Bizim bu çalışmadaki amacımız akut tek taraflı testis torsiyonu oluşturulan sıçanlarda melatonin ve kök hücre tedavisinin etkisini incelemek ve karşılaştırmaktır.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Testis:

Testis hem ekzokrin hem de endokrin bez olarak görev yapan ve çift halinde vücut dışında yerini almış skrotumun içerisinde yer alan erkek üreme sistemi organıdır (Ovalle ve Nahirney 2009).

2.1.1. Testis gelişimi:

Embriyo kromozomal ve genetik olarak cinsiyeti fertizasyon anında belirlenmiş olmasına rağmen yedinci haftada gonadlarda cinsiyete göre değişiklikler ortaya çıkar. Gonadlar 3 yapıdan köken almaktadırlar. Mezodermden köken alan mezotelyum, altındaki mezenşim ve primordiyal germ hücreleridir. Gonadlar 5.haftada mezonefroz üzerinden kalınlaşmış bir alan olarak belirlenir. Gonadal olarak adlandırılan hücre topluluğuna dönüşürler, primer seks kordları adı verilen uzantılarla alttaki mezankimle ilişki kurarlar. Böylelikle korteks ve medulladan oluşan bir gonad oluşur. Erkek genital sistemde korteks gerileyecek, medulla testise diferansiye olacaktır. Erkek yönde gelişim için Y kromozomunun kısa kolunda bulunan genler cinsiyet için çok önemlidir. Testis belirleyici faktör varlığında testiküler diferansiyasyon oluşabilmektedir, seminifer tübüllerde bu şekilde konumlanırlar (Langman's 1996).

Erkek Genital Yapılarının Gelişimi ise SRY (Y-kromozomun cinsiyet belirleyen bölgesi) etkisi altında primitif seks kordlarının kortikal bölgeleri dejenere olurken, medüller bölgesi sertoli hücrelerine diferansiye olur. SRY varlığında sadece seks kord hücreleri sertoli hücrelerine dönüşür. Yedinci haftada sertoli hücreleri testis kordlarını oluşturur. Germ hücreleri ile testis kordları pubertede kanalize olarak seminifer tübülleri oluşturur. Seminifer tübüllerin distalinde bulunan testis kordları lümen oluşturur ve rete testis adı verilen ince kenarlı kanallara farklanır. Gonadın medialindeki rete testis tübülleri efferent duktus ile birleşerek 5-12 adet nefrik kanalları oluşturur. Vaz deferenste nefrik kanallardan meydana gelir. Ve böylelikle testis yuvarlak hale gelmeye başlar ve mezonefroz ile teması azalır. Testis gelişimine devam ederken seks kordunun kortikal kısmı peritoneal epitelden ayrılmaya başlar.

SRY proteinin etkisi ile leydig hücreleri 9. ve 10. haftada mezenkimal hücrelerden gelişir. Leydig hücreleri testosteron üretir. 8. ve 12. haftalar arasında leydig hücrelerinden salınan testosteron vaz deferense kanalların dönüşmesini indükler. 9.

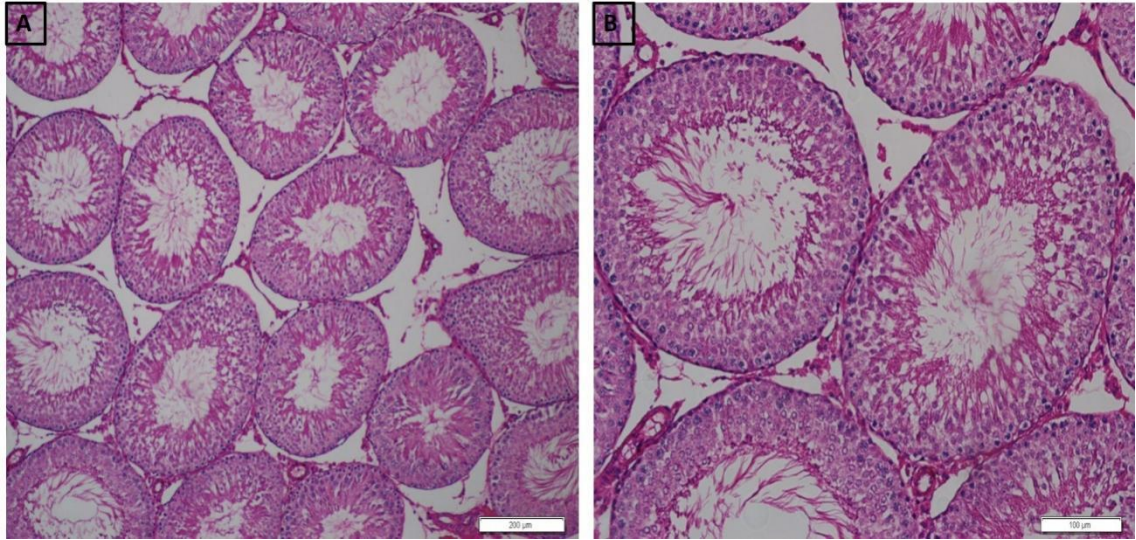
haftada epididim bölgesindeki 5-12 nefrik kanal rete testisin seks kordları ile bağlantı kurar. Bu tübüller 3. aya kadar rete testis ile eferent duktuliler olarak ilişki sağlar (Campbell-Walsh 2014).

2.1.2. Testis histolojisi:

Spermatozoa diye de bilinen erkek gamet üretimi, depolanması ve testosteron salımında yönetici organdır. Testis oval yapıda ve 4 cm uzunluğunda, 3 cm genişliğinde ve kalınlığındadır. Testis kapsül ile sarıdır. Testis kapsülü kollajen yapıdaki bağ dokusundan oluşur ve albuginea olarak adlandırılır. Albuginea altındaki damarlardan zengin bağ dokusu tunika vasküloza olarak adlandırılır ve testisin vasküler kapsülünü oluşturur. İç kısımda ise mediastinum testisi oluşturur. Bununla birlikte oluşan bağ dokusundaki septalar testis dokusunu bölümlere ayırır. Piramidal şeklindeki bu yapılar tek bir testis için yaklaşık olarak 50 tanedir, testiküler lobüller adını alır (Color textbook of Histology 2001). Lobüller sinir hücreleri, lenf damarları ve vaskülarize gevşek bağ dokusu ile sarılmış 1-4 tane seminifer tübülden oluşur. Seminifer tübüller arasında leydig hücreleri adı verilen intertisyel hücreler bulunur, seminifer tübüller spermatozoonları üretirken leydig hücreleride testosteron salgırlar (Basic histology, Text&Atlas 2009).

2.1.2.1. Semifer tübüller:

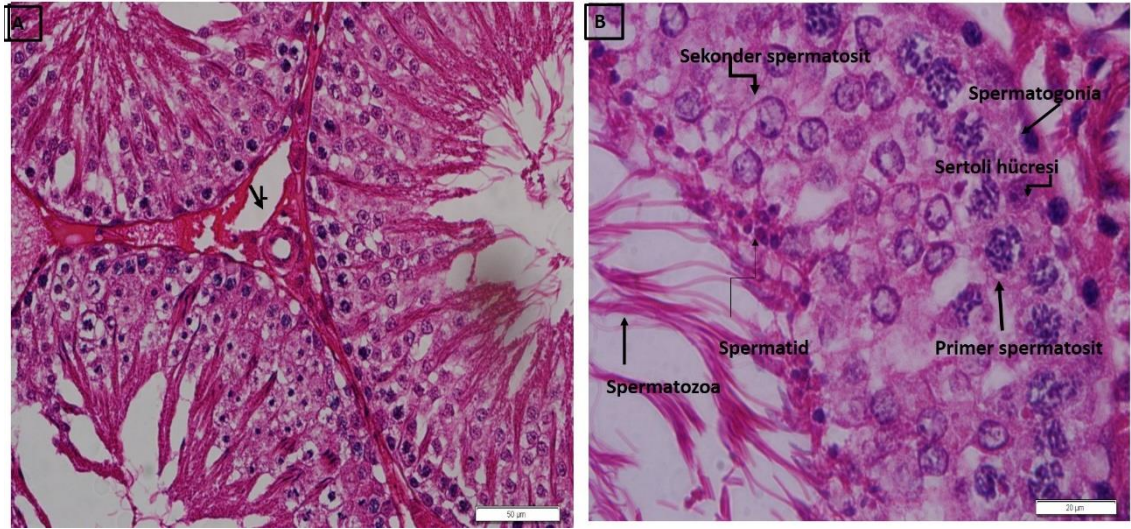
Özelleşmiş seminifer epitelyum ile içi döşeli merkezi bir lümen olmak üzere iki ayrı hücre popülasyonu içerir. Bu hücreler somatik sertoli hücreleri ve spermatogenik hücrelerdir (spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatitler). Epiteli bazal membran ile kollajen lifle, fibroblastlar ve myoid hücrelerden oluşan bir duvarla sarılmıştır. Myoid hücreler hareketsiz spermleri rete testise ileten kasılma hareketinde görevlidir. Spermler epididimal kanaldan geçtikten sonra motilite özelliklerini kazanır (Netter' s Essential Histology 2009). (Şekil 2.1.2.1).



Şekil 2.1.2.1: Seminifer tübüllerin genel görünümü, A:10X, B:20X, H&E boyaması

2.1.2.2.Sertoli Hücreleri:

Puberteye kadar sertoli hücreleri epitelin dominant hücre tipidir. Seminifer tübüller puberteden sonra döşeyen epitelin %10luk kısmını oluşturur (Netter's Essential Histology 2009). Sertoli hücreleri; bazal membrandan başlar ve gövdeleri lümene kadar uzanır böylelikle tübüller arası boşluklarda köprü görevi yaparlar. Prizmatik şekilli ve düzensiz sınırlıdır. Sertoli hücrelerinin görevleri: spermatogenik hücreleri desteklemek, beslemek ve korumaktır; spermatidler ile atılan rezidüel cisimleri fagositoz ile yok edilir; olgunlaşan spermatidlerin aktin aracılığı kasılmalarla seminifer lümene salınımını kolaylaştırır. Seminifer tübül lümenine protein ve iyonlardan oluşan bir sıvı salgılar. Sertoli hücreleri FSH uyarımına cevap verir. Folükül uyarıcı hormon androjen bağlayıcı protein (ABP) sentezini düzenler. Sertoli hücreleri inhibin ve aktivin salgılar. İnhibin, hipotalamus ve önhipofizden salınan gonodotropin salgılayıcı faktör ve FSH üzerine olumsuz feedback etki gösterirken aktivin FSH üzerine olumlu feedback etki gösterir (Histology and Cell Biology 2002). (Şekil 2.1.2.2).



Şekil 2.1.2.2: Seminifer tübüllerde H&E ile boyanmış; A) leydig hücreleri (OK) 40X büyütmede B) seminifer tübüllerde spermatogenez gösterilmiştir. 100X büyütmede.

2.1.2.3. Spermatogenik hücreler:

Spermatogoniumlar bazal kompartmanda bazal lamina ile yakın ilişkide olan diploid spermatogenik hücrelerdir. Sertoli hücreleri ile tıkalı bağlanımların arasında yer alır. Bu nedenle Kan-Testis bariyeri dışındadır. Spermatogoniumların kök hücre özelliği vardır. Erkek infertilitesinde önemli etkileri vardır. Spermatositler ve farklılaşmakta olan spermatitler radyoterapi ve kemoterapiye duyarlıdır. Spermatogonial kök hücreler spermatogenik süreci tekrar oluşturabilirler (Histology and Cell Biology 2002).

2.1.2.3.1. İnterstisyel Doku:

Seminifer tübüller arasındaki sinirler, bağ dokusu, lenf damarları ile kaplı alandır. Bu alanın en önemli kısmı leydig hücresidir. Leydig hücresi üçgen şeklinde merkezi çekirdeklidir. Leydig hücresi testosteron salgılar ve spermatogenez, fetal yaşam sırasındaki cinsiyet farklılaşması ve gonodotropin salgısının kontrolü için önemlidir (Basic Histology 2009).

2.1.2.3.2. Spermatogenez:

Spermatogonia'nın olgun sperme dönüşme olayına spermatogenezis denir. Germ hücrelerinin gelişimi ilk olarak pubertede başlar. Fetal yaşamda testis seminifer tübüllerinde spermatogonia aktif halde bulunur, pubertede sayıları gittikçe artar.

Spermatogonialar da mitoz geçirerek çoğalır ve değışime uğrarlar. Sertoli hücreleri yaşam boyunca sperm üretimi için gerekli koşulları oluşturur. Seminifer tübüller arasındaki intersitisyel doku; lenf damarlarını, testosteron üretiminden sorumlu leydig hücrelerini, büyüme faktörleri ile makrofajları, kan damarlarını içerir. Peritübüler miyoid hücreler seminifer tübüllerini sarar, destek sağlar, büyüme faktörlerinin kaynağıdır ve seminifer tübül lümeninde sıvı akışı ve sperm hareketliliğini düzenler. Spermatogonyal kök hücre havuzundaki germ hücrelerinin farklılaşma sürecine girerek sperm üretimini sağladığı gelişimsel sürece spermatogenez denir. Seminifer tübül içindeki spermatogonya en büyük germ hücresi olan primer spermatosit dönüşür. Bu olaydan sonra mayoz bölünme geçirerek 2 ye bölünen primer spermatosit sekonder spermatosit dönüşür ve daha sonra ikinci kez mayoz bölünmeye geçer ve spermatid oluşur. Bu olay yaklaşık 2 ay sürer. Spermiogenezis tamamlandığında spermier seminifer tübüllerin lümen açıklığına inerler.

Sertoli hücreleri spermier besleyen ve destekleyen hücrelerdir ve bilim insanları tarafından spermatogenezin düzenlenmesine büyük katkısı olduğu düşünülmektedir. Spermier seminer tübülden olgunlaşıp epididimise taşınırlar burada da depolanıp işlevsel olarak olgunluğa eriştiğinde hareketli bir şekilde duktus deferense taşınır.

Birçok gen ve moleküler faktörlerin rol oynadığı düşünülen spermatogenezisde yapılan çalışmalarda Bcl-2 proteinlerinin germ hücrelerinin olgunlaşması ve yaşamsal fonksiyonlarının gelişimleri için önemli bir yer aldığı belirtilmektedir. Yani normal spermatogenezis için Y kromozomu çok değerlidir. Çünkü kromozomdaki mikrolezyonlar spermatogenezisin zarar görmesine ve böylelikle infertiliteye neden olur (Moore Persaud,2009).

2.1.2.3.3. Spermin Yapısı:

Antoni Van Leuwenhook tarafından sperm morfoloji mikroskobun keşfi ile ilk kez tanımlanmıştır. Spermin morfolojik sınıflandırmasını WHO 1980 yılında yapmıştır. Morfoloji ile fertilizasyon ve gebelik oranları arasındaki ilişki 1987 yılında Kruger yapılarak kesin kriterler kullanılmıştır (Delilbaşı,2008). Sperm morfolojileri; baş, boyun, kuyruk özelliklerine göre incelenir; Baş 2-3µm. eninde, 4-5µm. boyunda düzgün, oval görünümde ve başın akrozom kısmı %40-70'ini kapsayacak şekilde olup vakuol içermemeli.

Baş anomalileri; büyük, küçük, yuvarlak amorf ve vakuollü diye oluşabilir. Boyun; 4-5µm. uzunluğunda düzgün kenarlı ve başın alt kısmında aksiller konumda bağlanmalı. Boyun bölgesindeki sitoplazmik cisimcik başın yarısından büyük olmamalı.

Kuyruk; 50-55µ uzunluğunda düzgün kıvrımlı, boyun kısmından daha ince ve sona doğru daha da incelmelidir. Kuyruk anamoniği ise; kısa, kıvrık, birden fazla kuyruk veya kendi eksenini etrafında kıvrılmış kuyrukları kapsar (Delilbaşı,2008).

Sıçan spermlii için günümüzde kullanılan net bir sınıflandırma sistemi bulunmamaktadır. Sperm morfolojisinin genel olarak değerlendirilmesinde kullanılan büyütmede orta parçayı ayırt etmek zordur ve yapılan çalışmalarda sıçan sperminin orta parçasının az sayıda anormalliği bildirilmiş bu sebeple de sadece baş ve kuyruk anormalliklerine bakılarak inceleme yapılır.

Sperm anormallikleri;

Başsız sperm: sadece kuyruk olarak görünür. Sperm yaymasında ise genellikle sadece baş olarak görünür. Bu da değerlendirmede baş ve kuyruk bir olmadığı için değerlendirilmeye alınmaz.

Düzleştirilmiş baş: küçülmüş kanca veya muz şeklini andırır. Bu bazen eğrilik yokluğu ile bazen de başın azaltılmış eğrilik dereceleri olarak görülür.

İğne baş: baş çivi başını andırır ve kapalı ya da eğimli olabilir.

Kıvrılmış kuyruk: orta parçanın bağlantı yerinde görülür. Bazen nadirde olsa kuyruğun ucunda bükülme olarak da görülebilir.

Çoklu anormallikler: tek bir sperm içinde görülmesinin mümkün olduğuna dikkat edilmelidir (Rat Sperm,2018).

2.2. Testis Torsiyonu:

Testis torsiyonu spermatik kordun kendi eksenini etrafında dönmesine bağlı olarak testis ve ilgili yapılara kan akışının azalması ya da tamamen durmasıdır (Gül ve Gürgöl,2018). Testis torsiyonu sıklıkla genç erkeklerde görülen ve müdahale edilmediği takdirde, testisin kaybına kadar gidebilen ürolojik acil durumlardan biridir. Testis ve tüm eklerinde 25 yaşına kadar torsiyon görülme insidansı 1/160 iken, sadece testis için bu oran 1/4000'dir. Testis torsiyonu her yaş grubunda görülebilmesine rağmen, hastalık ile özellikle ergenlik döneminde ve ilk bir yaşta sıklıkla karşılaşılır. Olguların %65 i ergenlik döneminde ve 13 yaş grubundadır (Campbell Üroloji 2014). Özellikle çocukluk çağında ve genç ergenlerde hızlı bir şekilde teşhis edilmeli ve cerrahi olarak tedavi edilmelidir (Gül ve Gürgöl 2018). Testis torsiyonundaki ana tedavi manuel veya cerrahi olarak testisin detorsiyonudur. Başarılı bir müdahalede bile, testis atrofisi oluşabilir ve bu hastaların %40-60'ında kısırlık gelişir. (Barada and Weingarten,1989). Testiste gelişen iskemi/reperfüzyon hasarının oluşması ve süresinin fertilitiyi etkilediği bilinen bir

gerçekdir. Oluşan torsiyona ilk 6 saat içinde uygulanan detorsiyon olumlu sonuç vermektedir. Tek taraflı testis torsiyonu olan vakaların karşı testisinde de endokrin ve ekzokrin fonksiyonlarda hasar olabileceği gösterilmektedir (We and MJ 1984). İlk 6 saat içerisindeki müdahale oldukça önemlidir enfarktüs gelişimi açısından, 10 saatten sonra vakaların yarısında 24 saatten sonra ise hepsinde enfarktüs gelişir. Testiste venöz konjesyon, interstisyel kanama, enflamatuvar hücre infiltrasyonu ve sonrasında hemorajik enfarktüs gerçekleşir. Birkaç hafta sonra granülasyon dokusu ve fibroz skar dokusu iyileşir (Üropatoloji 2016).

Testis torsiyonu ani başlayan testis ağrısı ve şişlik ile kendisini belli eder. Ağrı travmayı veya fiziki aktiviteyi takiben oluşabilir. Bununla birlikte bazen uykuda da aniden oluşabilir. Daha çok çocuklarda ve ergenlerde görülür ancak testis ağrısı ile başvuran 40-50 yaş grubu hastalarda da testis torsiyonu göz önünde bulundurulmalıdır (Güncel üroloji 2019). Renkli doppler ultrason tanıda çok önemli yer kaplar. Zarar gören testisin diğer testis ile karşılaştırılıp kan akımının olup olmadığına bakılarak değerlendirilir. Testiste kan akımının olmaması veya azalması torsiyon oluştuğunu gösterir. Anamnez, fizik muayene, laboratuvar ve Doppler USGye rağmen torsiyon şüpheliyse testis sintigrafisi ve kontrastlı testis MR'ı tanı konmasına etki eder. Tanı konulunca hemen detorsiyon yapılmalıdır. Detorsiyon başarılı olduğunda korddaki kıvrılma ortadan kalkıp kord uzar. Doppler ile manevra sonrası testis kanlanması kontrol edilmelidir. Manuel detorsiyon yapılsa bile cerrahi işlem geciktirilmemelidir ve mutlaka eksplorasyon ve fiksasyon yapılmalıdır. Detorsiyon yapıldıktan sonra testiste yeterli kanlanma gözlenmezse sıcak kompleks ile sarılmalı ve öyle izlenmelidir. Tedavi başarısını etkileyen sebeplerin başında geçen süre ve torsiyon derecesi önemlidir. Ağrı başlar başlamaz 6 saat içinde yapılacak cerrahi işlem ile kanlanma sağlanabilir (Güncel üroloji 2019).

Testis torsiyonu antioksidanların toplam miktarını azaltır ve toplam oksidanların miktarını ve oksidatif stres indeksini artırır (Abasiyanik ve Dağdönderen 2004). İskemi reperfüzyon (İ/R) hasarı sonucu oluşan serbest oksijen radikalleri testis yaralanmasına yol açar (Sekmenli ve Gündüz 2016). Spermilerin, plazma membranlarında yüksek seviyede doymamış yağ asitleri bulunduğundan, oksidatif strese ve özellikle lipid peroksidasyonuna karşı oldukça hassastırlar. Buna bağlı olarak, serbest oksijen radikallerinin bu mekanizma yoluyla spermier üzerindeki olumsuz etkisine bağlı olarak sperm hareketliliğinin kaybı, özellikle hücre ve aksonem hasarında adenosin trifosfat kaybı, sperm canlılığı kaybı ve morfolojik değişiklikler sperm kapasitesini ve akrozom tepkisini bozar (Morielli and O'Flaherty 2015).

2.3. Kök hücre

Kök hücre, mitoz bölünmeyle özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilen ve daha fazla kök hücre üretmek için kendini yenileme yeteneğine sahip olan, bütün çok hücreli canlıların doku ve organlarını oluşturan öncül hücrelerdir. Bir başka deyişle bu hücreler özelleşmemiş ya da farklılaşarak özel işlevler kazanmamış ana hücrelerdir. Temel kök hücre özellikleri; Kök hücreler uzun süre boyunca bölünme ve kendilerini yenileyebilme özelliğine sahiptir ve kök hücreler özelleşmiş hücrelere dönüşebilirler son olarak klon oluşturabilirler (Tuch BE 2006). Kök hücreler organizmanın yaşamı boyunca kendi kopyasını oluşturacak şekilde çoğalırlar. Gerektiğinde organ ve dokuya özgü öncü hücrelere dönüşebilirler. Embriyonik gelişim sürecinde, yetişkin insan hücrelerinin ve dokularının uzun süreli korunması ve onarımında, kök hücreler ile farklılaşmakta olan hücreler arasındaki dengeyi kurarlar (Yazır 2015).

Kök hücreleri öncü hücrelerden ayıran en önemli özelliklerinden biri, bölünmeler sırasında kök hücreler bir yandan öncü hücreye dönüşecek hücreyi üretirken diğer bir yandan da kendini yedeklemesidir. Bu olay asimetrik hücre bölünmesi sonucu oluşur ve kök hücre havuzunun yaşam boyu sabit kalmasını sağlar (Yazır 2015).

Kök hücre belirteçlerini kullanarak kök hücre tipini belirlemek en yaygın kullanılan yöntemlerdendir. Hücrelerin yüzeyinde yer alan, hücrede sinyal yolları üzerinde veya hücre-hücre yapışma molekülleri olarak rol oynayan bu belirteçlerden birçoğu 'CD' (Farklanma Kümeleri: Cluster of Differentiation) olarak bir başlık altında toplanmış olup, hücre türüne göre çok özgün veya çok yaygın olarak bulunurlar. Embriyonik kök hücreler için yaygın kullanılan belirteçler: SSA1, SSA4, TRA-1-60, Sox2, Oct4; hematopoetik kök hücreler için en yaygın kabul edilen belirteçler CD33, CD34, CD45; mezenkimal kök hücreleri ayırt etmek için CD29, CD54, CD90, CD106 kullanılır (Kök Hücre-Biyolojisi 2014).

2.3.1.Kök hücre çeşitleri ve kaynakları

Kök hücreler iki kaynaktan elde edilir. Embriyonik gelişim sürecinin erken döneminde blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonik kök hücreler ve embriyonik olmayan kaynaklardan elde edilen kök hücreler. Embriyonik olmayan kök hücreler: dokuya özgü kök hücrelerdir ve doğum sonrası dönemdeki kök hücreleri kapsar.3 çeşidi vardır. Bunlar; Mezenkimal kök hücreler, Hematopoetik kök hücreler ve Organlardaki kök hücrelerdir.

2.3.2. Mezenkimal Kök Hücreler:

“Mezenkim” epiblastın farklılaşmasından başlayarak embriyonun gelişmesinde ve daha sonra fetüsün yaşamında önemli yer tutan, gevşek bağ dokusu yapısındaki dokulara verilen isimdir. Mezoderm tabakasından köken alır. Organların bağ dokularında bulunan erişkin kök hücrelerdir. Stromal hücreler de denir. Göç edebilme kapasiteleri oldukça gelişmiştir. Bu sayede hasarlı bölgeye giderek hasarlı dokunun tamirini yaparlar. Plastik flasklara yapışma özelliği gösterirler. Yüzeylerinde bulunan bazı proteinler ve bulunmayan bir takım proteinlerle ayırt edilirler: CD29(+), CD90(+), CD54(+), CD106(+), CD34(-), CD45(-), CD11b(-) veya CD14(-), CD19(-) veya CD79a(-), HLA-DR1(-) Kemik iliğinden, yağ dokusundan, amniyotik sıvıdan, göbek kordonundan, diş pulpasından ve plesentadan elde edilebilirler. Kolay elde edilebilmeleri ve birçok dokuya dönüşebilmeleri kullanımları açısından büyük avantaj sağlar. Birden çok hücre serisine farklılaşabilmeleri ve in vitro çoğalabilmeleri nedeniyle bu hücreler mezenkimal kök hücre adını alırlar (Yazır 2015).

2.3.3. Kök hücrelerin kullanım alanları

Günümüzde hastalıkların tanı ve teşhisindeki gelişmeler hızlı bir şekilde devam etmektedir. Modern tıp' da ki bu gelişmelere rağmen bu son yöntemlerin kesin tedavisinde etkin olamadığı bazı hastalık grupları vardır; Tip 1 Diyabet, Multiple skleroz ve Romatoid artrit gibi giderek artan sıklıkla görülen tüm otoimmün hastalıklar, halen kesin nedeni bilinmeyen ölümcül bir hastalık olan Amyotrofik lateral skleroz, çeşitli nedenlere bağlı olarak ortaya çıkan kesin tedavisi için canlı vericiden nakil gerektiren kalp-karaciğer ve böbrek gibi organların yetmezlikleri, genetik tabanlı olmayan sağırılık-körlük gibi hastalıklar, çeşitli seviyelerdeki omurilik hasarı sonucu ortaya çıkan felçler, denge bozuklukları ile karakterize serobrospinal ataksiler, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar, müsküler distrofi gibi nöro-musküler dejeneratif hastalıklar, diyabete bağlı olarak veya başka nedenlerle periferik damarlarda ortaya çıkan olumsuzluklardan kaynaklanan ve amputasyona kadar giden ayaklarda iyileşmeyen yaralarla karakterize ülserler, tedavisi güç olan yanıklar, iyileşmeyen kırıklar, kırıkta dejenerasyonları, osteoartritler, tedavisi mümkün olmayan bel ağrıları, üreme hücresi üretilmemesi sonucu ortaya çıkan kısırlık, cinsel yetersizlik ve idrar kaçırma gibi. Bu sağlık sorunlarına sahip bireylerin yüz binlerle ifade edilen büyük bir kısmı kısıtlı kaliteyle yaşamlarına devam edebilirken büyük çoğunluğu, özellikle kesin tedavi için organ nakli gerektiren hastalıklarda yaşamlarını yitirmektedir (Kök Hücre-Biyolojisi 2014).

MSC' lerin in vitro erkek germ hücrelerine farklılaşma potansiyeline sahip oldukları gösterilmiştir (Nayernia and Lee 2006). Yakın zamanda, adipoz dokudan türetilmiş mezenkimal kök hücrelerin (AdMSC' ler), testiküler torsiyon kaynaklı germ hücre hasarını kurtarma ve busulfan ile indüklenmiş azospermik sıçanın seminifer tübüllerinde spermatogenezi indükleyebildiği göstermişlerdir (Hsiao 2015). Lokal enjeksiyon yoluyla nakledilen AdMSC' lerin İ/R ile indüklenen intrinsik apoptozu önlediği, yaralanan testis dokusunun oksidatif stresini azalttığı ve spermatogenetik hücrelere transdiferansiye ettiği gösterilmiştir (Cakici 2013). Bununla beraber yapılan çalışmalar otolog kök hücre kültürü SVF' nin, oksidatif stresi azaltarak, cinsel hormon homeostazını yeniden sağlayarak ve büyüme faktörlerini üreterek; testisleri hasardan koruyabildiğini ve T/D sıçanlarda spermatogenezi teşvik edebildiği gösterilmiştir (Liu et al. 2018).

2.4. Melatonin ve kullanımı

Melatonin; pineal bez, retina, gastrointestinal sistem, testis gibi dokular tarafından sentezlenen güçlü bir endojen antioksidandır (Reiter and Tan 2013). Melatonin antienflamatuar süreçlerde yer alan, sirkadiyen ve endokrin ritim düzenlenmesi ve tümör inhibisyonu dahil birçok biyolojik fonksiyona sahip bir hormondur. Mevcut kanıtlar melatoninin enflamatuar sitokinlerin salınımını azaltabildiğini, MSC'lerin proliferasyon kapasitesini arttırdığını ve MSC'lerin apoptozisini in vitro ve in vivo olarak ortadan kaldırdığını göstermiştir. Ayrıca, melatonin ROS üreten etkenleri ve antioksidan genlerin ekspresyonunu düzenleyerek, MSC' lerin koruyucu ve anti-apoptotik mekanizmalarını arttırdığı gösterilmiştir (Hu and Li 2019).

Serbest radikalleri temizleyici özelliği sayesinde, eksojen melatonin kullanımı oksidatif stresi ve inflamasyonu azaltır (Mirhosein 2018).

Ayrıca melatonin, dolaylı bir mekanizma ile glutathion peroksidaz, süperoksit dismutaz ve glutathion gibi doğal antioksidan seviyelerini artırabilir (Yurtçu 2008). Melatonin, lipofilik ve hidrofilik komponentlere sahip olması sayesinde, farklı organların fizyolojik bariyerlerinden serbestçe geçebilir (Tahan 2010).

Melatoninin direkt etkisi erkek üreme sisteminde ve hayvanlarda Leydig hücrelerinden testosteron sentezinde gözlenmiştir (Reiter 1996). Bazı çalışmalarda melatoninin, testiste iskemi-reperfüzyon kaynaklı oksidatif hasar üzerindeki etkisi gözlenmiştir (Kanter 2010).

Yapılan çalışmalar melatoninin, oksidatif stresi azaltarak, cinsel hormon homeostazını yeniden sağlayarak ve büyüme faktörlerini üreterek; testisleri hasardan koruyabildiğini ve T/D sıçanlarda spermatogenezi teşvik edebildiği gösterilmiştir (Zhou and Song 2018).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER:

3.1. Hayvan modeli ve testis torsiyonunun oluşturulması:

Çalışmamız için gerekli hayvanlar Pamukkale Üniversitesi Deneysel Cerrahi Uygulama Merkezinden temin edildi. Çalışmamızda Wistar-Albino cinsi, sağlıklı 40 adet erkek sıçan kullanıldı. Ortalama ağırlıkları 350-400 gr ağırlığındaki 8 haftalık sıçanlar rastgele seçilerek 5 gruba ayrıldı. Sham grubu (S) (n:8), testis torsiyon/detorsiyonu oluşturulmayan sadece cerrahi insizyon yapılan grup; torsiyon/detorsiyon grubu (T/D) (n:8), cerrahi insizyonla sağ testiste torsiyon/detorsiyon oluşturulan grup; torsiyon/detorsiyon oluşturulduktan sonra melatonin verilen grup (M) (n:8); torsiyon/detorsiyon oluşturulduktan sonra kök hücre verilen grup (KH) (n:8); torsiyon/detorsiyon oluşturulduktan sonra melatonin ve kök hücre birlikte verilen grup (KH+M) (n:8) olmak üzere ayrıldılar (Şekil 3.1.3).

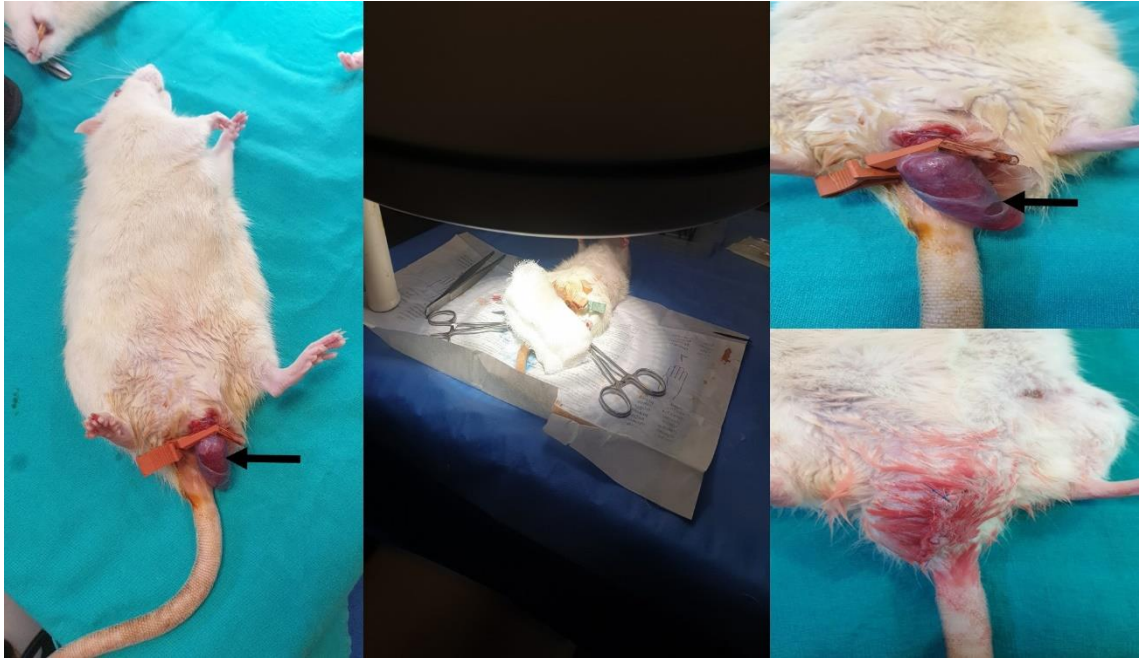
S grubu: Sağ inguinal skrotal insizyon yapılarak gubernakulum açıldı ve sağ testis çıkarıldı. Daha sonra torsiyon yapılmadan skrotuma geri yerleştirildi ve gubernakulum suture edilerek kapatıldı.

T/D grubu: Sağ testis çıkarıldı, sonra saat yönünde 720° döndürüldü ve bu pozisyonda 3 saat bekletildi. 3 saatin sonunda sağ testis detorsiyone edilerek skrotuma yerleştirildi ve gubernakulum suture edilerek kapatıldı.

M grubu: Testis torsiyonundan 3 saat sonra detorsiyon yapılır yapılmaz bir doz (25 mg/kg) melatonin intraperitoneal olarak uygulandı.

KH grubu: Torsiyon/detorsiyon işlemi tamamlanınca 3×10^5 hücre/kg dozunda mezenkimal kök hücre 20 µl PBS içerisinde sağ testise lokal olarak uygulanmıştır.

KH+M grubu: Torsiyon/detorsiyon işleminden sonra intraperitoneal olarak 25 mg/kg melatonin ve 3×10^5 mezenkimal kök hücre 20 µl PBS içerisinde sağ testise lokal olarak uygulanmıştır.



Şekil 3.1.3 : Deneysel cerrahi yapılarak testis torsiyonu oluşturulması;

3. 2. Kök hücrelerin elde edilmesi ve transplantasyonu:

Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen 2016BSP001 numaralı 'Deneysel olarak Asherman Sendromu Oluşturulan Sıçanlarda Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Tedavisi başlıklı projeden elde edilen Mezenkimal Kök Hücreler Akım sitometri analizi kullanılarak kök hücre yüzey belirteci olarak CD29, CD90, CD45, CD54, CD71, CD106 yönlerinden incelendi. Biz bu çalışmada 2016BSP001 nolu projede hem akım sitometriyle hem de farklılaşma deneyleriyle mezenkimal kök hücre olduğunu desteklediğimiz kök hücreler kullanılmıştır. 3. pasajda dondurduğumuz hücreleri bazal medium hazırlayarak steril şartlarda ve 37 °C de laminal kabin altında çözdürülmüştür. T75 flaklara ekilen hücrelerin çoğalması takip edilerek, deney prosedürü oluşturulduktan sonra KH, KH+M gruplarına T/D oluşturulduktan sonra 3×10^5 hücre dozunda mezenkimal kök hücre 20 µl PBS içerisinde sağ testise lokal olarak uygulanmıştır.

Deney işlemleri tamamlandıktan sonra bütün sıçanlar grup kafeslerine konulmuş ve her sıçana ağrıyı azaltmak için 5 mg/kg⁻¹ dozunda subkutan ketoprofen enjeksiyonu yapılmıştır. İşlemden 7. günün sonunda sıçanlar tekrar tartılıp genel anestezi altında her sıçandan kan örnekleri alınmıştır. Kan örneklerinde FSH, LH, Testosteron ve MDA

seviyeleri ELISA yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Perfüzyon sonrasında testis dokusu fiksatife konulduktan 72 saat sonra doku takip işlemleri yapılmıştır.

3. 3. Sperm sayımı ve morfolojik değerlendirme:

Testisler çıkartıldıktan sonra, kauda epididimis alınmış ve 2 ml izotonik solüsyon içerisinde parçalanmıştır. Örnekten 1 damla makler sayım kamerasına koyulmuş sonra ışık mikroskopu altında 40X büyütmede 100 karede sperm sayılarak sperm hücrelerinin toplam sayısı $10^6/\text{ml}$ olarak ifade edilmiştir. Kauda epididimisten elde edilen sperm örnekleri her sıçan için iki lam olarak yayılıp havada kurutma ile kurutulan örnekler morfolojik değerlendirme için DİFF QUICK metoduyla boyanmış ve lamalar ışık mikroskopunda 100x büyütmede görüntülenmiştir. Her lamda toplam 200 sperm hücresi incelenmiş ve normal, baş ve kuyruk anormallik oranları yüzde olarak ifade edilmiştir.

3.4. ELISA yöntemi

Alınan örneklerden 3500 devirde 10 dakika santrifüj sonunda elde edilen serumlar ependorflere ayrılarak çalışma gününe kadar -80 derecede saklandı. Çalışma günü oda sıcaklığına getirilen serumlar, Bioassay technology Laboratory (BT Laboratuvarı- Shanghai, China) ticari kiti kullanılarak analiz edildi.

Çalışmada kullanılan kitlerin standart ve kimyasalları hazırlandıktan sonra mikropalakada bulunan **kuyucuklara** standartlar ve örnekler pipetlenmiştir. Ardından prospektüste anlatılan adımlar izlenerek örneklerin testlerin konsantrasyonlarına göre renklendirilmesi sağlanmıştır. Renk oluşumu gözlendikten sonra 450 nanometrede (nm) Biotek Elx800 Mikropalaka okuyucu (BioTek Instruments Inc., USA) kullanılarak kuyucukların absorbens değerleri okunmuştur. Gen5 data analiz programı ile serum absorbens değerleri kullanılarak FSH (mIU/mL), LH (mIU/mL), Testosteron (ng/mL) ve MDA (nmol/mL) seviyeleri hesaplanmıştır. Analiz edilen 4 araştırma parametresi için çalışma içi CV<8% ve çalışmalar arası CV<10% olarak verilmiştir.

Cobas 801 immun oto analizöründe (Roche Diagnostic Systems, Mannheim, Germany) kemilüminesan yöntemle immün reaksiyon prensibine dayalı ölçüm yöntemi ile analiz edilmiştir.

3.4.1.ELİSA yöntemi prosedürü

1. Çalışmadan önce kitler, malzemeler ve örnekler oda sıcaklığına gelinceye kadar beklendi.
2. 25X'lik yıkama tamponu 1 X olacak şekilde seyreltilti.
3. Çalışmaya başlamadan 15 dk. önce, 100 X biotinlateddetection Ab 1X'e dilüe edilir.
4. Çalışmaya başlamadan 15 dk. önce, 100 x consantarted HRP Conjugate 1 X'e dilüe edildi.

Assay Prosedürü:

1. 100 µl standart veya örnekler kuyucuklara koyulur. 90dk 37 °C de inkübe edildi.
2. Sıvı uzaklaştırıldı ama yıkama yapılmadı. 100 µl Biotinylateddetectin Ab. Eklenir. 1 saat inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyondan sonra sıvılar uzaklaştırıldı. İnkübasyon sonrasında aspirasyon ve 3 defa yıkama tamponu (350 µl) ile yıkama işlemi yapıldı.
4. 100 µl HRP conjugate eklendi. 30 dakika 37 °C'de inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrası aspirasyon ve 5 defa yıkama tamponu ile yıkama işlemi yapıldı.
6. 90 µl Substrate reagent eklendi. 15 dakika 37 °C'de inkübe edildi.
7. 50 µl Stop solüsyonu eklendi. 450 nm'de mikroparka okuyucu cihazı (eliza) ile okuma işlemi yapıldı.
8. Sonuçlar hesaplanıp, analiz edildi.

3.5. Histopatoloji:

Reaktif Hazırlanması:

Fiksatif Solüsyonu Hazırlama: Bouins Solution Hazırlanışı;

1500ml Saturated aqueous solution of Picric Acid

500ml Neutral Buffered %10 Formalin

100ml Glacial acetic acid

Bouins solusyonu fiksasyon süresi max.18 saattir. İdeal zaman olarak testis dokusunda 12-14 saat aralığı tespit edilmiştir.

Bouins Solusyonunda Fiksasyon İşlemi

Orşiektomi sonrası disseke edilen dokular dikkatlice önce petriye alınarak ince iğneler ile (insulin iğnesi) delikler açılıp fiksatifin içine atılmıştır ve 2 saat bekletilmiştir. Enjektör yardımıyla testis içine fiksatif yavaşça verilerek doku içine nüfus etmesi kolaylaştırılmıştır. 3 saat süreyle oda koşullarında kültür kaplarında fiksatifte kalan dokular çıkarılıp bisturi yardımıyla dikkatlice enine 3-4 halka olacak şekilde dilimlenip kasetlere alınarak etiketleri ile birlikte daha büyük bir fiksasyon kabına alınmıştır. Fiksatif miktarı yaklaşık olarak içerdeki dokuların kapladığı hacmin 10 katı fazla olmak durumundadır. Bu yüzden fiksasyon için tekli doku kaplarından kasetlere alınan dokular daha büyük hacimdeki bir doku takip kabına alınarak daha fazla fiksatifle muamele edilmiştir. Bouin solüsyonundaki total fiksasyon süresi için testis büyüklüğüne göre 12-14 saatin optimal olduğu görülmüştür.

Formaldehitte fikse edilen testis dokuları 12 saat bouin solüsyonu ve ardından 72 saat formaldehitde bekletilen dokular çıkarıldı ve akan su altında 1 saat yıkandı. Rutin doku takip yöntemi ardında hematoksilin eozin boyanan kesitlerde seminifer tübül alanı, seminifer epitel kalınlığı ve Modifiye Johnsen skorlaması yapılmıştır.

3.5.1. Doku Takip Yöntemi:

1. Alınan dokular 72 saat formaldehitte bekletildi.
2. Akarsuda 60 dakika yıkandı.
3. %50 Etil Alkol' de 1 saat bekletildi.
4. %70 Etil Alkol' de 1 saat bekletildi.
5. %80 Etil Alkol' de 1 saat bekletildi.
6. %90 Etil Alkol' de 1 saat bekletildi.
7. %100 Etil Alkol' de 1 saat bekletildi.
8. Ksilen I de 1 saat bekletildi.
9. Ksilen II de 1 saat bekletildi.
10. Parafin I de 1 saat bekletildi.
11. Parafin II de 1 saat bekletildi.
12. Dokulara parafine gömme ve etiketleme işlemi yapıldı.

3.5.2. Hematoksiklen-Eozin Boyama Protokolü:

Dokular etüvde 60 dakika boyunca deparafinizasyona uğratıldı. Etüvden alınan dokular sırasıyla şu aşamalardan geçirilir:

- 1.Xylen (şeffaflaştırma amacı ile) 30 dakika
- 2.Xylen (şeffaflaştırma amacı ile) 30 dakika
- 3.%100 Etil alkol 10 dakika
- 4.%96 Etil alkol 10 dakika
- 5.%80 Etil alkol 10 dakika
- 6.%70 Etil alkol 10 dakika
- 7.Distile suda 10 dakika bekletme
- 8.Hematoksilen 3 dakika bekletme
- 9.Akansuda Yıkama
- 10.Asit -Alkol Batırıp çıkarma
- 11.Amonyak 1-2 saniye
- 12.Akarsu Yıkanma
- 13.Eozin 10 saniye
- 14.%70 Etil alkol 10 dakika
- 15.%80 Etil alkol 10 dakika
- 16.%96 Etil alkol 10 dakika
- 17.%100 Etil alkol 10 dakika
- 18. Ksilen 10 dakika
- 19.Kapatma; Ksilen den alınan lamalar üzerine entellan damlatıldı. Hava kabarcığı bırakılmayacak şekilde lamellerle kapatılarak ışık mikroskobunda incelenmeye hazır hale getirdi.

3.5.3. Seminifer Tübül Alanlarının ve Seminifer Epitel Kalınlığının Hesaplanması:

Her grup için parafin bloklardan Microtom cihazı ile 5 μm ' lik kesitler alınmıştır ve H/E boyama yöntemi ile boyanmıştır. 20X büyütmede seminifer epitel kalınlığı (μm) ve seminifer tübül alanı (μm^2) hesaplanmıştır. Gruptaki bütün sıçanlardan rastgele 10 alan her alanda 4 seminifer tübül ölçülmüştür. Kesitler Olympus BX-51 ışık mikroskobu ve Olympus PP72 Digital Kamera ataçmanı ile incelenerek fotoğrafları çekilmiştir.

3.5.4. Modifiye Johnsen Skorlaması:

H&E ile boyanan kesitler, spermatogenezi değerlendirmek için ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Bu sistem, olgunluk sırasına göre düzenlenmiş ana hücre tiplerinin yokluğuna veya varlığına göre, 1 ila 10 arasında bir ölçekte spermatogenezin korunmasını tanımlar. Bir Johnsen skoru 9 veya 10 normal histolojiyi gösterir, 8 puan hipospermatogenezi gösterir, 3-7 skoru matürasyon durması, 2 skoru germinal hücre aplazisi (sadece Sertoli hücreleri) ve 1 skoru tübüler fibrozisi temsil eder.

Her testis için 30 tübül germinal epitelyumu değerlendirilmiş ve her bir sıçan için Modifiye Johnsen skoru hesaplanmıştır.

1. Seminifer epitelyum yok.
2. Yalnız Sertoli hücresi var. Germinal hücre yok.
3. Yalnız spermatogonia var.
4. Spermatid veya spermatozoa yok, birkaç spermatosit var.
5. Spermatid veya spermatozoa yok, çok sayıda spermatosit var.
6. Spermatozoa, geç spermatid yok, birkaç erken spermatid var.
7. Spermatozoa ve geç spermatid yok, çok sayıda erken spermatid var.
8. Her tübülde 5 spermatozoadan daha az, birkaç geç spermatid var.
9. Hafif bozulmuş spermatogenez, birçok geç spermatid, düzensiz epitel.
10. Tam spermatogonezis

3.5.5. İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi

Doku takip yöntemi tamamlanan doku bloklarından, mikrotom cihazıyla 5 µm' lik kesitler alınıp, kesitler benmariye bırakıldı. Ardından uygulanan protokol sırası aşağıdaki gibidir:

- 1) Kesitler, benmariden lamlara alınıp lam taşıma sepetine yerleştirilir.
- 2) Lam taşıma sepeti etüvde 60 °C'de 1 gece bekletilir.
- 3) Ksilende, deparafinizasyon işlemi için 1 saat bekletilir.
- 4) Ksilenden çıkarılıp havada kurutularak PAP pen ile dokular işaretlenir.
- 5) Kesitler sırasıyla %100, %96, %80, %70, %50'lik etil alkol serilerinde 2'şer dakika bekletilir.
- 6) Alkolden çıkan preparatlar distile su ile 3 kez 5 dakika süreyle yıkanır.
- 7) Antijen retrieval işlemi için önceden hazırlanmış ve 37°C'de bekletilen Tripsin solüsyonu (200cc PBS + 0,2gr Tripsin) ile 37°C'de 30 dakika bekletilir.

- 8) 10 dakika PBS'de bırakılır.
- 9) Dokulardaki endojenperoksidaz aktivitesi, %30'luk H₂O₂: Metanol (1:9) karışımı ile 10 dakikalık uygulamayla ortadan kaldırılır.
- 10) Phosphate Buffered Saline (PBS) ile yıkanan kesitler, üzerlerine ilave edilen serum bloklama solüsyonu ile 10 dakika oda sıcaklığında bekletilir.
- 11) Kesitler üzerine uygun primer antikorlar ilave edilerek 1 gece inkübasyona bırakıldı.
Bu çalışmada kullanılacak primer antikorlar SOX-9 (Bioss antibodies lot: AA12301405, dilüe 1:200, USA), VASA (Bioassay technology, lot:20190628 dilüe 1:200 China), Kaspaz-3 (Elabscience, lot:EC5206, dilüe 1:200, USA) 'dür. Bütün primer antikorlar PBS ile dilüe edilir.
- 12) Kesitler, PBS ile yıkandıktan sonra primer antikorlarla reaksiyon veren, biotinlenmiş afiniteye sahip sekonder antikorlarla 20 dakika muamele edilir.
- 13) Tekrar PBS ile yıkanması yapılan kesitlere, biotinlenmiş-sekonder antikorlara kolayca bağlanabilen horse radish peroksidaz konjugatı streptavidin (HRP-SA) 10 dakika kadar muamele edilir.
- 14) Kesitler son kez PBS ile yıkandıktan sonra kromojen boyası DAB ile 3- 10 dakika kadar muamele edilir.
- 15) Antijenin lokalizasyonunun daha iyi gözlenmesi için kesitlere hematoksilen ile zıt boyama yapılır.
- 16) Kesitler akan suda yıkanır ve sırasıyla %50, %70, %80, %96, %100' lük etil alkol serilerinde 2' şer dakika bekletilir.
- 17) Alkol serilerinden çıkan dokular ksilen I ve ksilen II'de 2'şer dakika bekletilir.
- 18) Ksilenden alınan dokuların üzeri kuruması beklenilmeden entellan ile kapatılır.
- 19) Boyanmanın değerlendirilmesinde aşağıdaki skala kullanılır.

Kaspaz-3, SOX-9 ve VASA ekspresyonu gruplarda H skoru [$H\text{ SCORE} = \sum P_i (I+1)$]

Kullanılarak semikantitatif olarak değerlendirildi. Burada I, boyama yoğunluğunu belirtir (0=ifade yok, 1=hafif, 2=orta ve 3=güçlü). P_i, her yoğunluk için boyanan hücrelerin yüzdesini belirtir.

3.5.6. TUNEL Boyama Yöntemi

Her gruptan 5 µm kalınlıktaki kesitler polilizinli lam üzerine alındı. TUNEL metodu kullanılarak spermatojenik hücre apoptozisi değerlendirildi. Nükleusları kahverengi boyananlar TUNEL pozitif hücre olarak kabul edildi ve her lamda 5 rasgele alan seçildi. Her alanda 200 spermatojenik hücre sayılıp Apoptotik indeks (AI) hesaplandı.

Apoptotik İndeks (AI): Pozitif hücreler X 100/Total Hücre sayısı

TUNEL boyama protokolü:

%4 tamponlu formaldehit çözeltisinde 10 dakika bekletilerek fiksasyon işlemi uygulandı.

1. Lamlar PBS ile yıkandı.
2. Yıkama sonrası lamlar %70 lik etil alkolde 5 dakika bekletildi.
3. %95'lik etil alkolde 5 dakika bekletildi.
4. %100'lük etil alkolde 5 dakika bekletildi.
5. Lamlar kurutulup +4 °C'de saklandı.

Boyama işlemi aşağıdaki basamaklara göre yapıldı;

1. Rehidratasyon işlemi uygulandı.
 - a. %100 etil alkolde 5 dakika,
 - b. %95 etil alkolde 5 dakika,
 - c. %70 etil alkolde 5 dakika bekletildi.
 - d. PBS ile yıkama yapıldı.
2. %3 H₂O₂ 5 dakika bekletildi. (Not: DNA ya zarar verebileceği için 5 dakikadan daha fazla bekletilmedi.)
3. 3 kere 2 şer dakikalık aralıklarla PBS ile yıkama yapıldı.
4. 0,2% Triton X-100, Tween-PBS Çözeltisi ile 30 dakika bekletildi (%0,2 olacak şekilde Tween-PBS içerisinde seyreltildi) (0,5 ml Tween 20 ve 2 ml Triton X-100, 1 L PBS'ye ilave edildi).
5. Proteinaz-K 50 µl ilave edilip 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
6. PBS ile yıkama 3 kere 2 şer dakika yapıldı.
7. Pre-incubation buffer solüsyonunda 10 dakika bekletildi.
8. TdT reaction: TdT Reaction Mixture 2 saat 37 °C de nemli ortamda (5µl TdT Enzyme reagent-45µl TdT Label Reagent karıştırılarak) 1 saate inkübe edildi.
9. PBS ile yıkama 3 kere 2 şer dakika yıkama yapıldı.
10. 50 µl Background reducing buffer solüsyonunda oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi.

11. PBS ile yıkma 3 kere 2 şer dakika yıkama yapıldı.
12. Mouse anti-DIG solüsyonunda 1 saat 37 °C nemli ortamda inkübe edildi.
13. PBS ile yıkma 3 kere 2 şer dakika yapıldı.
14. HRP label polymer solüsyonunda 30 dakika bekletildi.
15. PBS ile yıkma 3 kere 2 şer dakika yapıldı.
16. DAB Chromojen uygulaması 20 dakika boyunca yapıldı.
17. Hematoksilen 30 saniye bekletildi.
18. Akar suda yıkama yapıldı.
19. %95 etil alkol 5 dakika bekletildi.
20. %100 etil alkol 3 er dakika 2 kez dakika bekletildi.
21. Ksilen 5 er dakika 2 kere bekletildi.
22. Entellan ile kapama işlemi uygulandı.

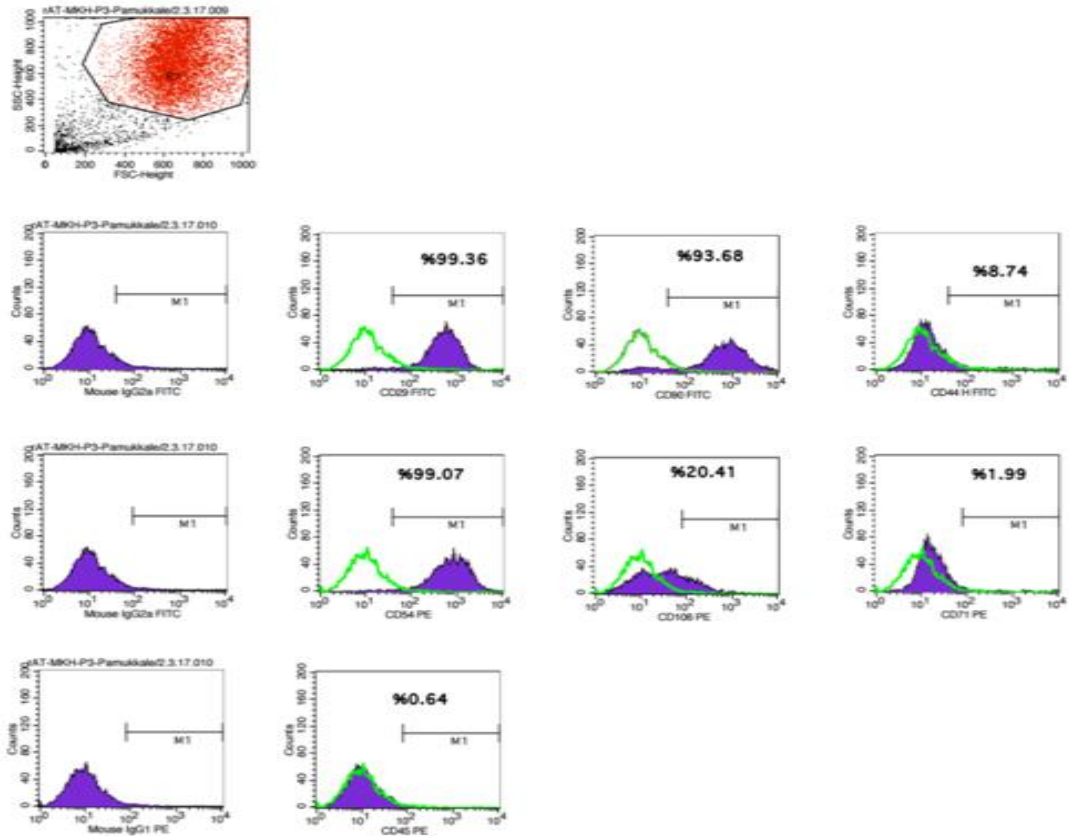
3.6. İstatiksel analiz:

Veriler SPSS 25.0 (IBM SPSS Statistics 25 software (Armonk, NY: IBM Corp.)) paket programıyla analiz edilmiştir. Sürekli değişkenler ortalama $\pm$ standart sapma ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verilmiştir. Bağımsız grup incelemelerinde Mann Whitney U testi ve Kruskal Wallis Varyans Analizi kullanıldı. Sayısal değişkenler arasındaki ilişkilerin incelenmesinde Spearman korelasyon katsayısı kullanıldı. Testiste torsiyon oluşturulması ve infertilite üzerine etki eden faktörlerin incelenmesinde ise Lojistik Regresyon analizi kullanıldı. Bağımsız grup incelemelerinde; Parametrik test varsayımları sağlandığında Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA, post hoc: Tukey testi) kullanıldı. Tüm analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR:

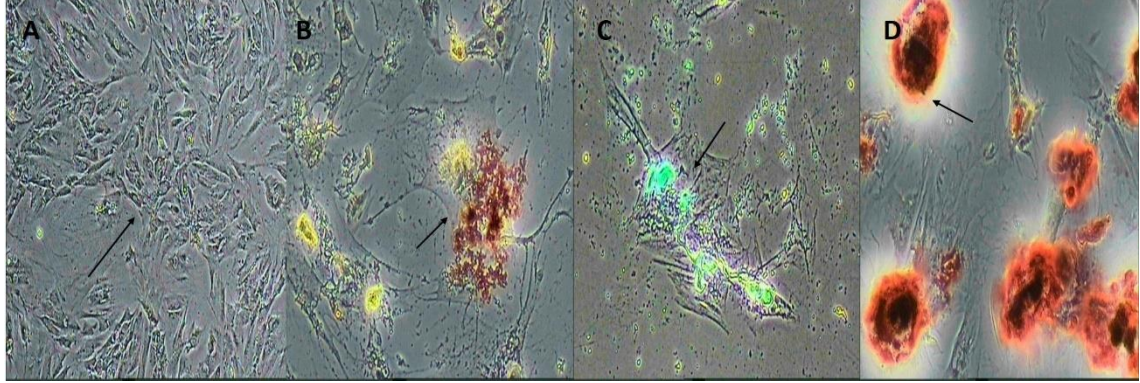
4.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

2016BSP001 numaralı 'Deneyisel olarak Asherman Sendromu Oluşturulan Sıçanlarda Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Tedavisi' başlıklı projeden elde edilen ve dondurulan Mezenkimal Kök Hücrelerin Akım sitometri analizi mezenkimal kök hücre yüzey belirteci olarak CD29, CD90, CD45, CD54, CD71, CD106 yönlerinden yapılmıştı (Şekil 3). Buradan alınan sonuçlara göre CD29, CD90, CD54 (%99,36, %93.68, %99.07) yüzey belirteçlerinin yüksek titrete olması ve CD45, CD71 (%0.64 ve %1.99) yüzey belirteçlerinin çok düşük bulunması bize mezenkimal kök hücre elde ettiğimizi göstermiştir. (Şekil 4.1.4-5)



Şekil 4.1.4: Mezenkimal Kök Hücrelerimizin Flow Sitometri Sonuçları: CD29, CD90, CD54 sırası ile %99,36, %93.68, %99.07 pozitif, CD45 ve CD71 ise %0.64 ve %1.99 pozitif.

Yapılan farklılaşma deneyleri sonucunda kök hücrelerin adipojenik, kondrojenik ve osteojenik farklılaştığı gösterilerek, elde ettiğimiz hücrelerin mezenkimal kök hücre olduğu flow sitometri analiz sonuçlarına destek olarak ispatlanmıştır (Şekil 4).



Şekil 4.1.5: ADMSC'nin üçüncü pasajda adipojenik, osteojenik ve kondrojenik dokuya farklılaşması. ADMSC'nin çözüldükten sonraki görüntüsü (A), adipojenik farklılaşma (B), kondrojenik farklılaşma (C) ve osteojenik farklılaşma (D). X20, inverted mikroskop.

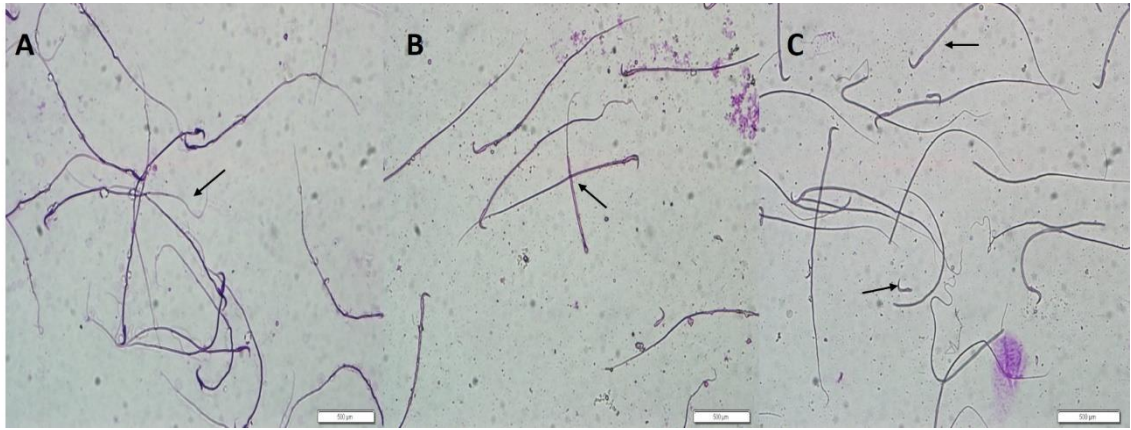
4.2.Sıçan ağırlıklarının, sperm sayımının ve morfolojik olarak değerlendirilmesinin istatistiksel sonuçları

Sıçanların ağırlıkları karşılaştırıldığında başlangıç ve son ağırlıkları gruplar arasında anlamlı farklılık göstermiştir. Başlangıç ve son ağırlıkları kök hücre, KH+M gruplarında anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. ($p<0,05$) grupların başlangıç ve deney bitiş ağırlıkları arasındaki fark hesaplanıp, istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Grupların sperm morfolojileri incelendiğinde S grubunda sperm başları, kuyukları ve boyutları birbiriyle uyumlu ve olağan olarak değerlendirilmiştir. T/D grubunda az sayıda olan spermier incelendiğinde sperm başlarının kısaldığı, bazı spermierde kısa kuyruk ve baş kopmalarının olduğu saptanmıştır. M grubunda ise sperm sayısı azdı ama buna rağmen sperm morfolojisi T/D grubuna göre S grubu gibi normal morfolojide sperm yoğunluğu fazlaydı. Gruplar arasındaki kruger morfolojik değerlendirmesinde normal morfolojideki sperm sayısını S grubunda $98,42 \pm 1.16$, T/D grubunda $15,75 \pm 12.89$, M grubunda $30,25 \pm 15.85$ olarak saptanmıştır. S grubunda normal morfolojideki sperm sayısı anlamlı olarak daha yüksek saptandı ($p<0,05$). Baş morfolojik değerlendirilmesinde baş anamolisi torsiyon grubunda anlamlı olarak daha yüksek

bulunmuştur ($p<0,05$). KH ve KH+M gruplarında sağ epididimiste sperm saptanamadığı için değerlendirilememiştir (Şekil 4.2.6).

Grupların sperm konsantrasyonları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Fakat testis torsiyonu oluşturduğumuz sağ testisteki sperm sayısı, melatonin verdiğimiz gruptaki sağ testiste sperm sayısı sham grubuna göre düşüktü (26.68 ± 36.85 , 20.38 ± 18.05 , 68.5 ± 53.98), $p>0.05$).



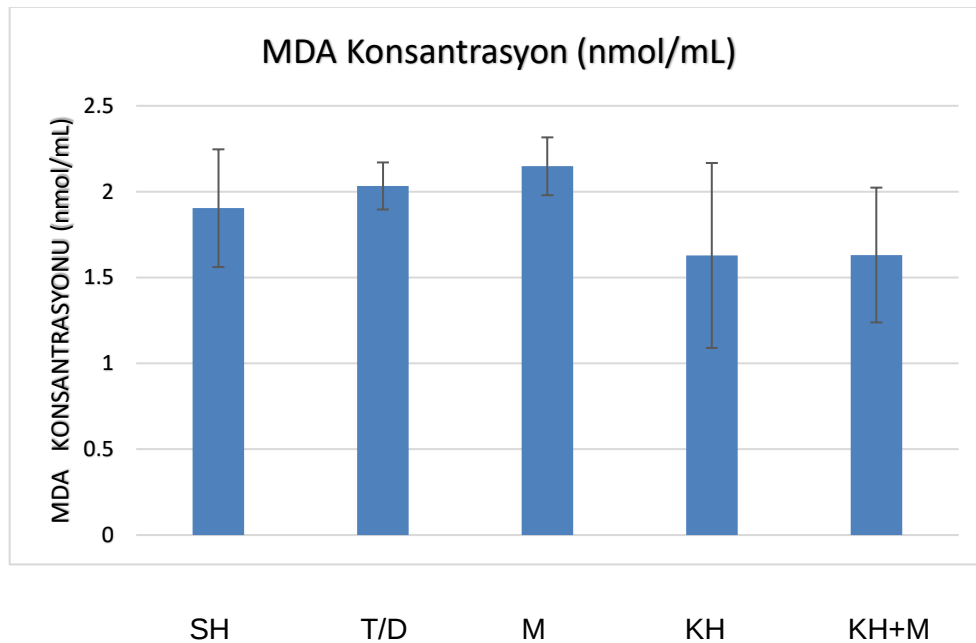
Şekil 4.2.6: Sham Grubu, Testis T/D Grubu, Melatonin Grubu morfolojik boyanma. Diff-Quick boyama, 100X (a: kuyruk anamoni, b: kuyruk anamoni, c: baş, boyun anamoni).

Grupların Kan FSH, LH, Testosteron ve MDA seviyelerinin karşılaştırılması

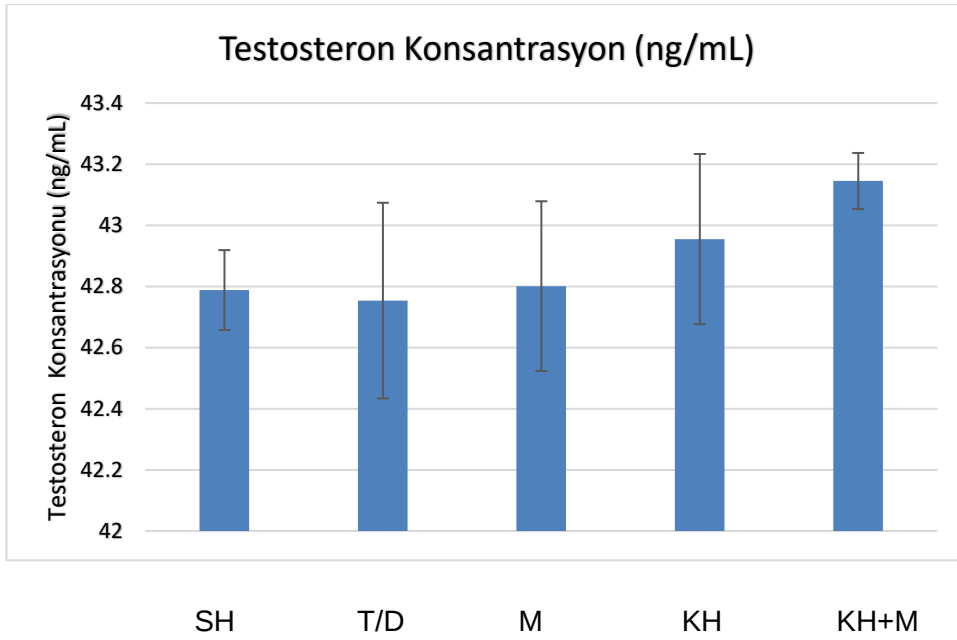
Grupların MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. MDA düzeyi S grubunda 1.9 ± 0.38 , T/D grubunda 2.03 ± 0.15 , M grubunda 2.15 ± 0.18 , KH grubunda 1.63 ± 0.59 ve KH+M grubunda 1.63 ± 0.45 olduğu görülmüştür. KH ve KH+M grubunda MDA düzeyleri düşük olarak saptanmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş değildir ($p>0,05$). Grupların hormon düzeyleri karşılaştırıldığında Testosteron, FSH, LH, değerleri arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. FSH istatistiksel olarak anlamlı olmasa da S grubunda diğer gruplara göre daha düşük olduğu saptanmıştır. FSH düzeyi diğer gruplarda T/D grubuna göre herhangi bir azalma göstermemiştir (Tablo 4.2.1, Şekil 4.2.7-10).

	SH	T/D	M	KH	KH+M	p
MDA (nmol/ml)	1.9±0.38 2.03(1.16-2.22)	2.03±0.15 2.03(1.87-2.18)	2.15±0.18 2.15(1.81-2.39)	1.63±0.59 1.61(0.8-2.44)	1.63±0.45 1.67(1.06-2.14)	0.103
TESTOSTERON (ng/ml)	42.79±0.14 42.83(42.57-42.99)	42.75±0.3 42.77(42.24-43.19)	42.8±0.3 42.86(42.31-43.2)	42.96±0.3 43.08(42.51-43.24)	43.15±0.11 43.16(43.03-43.24)	0.12
FSH (mIU/ml)	13.49±2.44 12.99(10.92-16.94)	16.62±2.76 16.56(12.27-21.66)	17.33±1.49 17.85(15.34-18.99)	16.26±3.46 16.58(11.12-21.49)	16.83±0.54 16.88(16.12-17.43)	0.116
LH (mIU/ml)	85.98±17.49 94.29(53.12-97.93)	94.7±10.18 93.42(83.24-112.6)	81.05±18.92 76.78(53.56-103.6)	91.68±12.16 88.58(75.67-110.2)	87.88±7.72 86.43(80.42-98.22)	0.674

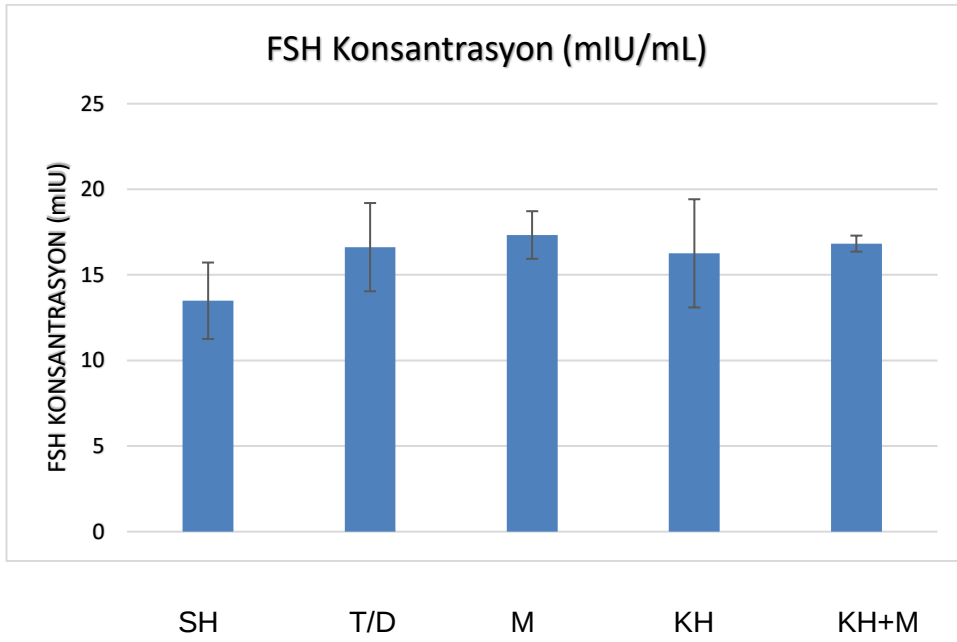
Tablo 4.2.1: FSH, LH, Testosteron ve MDA seviyelerinin gruplar arasında karşılaştırılması



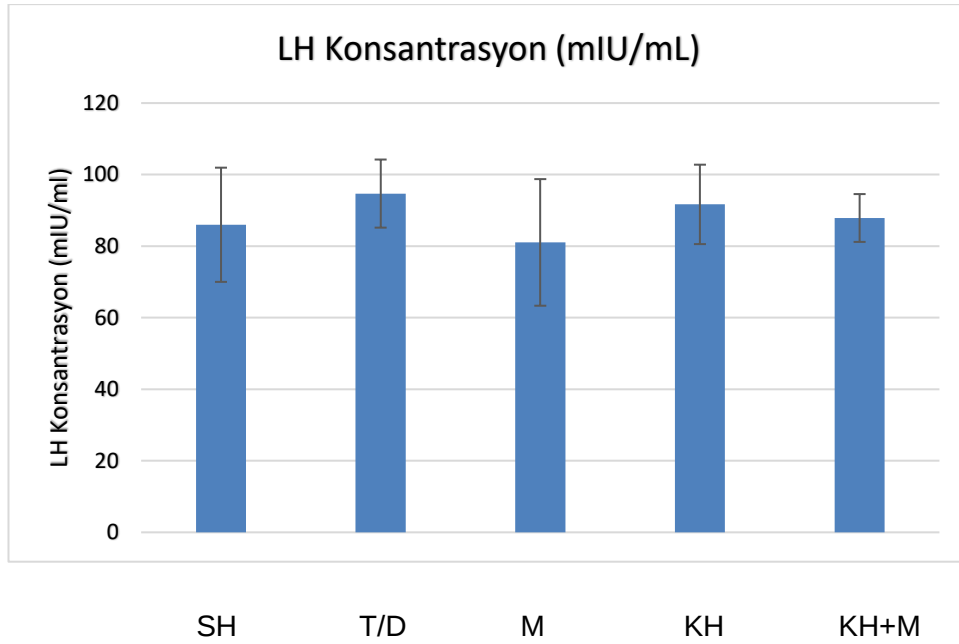
Şekil 4.2.7: Grupların kan MDA değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 4.2.8: Grupların kan Testosteron değerlerinin karşılaştırılması



Şekil4.2.9: Grupların kan FSH değerlerinin karşılaştırılması



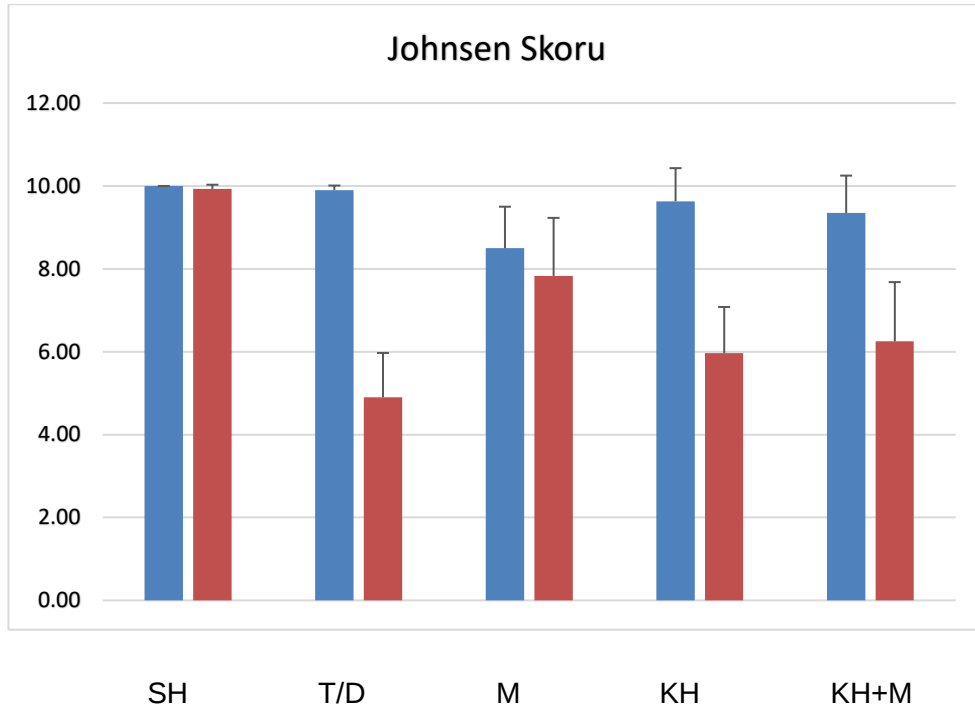
Şekil 4.2.10: Grupların kan LH değerlerinin karşılaştırılması

Grupların tübül alanı, Epitel kalınlığı ve Modifiye Johnsen Skorlama Sonuçları

Sağ testis tübül alanlarını karşılaştırdığımızda S grubunun tübül alanı torsiyon grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. KH+M grubunda tübül alanları, S grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. M grubunda sağ tübül alanında torsiyon detorsiyon grubuna göre artma saptanmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Sağ ve sol testislerin epitel kalınlığı S grubunda diğer gruplara göre yüksek saptanmıştır.

Modifiye Johnson skorlaması yapılan gruplarda sağ ve sol testis S grubunda (9.93 ± 0.1), diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksek elde edilmiştir. T/D grubunda sağ testiste Johnson skoru en düşük olduğu görülmüştür (4.9 ± 1.07). Johnson skorlaması S grubundan sonra en yüksek M grubunda (7.83 ± 1.4) daha sonra KH+M grubunda (6.25 ± 1.43) ve KH grubunda (5.97 ± 1.11) olarak hesaplanmıştır. Sol testisteki Johnson skorlamasında bütün grupların Johnson skoru 9 un üzerindeyken melatonin grubunda 8.5 ± 1 olarak saptanmıştır. Bu sonucun S grubuna istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.2.11).

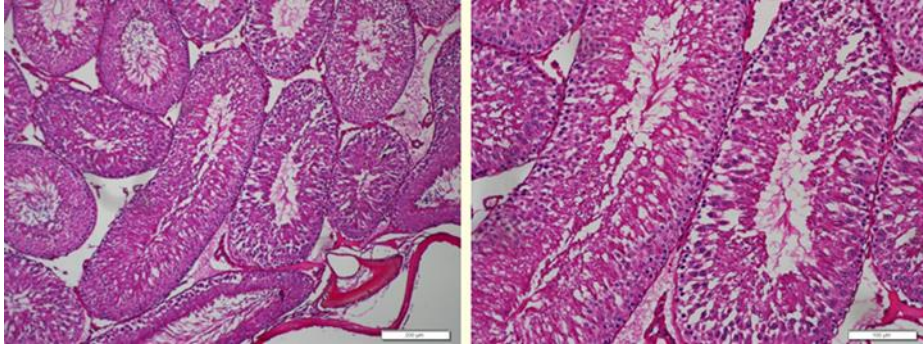


Şekil 4.2.11: Grupların Modifiye Johnsen skorlanması; mavi: sol testis, kırmızı: sağ testis

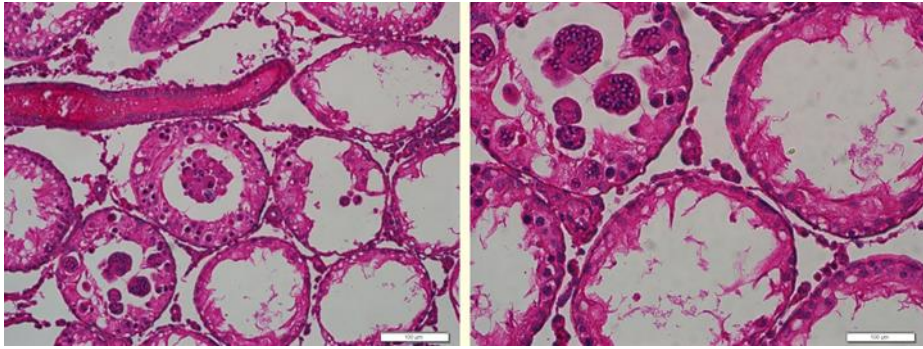
Grupların H&E Boyama Sonuçları:

S grubunun testis dokusu normal testis görüntüsündeydi. Seminifer tüp epiteli morfolojik ve kalınlık olarak normaldi. S grubunda hücre tabakaları seminifer tübül boyunca normal boyutlarında görülüyordu. Normal spermatogenez bütün epitel boyunca görülmekteydi (Şekil 12). Testis torsiyon grubunda seminifer tübül çapı azalmış olarak saptandı. Anormal spermatogenez ve maturasyon aresti görüldü. T/D grubunda hücreler arasında kistik değişiklikler, vakuolizasyon, seminifer tübül hücrelerinde dejeneratif değişiklikler, hücreler arası kopmalar mevcuttu. Dahası hasarlı tübüllerdeki hücre yoğunluğunun azaldığı dikkat çekiciydi. T/D incelmış epitel, geniş bir lümen testiküler damarlarda konjesyon saptandı. Kalınlaşmış bir bazal membran gözlemlendi (Şekil 4.2.13).

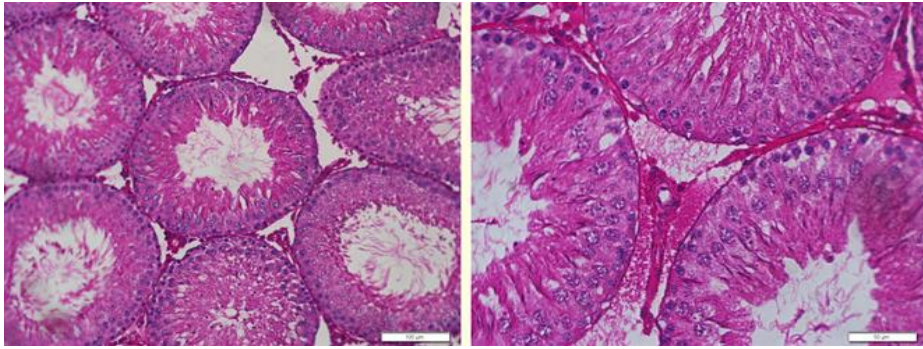
Melatonin verilen grupta histolojik görüntü T/D grubuna göre sham grubuna benzerdi. Spermatojenik seri hücreler epitel kalınlığı boyunca görünüyordu. Fakat bazı tübüllerde multinükleer dev şekilli hücrelerin görülmesi dikkat çekiciydi (Şekil 4.2.14). KH ve KH+M grubunda bazı tübüllerde hücresel bağlantıların kopması ile birlikte sağlam tübüller de görülmekteydi. M grubunda gözlenen dev hücreler KH, KH+M gruplarında saptanmadı (Şekil 4.2.15-16).



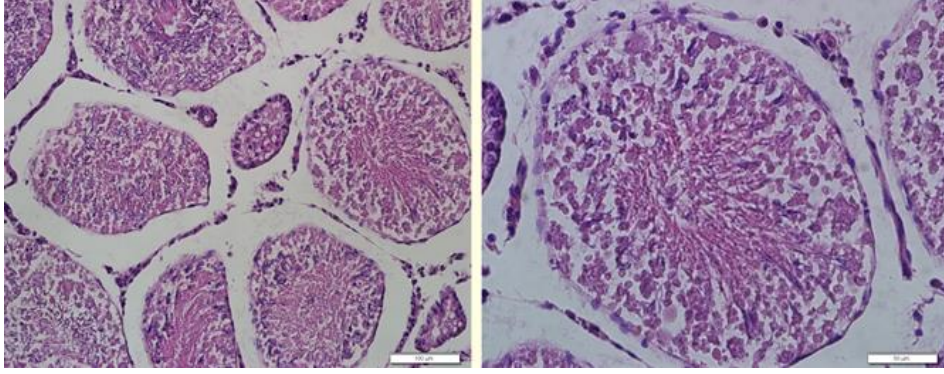
Şekil 4.2.12: Sham Grubu H&E görünümü: 20X ve 40X büyütmede



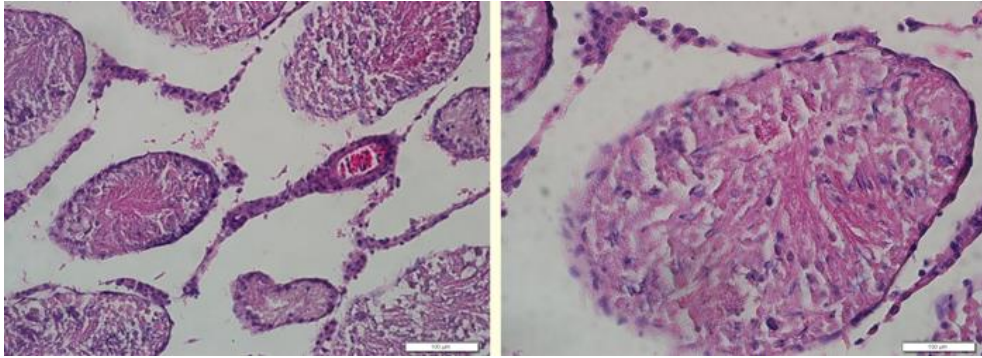
Şekil 4.2.13: Torsiyon Grubu H&E görünümü: 20X ve 40X büyütmede



Şekil 4.2.14: Melatonin Grubu H&E görünümü: 20X ve 40X büyütmede



Şekil4.2.15: Kök Hücre Grubu H&E görünümü: 20X ve 40X büyütmede



Şekil 4.2.16: Kök Hücre Melatonin Grubu H&E görünümü: 20X ve 40X büyütmede

Grupların SOX-9, VASA ve Kaspaz-3 Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Sonuçları:

SOX-9

S grubunda SOX-9 seminifer tübüllerde yer yer pozitif ekspresyon gösterirken, interstisyel alanda Leydig hücrelerinde, damar duvarında ve bağ dokusunda negatif ekspresyon gösterdiği belirlendi.

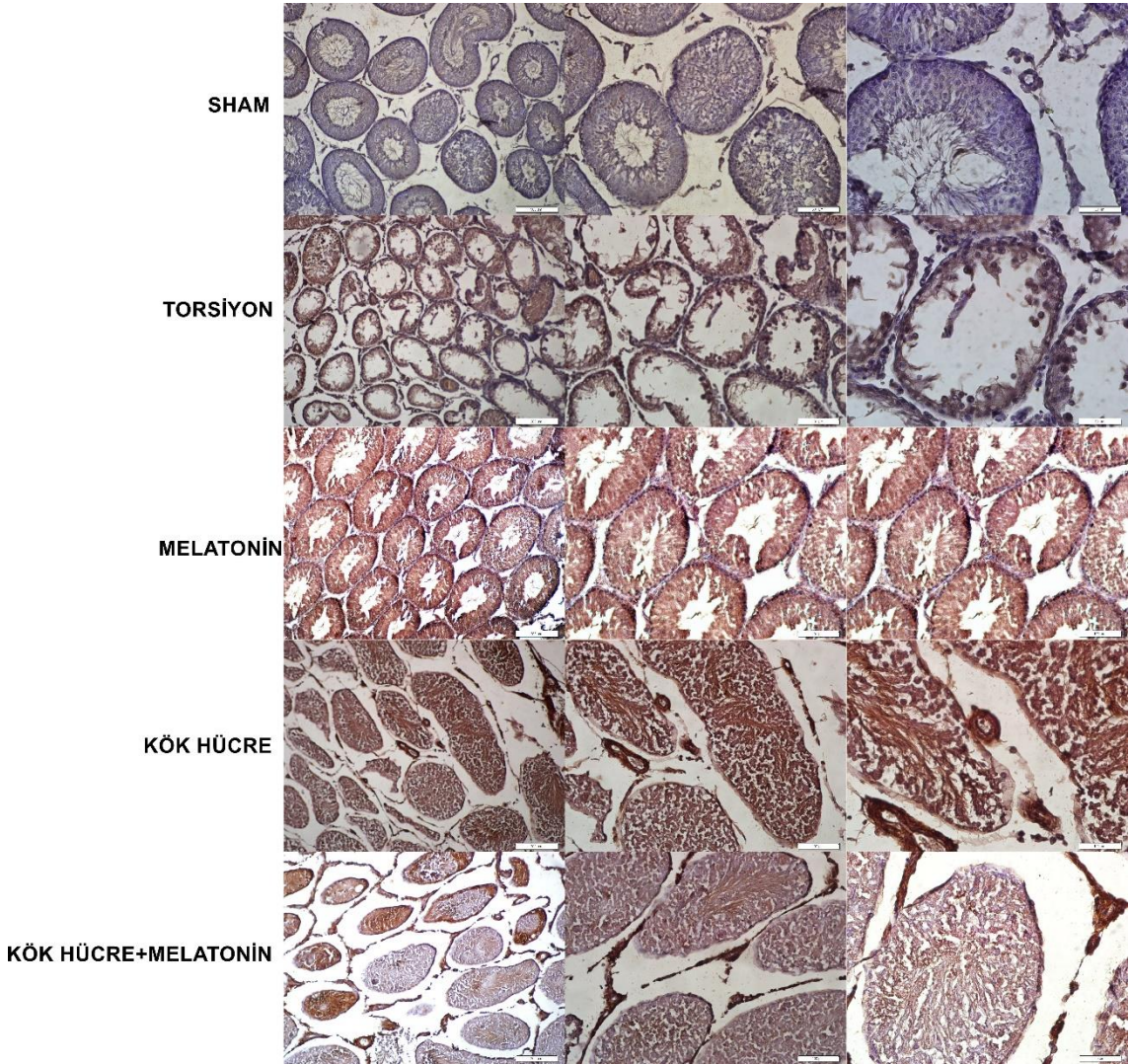
T/D grubunda seminifer tübüllerde membran negatifken spermatojenik serinin kuvvetli pozitif olduğu dikkati çekti. İntestisyel alanda tüm yapıların negatif bazı alanlarda çok zayıf pozitif olduğu gözlemlendi.

M grubunda reaksiyon seminifer tübülleri çevreleyen bazal membranda negatif olarak izlenirken spermatojenik seride bazı hücrelerin pozitif reaksiyon gösterdi belirlendi. İntestisyel alanda Leydig hücrelerinin, damar duvarının ve bağ dokusunun da kuvvetli pozitif boyandığı gözlemlendi.

SOX-9 KH grubunda kuvvetli reaksiyon göstermişti. Seminifer tübüllerde spermatojenik seri, Sertoli hücrele, İnterstisyel alanda Leydig hücreleri, damar duvarı, bağ dokusu kuvvetli pozitif ekspresyon gösterdi.

KH+M grubunda reaksiyon seminifer tübülleri çevreleyen bazal membranda negatif olarak izlenirken, spermatojenik seride reaksiyonun kuvvetli pozitif olduğu dikkati çekti. İnterstisyel alanda Leydig hücrelerinde, damar duvarında ve bağ dokusunda reaksiyonun kuvvetli olduğu belirlendi.

Sox-9 ekspresyonunda S ve TD grupları arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Fakat tedavi gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha düşük ekspresyon gösterdiği bulundu ($p<0,05$). Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$) (Şekil 4.2.17-21) (Tablo 4.2.2).



Şekil 4.2.17: Hematoksilen immünoperoxidaz yapılan SOX-9 gruplarının görüntüsü; ok ile gösterilen yapılar seminifer tübüller, bağ dokusu lifleri ve damar duvarı.

		SOX-9		VASA		KASPAZ-3		TUNEL	
	n	Ort.	S.S	Ort.	S.S	Ort.	S.S	Ort.	S.S
Sham	8	149,16	25,30	277,33	14,89	93,83	12,10	84,50	38,87
Torsiyon/Detorsiyon	8	141,83	29,45	290,00	7,09	292,83	10,51	293,66	8,40
Melatonin	8	276,33	20,01	298,16	2,22	96,33	5,68	164,33	23,15
Kök Hücre	8	271,66	19,21	187,00	25,02	141,16	45,72	142,66	32,82
Kök Hücre + Melatonin	8	237,00	15,63	197,83	24,20	181,50	24,88	135,33	28,04

Tablo 4.2.2: Gruplardan alınan testis dokusunda TUNEL, KASPAZ-3, SOX-9, VASA ekspresyonunun H skor analizi sonuçları. İstatistiksel olarak anlamlılık $p < 0,05$.

VASA

S grubunda seminifer tübül duvarı, interstisyel alanda Leydig hücreleri, damar duvarı ve bağ dokusu kuvvetli pozitif reaksiyon gösterdi.

T/D grubunda VASA seminifer tübül bazal membranında, spermatojenik seride ve sertoli hücrelerinde interstisyel alanda, leydig hücrelerinde, damar duvarında ve bağ dokusunda kuvvetli pozitif reaksiyon gösterdi.

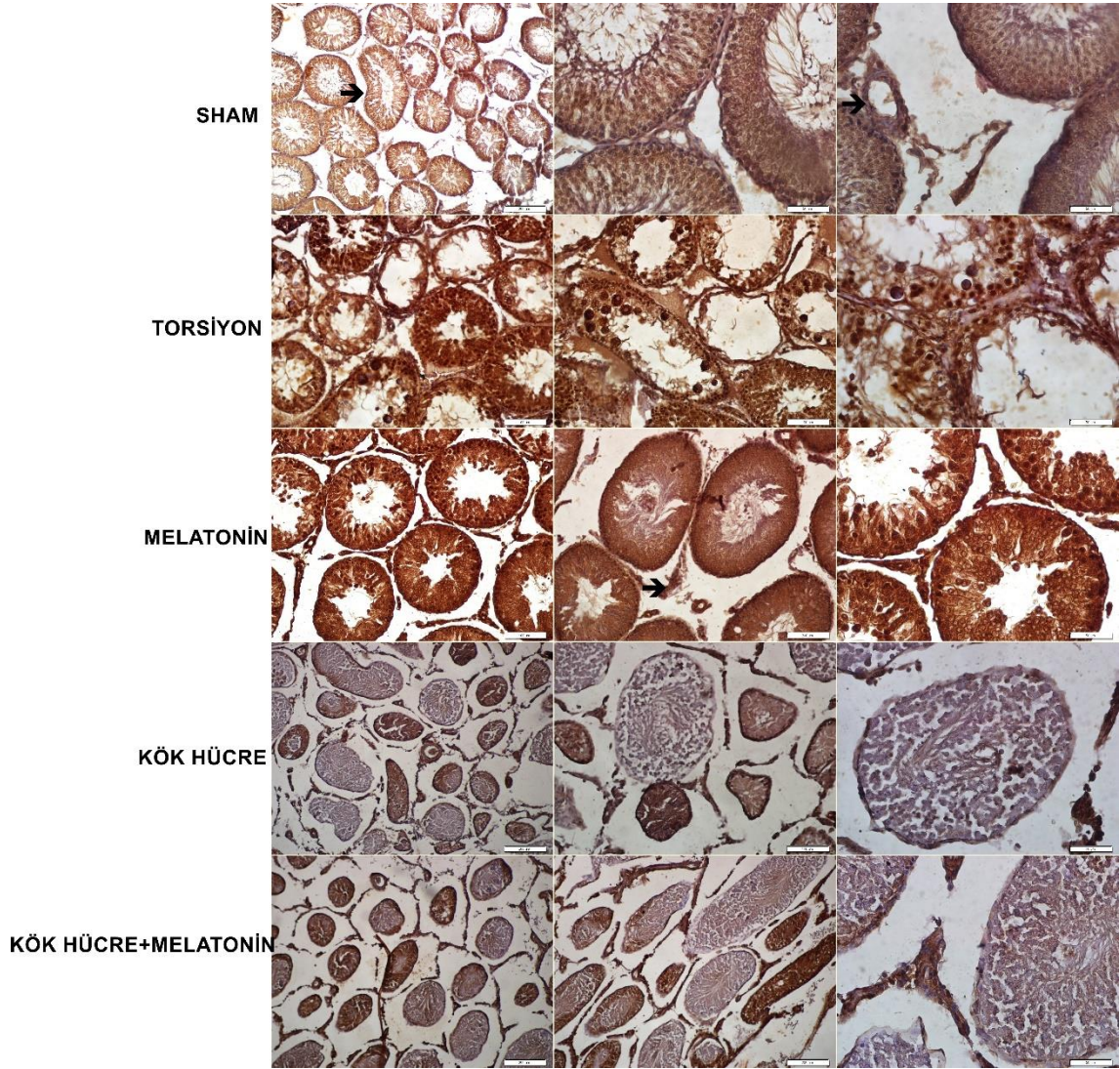
M grubunda seminifer tübüllerde spermatojenik seride kuvvetli pozitif boyama izlendi. Bununla birlikte geç tipte spermatidlerin baş bölgesinin negatif olduğu ilgiyi çekti. İnterstisyel alanda leydig, damar duvarı, bağ dokusu kuvvetli pozitif boyanma gösterdi

KH grubunda reaksiyon seminifer tübülleri çevreleyen bazal membranda negatif olarak izlenirken, spermatojenik seride bazı hücrelerin zayıf pozitif reaksiyon gösterdiği belirlendi. İnterstisyel alanda Leydig hücrelerinin, damar duvarının ve bağ dokusunun da kuvvetli pozitif boyandığı gözlemlendi.

KH+M grubunda seminifer tübüllerin kuvvetli pozitif reaksiyon gösterirken geri kalanlarda reaksiyonun zayıf pozitif olduğu belirlendi. Kuvvetli reaksiyon gösteren tübüllerde tüm spermatojenik seri hücrelerinde reaksiyon kuvvetli pozitif. İnterstisyel alanda Leydig hücreleri, damar duvarı, bağ dokusu kuvvetli pozitif izlendi.

VASA ekspresyonu S, TD, M gruplarında yüksek saptandı. S, TD, M grupları kendi aralarında istatistiksel olarak bir fark saptanmazken, KH, KH+M gruplarına göre VASA

ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p<0,05$). VASA ekspresyonu en yüksek M grubundaydı. Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında M grubundaki VASA ekspresyonu KH, KH+M gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,05$) (Şekil 4.2.18-21) (Tablo 4.2.2).



Şekil4.2.18: Hematoksilen immünoperoksidaz yapılan VASA gruplarının görüntüsü; ok ile gösterilen yapılar seminifer tübüller, bağ dokusu lifleri ve damar duvarı.

Kaspaz-3

S grubunda reaksiyon seminifer tübülleri çevreleyen bazal membranda negatif olarak izlenirken spermatojenik seride bazı hücrelerde zayıf sitoplazmik pozitif reaksiyon gözlemlendi. İntestisyel alanda Leydig hücreleri, damar duvarı ve bağ dokusu orta derecede pozitif reaksiyon gösterdi.

T/D grubunda reaksiyonun çok kuvvetli olduğu izlendi. Seminifer tübüllerde tüm hücrelerde ve intestisyel alanda tüm yapılarda Kaspaz-3 kuvvetli pozitif boyanmıştı.

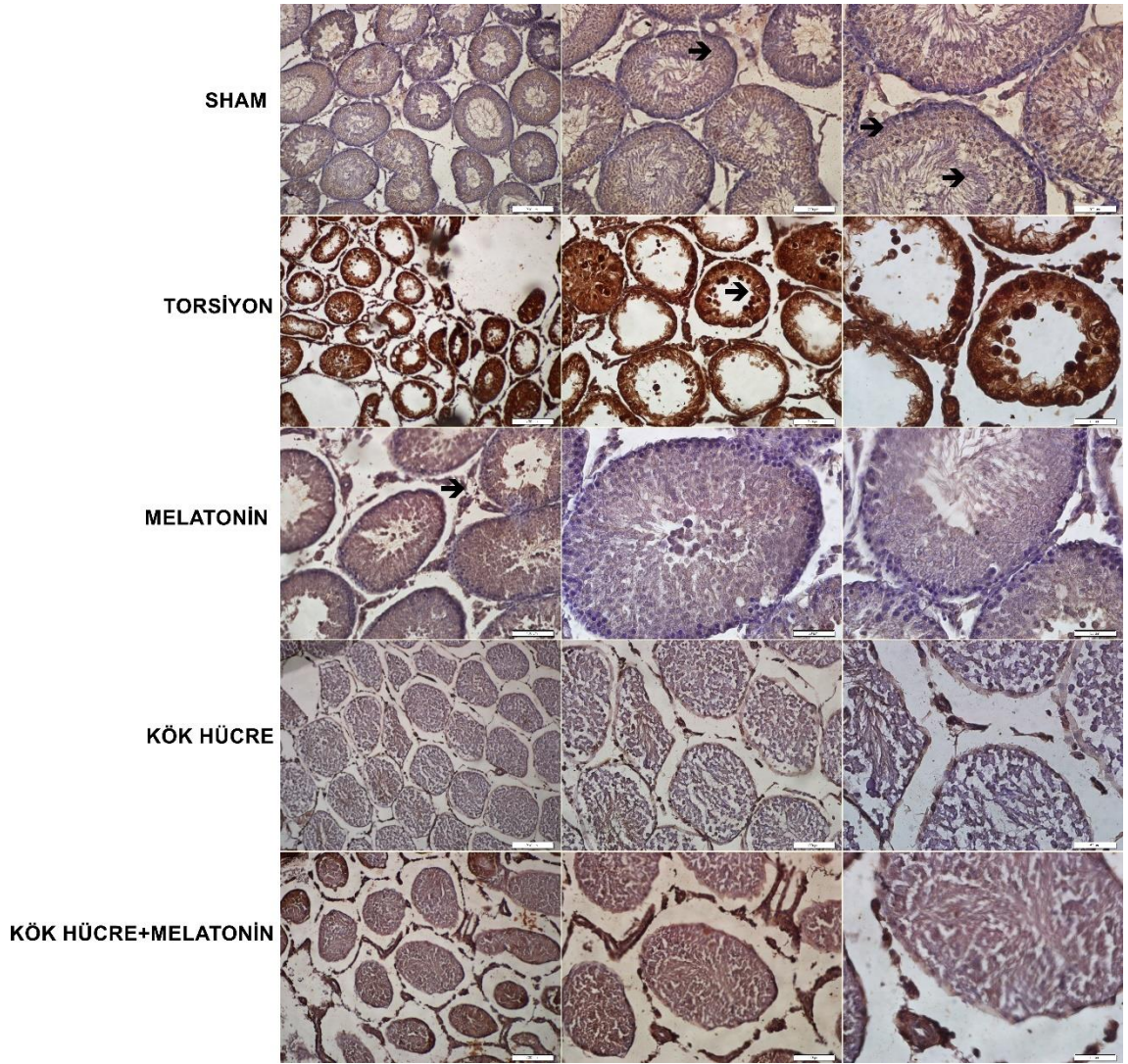
M grubunda reaksiyon seminifer tübülleri çevreleyen bazal membranda negatif olarak izlenirken spermatojenik seride bazı hücrelerde çok zayıf pozitif reaksiyonun varlığı ilgiyi çekti. İntestisyel alanda Leydig hücrelerinin, damar duvarının ve bağ dokusunun zayıf pozitif reaksiyon gösterdiği belirlendi.

KH grubunda pozitif reaksiyon seminifer tübüllerin bazal membranında interstisyel alanda Leydig hücrelerinde damar duvarında ve bağ dokusu liflerinde izlendi. Spermatik seride reaksiyon izlenmezken bazı seminifer tübüllerde spermatid kuyruklarında orta derecede reaksiyon görüldüğü belirlendi.

KH+M grubunda Kaspaz-3 reaksiyonu seminifer tübülleri çevreleyen bazal membranda kuvvetli olarak izlenirken spermatojenik seride bazı hücrelerde zayıf pozitif reaksiyonun varlığı ilgiyi çekti. İnterstisyel alanda pozitif reaksiyon izlendi. İntestisyel alanda Leydig hücrelerinin, damar duvarının ve bağ dokusunun kuvvetli reaksiyon gösterdiği belirlendi.

Kaspaz-3 ekspresyonunda H skor analizi sonuçlarına göre TD grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05$).

KH ve KH+M grubunda S grubuna göre Kaspaz-3 ekspresyonu anlamlı olarak yüksektir ($p<0,05$). M grubuyla S grubu arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında M grubu, KH ve KH+M grubuna göre Kaspaz-3 ekspresyonu anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 4.2.19-21) (Tablo 4.2.2).



Şekil 4.2.19: Hematoksilen immünoperoksidaz yapılan Kaspaz-3 gruplarının görüntüsü; ok ile gösterilen yapılar seminifer tübüller, bağ dokusu lifleri ve damar duvarı.

Grupların TUNEL Boyama Sonuçları:

S grubunda seminifer tübüllerde spermatojenik seri hücrelerinde interstisyel alanda Leydig hücreleri, damar duvarı ve bağ dokusu orta derecede TUNEL negatif reaksiyon gösterdi.

T/D grubunda seminifer tübüllerde, spermatojenik seri de interstisyel alanda Leydig hücrelerinde, damar duvarında ve bağ dokusunda TUNEL kuvvetli pozitif reaksiyon gösterdi.

M grubunda seminifer tübüllerde spermatojenik seri TUNEL negatif ekspresyon gösterirken, interstisyel alanda Leydig hücreleri, damar duvarı ve bağ dokusu orta derecede tünel pozitif reaksiyon gösterdi.

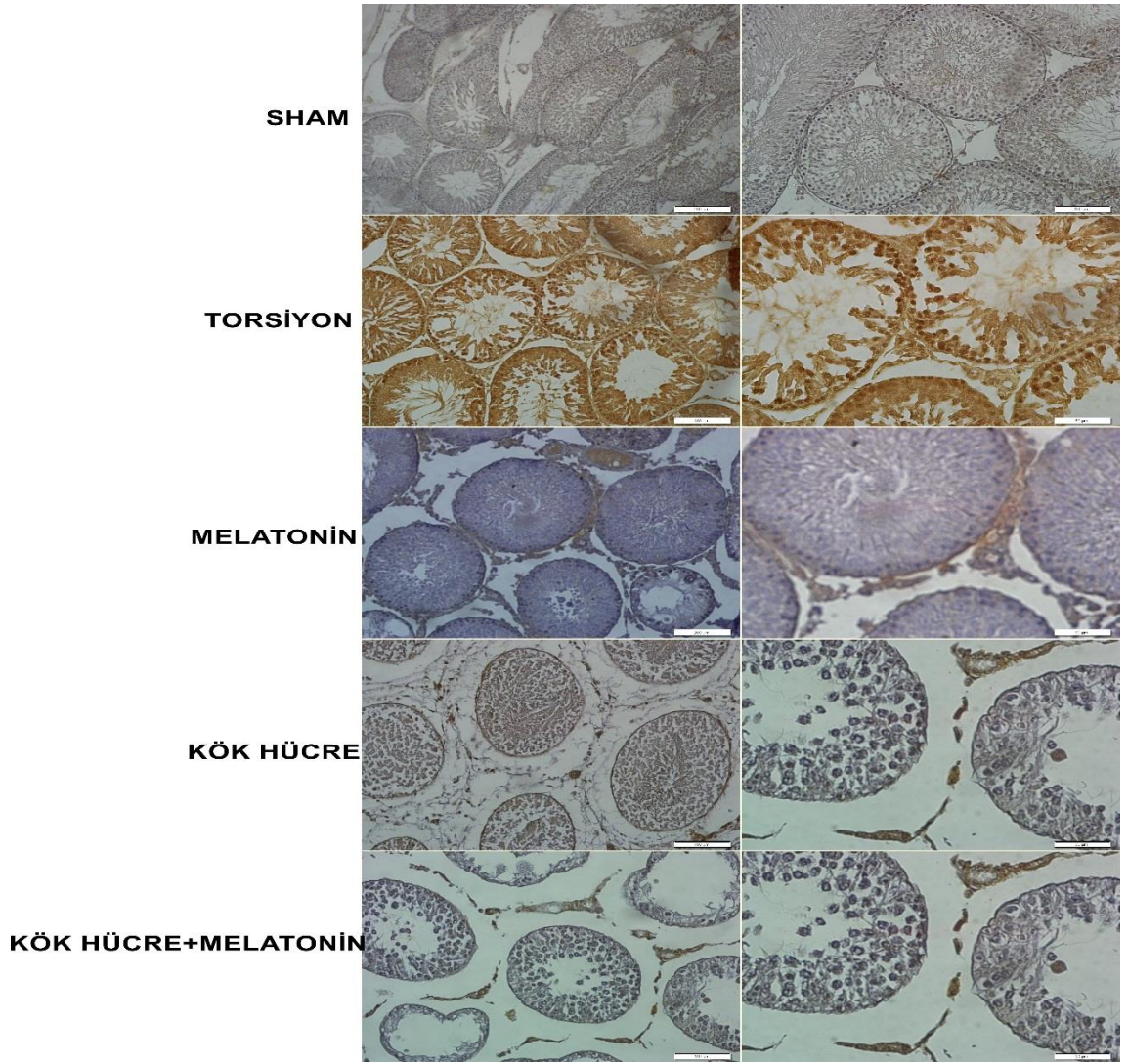
KH grubunda seminifer tübüllerde spermatojenik seri interstisyel alanda Leydig hücreleri, damar duvarı ve bağ dokusu orta derecede TUNEL pozitif reaksiyon gösterdi.

KH+M grubunda seminifer tübüllerde, spermatojenik seri ve sertoli hücreleri TUNEL negatif iken interstisyel alan Leydig hücreleri, damar duvarı TUNEL pozitif reaksiyon gösterdi.

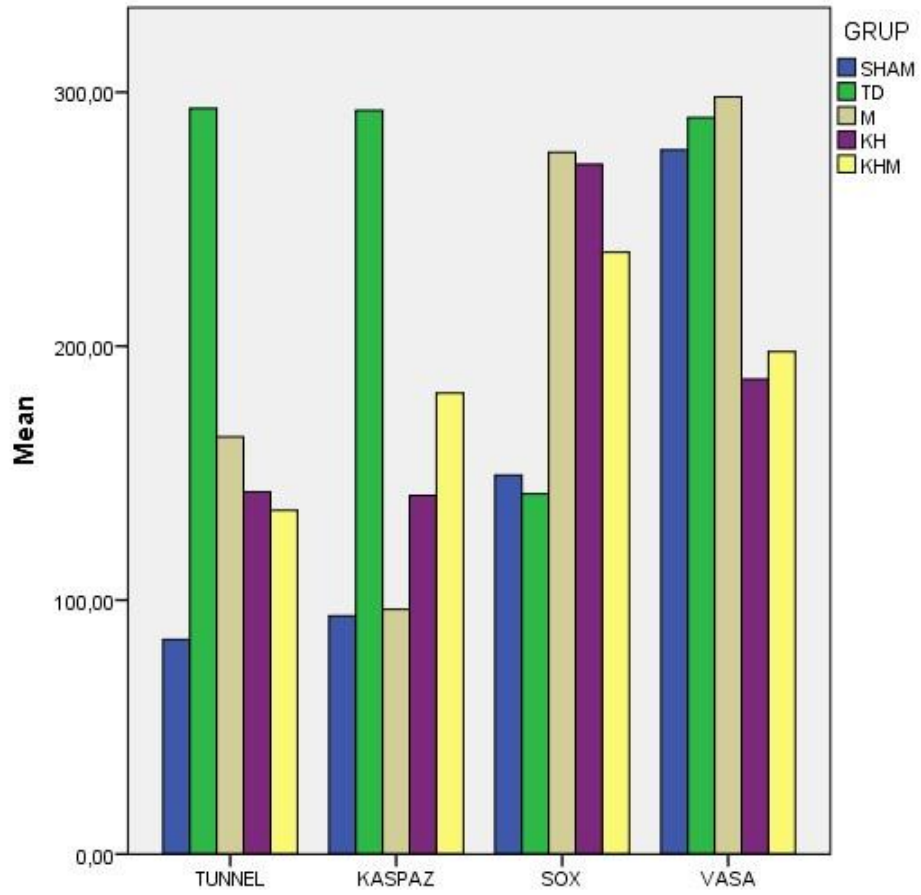
Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında S grubunun TUNEL pozitifliği diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düşük saptanmıştır ($p<0,05$).

TUNEL pozitifliği diğer gruplara göre anlamlı yüksektir.

M, KH, KH+M gruplarında S grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptanmasıyla birlikte TD grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$) (şekil 4.2.20-21) (Tablo 4.2.2).



Şekil 4.2.20: TUNEL yapılmış grupların görünümü.



Şekil 4.2.21: Gruplardan alınan testis dokusunda TUNEL, KASPAZ-3, SOX-9, VASA ekspresyonunun H skor analizi sonuçlarının grafik görüntüsü.

5.TARTIŞMA

Bizim çalışmamızda torsiyon detorsiyon oluşturulan sıçanlarda M, KH, KH+M tedavisinin hormonal fonksiyonları etkilemediği görülmüştür. Bir oksidatif biyobelirteç olan MDA nin tedavi gruplarında azalması, bu tedavilerin oksidatif hasarı azalttıklarını gösterdi. Kaspaz-3 ve TUNEL sonuçları bize bu tedavilerin intrinsek apoptotik yolağında etkili olduğunu göstermiştir.

Testis torsiyonunun infertilite üzerinde etkisi ve mekanizması üzerine hala çalışmalar yapılmaktadır. Marco ve ark. yaptığı çalışmada detorsiyon yapılan deney grubuyla orşiektomi yapılan deney grubunun sperm yoğunluğu bakımından bir fark bulunmamıştır (Marco 2007). Torsiyon oluşturulup detorsiyon yapılan grupların sperm morfolojisinde bozukluklar meydana geldiği ve hareket fonksiyonlarında azalma olduğu gözlenmiştir. Diğer testisin etkilendiğini gösteren otoimmün mekanizmalarla kan akımının azaldığı gözlenmiştir. Bu azalma infertilite ile doğru orantılıdır (Karagüzel 2004). Yapılan bir çalışmada testis T/D oluşturulan sıçanlara 3×10^4 MSC detorsiyonunda 30' önce verilmiş. Cerrahiden 3 gün sonra testis ve epididimide sperm sayımı yapılmıştır. Sonuçta MSC 'in lokal enjeksiyonunun sperm motilitesini koruduğunu, glikoz metabolizmasını regüle ettiği saptanmıştır (Hsiao 2019). Azizollahi ve ark. (2016) T/D oluşturdukları farelere spermatogonial kök hücre vermiş, 8 hafta sonra kesilen sıçanların testisleri alınarak incelenmiştir. Epididimiste kök hücre verilen grupta sperm sayısı T/D grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunsa da kontrol ve sham grubuna göre düşük saptanmıştır. Bu çalışmada testiküler biyopsi skorlamasıyla, sperm sayısı arasında yüksek kolerasyon saptanmıştır (Azizollahi ve ark. 2016). Bizim çalışmamızda T/D grubunda sperm morfolojisi ve hareketliliğinin azaldığı saptanmıştır. M grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sperm canlılığı ve normal morfolojideki sperm sayısı T/D grubuna göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. KH ve KH+M gruplarında epididimiste sperm görmememizin sebebi olarak da torsiyona bağlı gelişen sperm kaybının sakrifikasyon yaptığımız 7 günlük süre içerisinde geri dönmemesine bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Sperm hareketliliği ve sperm sayısının geri kazanılması için optimal MSC dozunun yarısına MSC 'lerin uzun süreli spermatogenez üzerindeki etkisi, torsiyondan sonra antisperm antikor ile kontrolateral testis üzerindeki etkisi ve potansiyel sekellerinin daha fazla araştırılması gerekir (Hsiao 2019).

MDA iskemi ve iskemi-reperfüzyon hasarı sırasında sıklıkla oksidatif stres biyobelirteci olarak kullanılan organik bir bileşiktir (Sireger ve ark. 2021) .Testis torsiyonu ve detorsiyonu uyguladıkları sıçanlara insan adiipoz kökenli mezenkimal kök

hücre vermişler. Tedavi gruplarında MDA seviyelerini anlamlı olarak düşük saptamışlardır. Sonuçta intratestiküler ADMSC uygulamasının iskemi-reperfüzyon hasarına bağlı ROS hasarını inhibe edebileceğini savunmuşlardır (Sinegar 2021). Hsiao ve ark. orbital yağ doku MSC'ler MDA ekspresyonunu düşürdüğünü saptamışlardır (Hsiao 2015). Yapılan başka bir çalışmada T/D oluşturulan sıçanlara kültüre edilmeyen adipoz doku elde edilen stromal vasküler fraksiyon (SVF) lokal olarak verilmiş. 3., 7., 14. ve 28. günlerde değerlendirme yapılmıştır. MDA T/D grubunda yüksek bulunmuştur. SVF anlamlı olarak MDA seviyesini azaltmıştır (Zhou 2019). Bizim çalışmamızda da bu çalışmayla paralel olarak kök hücre verilmesi 7. günde bakıldığında MDA düzeyini düşürmüştür. Fakat istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır.

İpsilateral testis hasarı kontralateral testis dokusuna zarar verir (Mirhoseini 2017). Yapılan bir çalışmada sağ IR oluşturulan prepubertal sıçanlara intraperitoneal 50mg/kg⁻¹ tek doz melatonin verilmiş, ipsilateral ve kontralateral testis biyokimyasal olarak incelenmiştir. Melatonin uygulamasının lipid peroksidasyonunu ve enzim aktivitesini anlamlı olarak azalttığı saptanmıştır. Yapılan çalışmada ipsilateral yapılar hasarın kontralateral testise de zarar verdiği görülmüştür (Parlaktaş 2014). Melatoninin hücrelerde fosfolipid tabakasının dış yüzeyine bağlanır. Membrandan önce serbest radikallerle temas eder ve bu şekilde hücre membranını korur. Sonuçta çekirdeği organelleri ve hücre membranını serbest radikal hasarına karşı korur (Karabulut 2020). Melatoninin serum ve seminal plazma seviyeleri infertil hastalarda düşüktür. Melatonin ROS ve lipid peroksidasyonu etkili bir şekilde azaltır (Yu 2018). Semercioz ve ark. Tek taraflı testis T/D oluşturdukları sıçanlara 3 hafta boyunca çinko ve melatonin uygulamışlar. Bu tedavilerin oksidatif stresi azalttığını, bunun yanı sıra inhibin B düzeylerini saptamışlardır. Testis T/D oluşturulmadan önce verilen melatoninin kan ve doku Glutasyon (GSH) ve MDA seviyelerinde düzelmeye sebep olduğu saptanmıştır (Semercioz 2017). Genç ve yaşlı sıçanlarda yapılan bir çalışmada 10mg/kg subkutan melatonin testisteki koruyucu etkisi incelenmiş. Yaşlı hastalarda melatonin tedavisinin MDA seviyesini azalttığı, GSH ve testosteron seviyesini arttırdığını saptamışlar. Melatonin tedavisinin apoptotik hücre sayısını azalttığını ve motil sperm sayısını arttırdığını saptamışlardır (Muratoğlu 2019). Mirhoseini ve ark. testis T/D oluşturdukları sıçanlara 15ng/kg melatonin vermişler. 7 saat sonra kurban edilen sıçanlar histopatolojik olarak incelenip, MDA seviyeleri bakılmıştır. MDA seviyelerinde anlamlı bir iyileşmenin olmadığı belirlenmiştir (Mirhoseini 2017). Bizim çalışmamızda ise melatonin testis torsiyonu detorsiyonu oluşturulan sıçanlarda 7. günde MDA seviyesini istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azaltmak yerine bir miktar attırmıştır. KH+M

grubunda MDA seviyesinin sadece torsiyon oluşturulan gruba ve tedavide sadece melatonin verilen gruba göre düşük saptanması kök hücrelerin oksidatif hasarı düzeltmede melatoninden bağımsız olarak etkili olduğunu düşündürmüştür.

Erkek gamet farklılaşma ve olgunlaşma süreci olan spermatogenezis hipofiz bezinden salgılanan LH ve FSH, testisteki Leydig hücrelerinden salgılanan testosteron gibi çeşitli hormonlar tarafından düzenlenir (Yu 2018). Testiküler iskemiye bağlı gelişen tübüler hasar sonucu gelişen FSH seviyesindeki bozulma, sperm yoğunluğundaki patolojilerin nedeni olabilir (Anderson 1986). FSH seviyelerindeki değişiklikler germinal epitel hasarını göstermede majör belirteçtir. Şen ve ark. çalışmasında sperm hareketliliğindeki düşüşün artmış FSH konsantrasyonuna bağlı gelişen germinal epitel hasarına bağlanmıştır. Birçok çalışma FSH yüksekliğinin sperm konsantrasyonunu ve motilitesini azalttığını göstermiştir (Şen 2018). Başka bir çalışmada FSH ve LH T/D gruplarında anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (Zhou 2019). Hsiao ve ark yaptığı çalışmada ise FSH seviyeleri T/D 'da artarken, kök hücre verilen grupta 7. günde normale döndüğü belirtilmektedir (Hsiao 2015). Bizim çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte S grubuna göre artmış FSH düzeyleri bütün gruplarda devam etmekteydi.

Hsiao ve ark. orbital yağ doku MSC enjeksiyonundan sonra 7. günde serum testosteron seviyelerinin normale döndüğü saptamış ve T/D 13. günde LH seviyesini artırırken 7. günde kök hücre verilmesi LH değişikliğini etkilemediğini göstermiştir (Hsiao 2015). Bizim çalışmamızda ise LH seviyesi gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermemiştir.

Melatoninin testislerde ve epididimiste reseptörlere sahip olduğu gösterilmiştir. Pineal bezin çıkartılması testis, prostat, seminal vezikül ağırlığının anlamlı bir şekilde arttırmıştır. Melatonin direkt sıçan Leydig hücrelerini etkiler ve testosteron seviyelerini artırır. Fakat genç sıçanlarda tek doz Melatoninin uygulanması serum testosteron seviyelerini düşürmemiştir (Maitra ve Ray 2000). Düşük doz melatonin fertilitiyi ve testosteron seviyelerini artırır. Muratoğlu ve arkadaşları (2019) Melatonin yaşlı hastalarda apoptotik hücre ve testosteron sayısını azalttığını saptamıştır (Muratoğlu 2019). Karabulut ve arkadaşları yaptığı çalışmada thioasetemidin indüklediği testis hasarında melatoninin etkileri incelemişlerdir. Serum testosteron seviyeleri hasarlı testis grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak düşük olduğu saptanmıştır (Karabulut 2020). Melatonin koyun testislerindeki testosteron oranını iki kat arttırdığı bulunmuştur (Deng 2016). Leydig hücreleri melatonine duyarlıdır. Melatoninin Leydig hücrelerindeki melatonin membran reseptörüne bağlanarak androjen sekresyonunu düzenler (Yu 2018). Bizim çalışmamızda bu çalışmalara zıt olarak melatonin

testosteron seviyesini arttırmamıştır. Fakat istatistiksel olarak anlamlı olmasa da KH verilen gruplarda testosteron seviyeleri bir miktar artırmış olması kök hücrelerin Leydig hücrelerini olumlu etkilediğini düşündürdü.

Testiküler T/D modeli seminifer tübül çapının azalmasına neden olur (Semercioz 2017). Melatonin testiküler torsiyonda (Ekici 2012), İskemi-Reperfüzyonda (Parlaktaş,2014), siklofosfomidin neden olduğu toksisitede (Chabra and Shokrzade 2014) koruyucu etki gösterir. Melatonin testis T/D hasarında spermatogenezi iyileştirdiği bildirilmiştir (Mirhoseini 2017). Yapılan bir çalışmada melatoninin uygulanmasının tübül çapını arttırdığı görülmüştür. Melatonin uygulanan deney grubunda ortalama tübül çapı ve MJS' si değerlendirildiğinde kontrol grubuna yakın değerlerde olduğu saptanmıştır. Apoptotik hücreler değerlendirildiğinde testis hasarlı gruba göre melatonin uygulanan grupta kontrol grubuna benzer sonuçlar elde edilmiştir (Karabulut 2020). Mirhoseni ve ark. yaptığı çalışmada 15ng/kg melatoninin sıçanlarda tübül çapında artma saptamışlar. Fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Epitel uzunluğu açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Çalışmamızda tübül alanı ve epitel kalınlığı en yüksek S grubunda, en düşük T/D grubunda saptanmıştır. Ama tedavi gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık saptanamamıştır.

Sireger ve ark. (2021) testis torsiyonu ve detorsiyonu oluşturdukları sıçanlarda histopatolojik değerlendirmede, MJS' si insan adipoz mezenkimal kök hücre verilen grupta anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır.

Başka bir çalışmada SVF' nin MJS' u anlamlı olarak arttırdığını saptanmıştır. Enjekte edilen SVF hücreleri anlamlı olarak intertisyel bölgeye geçmiş ve testiste seminifer tübüllerde Fibroblast Büyüme Faktörü ve kök hücre büyüme faktör sekresyonunu arttırmıştır. Germ hücrelerinde ve Leydig hücrelerinde de hasarı azaltmıştır. T/D testiste hem 3. hem de 7. günde irregüler ve atrofik seminifer tübüller gözlenmiştir. 28. günde sadece spermatogoninin olduğu tübüller saptanmıştır. SVF uygulaması sham grubuyla aynı olmasa da MJS' ini T/D grubuna göre anlamlı olarak arttırmıştır. Fakat 28. günde bakıldığında SVF verilen grupta ciddi hasar ve azalmış MJS' i bulunmuştur. (Zhou 2019). Bizim sonuçlarımıza göre hormon düzeyleri etkilenmemekle birlikte melatonin, testisin yapısal olarak düzenlenmesine katkı sağlamıştır. MJS sonuçlarına göre T/D grubuna göre tedavi gruplarında sağ testiste düzelme görülmüştür. En belirgin düzelme M grubundadır.

Yapılan bir çalışmada testis T/D oluşturulan sıçanlara melatonin 17 mg/kg ve 1 mg/kg kolsisin 7 gün boyunca (oral) verilmiş ve histopatolojik olarak değerlendirilmiştir.

T/D oluşturulan grupta HE boyama sonucunda nekrotik alanlar dikkati çekmiştir. Melatonin ve Kolsisin hasarlayıcı etkileri azalmıştır. Fakat melatonin ve kolsisin verilen gruplarda Giant (dev) hücreler saptanmıştır (Sekmenli 2017). Bizim çalışmamızda da sadece Melatonin verilen grupta multinükleer dev hücrelere rastlanılmıştır. Fakat KH+M grubunda bu dev hücrelerin görülmemesi dikkat çekicidir. Kanimaghahi ve ark. yaptığı çalışmada hamsterlarda bisülfanla indüklenen testis hasarında intratübel olarak ADMSC vermişler. Bu hücrelerin azospermik testiküler tübülde spermatogenesis indeksi ADMSC transplasyonunu yapılan hamsterlardan normal hamster grubuyla aynı bulunmuştur (Kanimaghahi 2018). ADMSC'ler testiküler kan duvarı dahil intertisyel ve seminifer tübül bölgelerine integre olabilir. Burada çeşitli büyüme faktörleri salgılar (FGF, SCF), oksidatif stresi azaltır, hormon seviyelerini düzenler. Leydig hücrelerinin ve germ hücrelerinin yenilenmesini sağlar. Böylece histolojik düzelmesine katkıda bulunur (Sineger 2021). Çalışmamızda deney gruplarında seminifer tübüllerde ve intertisyel alanlarda histolojik olarak düzelmelerin gözülmesi bu çalışmaları destekler niteliktedir.

Mezenkimal kök hücreler parakrin olarak immünsupresif etki yaparlar. HUC- MSC' ler inflamatuvar sitokinler olan TNF- α ve IL-1 β ekspresyonunu azaltır (Zhang 2020). Yapılan bir çalışmada Enjekte edilen SVF hücreleri anlamlı olarak intertisyel bölgeye geçmiş ve testiste seminifer tübüllerde Fibroblast Büyüme Faktörü ve kök hücre büyüme faktör sekresyonunu arttırmıştır. Germ hücrelerinde ve Leydig hücrelerinde hasarı azaltmıştır. SOX-9 ekspresyonu açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Zhou 2019). Bizim çalışmamızda Sox-9 ekspresyonunda S ve TD grupları arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Fakat tedavi gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha düşük ekspresyon gösterdiği bulundu. T/D VASA ve P450(+) hücre ekspresyonu tedavi gruplarında T/D grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunsada S grubuna göre hala düşüktür (Zhou 2019). Bizim çalışmamızda bu çalışmaya zıt olarak VASA ekspresyonu S, TD, M gruplarında oldukça yüksekken kök hücre verilen gruplarda düşük olduğu saptandı.

Sert *invivo* mikro çevre MSC tabanlı tedavinin etkisini zayıflatır. Son yıllarda melatonin MSC'in hayatta kalma oranını arttırmakta etkili bir ajan olduğu belirtilmektedir. İltihabı, apoptozisi ve oksidatif stresi azaltarak birçok organın fonksiyonlarının geri kazandırılmasında sinerjik etki gösterdiği saptanmıştır (Hu,2019). Ming liu ve ark. (2019) yaptığı çalışmada testis torsiyonu oluşturdukları Sprague-Dawley sıçanlara detorsiyondan 15 dk. önce 17mg/kg melatonin vermişlerdir 24 saat sonra sakrifiye ettikleri sıçanlarda melatonin testis dokusunda apoptoz ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenleyerek ve total antioksidan kapasiteyi arttırarak

spermatogenezisi koruduğu saptanmıştır (Liu 2019). şen ve ark. yaptığı çalışmada radyasyona bağlı meydana gelen testis hasarında intraperitoneal olarak 1 hafta 12 mg/kg/gün olacak şekilde melatonin vermişlerdir. Radyoiyodinin apoptozis ve sperm kalitesini bozan etkisini düşürdüğünü saptamışlardır (şen 2018). Hasio ve ark. yaptığı çalışmada TUNEL testi ve Kaspaz-3 ve BAX sonuçları kök hücrelerin intrinsek apoptozisi indüklediğini göstermişlerdir. (Hsiao 2015). Zhang ve ark. (2020) testiküler IR hasarı oluşturdukları sıçanlara intravenöz insan-umbilikal kord multipotent mezankimal stromal hücreler vermişler. Kök hücrelerin inflamatuvar yanıtı ve oksidatif stresi azaltarak spermatojenik hücre hasarını azalttığını saptamışlardır. Kök hücre verilen grupta nötrofil infiltrasyonunun, ROS, germ hücre apoptozisinin azaldığını bulmuşlardır. Testiküler torsiyon germ hücre apoptozise neden olur. Apoptotik yol genellikle inflamasyon ve ROS ile aktive edilir. TUNEL sonuçları testiküler torsiyon germ hücre apoptozisini özellikle 1. ve 3. günlerde indüklediği göstermektedir. Bununla birlikte kök hücre verilen grupta 1. ve 3. günlerde apoptotik hücre oranı kontrol grubuna yakındır. TUNEL (+) hücre varlığı 7. günden sonra torsiyon grubunda, kök hücre ve kontrol grubuyla benzer bulunmuştur (Zhang ve ark. (2020). Bizim alışmamızda tedavi gruplarında spermatojenik seri hücrelerde 7. günde alınan dokularda apoptotik hücre sayısı azalmıştır. S grubu kadar düşük olmasa da tedavi gruplarındaki TUNEL pozitifliği TD grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Fakat tedavinin etkinliği doğrultusunda gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Azospermisi olan fare testisine spermatogonial kök hücre nakliyle eř zamanlı verilen 20mg/kg melatonin transplantasyonun etkinliği ve testis dokusunun yapısal özelliklerini iyileştirdiği saptanmıştır (Gholami 2014). Başka bir çalışmada azospermik farelerde spermatogonial kök hücrelerin melatoninlerle aynı anda transplantasyonunun testis dokusunun yapısal özelliklerini iyileştirdiği saptanmıştır. (Yu 2018)

6.SONUÇ

Sonuç olarak çalışmamızda bütün tedavi grupları torsiyonun testis dokusunda oluşturduğu dejenerasyonu düzeltmiştir. Melatonin ve kök hücrenin birlikte uygulamasının diğer tedavi gruplarına göre VASA, SOX-9, Kaspaz-3 ekspresyonu ve apoptozise etkisi yönünden bir üstünlüğünün olmadığı saptanmıştır.

7. KAYNAKLAR:

Abasiyanik A, Dağdönderen L. Beneficial effects of melatonin compared with allopurinol in experimental testicular torsion. J Pediatr Surg. 2004; 39: 1238- 1241

Barada JH, Weingarten JL, Cromie WJ. Testicular salvage and age related delay in the presentation of testicular torsion. J Urol. 1989; 142:746-8

Başaklar Can langman's medical embryology.1996 Sixth edition.pp 260-296

Cakici C, Buyrukcu B, Duruksu G et al. Recovery of fertility in azoospermia rats after injection of adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells: the sperm generation. Biomed Res Int. 2013; 2013:529589

Can Alp Kök Hücre-Biyolojisi Ankara 2014 sy:404-409

Carneiro, J., & Junqueira, L. C. Basic histology: text & atlas. McGraw-Hill. 2009 p. 515.

Chenxia Hu and Lanjuan Li. Melatonin plays critical role in mesenchymal stem cell-based regenerative medicine in vitro and in vivo. Stem Cell Research & Therapy. 2019; 10:13

Gardner LP, James LH. Color textbook of Histology, 2.edition. Editors: Gardner LP,James LH. Philadelphia, W.B Saunders Company, 2001;487-508.

Gul, S. S., Gurgul, S., Uysal, M., & Erdemir, F. The Protective Effects of Pulsed Magnetic Field and Melatonin on Testis Torsion and Detorsion Induced Rats Indicated by Scintigraphy, Positron Emission Tomography/Computed Tomography and Histopathological Methods. *Urology journal*, 2018;15(6), 387-396.

Gültekin F, Delibas N, Yasar S, Kılınc. In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. Arch. Toxicol. 2001; 75:88-96

Hsiao CH, Ji AT, Chang CC et al. Local injection of mesenchymal stem cells protects testicular torsion-induced germ cell injury. Stem Cell Res Ther. 2015; 6:113

Junquera CL, Carneiro j, Kelley RO. Basic histology, Text&Atlas,11.edition. Editors: Luiz Carlos Junqueira, Jose Carneiro. Nobel Tıp Kitabevi, 2009;418-33.

Kanter M. Protective effects of melatonin on testicular torsion/detorsion-induced ischemiareperfusion injury in rats. *Exp Mol Pathol.* 2010; 89: 314-320

Karimaghai, N., Tamadon, A., Rahmanifar, F., Mehrabani, D., Jahromi, A. R., Zare, S., ... & Dianatpour, M. Spermatogenesis after transplantation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in busulfan-induced azoospermic hamster. *Iranian journal of basic medical sciences*, 2018. 21(7), 660.

Kierszenbaum AL. Histology and Cell Biology. 1st Edition. Editor: Kierszenbaum AL. Missouri, Mosby, 2002;531-64.

Liuhua zhou, kaiwei song, luwei xu, feng zhao, hongqiang tian et all. Protective Effects of Uncultured Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction on Testicular Injury Induced by Torsion-Detorsion in Rats. *Stem cells translational medicine.* 2018; 00:1–9

Local injection of mesenchymal stem cells protects testicular torsion-induced germ cell injury. *Stem cell research & therapy*, 2017 6(1), 1-12.

Mehri Mirhosein, Fereshteh Talebpour Amiri, Abbas Ali Karimpour Malekshah, Zahra Rezanejad Gatabi, Elmira Ghaffari. Protective effects of melatonin on testis histology following acute torsion-detorsion in rats 2018.

Moore K. L, Persaud T. V. N. (Çeviri Edt; Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H. Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi. Nobel Tıp Kitabevi. 8. Baskı 2009; sy:18-20

Morielli T, O'Flaherty C. Oxidative stres impairs function and increases redox protein modifications in humanspermatozoa. *Reproduction.* 2015; 149:113-23

Nayernia K, Lee JH, Drusenheimer N, Nolte J, Wulf G, Dressel R, et al. Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. *Lab Invest.* 2006; 86:654-663

Netter's Essential Histology 2009

Ovalle WK, Nahirney P. Netter's Essential Histology. 1st Edition. 2009;377-98.

Öner-lyidogan, Y., Gürdöl, F., & Öner, P. The effects of acute melatonin and ethanol treatment on antioxidant enzyme activities in rat testes. *Pharmacological Research*, 2001. 44(2), 89-93.

Reiter RJ, Tan DX, Rosales-Corral S, Manchester LC. The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives. *Mini Rev Med Chem.* 2013;13(3):373–84

Reiter, R. J. Functional diversity of the pineal hormone melatonin: its role as an antioxidant. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes*, 1996. 104(1), 10-16.

Sekmenli T, Gunduz M, Öztürk B, Karabağlı P, Ciftci I, Tekin G, et al. The effects of melatonin and colchicine on ischemia-reperfusion injury in experimental rat testicular torsion model. *J Pediatr Surg*. 2016; 52: 582-586

Sekmenli, T., Gunduz, M., Öztürk, B., Karabağlı, P., Ciftci, I., Tekin, G., & Yılmaz, M. The effects of melatonin and colchicine on ischemia–reperfusion injury in experimental rat testicular torsion model. *Journal of pediatric surgery*, 2017. 52(4), 582-586.

Serdar Savas Gül, Serkan Gürgül, Murat Uysal, Fikret Erdemir The Protective Effects of Pulsed Magnetic Field and Melatonin on Testis Torsion and Detorsion Induced Rats Indicated by Scintigraphy, Positron Emission Tomography/Computed Tomography and Histopathological Methods. *Miscellaneous*. 2018

Singh, R. D., & Singh, S. K. Torsion of undescended testis in an infant: case for early orchiopexy. *Journal of the Indian Medical Association*, 2011. 109(8), 593-594.

Tahan G, Akin H, Aydogan F, Ramadan SS, Yapicier O, Tarcin O, et al. Melatonin ameliorates liver fibrosis induced by bile-duct ligation in rats. *Can J Surg* 2010. 53: 313-318.

Thomas WE, Cooper MJ, Crane GA, et al. Testicular exocrine malfunction after torsion. *Lancet*. 1984; 2:1357-60

Tuch BE "Stem cells — a clinical update". *Australian Family Physician* 2006; 35 (9): 719–21

WEB_2.RatSperm morphological assessment.
http://www.irdg.co.uk/Sperm_morphology.pdf, 03.09.2018

Wein j. Alan Campbell Üroloji 8. Baskı 2. Cilt 2014 sy:1475

Yaman Ö., Kadioğlu A., Taşcı İ. Güncel Üroloji 2. Baskı 2018:372-375

Yazır yusufhan 14. Kök hücre ve doku mühendisliği kursu: Temel kök hücre teknikleri ve moleküler biyoloji uygulamaları 2015

Yörükoğlu Kutsal-Tuna Burçin üropatoloji kongre kitabevi 2019 sy:502

Yurtçu M, Abasiyanik A, Avunduk MC, Muhtaroglu S. Effects of melatonin on spermatogenesis and testicular ischemia-reperfusion injury after unilateral testicular torsion-detorsion. *J Pediatr Surg*. 2008; 43: 1873-1878

Zhang, J., Campbell, R. E., Ting, A. Y., & Tsien, R. Y. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2002. 3(12), 906-918.