

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

**SIÇANLARDA METOTREKSAT KAYNAKLI TESTİS
HASARI ÜZERİNE MEZENKİMAL KÖK HÜCRENİN
HİSTOPATOLOJİK ETKİSİ**

MELTEM HALAT
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Nezihe Tülin BOYLU

İKİNCİ DANIŞMAN
Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-17012 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Meltem HALAT tarafından hazırlanan “Sıçanlarda metotreksat kaynaklı testis hasarı üzerine mezenkimal kök hücrenin histopatolojik etkisi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:/...../.....

Üye (Tez Danışmanı) : Yrd. Doç. Dr. Nezihe Tülün BOYLU ADÜ

Üye : Prof. Dr. Çetin PEKÇETİN DEÜ

Üye : Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN ADÜ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Kadri Murat GÜRSES ADÜ

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın yürütülmesi, değerlendirilmesi ve yorumlanmasındaki her aşamada bilgi ve tecrübeleriyle bana daima destek olan danışman hocam Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. N. Tülin BOYLU'ya saygı ve şükranlarımı sunarım.

Hücre kültürü aşamalarında laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan bilgi ve deneyimlerini paylaşan tez danışmanım Adnan Menderes Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN'e teşekkürlerimi sunarım.

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN'e, teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin istatistiksel analizlerinde yardımlarını esirgemeyen Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Fakültesi İstatistik Bölümü Araş. Gör. Özgür DANIŞMAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince manevi desteğini hissettiğim, bilgilerini paylaşan hayatımda olduğu için kendimi şanslı hissettiğim, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Dalı Araştırma görevlisi Tuğba ÇELİK SAMANCI'ya, histolojik çalışmalarda yardımlarını gördüğüm, yüksek lisans öğrencisi H. Fulya YILMAZ ve Gizem BAŞARAN'a, ADÜ Deney Hayvanları çalışanlarına ve ADÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına teşekkür ederim.

Son olarak varlığı varlığım olan, maddi manevi destekleriyle yanımda olup kararlarımda beni yüreklendiren, bütün fedakârlıkları sevgileri ve kuşkusuz güvenleri için hayattaki en büyük hazinelerim olan annem Zekiye HALAT'a, babam Orhan HALAT'a, kardeşlerim Gamze ve Buse HALAT'a, yol arkadaşım Sezer SELÇUK'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Meltem HALAT

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ.....	xi
EKLER DİZİNİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Testis Anatomisi	3
2.1.1. Testislerin Lenf Akımı.....	6
2.2. Testis Histolojisi	7
2.2.1. Testisin Genel Yapısı.....	7
2.2.2. Testis Gelişimi.....	8
2.2.3. Spermatogenezis	8
2.2.4. Seminifer Tübüller.....	9
2.2.5. Sertoli Hücreleri	11
2.2.6. Leydig Hücreleri (İnterstisyel Doku)	13
2.2.7. Spermatogenezi Etkileyen Faktörler	13
2.3. Testis Embriyolojisi.....	14
2.3.1. Genital Kanalların Gelişimi.....	17
2.3.2. Erkek Genital Kanal ve Bezlerinin Gelişimi	17

2.3.3. Testislerin İnışı	17
2.4. Metotreksat	19
2.5. Kök Hücre	20
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	23
3.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Deney Grupları	23
3.2. Sıçan Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücre Elde Edilmesi.....	24
3.2.1. Hücre Kültür İşlemleri:.....	24
3.2.1.1. Red Floresan Proteinle (RFP) Mezenkimal kök hücrelerin işaretlenmesi	25
3.2.1.2. Hücre canlılık testi.....	25
3.2.1.3. Mezenkimal kök hücrelerin akım sitometrik analizi	25
3.3. İmmunofloresan İnceleme	26
3.4. Dokuların Elde Edilmesi	26
3.5. Işık Mikroskopik İnceleme için Dokuların Takibi	27
3.5.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü	28
3.5.2. PAS Boyama Protokolü.....	29
3.6. İstatiksel Analiz	29
4. BULGULAR	34
4.1. Hücre Kültürü ve İmmünfenotiplendirilmesi	34
4.1.1. Sıçan Kemik İliğinden İzole Edilmiş Mezenkimal Kök Hücrenin Kültür ve İmmünfenotiplendirilmesi.....	34
4.2. Kök Hücre Belirteçleri Kullanılarak Akım Sitometrisi İle Hücrelerin Mezenkimal Kök Hücre Olduğunun Gösterilmesi.....	35
4.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Varlığının RFP pozitifliği ile ölçülmesi	37
4.4. Hematoksilen-Eozin ve PAS Histokimyasal Bulguları	38
4.4.1. Kontrol grubu bulguları.....	38
4.4.2. MTX Grubu Bulguları.....	41
4.4.3. Kök Hücre Bulguları	47

4.4.4. İstatistiksel Analiz	40
5. TARTIŞMA.....	54
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	56
KAYNAKLAR.....	57
EKLER	61
ÖZGEÇMİŞ.....	62

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABP	: Androjen Bağlayıcı Protein
aER	: Düz Endoplazmik Retikulum
AMH	: Anti-Müllerian hormon gonadotropik hormon
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CO₂	: Karbondioksit
FBS	: Fetal Boin Serum
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
H-E	: Hematoksilen-eozin
İHK	: İç Hücre Kütesinde
LH	: Luteinleştirici Hormon
MEM	: Minimum essential medium
MIS	: Müllerian İnhibe Edici Madde
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
MTX	: Metotreksat
PAS	: Periyodik-Asit Schiff
PBS	: Fosfat tuzu tamponu
RFP	: Red flouresan protein
STÇ	: Seminifer tübül çapı
STEÇ	: Seminifer tübül epitel çapı
TÇ	: Tübül çapı
TEÇ	: Tübül epitel kalınlığı
Tripsin- EDTA	: Tripsin-Etilendiamin tetraasetikası

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Erkek üreme sisteminin anatomik görünümü. Gökmen (2008) den modifiye edilmiştir.....	3
Şekil 2: Testisin örtüleri. Sobotta'dan (Cilt 2,1990) modifiye edilmiştir.	4
Şekil 3: Testisin anatomik yapısı. Arıncı ve Elhan (2014) dan modifiye edilmiştir.....	5
Şekil 4: Testisin skrotumla birlikte şematik görünümü. Human Histology (second edition,1997) den modifiye edilmiştir.	8
Şekil 5: Spermatogenez olayı. Carlos (2009) dan modifiye edilmiştir.	9
Şekil 6: Seminifer tübül epiteli. Carlos (2009) dan modifiye edilmiştir.....	10
Şekil 7: Seminifer tübül ve çevresindeki dokunun bir bölümü. Carlos (2009) dan modifiye edilmiştir.....	11
Şekil 8: Spermatogenik seri hücrelerinin görünümü. Carlos (2009) dan modifiye edilmiştir.....	12
Şekil 9: Carlos (2009) dan modifiye edilmiştir.....	13
Şekil 10: Erkek üreme sisteminin hipofiz tarafından kontrolü. A Textbook of Histology 10th ed. Saunders (1975) den modifiye edilmiştir.....	14
Şekil 11: A. Testisten geçen tunika albuginea, testis kordları, rete testis ve primordial germ hücrelerini gösteren transvers kesit. B.Testis ve genital kanalın 4. aydaki görünümü. Langman (2012) dan modifiye edilmiştir.....	15
Şekil 12: Tunika albuginea, testis kordonlarını yüzeydeki epitelyum dokudan ayırır. Moore (2009) dan modifiye edilmiştir.	16
Şekil 13: Testisin perirenal pozisyondan skrotal pozisyona inişi esnasındaki olayların şematik özeti. Langman (2011) den modifiye edilmiştir.....	18
Şekil 14: İnguinoskrotal iniş sırasında gubernakulumun görünümü. Langman (2011) den modifiye edilmiştir. T, testis; PV, prosesus vajinalis. KM: kremaster kası.....	18
Şekil 15: Metotreksatın kimyasal yapısı. Sönmeza ve ark (2016) 'dan modifiye edilmiştir.....	20

Şekil 16: Kemikliğinden izole edilen MKH'lerin immünofenotipik özelliklerinin akım sitometri sonuçları	35
Şekil 17: Mezenkimal kök hücre verilmiş sıçan akciğer dokusundaki CD34 sayımı.....	36
Şekil 18: Her bir sıçanın kök, kontrol ve MTX grubunda seminifer tübül çapı ortalamaları.....	51
Şekil 19: Her bir sıçanın kök, kontrol ve MTX grubunda seminifer tübül epitel çapı ortalamaları.....	51
Şekil 20: Her bir sıçanın kök, kontrol ve MTX grubunda seminifer tübül çapı genel ortalamaları.....	52
Şekil 21: Her bir sıçanın kök, kontrol ve MTX grubunda seminifer tübül epitel çapı genel ortalamaları.....	52

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Dokuların elde edilmesi.....	27
Resim 2: Sıçan kemik iliği kaynaklı ve üçüncü pasajdaki mezenkimal kök hücrelerin morfolojik yapısı ışık mikroskobundaki görüntüsü.	34
Resim 3: Sıçan testisinde mezenkimal kök hücre varlığının immünofloresan mikroskobuyla görüntülenmesi.	37
Resim 4: Kontrol grubu ışık mikroskobik görüntüsü. Spermatogenik seri hücreleri (çift ok), bazal membran (tek uçlu ok) X10, H-E boyama.	38
Resim 5: Kontrol grubu ışık mikroskobik görüntüsü. Spermatogenik seri hücresi (çift uçlu ok), sertoli hücresi (tek uçlu ok) X40, PAS boyama.	38
Resim 6: Kontrol grubu ışık mikroskobik görüntüsü. Tunika albuginea X10, PAS boyama.....	39
Resim 7: Kontrol grubu ışık mikroskobik görüntüsü. Bazal membran (tek başlı ok), spermatogenik seri hücreleri (çift başlı ok), kapiller (ince uçlu üçgen) X10 PAS boyama.	40
Resim 8: Kontrol grubu ışık mikroskobik görüntüsü. Kapiller (ince uçlu üçgen), Leyding (ince ok), Makrofaj (ok başı) X40, H-E boyama.	40
Resim 9: Kontrol grubu ışık mikroskobik görüntüsü. Hiperkromazi X40, PAS boyama. ...	41
Resim 10: MTX grubu ışık mikroskobik görüntüsü, spermatogenik seri hücreleri (çift uçlu ok), ondülasyon (tek uçlu ok) X10, PAS boyama.....	41
Resim 11: MTX grubu ışık mikroskobik görüntüsü. Spermatogenik seri hücrelerinde azalma (çift uçlu ok), interstisyel alan (tek uçlu ok) X10, H-E boyama.	42
Resim 12: MTX grubu ışık mikroskobik görüntüsü. Küçük spermatogenik seri hücreleri (çift uçlu ok), seminifer tübüller (tek uçlu ok) X10, H-E boyama.	42
Resim 13: MTX grubu ışık mikroskobik görüntüsü. Vakuol (ok başı), seminifer tübüller (tek uçlu ok) X10, H-E boyama.	43
Resim 14: MTX grubu ışık mikroskobik görüntüsü. Dejenere tübül X10, H-E boyama.	43

Resim 15: MTX grubu ışık mikroskopik görüntüsü, interstisyel alan (kalın ok), dev hücreler (ince ok) x10, PAS boyama.	44
Resim 16: MTX grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Konjesyon (ok başı), ondülasyon (tek uçlu ok) X10, PAS boyama.....	44
Resim 17: MTX grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Damla şeklinde hücreler X40, H-E boyama.	45
Resim 18: MTX grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Spermatogenik seri hücrelerinde hipertrofi X40, H-E boyama.	45
Resim 19: MTX grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Spermatogenik seri hücrelerinde hiperkromazi X40, PAS boyama	46
Resim 20: MTX grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Ödem oluşumu X10, PAS boyama....	46
Resim 21: MTX grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Konjesyon (ok başı), lümen (tek uçlu ok) X10, PAS boyama.	47
Resim 22: Kök hücre grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübül lümeni X40, H-E boyama.	47
Resim 23: Kök hücre grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Hipertrofi X40, H-E boyama....	48
Resim 24: Kök hücre grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Konjesyon (tek uçlu ok), H-E boyama, dejenere tübül (ok başı) X4, H-E boyama.	48
Resim 25: Kök hücre grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Dejenere tübül (ok başı), vakuol (tek uçlu ok) x10, H-E boyama.....	48
Resim 26: Kök hücre grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Spermatogenik seri hücreleri (çift uçlu ok), bazal membranda ayrılma (tek uçlu ok) X10, H-E boyama.....	49
Resim 27: Kök hücre grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Seri hücrelerinde ayrışma X10, PAS boyama.	49
Resim 28: Kök hücre grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Konjesyon X10, H-E boyama....	50

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Işık mikroskobu doku takip yöntemi.....	28
Tablo 2: H-E boyama protokolü	29
Tablo 3: PAS boyama protokolü	29
Tablo 4: İstatistik sonuçları	30
Tablo 5: Seminifer tübül çapı ve seminifer tübül epitel çapı ölçümleri	50
Tablo 6: Sıçan ağırlıklarının, sağ ve sol testis ağırlığının ortalama ve standart sapmaları ..	53

EKLER DİZİNİ

Ek 1: Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurul	61
--	----

ÖZET

SIÇANLARDA METOTREKSAT KAYNAKLI TESTİS HASARI ÜZERİNE MEZENKİMAL KÖK HÜCRENİN HİSTOPATOLOJİK ETKİSİ.

Halat M. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2017

Metotreksat (MTX) bir folik asit antagonisti, antiproliferatif, anti-inflamatuar ve immünomodülatör etkilere sahiptir. Akut lenfoblastik lösemi, non-hodgkin lenfoma, meme kanseri ve baş boyun kanserlerinin tedavisinde kullanıldığı gibi kanser olmayan hastalıklarda da (romatoid artrit) kullanılmaktadır. MTX neden olduğu oksidatif strese bağlı testiküler hasarı spermatojenik hücreleri ve sertoli hücreleri üzerinde olmaktadır. Aynı zamanda leydig hücrelerinde de fonksiyon bozukluğuna ve buna bağlı olarak testosteron seviyesinde azalmaya neden olmaktadır. Kemoterapotik ilaçların zararlı etkilerine çok duyarlı olan spermatojenik hücrelere verdiği zararlar sonucu MTX infertiliteye yol açabilecek ajanlar arasında belirtilmiştir. Kök hücreler, kendilerini yenileme, bir organizmanın yaşamı boyunca kaybolan hücrelerinin yerini yenisinin alması ve fonksiyonel olarak farklılaşmış hücreleri oluşturabilme kapasitesine sahip hücrelerdir. Her ne kadar kök hücrelerin kendini yenileyerek bölünmeleri ile sonsuz bölünebildikleri düşünülse de kök hücrelerin sonsuz çoğalabilme yeteneklerini gösteren çok az kanıt vardır. Kök hücreler vücutta, epitel yenilenmesi, hematopoez ve spermatogenez gibi rejenerasyona katkıda bulunurlar. Sıçan kemik iliğinde alınacak olan mezenkimal kaynaklı kök hücreler uygun ortamda pasaj 3'e getirilecek. Bu kök hücreler Red Fluorescent Proteinle (RFP) işaretlenecek. Kök hücreler RFP ile işaretlendiği için floresans mikroskop yardımı ile verdiğimiz kök hücrelerin testiste varlığı gösterilmiş olacak. Flow sitometrik, mezenkimal kök hücrelerin yüzey marker'ının ekspresyonu analiz etmek için CD 11b, CD 29, CD 45 ve CD 90 kullanılacaktır.

Kemik iliğinden aldığımız kök hücreleri Flow sitometride CD 29 ve CD 90 markerları ile mezenkimal kök hücrenin pozitif ekspresyonu gösterilecektir.

Hematopoetik belirteçlerden olan CD 45 ve CD 11b ile negatif ekspresyon olduğu gösterilecektir.

Akciğer dokusunda flowsitometri ile CD 34 negatif olarak belirlenmesi ile kök hücrenin mezenkimal kaynaklı kök hücre olduğu belirlenecektir.

Anahtar Kelimeler: Metotreksat, Kök hücre, Testis

ABSTRACT

HISTOPATHOLOGICAL EFFECT OF THE MESENCHYMAL STEM CELL ON METHOTREXATE-INDUCED TESTIS INJURY IN RATS.

Halat M. Adnan Menderes University Health Science Institute Histology-Embryology Program Graduate thesis, Aydın, 2017

Methotrexate (MTX) has a folic acid antagonist, antiproliferative, anti-inflammatory and immunomodulatory effects. MTX is used in the treatment of acute lymphoblastic leukemia non-hodgkin lymphoma, breast cancer and head and neck cancer, as well as non-cancer diseases (rheumatoid arthritis). The oxidative stress-induced testicular damage caused by MTX is on spermatogenic cells and sertoli cells. It also causes dysfunction in leydig cells and consequently decrease in testosterone level. The damages to spermatogenic cells, which are very sensitive to the harmful effects of chemotherapeutic drugs, are among the agents that can lead to MTX infertility. Stem cells are cells that have the capacity to regenerate themselves, to take the place of cells lost during the life of an organism, and to form functionally differentiated cells. Although the stem cells are thought to be infinitely divisible by renewing themselves, there is little evidence that stem cells have the ability to reproduce infinitely. Stem cells contribute to regeneration in the body, such as epithelial regeneration, hematopoiesis, and spermatogenesis. The mesenchymal stem cells to be removed in the rat bone marrow will be brought to passage 3 in the appropriate environment. These stem cells will be marked with Red Fluorescent protein. Because the stem cells are labeled with Red Fluorescent Protein, the presence of the stem cells we give with the help of a fluorescence microscope will be shown to the testis. CD 11b, CD 29, CD 45 and CD 90 will be used to analyze the expression of flow cytometric, surface marker of mesenchymal stem cells. The stem cells we obtained from bone marrow will show positive expression of the mesenchymal stem cell with Flow cytometride CD 29 and CD 90 markers. Negative expression with CD45 and CD11b, which are hematopoietic markers, will be shown. Flow cytometry and CD34 negative determination of lung tissue will determine the root cell as mesenchymal stem cell.

Keywords: Metotreksat, Stem cells, Testis

1. GİRİŞ

2012 yılında kanserden kaynaklı 4,3 milyon erken ölüm vardı ve erken ölümlerin 2012 den 2030 yılına kadar %44 oranında artması beklenmektedir (WHO, 2015).

Metotreksat (MTX) bir folik asit antagonisti, antiproliferatif, antiinflamatuvar ve immünomodilatör etkilere sahiptir (Sönmez ve ark, 2016). Akut lenfoblastik lösemi, non-hodgkin lenfoma, meme kanseri ve baş boyun kanserlerinin tedavisinde kullanıldığı gibi kanser olmayan hastalıklarda da (romatoid artrit) kullanılmaktadır (Yuluğ ve ark, 2013). MTX neden olduğu oksidatif strese bağlı testiküler hasarı spermatojenik hücreleri ve sertoli hücreleri üzerinde olmaktadır. Aynı zamanda leydig hücrelerinde de fonksiyon bozukluğuna ve buna bağlı olarak testosteron seviyesinde azalmaya neden olmaktadır. Kemoterapötik ilaçların zararlı etkilerine çok duyarlı olan spermatojenik hücrelere verdiği zararlar sonucu MTX infertiliteye yol açabilecek ajanlar arasında belirtilmiştir (Oktar ve ark (2010); Vardı ve ark, 2010). Kök hücreler, kendilerini yenileme, bir organizmanın yaşamı boyunca kaybolan hücrelerinin yerini yenisinin alması ve fonksiyonel olarak farklılaşmış hücreleri oluşturabilme kapasitesine sahip hücrelerdir (Li ve Xie, 2005). Her ne kadar kök hücrelerin kendini yenileyerek bölünmeleri ile sonsuz bölünebildikleri düşünülse de kök hücrelerin sonsuz çoğalabilme yeteneklerini gösteren çok az kanıt vardır (Kanatsu-Shinohara ve ark, 2005). Kök hücreler vücutta, epitel yenilenmesi, hematopoez ve spermatogenez gibi rejenerasyona katkıda bulunurlar (Orwig ve ark, 2002). Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler birçok dokudan elde edilebilirler ve çoğalmaya elverişli hücrelerdir. Stromal kökenli oldukları için destek hücresi özelliği taşırlar (Dominici ve ark, 2006). MTX kullanımı sonucu testiste oluşan hasar üzerine mezenkimal kök hücrelerin etkinliğini göstermeyi hedefliyoruz.

Flow sitometrik, mezenkimal kök hücrelerin yüzey marker'ının ekspresyonu analiz etmek için CD 11b, CD 29, CD 45, CD 90 ve CD 34 kullanılacaktır.

Kemik iliğinden aldığımız kök hücreleri Flow sitometride CD 29 ve CD 90 markerları ile mezenkimal kök hücrenin pozitif ekspresyonu gösterilecektir.

Hematopoetik belirteçlerden olan CD 45 ve CD 11b ile negatif ekspresyon olduğu gösterilecektir.

Akciğer dokusunda flowsitometri ile CD 34 negatif olarak belirlenmesi ile kök hücrenin mezenkimal kaynaklı kök hücre olduğu belirlenecektir (Can, 2014).

Bu çalışmada MTX'in testis üzerinde oluşturduğu hasar histopatolojik olarak gösterilecektir. "Mezenkimal kök hücreler MTX sonucunda oluşan testis hasarı üzerinde etkilidir." hipotezi bu çalışmada test edilecektir.

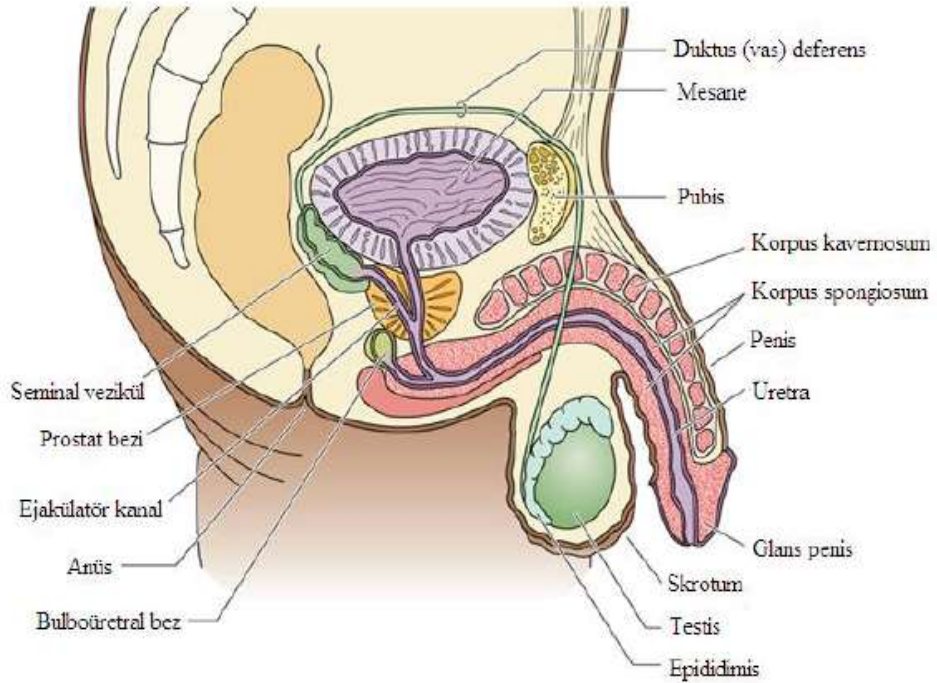
Beklenen sonuç; kök hücrelerin MTX'in neden olduğu oksidatif strese bağlı testiküler hasarın, spermatojenik hücrelerin ve sertoli hücrelerinin üzerindeki olumsuz etkilerinin iyileştirilmesi ve patogeneze üzerinde olumlu bir etki göstermesidir. Çalışmada test edilen hipotezin doğrulanması hem testis hasarı üzerinde hem de hastanın fertil olmasına olumlu katkı sağlayabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Anatomisi

Erkek üreme organı olan testisler funikulus spermaticus'a asılı durumda bulunurlar. Testisler sağlı sollu bir çift olup, skrotumun içerisindedirler. Yaklaşık 4-5 cm uzunluğunda, 2,5 cm genişliğinde, 3 cm kalınlığında ve 10-14 g ağırlığındadırlar (Arıncı ve Elhan, 2014). Büyüklükleri aynı olmasına rağmen yapı bakımından sol testis sağ testise oranla daha aşığıdadır. Hatta sağ testis sol testise göre %10 daha aşığıdır (Drake ve ark, 2007).

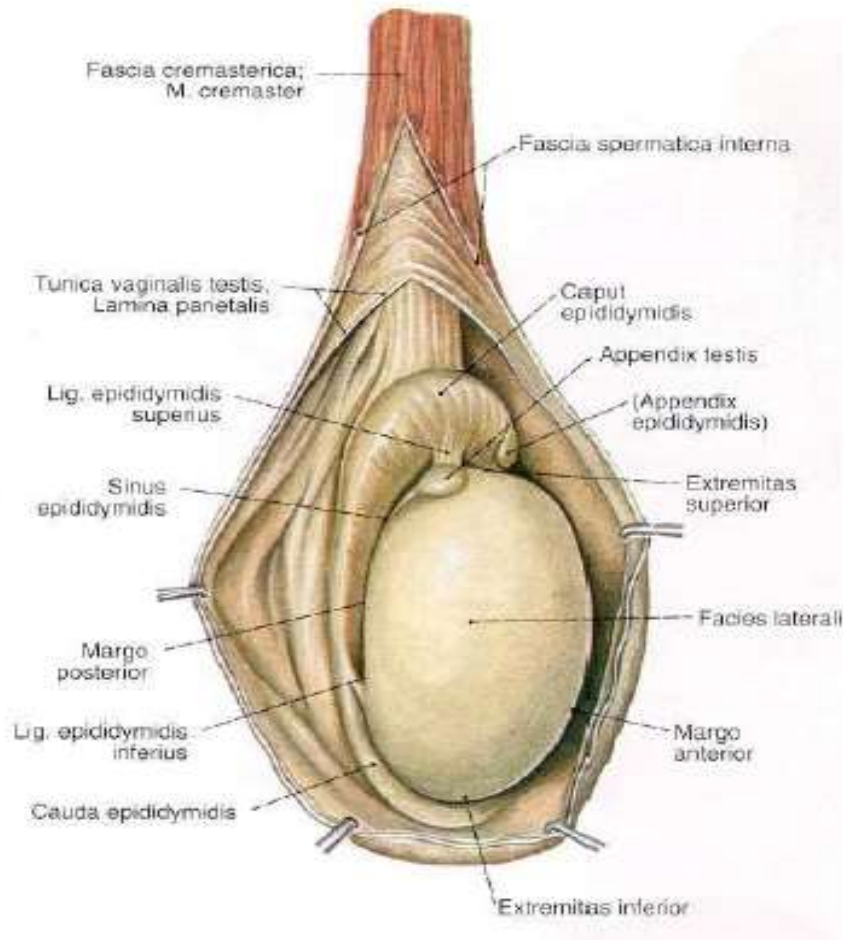
Testisler intrauterin hayatın genellikle 7. ayında skrotuma iner. Bir yaşına kadar inmezse cerrahi işlem gerekir (Arıncı ve Elhan, 2014). Skrotum içinde testis, duktus deferens, epididimis ile funikulus spermaticusu kapsayan torbadır. Karın boşluğunda kalıp skrotuma inmeme durumuna kriptorşizm (inmemiş testis) denir. Erken dönemde tedavi edilmezse tubuli seminiferi contorti de spermatogenezis ve atrofinin meydana gelmesini engeller. Testisler skrotuma inmezse sperm yaşamaz ve olgunlaşamaz. Bu durum da kısırılık (sterilite) olur. (Gökmen, 2008)



Şekil 1: Erkek üreme sisteminin anatomik görünümü. Gökmen (2008) den modifiye edilmiştir.

Testisin örtüleri dıştan içe doğru şöyledir:

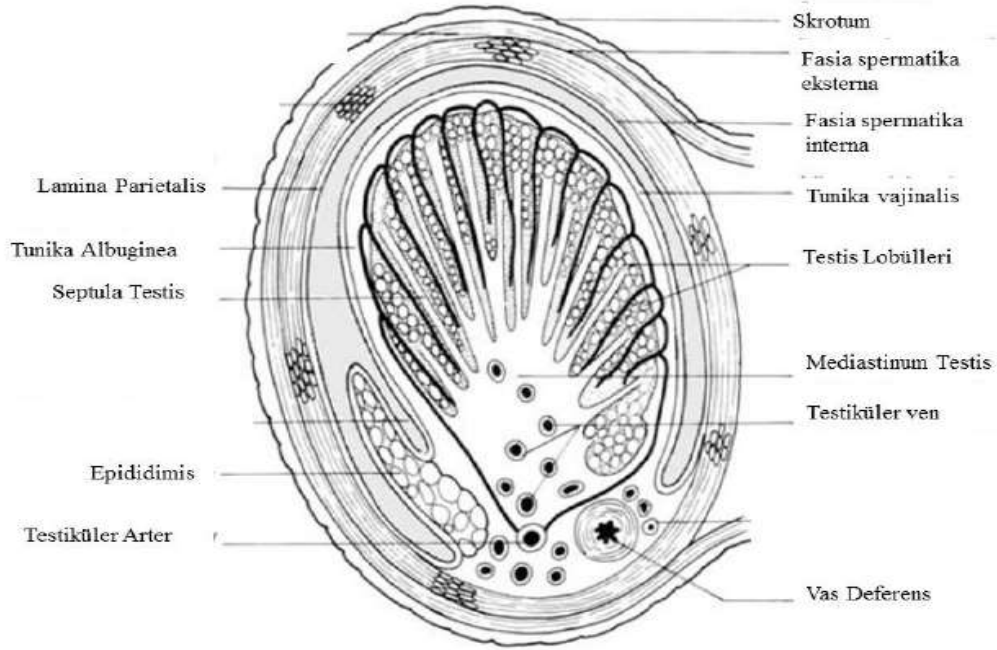
1. Scrotum
 2. Tunica dartos
 3. Fascia spermatica externa
 4. Fascia cremasterica
 5. Fascia spermatica interna
 6. Tunica vaginalis testis
 - a) Lamina parietalis [periorchium]
 - b) Lamina visceralis [epiorchium]
- I. Tunica albuginea
- II. Tunica vasculosa (Arıncı ve Elhan, 2006)



Şekil 2: Testisin örtüleri. Sobotta'dan (Cilt 2,1990) modifiye edilmiştir.

Testisin spermatic arterleri kıvrımlıdır. Bu bölgedeki kan spermatic venlerin pampiniform pleksusunda bulunan kana paralel ancak zıt yönde hareket etmektedir. Bu anatomik yapı, ısı ve testosteronun zıt akım değiş tokuşuna izin verebilir (William, 1995). Testis venlerinde solda yer alan (v. testicularis) sol v. renalis'e, sağda yer alan v. cava inferior'a açılırlar (Yavaş, 2010).

Testis in facies medialis (iç yan yüz) ve facies lateralis (dış yan yüz) olmak üzere iki yüzü; margo anterior (ön kenar) ve margo posterior (arka kenar) olmak üzere iki kenarı; ekstremas superior (üst uç) ve ekstremas inferior (alt uç) olmak üzere de iki ucu vardır (Arıncı ve Elhan, 2014).



Şekil 3: Testisin anatomik yapısı. Arıncı ve Elhan (2014) dan modifiye edilmiştir.

Tunica vaginalis, testisin dış yüzünü örten seröz zar olup, embriyonik processus vaginalis'in distal kalıntısıdır (Moore, 2009). Tunica vaginalis; skrotum'un iç yüzünü döşeyen lamina parietalis (periorchium) ve testisi örten lamina visceralis (epiorchium) olarak iki katmandan oluşur (Hatiboğlu, 2005). Testisin yapısı lamina visceralis, tunica albuginea ve tunica vasculosa olmak üzere 3 tabakadan oluşmaktadır. Lamina visceralis büyük ölçüde testisi örter. Testis ve epididimisin arka kenarlarından, lamina parietalis olarak fascia spermatica internanın iç yüzüne geçer (Arıncı ve Elhan, 2014).

Lamina parietalis (periorchium), periton'un fascia spermatica interna'yı döşeyen kısımdır (Hatiboğlu, 2005). Spermaticusun ön ve iç bölümünde yukarıya doğru biraz uzadığı için lamina visseralisden daha geniştir. Lamina parietalisin iç yüzü düzdür ve mezotel ile kaplıdır. (Sancak ve Cumhuriyet, 2004; Hatipoğlu MT ve MG, 2006)

Tunica albuginea, testisi dıştan saran, mavimsi beyaz renkli, sıkı fibröz bağ dokusundan oluşan bir zarıdır. Üst yüzeyi peritoneum uzantısı olan tunika vaginalis testis ile sarılmıştır. Testis içine uzanan septula testis adı verilen bölmeleri testiste lobüli testisi meydana getirir

(Gökmen, 2008). Her testiste sayıları 200-300 arasında değişen lobuli testis adı verilen bez kümeleri vardır. Bu bez kümelerinin büyüklükleri buldukları yere göre farklılık gösterir. Testisin ortasında yer alanlar daha büyük ve uzundur, kenarında yer alanların yapısı ise; tabanı periferde, tepesi mediastinum testise yönelmiş şekildedir (Arıncı ve Elhan, 2014).

Tunica vasculosa, tunica albuginea'nın iç yüzünü saran, kan damarı açısından oluşmuş bir tabakadır. Damarlar arasında kalan boşlukları da gevşek bağ dokusu doldurur. Testisin içindeki tüm lobuli testisi de sarar (Gökmen, 2008).

2.1.1. Testislerin Lenf Akımı

Lenfatik damarlar yüzeysel ve derin olmak üzere iki şekildedir. Yüzeysel lenf damar ağı tunika vaginalis'in alt kısmından, derin lenf damar ağı ise epididimis ve testisten başlar. Bu damarlar funiculus spermaticus içerisinde ve sonra da a. testicularis'lerle beraber hareket eder. Nodi aortici laterales ve nodi preaortici son bulurlar (Gökmen, 2008).

Arterleri: Epididimis ve testis, a. testicularis'ten beslenirler.

Venleri: Funiculus spermaticus'u saran bir ağ şeklinde plexus pampiniformis'i sonra da testis ve epididimis venleri birbirleriyle birleşerek, v. testicularis'i oluştururlar. Sağdaki v.cava inferior'a soldaki v.renalis sinistra'ya açılır.

Sinirleri: T10.-11. Medulla spinalis segmentlerinden oluşan simpatik lifler, damarların etrafındaki plexuslar ile gelir (Arıncı ve Elhan, 2014).

2.2. Testis Histolojisi

2.2.1. Testisin Genel Yapısı

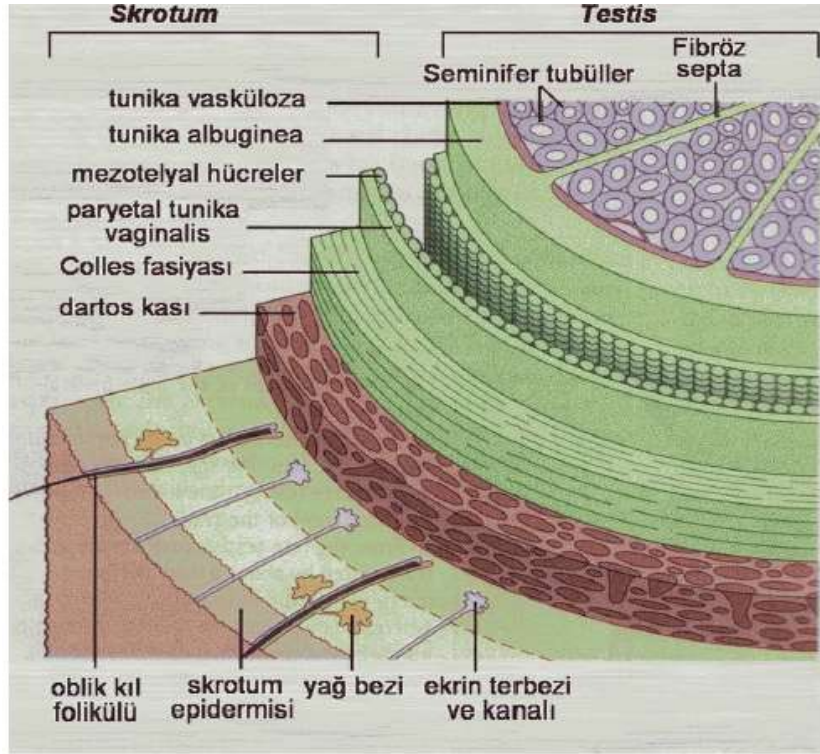
Erkek üreme sistemi hem ekzokrin hem de endokrin işlevleri bulunan bir çift testis, kanal sistemi (duktuli efferentes, duktus epididimis, duktus deferens ve duktus ejakulatorius) ve onlara bağlı yardımcı bezleri (seminal vezikül, prostat, bulboüretal bezleri-Cowper bezleri) içermektedir (Ovalle ve Nahirney, 2009).

Testisler, embriyolojik gelişim esnasında karın boşluğunun arka duvarında gelişirler. Fetüsün gelişmesi döneminde göç ederler ve skrotum içinde spermatik kordonların uçlarında asılı olarak konumlanırlar. Skrotuma doğru gerçekleştirdikleri bu göç sebebiyle her bir testis kendisiyle birlikte peritonu, tunika vaginalis adı verilen seröz bir kese şeklinde skrotum içine sürükler. Tunika vaginalis dışta parietal, içte visseral bir tabakadan oluşur ve testisin ön ve yan kısımlarında tunika albuginea'yı örter (Gartner ve Hiatt, 2007)

Testis, sıkı bağ dokusu yapısındaki kalın bir kapsül olan tunika albuginea ile çevrelenmiştir. Tunika albuginea, testislerin her birini çevreler. Kapsülün iç kısmı tunika vasküloza olarak adlandırılır. Tunika vasküloza kan damarları içerir gevşek bağ dokusundan oluşmuştur. (Pawlina R, 2010)

Testisin arka bölümünde kapsül kalın bir katlanma gösterir ve içeriye doğru uzanır. Bu kısım mediastinum testis adını alır. Her bir testis, kapsülden uzanan bağ dokusundan oluşan septumlar tarafından yaklaşık 250 lobüle bölünür. (Ovalle ve Nahirney, 2009).

Her bir lobül bağ dokusu yapısındaki stromadan meydana gelmektedir. Bu stroma içerisinde erkek üreme hücresi olan spermin üretildiği 1-4 adet seminifer tübül ve testis androjenlerini salgılayan leydig (interstisyel) hücreleri bulunmaktadır. Bu hücreler erkek cinsiyet hormonu olan testosteronu üretirler (Pawlina R, 2010).



Şekil 4: Testisin skrotumla birlikte şematik görünümü. Human Histology (second edition, 1997) den modifiye edilmiştir.

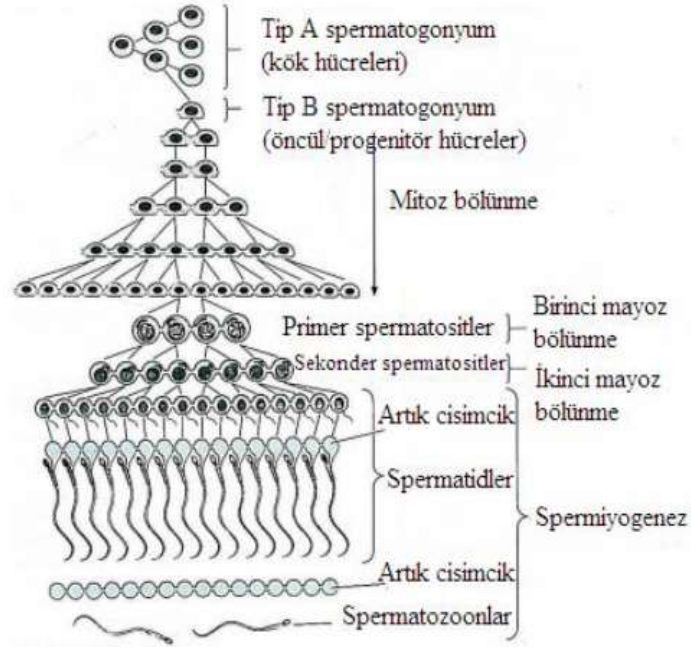
2.2.2. Testis Gelişimi

Testisler ara mezodermden köken alırlar. Ara mezoderm seminifer tübül öncülü olan primer epiteliyal cinsiyet kordonlarını oluşturur. 4 haftalık embriyoda, primordiyal üreme hücreleri vitellus kesesi endoderminden kordonlara doğru yol alırlar. Yeni doğanlardaki testis, tabakalar halinde düzenlenmiş şekildeki içi dolu üreme hücre kordonlarından ve gelecekte sertoli hücrelerine dönüşecek olan epitelyum hücrelerinden oluşurlar, kordonlar ergenliğe kadar doludur, uzadıkları zaman çapları genişler ve içlerinde lümen meydana gelir. Leydig hücreleri ise seminifer tübüllerin arasında yer alan mezenkimden gelişirler (Ovalle ve Nahirney, 2009).

2.2.3. Spermatogenezis

Spermatozoonların üretimine spermatogenez denir. Bu süreç, spermatogonyum denilen ilkel üreme hücresi ile başlar. Bu hücreler, bazal laminanın üzerinde bulunan küçük hücrelerdir. Ergenlikte büyür ve mitoz bölünme geçirirler (Ovalle ve Nahirney, 2009). Mitoz bölünme sonucu meydana gelen hücreler 2 yoldan birini izlerler. Birincisi, A tipi

spermatogonyumlar kök hücreler olarak bölünürler. İkincisi ise, devam eden mitoz bölünme süresince farklılaşarak B tipi spermatogonyumları meydana getirirler (Carlos, 2009).



Şekil 5: Spermatogenez olayı. Carlos (2009) dan modifiye edilmiştir.

2.2.4. Seminifer Tübüller

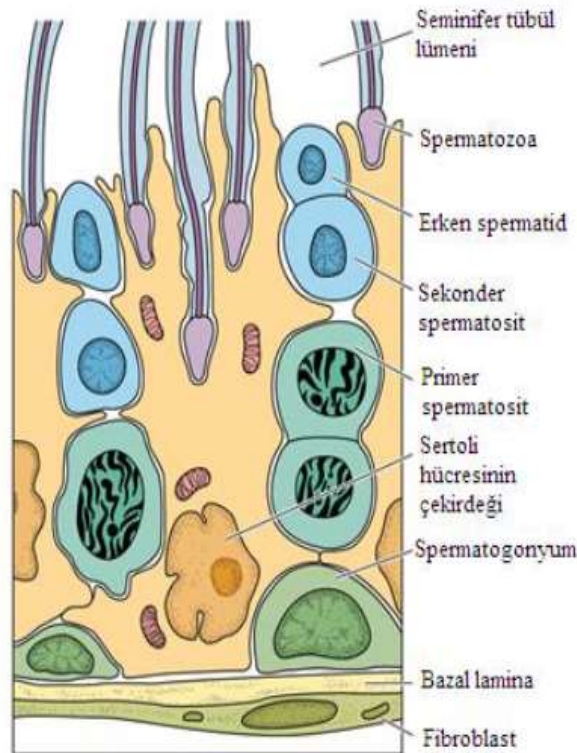
Her testiste toplam uzunluğu 280-400 m arasında olan 600-1200 seminifer tübül vardır. Çapları 150-250 μm , boyları 30-70 cm olan; iki ucu U şeklinde ve rete testise açılan tüplerdir. Tunika propriya tarafından çevrelenmiş seminifer epitelden oluşurlar (Pawlina R, 2010). Tübüller kıvrımlı yapıdadır. Uçları testisin mediastinumuna yakındır, kısa segmentler halinde devam eden yapılar şeklinde uzanırlar. Bu bölüme düz tübül (tubulus rektus) denir. Düz tübüller, mediastinumun içerisinde dallanan kanallar sistemi olan rete testis ile devam eder. Rete testis kanalları anastomoz yaparak, yaklaşık 10-20 adet duktuli efferentes ile epididimin baş kısmına bağlanmaktadır (Carlos, 2009). Her bir seminifer tübül dışta fibrositlerin bulunduğu bağ dokusu ve içte bazal membran ile çevrelenmiştir. Seminifer tübüllerin arasında interstisyel (leydig) hücrelerini içeren interstisyel bağ dokusu yer almaktadır (Demir R, 2014). Seminifer tübül çok katlı germinal bir epitele sahiptir. Epiteli oluşturan hücreler sertoli ya da destek hücreleri ve spermatogenik hücrelerdir.

Seminifer tübüldeki üreme hücreleri spermatogenezin farklı aşamalarını sergiler. Bazal membrana en yakın olan yuvarlak çekirdekli hücreler spermatogonyumlardır (Ovalle ve Nahirney, 2009).

Aralıksız yenilenen kök hücre topluluğudur. Çapları yaklaşık 12 μm 'dir. Spermatogonyumlar bölündükleri zaman büyük çekirdeklere sahip, fakat kromatini spagettiye benzeyen daha büyük olan primer spermatisit hücrelerini meydana getirirler. Primer spermatisitler 10-22 gün sonra, mayoz bölünme geçirirler ve daha ufak olan sekonder spermatisitleri oluştururlar (Carlos, 2009). Sekonder spermatisitler nadir görülür ve oluştukları anda bölünerek spermatidleri meydana getirirler. Bu esnada spermatidler sertoli hücrelerine tutunurlar (Ovalle ve Nahirney, 2009)

Sertoli hücreleri, spermatogenez serisindeki hücreleri çevreleyen uzun ve sütuna benzeyen hücrelerdir. Bu hücrelerin tabanı bazal lamina üzerine oturur, tepe kısımları seminifer tübül lümenine ulaşır (Carlos, 2009).

Spermatidler bölünme olmaksızın lümeneye bırakılır ve efferent kanallara geçecek olan spermatozoonlara dönüşürler (Ovalle ve Nahirney, 2009).



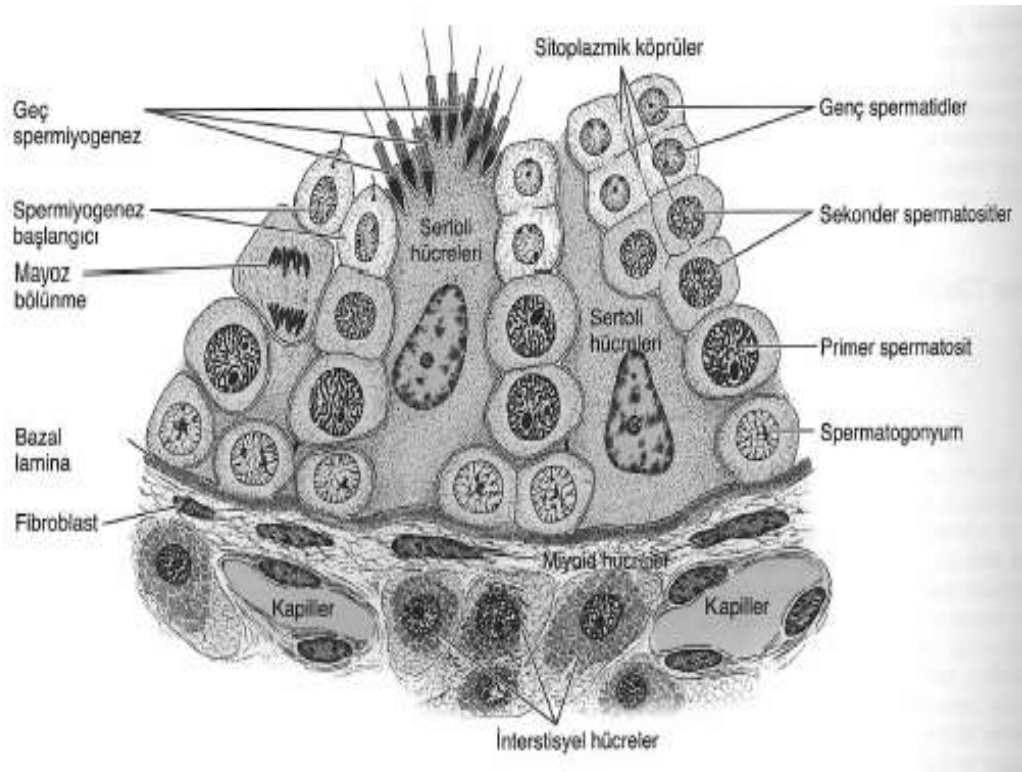
Şekil 6: Seminifer tübül epiteli. Carlos (2009) dan modifiye edilmiştir.

2.2.5. Sertoli Hücreleri

Destek hücreleri ya da sustentaküler hücreler de denir. Puberteden sonra sertoli hücreleri çoğalmaz (Pawlina R, 2010)

Sertoli hücreleri seminifer tübülün iskeletini şekillendirirler. Seminifer tübülün bazal membranından lümenine kadar uzanan düzensiz sınırlara sahip, ince ve uzamış hücrelerdir (Demir R, 2014).

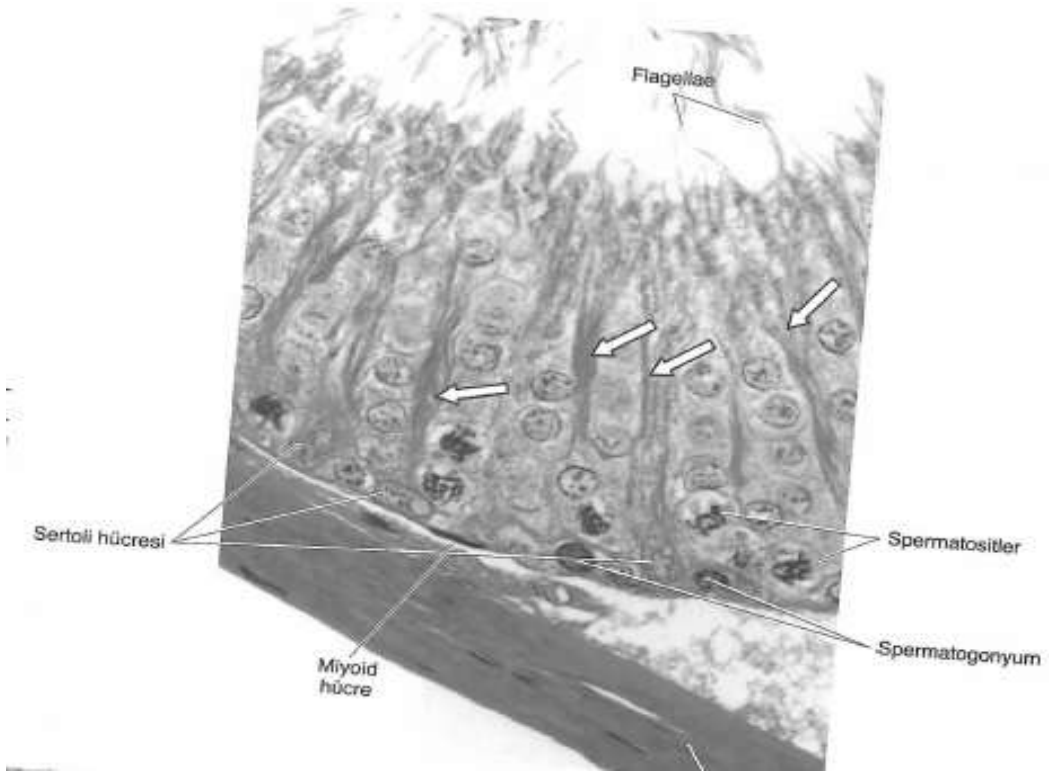
Spermatozoonların desteklenmesinde ve olgunlaşmasında görevlidirler. Ergenlik dönemi sonrası seminifer tübül epitelindeki hücrelerin %10'u sertoli hücresidir. Işık mikroskopunda, spermatogenik seri hücrelerini saran çok sayıda yan uzantının olması nedeniyle sertoli hücrelerinin sınırları güçlükle ayırt edilir.(Carlos, 2009)



Şekil 7: Seminifer tübül ve çevresindeki dokunun bir bölümü. Carlos (2009) dan modifiye edilmiştir.

Her hücrede sınırları belirsiz ökromatik bir çekirdek ve belirgin bir çekirdekçik vardır. Sitoplazmada ise hücre iskeleti elemanlarından mikrotübüller ve ara filamanlar, ayrıca yassı mitokondriyumlar, belirgin olmayan bir düz endoplazmik retikulum (aER),

lipofuksin içeren lizozomlar ve çok sayıda lipit damlacığı vardır. (Ovalle ve Nahirney, 2009)



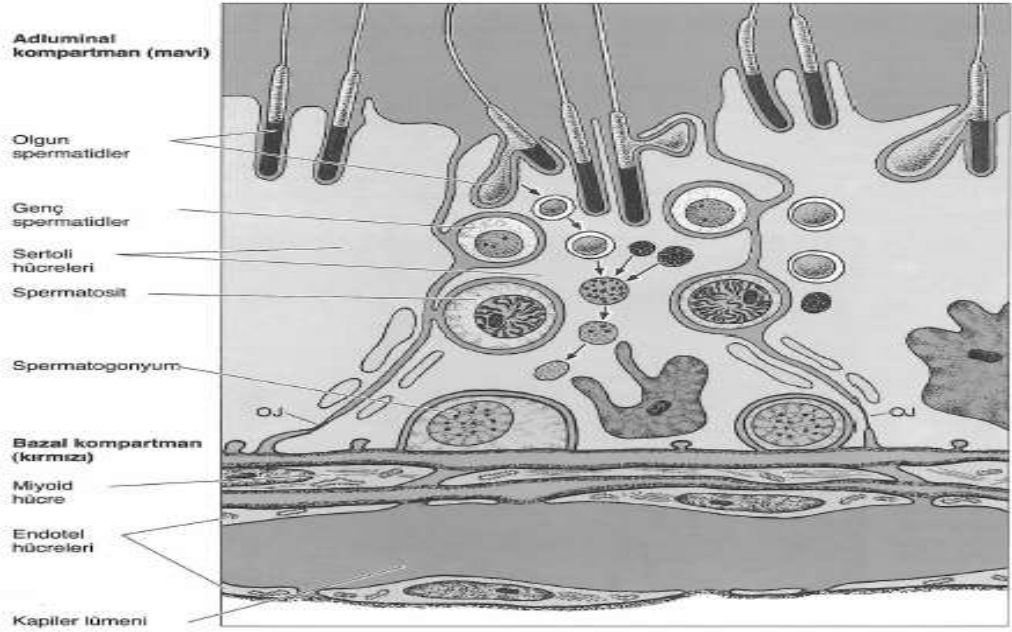
Şekil 8: Spermatogenik seri hücrelerinin görünümü. Carlos (2009) dan modifiye edilmiştir.

Yan yana dizilmiş sertoli hücreleri, hücrenin bazolateral yüzeyinde bariyer oluşturan sıkı bağlantılar sayesinde kan-testis bariyerini oluştururlar. Bu bariyer, spermatogonyumlar ile primer spermatositleri daha tepede bulunan sekonder spermatositler ve spermatidlerden ayırır. (Carlos, 2009)

Sertoli hücrelerinin görevleri:

- Gelişme aşamasındaki spermatozoonları desteklemek, korumak ve beslenmesini sağlamak
- Fagositoz
- Salgılama-Androjen bağlayıcı protein (ABP) üretimi
- Anti-Müllerian hormon (AMH) üretimi
- Kan-testis bariyeri

- İnhibin B üretmek=Hipofiz bezindeki FSH (folikül uyarıcı hormon) üretimini engeller (Carlos, 2009, Abraham, 2006)



Şekil 9: Carlos (2009) dan modifiye edilmiştir.

2.2.6. Leydig Hücreleri (İnterstisyel Doku)

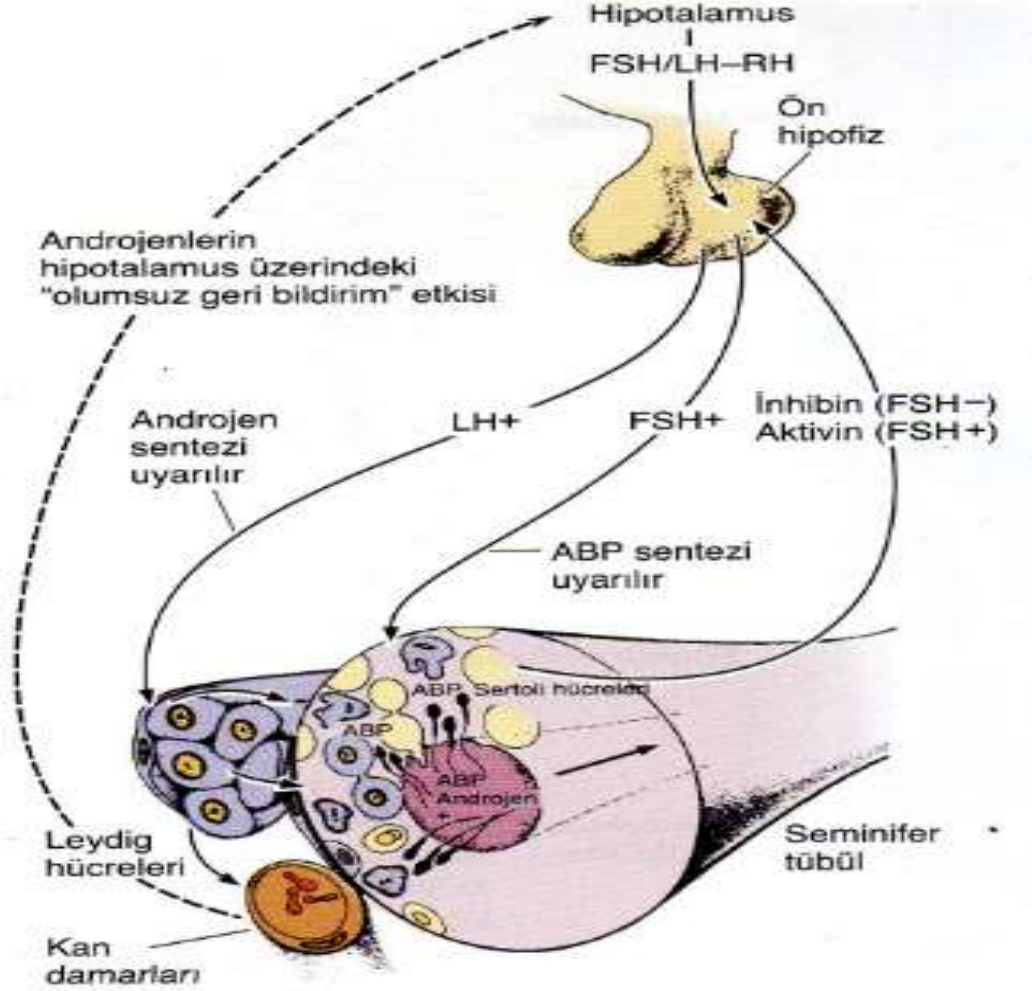
Seminifer tübüllerin arasında yer alan gevşek bağ dokusunda yuvarlak ya da çokgen şeklinde, merkezin dışında bir çekirdeği ve küçük lipid damlacıkları bulunan eozinofilik sitoplazmalı hücrelerdir. Hücre yüzeyinde çok sayıda mikrovillus vardır. Sitoplazmalarında aER vardır (Ovalle ve Nahrney, 2009). Gebeliğin 8. haftasında, erkeklik hormonu olan testosteronu üretirler (Sadler, 2011).

Leydig hücrelerinin hem görevleri hem de sayıları hormonal uyarılara bağlı olarak değişir. Hamilelik esnasında plasentadan üretilen gonadotropik hormon, anneden kan yoluyla fetüse geçer ve androjenik hormonları üreten çok miktarda fetal testis intertisyel hücreleri etkinleştirir. Erkek genital organların embriyonik değişimi için bu hormonlar gereklidir (Carlos, 2009)

2.2.7. Spermatojenezi Etkileyen Faktörler

Hipofizden salgılanan FSH ve lüteinleştirici hormon (LH) testis üzerinde etkilidir. Bu hormonlar, testosteron üretimini uyarırlar.

FSH=Sertoli hücrelerinde de etkilidir. Adenilat siklazı uyarır, böylece cAMP seviyesini artırır. Androjen bağlayıcı protein yapımını ve salgısını uyarır. Bu protein, testosteronu bağlar ve seminifer tübüllerin lümenine taşır (Carlos, 2009)

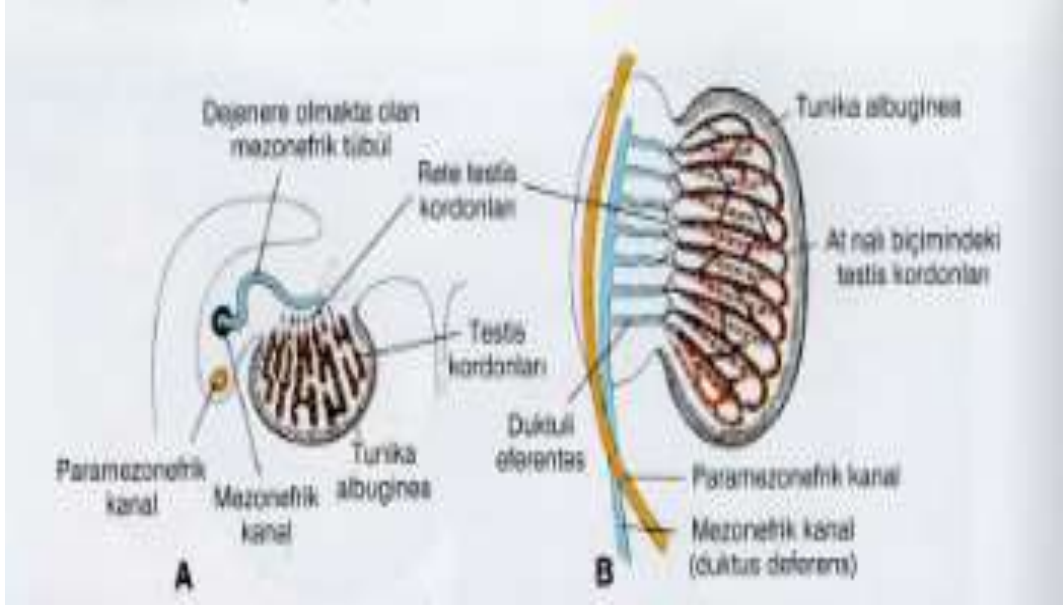


Şekil 10: Erkek üreme sisteminin hipofiz tarafından kontrolü. A Textbook of Histology 10th ed. Saunders (1975) den modifiye edilmiştir.

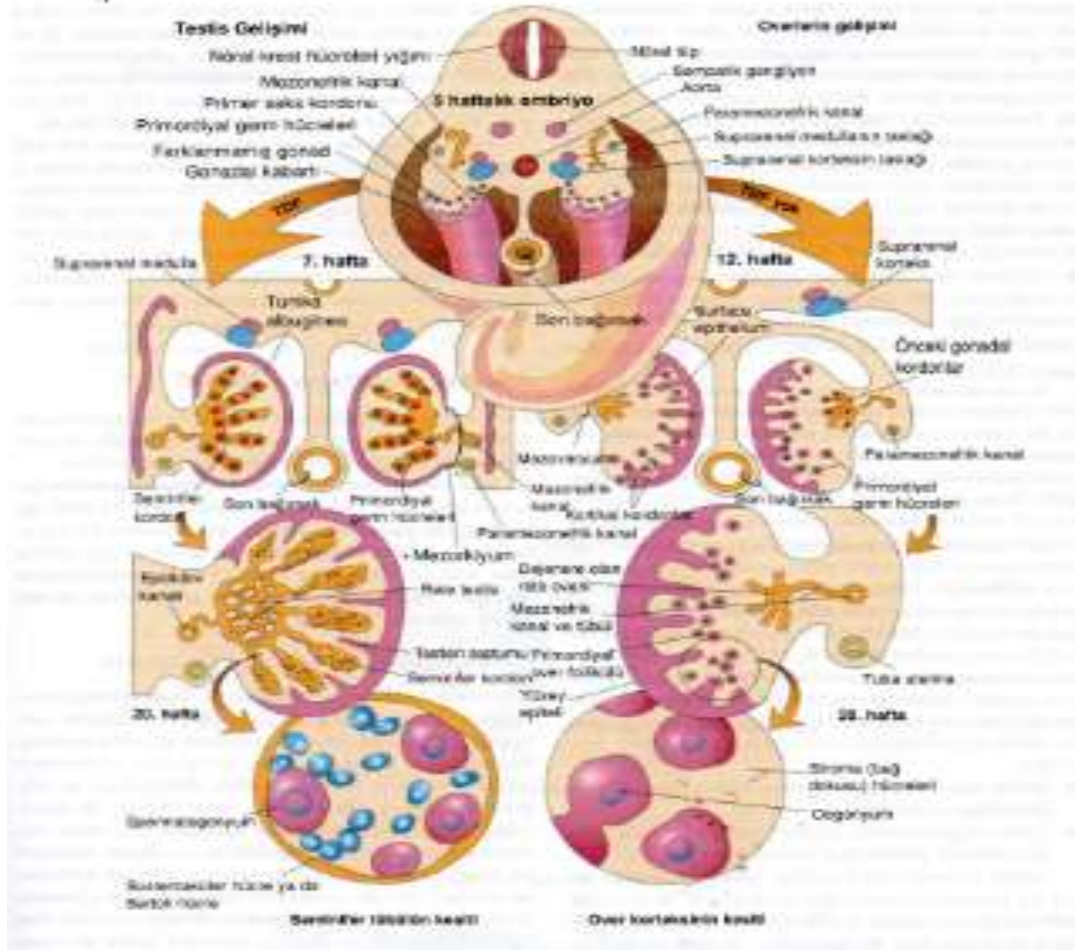
2.3. Testis Embriyolojisi

Testisler, seks kromozom kompleksinde normal görünümlü bir Y kromozomuna sahip embriyolarda gelişirler (Moore, 2009). XY kromozom kompleksine sahip olan embriyo genetik olarak erkektir. Y kromozomunun kısa kolunda testis belirleyici faktörü kodlayan SRY geni bulunur. (Sadler, 2011). SRY geni, farklılaşmamış gonadın gelişimini bir testise yönlendirir. Testiküler tayin yapabilmek için transkripsiyon faktörü SOX9'un ekspresyonu da olmalıdır (Moore, 2009). Primitif cinsiyet kordonları SRY geninden dolayı

testis ya da meduller kordonları oluşturmak amacıyla çoğalmaya devam ederler, medullanın derinliklerine geçerler. Sonra kordonlar bez yapısının hilusuna, sonra rete testis tübüllerini meydana getirecek olan küçük hücre sıraları halinde bir ağ oluşturacak biçimde dağılırlar. Gelişimin ileri aşamalarında tunika albuginea, yoğun fibröz bağ dokudan oluşan ve kalın olan kapsül yapısındadır. Fetüste testiküler gelişim için karakteristik bir özelliktir (Sadler, 2011).



Şekil 11: A. Testisten geçen ve tunika albuginea, testis kordları, rete testis ve primordial germ hücrelerini gösteren transvers kesit. B. Testis ve genital kanalın 4. aydaki görünümü. Langman (2012) dan modifiye edilmiştir.



Şekil 12: Tunika albuginea, testis kordonlarını yüzeydeki epitelyum dokudan ayırır. Moore (2009) dan modifiye edilmiştir.

Testis aşamalı şekilde bozulan mezonefroza ayrılır, kendi mezenteriyale (mezorkiyum) kalır. Seminifer kordonlar düz tübüllere (tubuli rekti), seminifer tübüllere ve rete testise dönüşürler (Moore, 2009). Testis kordonları gelişimin 4. ayında at nalı biçimindedir. Bu nalın açık olan uçları rete testisle devam eder. Bu aşamada testis kordonları sertoli destek hücrelerinden oluşur. Testis kordonlarının arasında interstisyel leydig hücreleri vardır. Bu hücreler kordonlar farklılaşmaya başladıktan kısa bir süre sonra gelişim göstermeye başlarlar (Sadler, 2011). Leydig hücrelerini oluşturan mezenşim ile seminifer tübüller ayrılmışlardır. Leydig hücreleri gebeliğin 8. haftasında mezonefrik kanalların ve dış genital organların farklılaşmasını sağlayan androjenik hormonlar - testosteron ve androstenedion- üretimine başlarlar. Testosteron üretimi human koryonik gonadotropin tarafından uyarılır. Ayrıca fetal testis antimüllerian hormon ya da müllerian inhibe edici madde (MIS) denilen bir glikoprotein üretir (Moore, 2009). MIS,

ergenliğe kadar bulunan sertoli hücreleri tarafından üretilir. Aynı zamanda uterus ve tuba uterinaları meydana getiren Müller kanallarının gelişimini engeller. Ergenlik döneminde testis kordonlarının lümenleri açılır ve seminifer tübüllere dönüşürler. Sonra seminifer tübüller rete testis tübülleri ile birleşirler ve duktuli efferenteslere girerler. Daha sonra duktuli eferent rete testis ile birlikte mezonefrik ya da wolf kanalları birbirine bağlarlar (Sadler, 2011).

Seminifer tübül duvarlarında 2 tür hücre vardır

- Sertoli hücreleri (destekleyici hücreler)
- Spermatogonyumlar

2.3.1. Genital Kanalların Gelişimi

Wolf kanalları (Mezonefrik kanal) ve Müller kanalları (Paramezonefrik) erkek ve dişi embriyolarında bulunan iki çift genital kanallardır (Moore, 2009).

Wolf kanalları erkek üreme sisteminin gelişimi açısından önemlidir.

2.3.2. Erkek Genital Kanal ve Bezlerinin Gelişimi

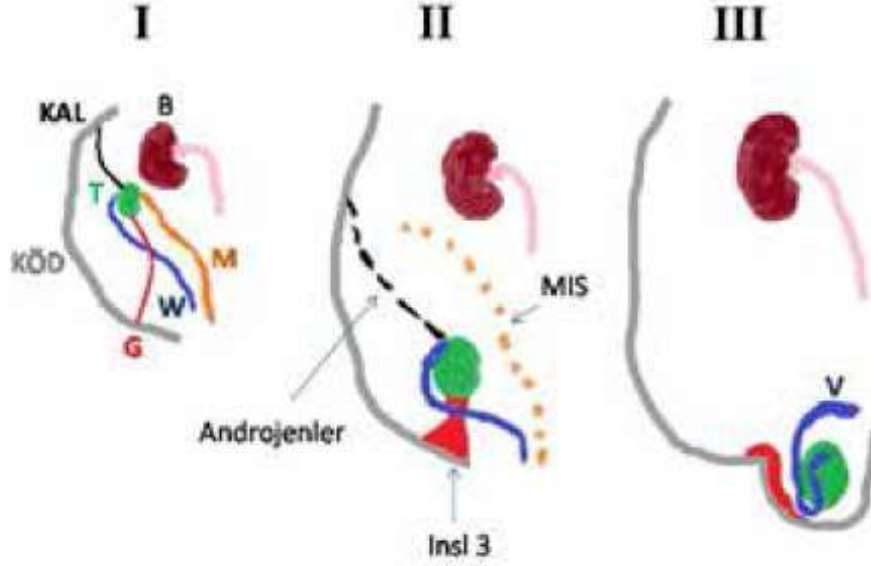
Testosteron ve MIS, fetal testis tarafından üretilir. Testosteron hormonu erkek genital kanallarını oluşturmak amacıyla Wolf kanallarını uyarır. MIS, epitelyal-mezenşimal dönüşüm ile Müller kanallarının yok olmasına neden olur. Mezonefroz bozulurken, bazı mezonefrik tübüller efferent kanalcıklara dönüşür (Moore 2009).

Efferent kanalcıklar epididimis kanalına dönüşen Wolf kanalına açılırlar. Sonra Wolf kanalı kalın, düz bir kas ile çevrelenir ve duktus deferense dönüşür. Wolf kanallarının kaudal kısmında lateral çıkıntılar vardır ve bu çıkıntılar seminal bezi (vezikül) oluşturur. Seminal bezin salgıları spermilerin beslenmesini sağlar. (Sadler, 2011)

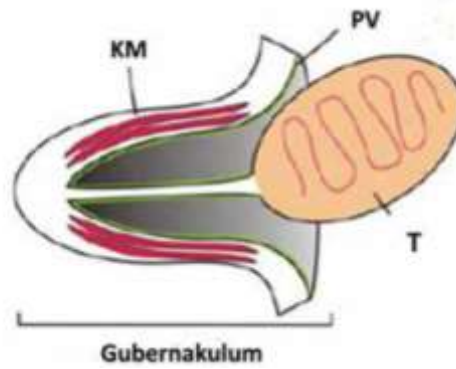
2.3.3. Testislerin İnisi

Testisin kaudal kısmından dışa doğru çıkıntı ve ekstraselüler matriks açısından zengin, yoğun mezenşimal yapıya gubernakulum denir (Sadler, 2011). 26. haftaya doğru, testisler karın arka duvarından inguinal halkalara inmiştir. Testislerin inisi androjenlerce

kontrol edilir. Gubernakulum da bu iniş sırasında rehberlik eder. Testislerin skrotuma inişi yaklaşık 2-3 gün sürer (Moore, 2009). İnme esnasında, testisler aorta tarafından beslenmeye devam ederler (Sadler, 2011). Testisler, gebelikte 12. haftada inguinal bölgeye gelir. 28. haftada inguinal kanaldan geçer ve skrotuma 33. haftada ulaşır (Sadler, 2011).



Şekil 13: Testisin perirenal pozisyondan skrotal pozisyona inişi esnasındaki olayların şematik özeti. Langman (2011) den modifiye edilmiştir.



Şekil 14: İnguinoskrotal iniş sırasında gubernakulumun görünümü. Langman (2011) den modifiye edilmiştir. T, testis; PV, prosesus vajinalis. KM: kremaster kası

2.4. Metotreksat

Metotreksat (MTX), 4-amino-4-deoksi-10-N-metilpteroilglutamik asit yapısına sahiptir. Folik asit antagonistidir. Yıllardır malign tümörlerin kemoterapisi için kullanılan bir ajandır. Uzun süre kullanılan MTX, hücre döngüsünün 'S fazı' üzerinde sitotoksik etki uygular ve hücre bölünmesini engeller. (Armağan ve ark, 2008; Sayılmaz ve ark, 2016)

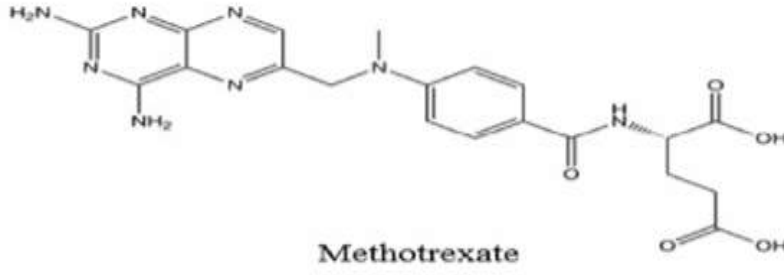
Kanser kemoterapisi için kullanılan ilaçların çoklu organ sistemlerinde akut toksik yan etkiler ürettiği bilinmektedir. Çoğunlukla etkilenen organlar kemik iliği, mide ve bağırsağa ait alanlar, mukozal membranlar ve kıl folikülü gibi kendiliğinden yenilenen hücre popülasyonları içeren organlardır.(Vardı ve ark, 2009)

MTX, akut lenfoblastik lösemi, osteosarkom, koryosarkom, non-Hodgkin lenfoma ve lenfoma, göğüs kanseri, baş-boyun kanseri ve neoplazik olmayan romatoidartrit ve sedef hastalığı gibi çeşitli neoplazilerin tedavisinde kullanılır. (Cole ve ark, 2006; Nouri ve ark, 2009)

MTX ile indüklenen sitotoksosite, tümör hücreleri ile sınırlı değildir; fakat MTX'in endojen oksidan sistemleri ve iltihap yollarıyla indüklenerek de hareket edebileceği hayati organları etkileyebilir. (Azza ve ark, 2014). MTX'in testiküler toksisitesi infertilite açısından önemli bir yan etkidir. Spermatogenez boyunca hayvanlarda hücresel ve moleküler özellikler üzerinde antikanser ilacına maruz kalımdan sonra gonadal hasarı değerlendirmek için kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. MTX, özellikle gonadları hedef alır ve erkek infertilitesine neden olur. Erkeklerin MTX'e maruz kalması oligospermiye yol açan hücresel kromozomal değişikliklere yol açar.(Armağan ve ark, 2008; Azza ve ark, 2014)

MTX uygulaması; sperm sayısının azalmasına, testisin seminifer tübüllerinde düzensizliğe ve sperm DNA hasarına neden olur.(Sönmeza ve ark, 2016)

MTX kaynaklı toksisite mekanizmaları henüz tam olarak belirlenmemiştir. (Daggulli ve ark, 2014)



Şekil 15: Metotreksatın kimyasal yapısı. Sönmeza ve ark (2016) ‘dan modifiye edilmiştir.

2.5. Kök Hücre

Bir başka hücreye farklılaşabilen hücrelerdir. Kök meristeminin ucunda, hızlı bölünme yeteneğine sahiptirler. Organizmayı oluşturan ilk hücreler için de kök hücre denilebilir.

İnsan da 5-6 günlük bir blastokistin iç hücre kütesinde (İHK) bulunan hücelere embriyo kök hücresi denir. Bunlar embriyo gövdesinde bulunan tüm hücre tabakalarını ve bunlardan meydana gelecek olan doku ve organ sistemlerini oluşturma yetkinliğine sahiptirler. (pluripotent) Embriyonun gövdesi dışına çıkarıldığında deneysel yöntemlerle farklılaşmaları ve dokulardaki hücelere benzer hücelere dönüşmeleri olasıdır. Fakat yüksek telomerez enzim aktivitesi sonucunda kontrolsüz çoğalma ile tümör hücelerine de dönüşebilirler.

Gelişme aşamasındaki organizmada embriyo kök hücelerinin varlığı söz konusu değildir. Fakat kemik iliği, çeşitli organlar ve organların belirli doku bölgelerinde, gerekli durumda kendini çoğaltan, kararlanabilen ve farklılaşabilen hüceler vardır. Bunlara yetişkin kök hüceler (YKH) ya da dokuya özgü kök hüceler denir. Yetişkin kök hücelere örnek olarak; derideki epidermisi yenileyen kök hüceler, bağırsak epitelini yenileyen kök hüceler ya da kan hücelerini yenileyen hematopoetik kök hüceleri verilir. Bunlar pluripotent özelliğe sahip değildirler. Bu yüzden daha sınırlı sayıda hücre türüne farklılaşma söz konusudur.

Kök hüceler kendi aralarında çoğalma ve farklılaşma yeteneklerine göre hiyerarşik bir sınıflandırmada değerlendirilirler.

Kök hücrelerin bir kısmı plasenta, amniyon zarı ve göbek kordonu gibi embriyo dışı dokulardan elde edilirler. Bunlara fetüs kök hücreleri denir. Fetüs kök hücreleri, fetüse zarar vermeden hamilelik süresince ya da doğum anında kolayca ve etik sorunlara yol açmadan elde edilebilirler. Kök hücreler;

- a) kendini yenileme
- b) farklı hücrelere farklılaşma yetkinliği (potensi)
- c) klon oluşturma yeteneği (klonalite) sahiptirler.

Embriyo kök hücreleri, çok kısa ömürlüdürler. Hızlı bir şekilde embriyo gövdesini meydana getiren katmanlara farklılaşırlar. (gastrulasyon)

Kök hücrelerin ortak özellikleri

1. Dokularda az sayıda bulunurlar.
2. Hayat boyu belirli oranda bölünürler ve bölündükleri zamanda sayılarını korurlar.
3. Bölünme sonucu oluşan iki yavru hücreden en az bir tanesi kök hücre olarak mevcut olan hücre havuzuna katılırlar.
4. Çok kez bölünüp geçici (transit) hücreleri meydana getirirler. Bu hücrelerde kısa sürede farklılaşarak dokuya özgü olan farklılaşmış hücreleri oluştururlar.
5. Genelde bölünme hızları yavaştır, fakat doku yaralanması sonucunda bölünme etkinlikleri yoğunlaşır.
6. Yaşam boyu varlıklarını korurlar, fakat yaşla beraber sayıları azalır. Dokulardaki en uzun süre yaşayan ve en kalıcı olan hücrelerdir.
7. Sinyal moleküllerine ve büyüme faktörlerine duyarlıdır ve hızlı şekilde yanıt verirler.
8. Embriyo ve yetişkindeki kök hücreler Go evresini hızlıca geçerek hücre döngüsünü çok çabuk tamamlarlar.
9. Diğer hücrelere kıyasla farklı kromatin örüntüsüne sahiptirler.

10. Strese karşı dayanıklıdırlar.

a) Kök hücrenin kendini yenileme özelliği:

Kök hücrelerin kendini yenilemesi demek eskiyen organellerini onarması demek değildir. Kök hücre havuzunu yenilemesi demektir.

b) Farklılaşma yetkinliği (potensi)

Bir hücrenin farklılaşması başka bir hücreyle karşılaştırıldığında anlam kazanır. Farklılaşma ileriye ve geriye dönük olmak üzere iki şekilde incelenir. Deneysel olarak elde edilen uyarılmış pluripotent kök (uPK) hücreler ileriye ve geriye farklılaşmanın gerçekleştiği en bilinen örneklerdir. Hematopoetik kök hücreler, farklılaşma teriminin en iyi bilinen örnekleridir.

c) Klon oluşturma yeteneği (klonalite)

Bir hücreden çok sayıda yeni kök hücrenin meydana gelmesidir. Kök hücreler arasındaki karşılaştırmalarda; klonun büyüklüğü ve klon oluşturma hızı gibi ölçütler kullanılır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Hücre kültürü basamakları Adnan Menderes Üniversitesi (Adü) Merkez Araştırma Laboratuvarında, Hayvan deneyleri aşaması ise Adü Hayvan Deneyleri Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Dokuların histokimyasal boyaması Adü Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji laboratuvarında gerçekleştirildi. Akım sitometri analizi Adü Uygulama ve Araştırma Hastanesi'nde yapıldı. İmmünofloresans görüntüleme ise Adü Veteriner Fakültesi'nde yapıldı.

3.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Deney Grupları

Çalışmalarda tercih edilen deney hayvanı olan 350- 400 gram ağırlığında erkek Sprague Dawley ratlardan 24 adedi çalışmada, 5 sıçan ise kök hücre elde edilmesinde kullanılacaktır.

24 sıçan rastgele kontrol, metotreksat+ kök hücre ve metotreksat grubu olmak üzere üç gruba ayrılacak. 5. günde sıçanlar anestezi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edileceklerdir (Şener ve ark, 2006).

Kontrol grubundaki 6 sıçana bir şey verilmeyecek. Kök hücre grubundaki 6 sıçana intraperitoneal 20 mg/kg metotreksat verildikten 30 dakika sonra 1×10^6 mezenkimal kök hücre 1ml Minimum essential medium (MEM) içerisinde seminifer tübüllerin lümenine verilecektir (Çakıcı ve ark, 2013). Metotreksat grubuna ise intraperitoneal olarak 20 mg/ kg olacak şekilde MTX verilecek (Şener ve ark (2006); Sheikhabaei ve ark, 2016). Sakrifiye edildikten sonra testis dokusu alınarak histokimyasal olarak incelenecek.

Grupların Oluşturulması:

Kontrol Grubu (K): 23 ± 2 °C, %45-65 nem ve 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ortamda, yem ve suyun *ad libitum* sağlandığı koşullarda 6 adet erkek sıçan takip edildi. Sıçanlara anestezik madde (Ketamin+Ksilezin) intraperitoneal şekilde verilerek servikal dislokasyon ile sakrifiye edilerek testisleri çıkartıldı ve Bouin solüsyonu içerisine konuldu.

Kök Hücre Grubu (KH Grubu): 23 ± 2 °C, %45-65 nem ve 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ortamda, yem ve suyun *ad libitum* sağlandığı koşullarda 6 adet erkek sıçan takip edildi. 6 sıçana intraperitoneal 20 mg/kg metotreksat verildikten 30 dakika sonra 1×10^6 mezenkimal kök hücre 1ml MEM içerisinde seminifer tübüllerin lümenine verildi.

Metotreksat (MTX Grubu): 6 sıçana intraperitoneal 20 mg/kg metotreksat verilecektir.

3.2. Sıçan Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücre Elde Edilmesi

Mezenkimal kök hücre elde edilmesi için donör olarak 200- 250 gram ağırlığındaki 6 adet erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar ketamin (Alfamine, 10mg/ml) ve Ksilazin (Alfazyne, 20mg/ml) uygulaması ile anestezi altında sakrifiye edildi. %70'lik alkol ile ön ve arka ayakları steril edildi. Daha sonra steril makas ve bisturi ile sıçanların femurları çıkartıldı. Çıkarılan femurlar yumuşak dokularından temizlenip kemiklerin serbest hale gelmesi sağlandı. Önceden hazırlanan 40 ml PBS bulunan falkon tüplere yumuşak dokusundan temizlenen femurlar konuldu. Kök hücre kültür laboratuvarına kısa sürede götürüldü.

3.2.1. Hücre Kültür İşlemleri:

İşlemler için, Minimum Essential Medium (MEM) çekilmiş insülin enjektörleri kullanıldı. Her kemik için 1cc, toplamda ise hayvan başına 5-7 cc MEM kullanıldı. Femurun ortasından tutularak makas yardımı ile kemikler her iki uç kısmından kesildi. Kanal açılmış oldu. Medyumdan 5 ml çekilerek steril falkon tüplere (50 ml'lik) konuldu. Medyum konulan falkon tüpün kapağı açılarak uçları kesilen kemikler dik bir şekilde pens aracılığı ile falkon tüpün içerisine doğru tutuldu. Daha sonra önceden medyum çekilen insülin enjektörlerinin iğneleri bu kemiklerin kanalından içeriye doğru sokularak medyum içeriği kanaldan iç kısma doğru enjekte edildi. Kemik iliği içeriğine sahip olan falkon tüp 5-10 sn çalkalandı ve sonrasında 1250 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Çıkan süpernatant atıldı ve pellet üzerine medyum eklenerek tekrar 1250 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pellet üzerine tekrar 13 ml tam besi yeri eklenerek pipetaj yapıldı, T25 flakslara dağıtıldı. Bu durumda flakslara hücre ekimi yapılmış oldu. CO2 inkubatörüne kaldırılan hücrelerin üç günde bir medyumunu değiştirildi ve mikroskopta kontrol edildi. Üçüncü pasajın sonunda sayım yapıldıktan sonra hücreler donduruldu.

3.2.1.1. Red Floresan Proteinle (RFP) Mezenkimal kök hücrelerin işaretlenmesi

Çalışmamızda; MKH'lerin immunofloresan mikroskobunda görüntülenmesi için RFP (Sigma-Aldrich PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kits for General Cell Membrane Labeling) kiti kullanılmıştır. Önceden dondurduğumuz 8×10^6 mezenkimal kök hücre su banyosunda çözdürüldü. Her hücre için 5 ml olacak biçimde MEM (Minimum Eagle Medium) eklendi. 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı, her hücreye 5 ml olacak şekilde tekrar MEM eklendi. Daha sonra tekrar 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Ependorfa kitin içerisinde yer alan diluent C'den 0,8 ml eklendi ve pipetaj yapıldı. Santrifüj edilen hücrelerin süpernatantı atıldı ve ependorfa eklediğimiz diluent C solüsyonu pellete eklenerek pipetaj yapıldı. Başka bir ependorfa diluent C den 1 ml alınıp, boya solüsyonundan 4 mikrolitre eklenerek pipetaj yapıldı. Yukarıdaki karışımdan 800 mikrolitre alınarak hücrelere eklendi. Hücrelerin üstüne 1,6 ml FBS(Fetal Boin Serum) eklenip 1 dakika bekletildi. 6 ml tam besiyeri eklendi. Daha sonra 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatantı atıldıktan sonra 6 ml tam besiyeri eklendi ve tekrar santrifüj edildi. Son olarak tekrar süpernatant atıldı ve her hayvan başına 1ml içerisinde 1×10^6 olacak şekilde toplam 8 ml tam besiyeri eklendi. Sıçanlara mezenkimal kök hücreler kuyruk veninden verildi.

3.2.1.2. Hücre canlılık testi

Kültür edilen hücreler tripsin ile muamele edildikten sonra petrilere ayrılarak 5 dakika 1250 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve geriye kalan pellet kısmına PBS ile pipetaj yapıldı. Sonra Tripkan Blue ile 1/1 oranında dilüe edilerek geliştirilmiş Neubauer lamı kullanılarak hücre sayımı yapıldı.

3.2.1.3. Mezenkimal kök hücrelerin akım sitometrik analizi

Akım sitometride mezenkimal kök hücrelerin yüzey markerlarının ekspresyonunu analiz etmek amacıyla CD 11b, CD 29, CD 45, CD 90 ve CD 34 antikorları kullanıldı. Amaç süspansiyon haline gelmiş hücrelerin mezenkimal kök hücre olup olmadığının gerekli monoklonal antikorlar kullanılarak analiz etmektir. Erken dönem pasajlara ait mezenkimal kök hücre dizisi yüzey ekspresyon işaretçileri açısından akım sitometrik analiz kullanılarak tanımlandı. Kültür kabının yüzeyine tutunan mezenkimal kök hücreleri %0.25 tripsin-edta (tripsin etilendiamin tetraasetikasit) ile yüzeyden kaldırıldıktan sonra kültür medyumunu

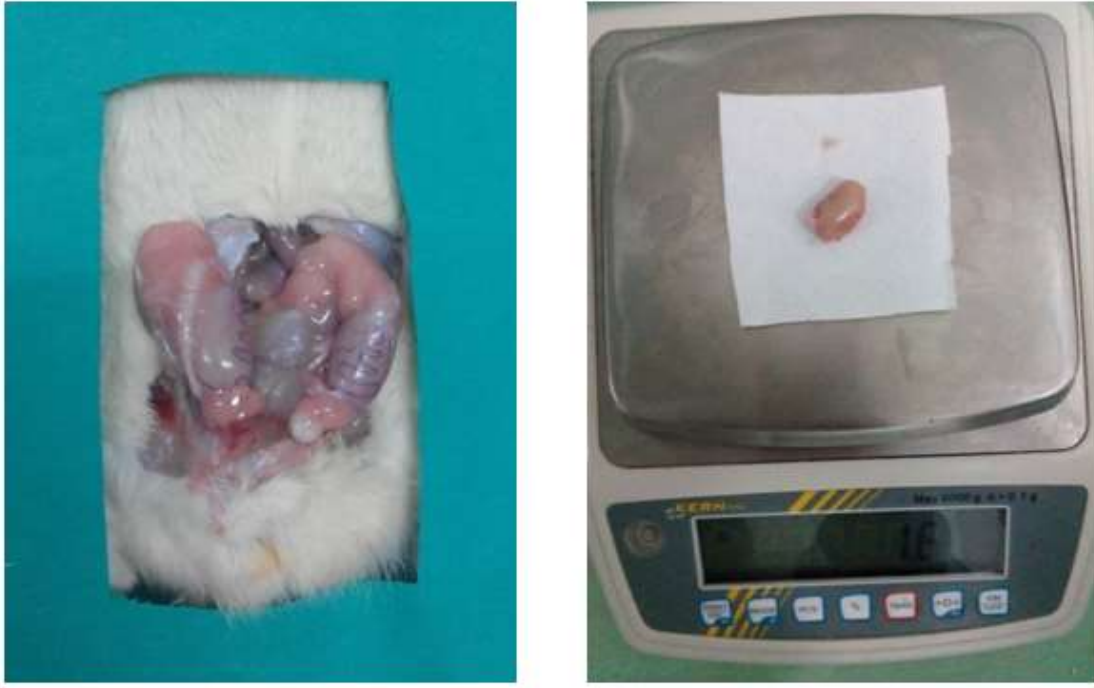
içeren tüplere aktarılıp santrifüj edildi. Santrifüj ve PBS'le yıkama sonrası pellet çözüldü ve hücreler sayıldı. Daha sonra 1×10^6 olacak şekilde PBS içerisinde süspansiyon edildi. Belirlenen hücre yüzey işaretçilerine özel fluorescein isothiocyanate (FITC) konjuge monoklonal CD 11b, CD 29, CD 45, CD 90 ve CD 34 antikorları % 3 BSA içeren PBS içerisinde ($1 \mu\text{g/ml}$ olacak biçimde) oda sıcaklığında, karanlıkta, 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası %0.1 sodyum azide içeren yıkama solusyonu eklendi ve 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek temizlendi. Hazırlanan hücre süspansiyonu FACS Calibur Akım Sitometri (BD Sciences) cihazında okutuldu ve analizi BD Cell Quest™ software programı ile yapıldı.

3.3. İmmunofloresan İnceleme

Kök hücre verilen sıçanlardan alınan doku örnekleri tespit edildikten sonra parafine gömülüp örnekler, $5 \mu\text{m}$ 'lik kesitler şeklinde lam üzerine alındı. Sonra ksilolde deparafine edildi ve alkol serilerinden geçirildi. PBS ile yıkama işlemi yapıldı. 10 dakika Metanol ile karanlık ortamda bekletilerek PBS ile 3 kere yıkandı. Sonra PBS içerisinde 1/1000 oranında dilue edilen DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) boyasında 10 dakika bekletildi. Tekrar PBS ile 3 kere yıkandı. Lam üzerine mounting medyum damlatılarak lamel ile kapatıldı ve dokular floresan mikroskopta görüntülendi.

3.4. Dokuların Elde Edilmesi

Çalışmamız Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 17.01.2017 tarih ve 2017-012 sayılı karar numarası ile onay alınarak yapılmıştır. Çalışma için, Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel laboratuvarında "*Sprague Dawley*" cinsi sıçanların testisleri alındı. Doku örnekleri Bouin solusyonu içerisinde 4 saat bekletildi.



Resim 1: Dokuların elde edilmesi.

3.5. Işık Mikroskopik İnceleme için Dokuların Takibi

Dokular içerisinde bir miktar Bouin solüsyonu enjekte edildi. Daha sonra doku örnekleri Bouin solüsyonu içerisinde 4 saat bekletildi. 4 saat sonucunda doku örnekleri trimlendi ve %50, %60 ve %70'lik alkol serilerinden geçirildi. %70'lik alkolde 24 saat bekletildikten sonra tespit işlemi yapıldı. Uygulama için hazırlanan dokular takip cihazında (Leica TP 1010) 12 saat süreyle rutin doku takibi işlemine tabi tutularak her hayvana ait parafin bloklar hazırlandı. Parafin bloklar hazırlamak için kullanılan doku takip yönteminin basamakları Tablo X'de gösterilmiştir. Gömme işleminden sonra her bir parafin bloktan, tam otomatik, rotary mikrotom (Leica RM 2265, Germany) yardımıyla Feather Mikrotom bıçağı (35S) ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Elde edilen kesitlere hematoxilen-eozin boyama (H-E) ve Periyodik-Asit Schiff (PAS) boyama yapıldı. Görüntüler Olympus -BX50 mikroskobu ile alındı.

Tablo 1: Işık mikroskobu doku takip yöntemi

Kimyasal	Süre
Bouin Solüsyonu	4 saat
%50 Alkol	2 saat
%60 Alkol	2 saat
%70 Alkol	24 saat
%10 Formaldehit	1.5 saat
%10 Formaldehit	1.5 saat
%80 Ethanol	1 saat
%80 Ethanol	1 saat
%95 Ethanol	1 saat
%95 Ethanol	1 saat
%100 Ethanol	1 saat
%100 Ethanol	1 saat
Ksilol	1.5 saat
Ksilol	1.5 saat
Parafin	1.5 saat
Parafin	1.5 saat
Gömme	

3.5.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

1) Parafin kesitler ksilolde deparafinize edildi. Azalan alkol derecelerinden 2 dakika süreyle geçirilerek distile suya kadar getirildi ve distile suda 5 dakika bekletildi.

2) Filtre edilmiş Mayer's Hematoksilen (Merck %37) solüsyonunda 5 dakika bekletildi.

3) Kesitler distile suda 1 dakika bekletilerek, hematoksilen fazlalıklarından arındırıldı.

4) Zıt boyama için Eozin-Y (HT110132 Sigma) solusyonunda 1 dakika bekletildi.

5) Dehidratasyon ve parlatma amacıyla 2'şer dakika yükselen alkol derecelerinde sırasıyla %80 ve %100 etil alkol serilerinden geçirildi.

6) Ksilolden geçirildi, Entellan-Nuevo (Merck Millipore) damlatıldı ve lam ile kapatıldı.

H-E boyama protokolü Tablo. 2' de gösterilmiştir.

Tablo 2: H-E boyama protokolü

Kimyasal	Süre
Ksilol	5 dakika
Ksilol	5 dakika
% 100 Alkol	2 dakika
%80 Alkol	2 dakika
Distile su	5 dakika
Hematoksilen	5 dakika
Distile su	1 dakika
Eozin	1 dakika
%80 Alkol	2 dakika
% 100 Alkol	2 dakika
Ksilol	5 dakika
Ksilol	5 dakika

3.5.2. PAS Boyama Protokolü

Tablo 3: PAS boyama protokolü

Kimyasal	Süre
Ksilol	6 dakika
% 100 Alkol	3 dakika
%96 Alkol	3 dakika
Distile su	1 dakika
Periyodik Asit	10 dakika
Distile su	1 dakika
Schiff	10 dakika
Akarsu ve Distile su	10 dakika
Hemotoksilen	1 dakika
Distile su	1 dakika
%96 Alkol	2 dakika
%96 Alkol	2 dakika
% 100 Alkol	3 dakika
Ksilol	3 dakika
Ksilol	3 dakika
Kapatma	

3.6. İstatiksel Analiz

Çalışmada yer alan seminifer tübül çapı ve seminifer tübül epitelyum çaplarının ölçümleri ortalama \pm standart sapma ($ort \pm s$) ve ortanca (min-maks: minimum-maksimum) ile ifade edilmiştir.

Veriler IBM SPSS Statistics 20 Programı kullanılarak analiz edilmiştir. Araştırma sonuçlarına göre kontrol, kök ve MTX gruplarında hayvanların kiloları, sağ testis ağırlıkları ve sol testis ağırlıkları farklılık göstermemektedir ($P > 0,05$). Seminifer tübül çapı ve seminifer tübül epitel çapı ölçüm değerlerinin normal dağılıma uygunluğu Shaphiro Wilk

testi ile araştırıldı ve grupların normal dağılıma uyduğu gözlemlendi ($P>0,05$). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olup olmadığı tek yönlü ANOVA testi ile araştırıldı. Semifer tübül çapı ve semifer tübül epitel çapı ölçüm değerleri için gruplar arasında anlamlı farklılıklar gözlemlendi ve hangi gruplar arasında farklılıklar olduğunu belirlemek için Tukey ve Games Howell testleri uygulandı. Üç grup içinde birbirinden farklılık gözlemlendi ($P<0,05$).

Tablo 4: İstatistik sonuçları

Gruplar = Kontrol

One-Sample Testi						
Test Değeri = 0						
	t	df	Sig. (2-kuyruklu)	Ortalama farkı	95% Farkın güven aralığı	
					alt	üst
STC	90,811	59	,000	236,21167	231,0068	241,4165

a. gruplar = kontrol

One-Sample Testi						
Test Değeri = 0						
	t	df	Sig. (2-kuyruklu)	Ortalama farkı	95% Farkın güven aralığı	
					alt	üst
STEC	61,390	59	,000	68,07000	65,8513	70,2887

a. gruplar = kontrol

Gruplar = Kök

One-Sample Testi						
Test Değeri = 0						
	t	df	Sig. (2-kuyruklu)	Ortalama farkı	95% Farkın güven aralığı	
					alt	üst
STC	48,513	59	,000	218,86333	209,8360	227,8907

a. gruplar = kok

One-Sample Testi						
Test Değeri = 0						
	t	df	Sig. (2-kuyruklu)	Ortalama farkı	95% Farkın güven aralığı	
					alt	üst
STEC	39,501	59	,000	61,56500	58,4463	64,6837

a. gruplar = kok

Gruplar = MTX

One-Sample Testi

	Test Değeri = 0					
	t	df	Sig. (2-kuyruklu)	Ortalama farkı	95% Farkın güven aralığı	
					alt	üst
STC	32,467	59	,000	191,84333	180,0196	203,6671

a. gruplar = mtx

One-Sample Testi

	Test Değeri = 0					
	t	df	Sig. (2-kuyruklu)	Ortalama farkı	95% Farkın güven aralığı	
					Lower	Upper
STEC	25,790	59	,000	54,53833	50,3069	58,7698

a. gruplar = mtx

STC için Oneway ANOVA testi

Varyasyonların homojenliği testi

STC

Levene İstatistiği	df1	df2	Sig.
9,866	2	177	,000

ANOVA

STC

	Kareler toplamı	df	Ortalama kare	F	Sig.
Gruplar arasında	59991,881	2	29995,941	24,177	,000
Gruplar içinde	219602,849	177	1240,694		
Genel Toplam	279594,730	179			

Post Hoc Testleri

Çoklu Karşılaştırmalar

Bağımlı değişken : STC

	(I) gruplar	(J) gruplar	Ortalama farkı (I-J)	Std. hata	Sig.	95% Güven aralığı	
						Alt sınır	Üst sınır
Tukey HSD	kontrol	kok	17,34833*	6,43090	,021	2,1483	32,5484
		mtx	44,36833*	6,43090	,000	29,1683	59,5684
	kok	kontrol	-17,34833*	6,43090	,021	-32,5484	-2,1483
		mtx	27,02000*	6,43090	,000	11,8199	42,2201
	mtx	kontrol	-44,36833*	6,43090	,000	-59,5684	-29,1683
		kok	-27,02000*	6,43090	,000	-42,2201	-11,8199
Games-Howell	kontrol	kok	17,34833*	5,20759	,004	4,9476	29,7490
		mtx	44,36833*	6,45613	,000	28,9542	59,7825
	kok	kontrol	-17,34833*	5,20759	,004	-29,7490	-4,9476
		mtx	27,02000*	7,43430	,001	9,3579	44,6821
	mtx	kontrol	-44,36833*	6,45613	,000	-59,7825	-28,9542
		kok	-27,02000*	7,43430	,001	-44,6821	-9,3579

Oneway ANOVA for STEC

Varyasyonların homojenliği testi

STEC

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
8,500	2	177	,000

ANOVA

STEC

	Kareler toplamı	df	Ortalama Farkı	F	Sig.
Gruplar arasında	5495,901	2	2747,951	16,899	,000
Gruplar içinde	28782,144	177	162,611		
Genel toplam	34278,046	179			

Post Hoc Testleri

Çoklu Karşılaştırmalar

Bağımlı değişken: STEC

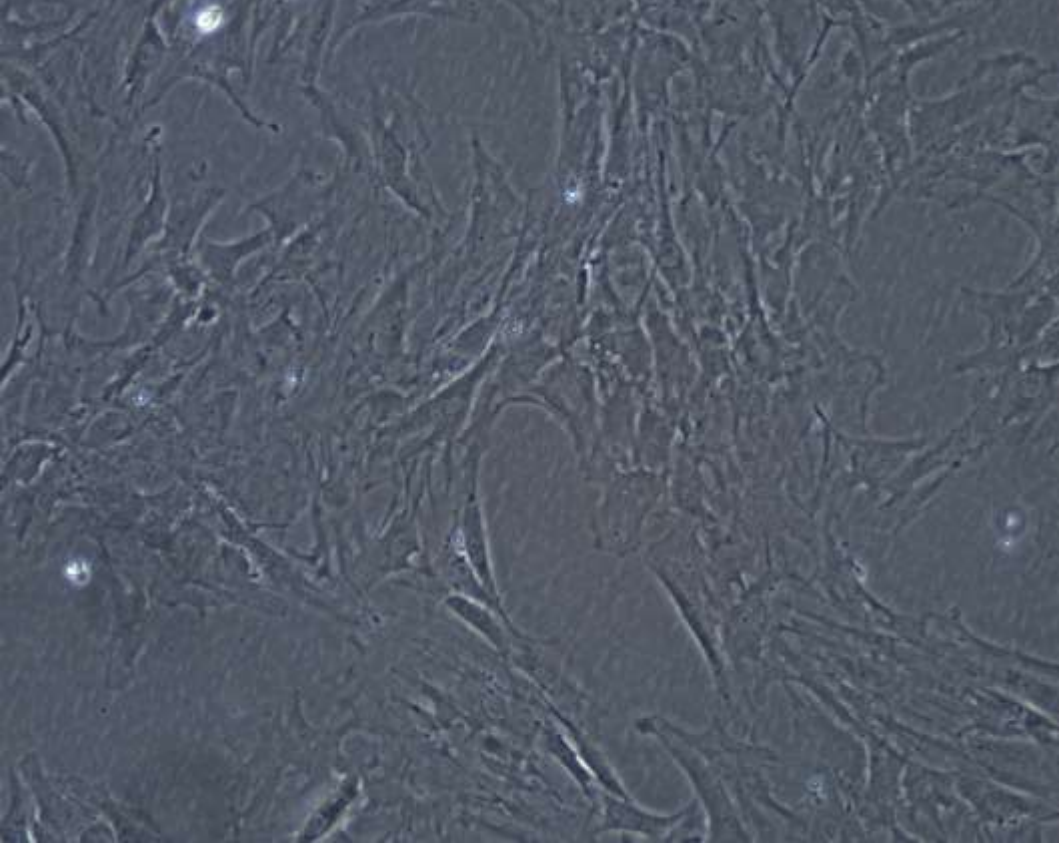
	(I) gruplar	(J) gruplar	Ortalama farkı (I-J)	Std.Hata	Sig.	95% Güven aralığı	
						Alt sınır	Üst sınır
Tukey HSD	kontrol	kok	6,50500*	2,32817	,016	1,0021	12,0079
		mtx	13,53167*	2,32817	,000	8,0288	19,0345
	kok	kontrol	-6,50500*	2,32817	,016	-12,0079	-1,0021
		mtx	7,02667*	2,32817	,008	1,5238	12,5295
	mtx	kontrol	-13,53167*	2,32817	,000	-19,0345	-8,0288
		kok	-7,02667*	2,32817	,008	-12,5295	-1,5238
Games-Howell	kontrol	kok	6,50500*	1,91276	,003	1,9585	11,0515
		mtx	13,53167*	2,38776	,000	7,8405	19,2228
	kok	kontrol	-6,50500*	1,91276	,003	-11,0515	-1,9585
		mtx	7,02667*	2,62699	,023	,7841	13,2692
	mtx	kontrol	-13,53167*	2,38776	,000	-19,2228	-7,8405
		kok	-7,02667*	2,62699	,023	-13,2692	-,7841

4. BULGULAR

4.1. Hücre Kültürü ve İmmünofenotiplendirilmesi

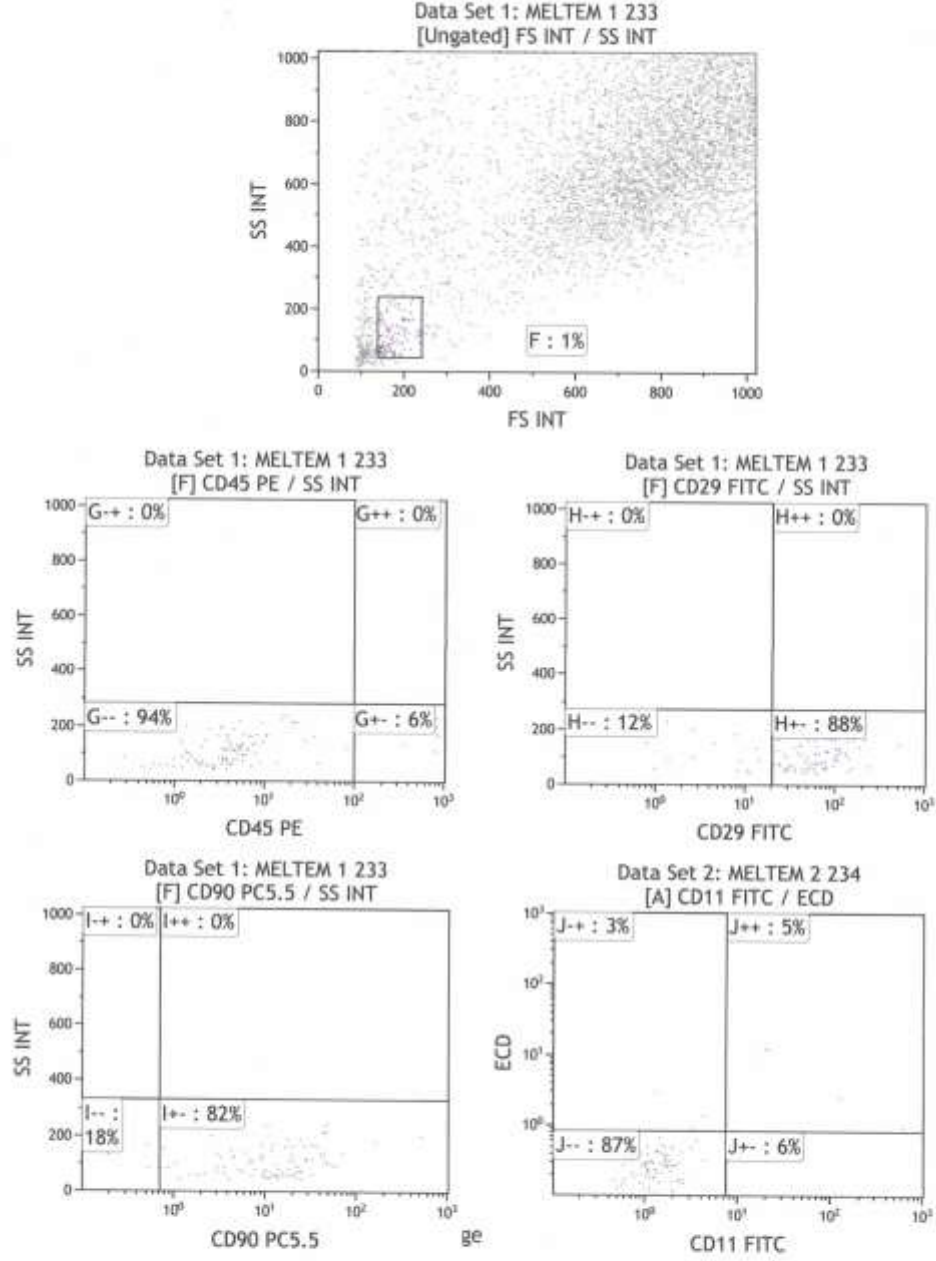
4.1.1. Sıçan Kemik İliğinden İzole Edilmiş Mezenkimal Kök Hücrenin Kültür ve İmmünofenotiplendirilmesi

Sıçan kemik iliği kaynaklı ve üçüncü pasajdaki mezenkimal kök hücrelerin morfolojik yapısı ışık mikroskopunda gösterildi (Resim 2).



Resim 2: Sıçan kemik iliği kaynaklı ve üçüncü pasajdaki mezenkimal kök hücrelerin morfolojik yapısı ışık mikroskopundaki görüntüsü.

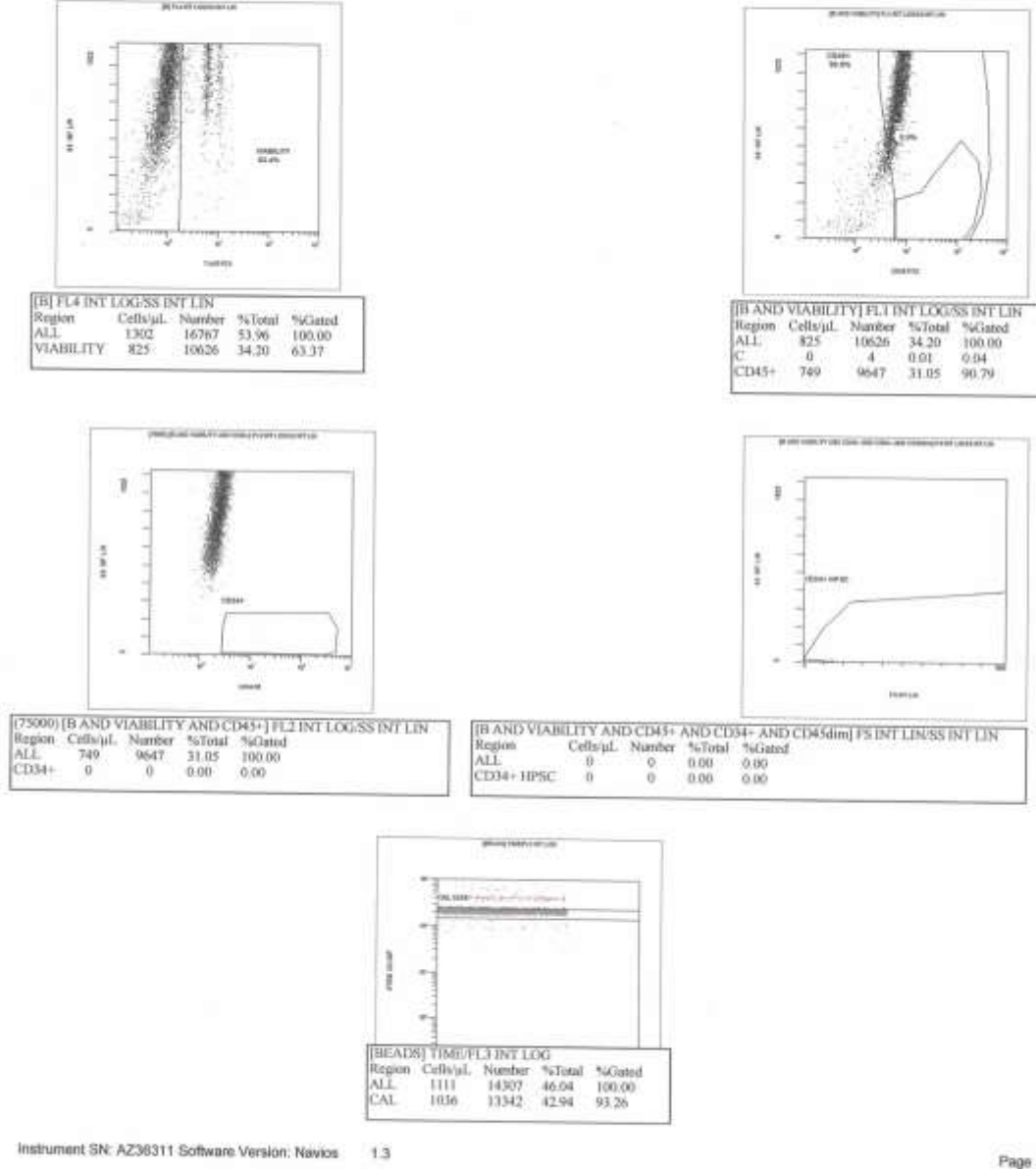
4.2. Kök Hücre Belirteçleri Kullanılarak Akım Sitometrisi İle Hücrelerin Mezenkimal Kök Hücre Olduğunun Gösterilmesi



Şekil 16: Kemikliğinden izole edilen MKH'lerin immünofenotipik özelliklerinin akım sitometri sonuçları

Sıçan kemik iliğinden izole edilen mezenkimal kök hücrelerin immünofenotipik karakteristik analizi için akım sitometri tekniği ile hematopoetik belirteçleri CD45 PE (%)

6,0) ve CD11b FITC (% 11,0) negatif ekspresyon gösterdiği tespit edilirken, stromal belirteçleri CD29 FITC (% 88,0) ve CD90 (% 82,0) Şekil 16'da görüldüğü üzere pozitif ekspresyon göstermiştir.

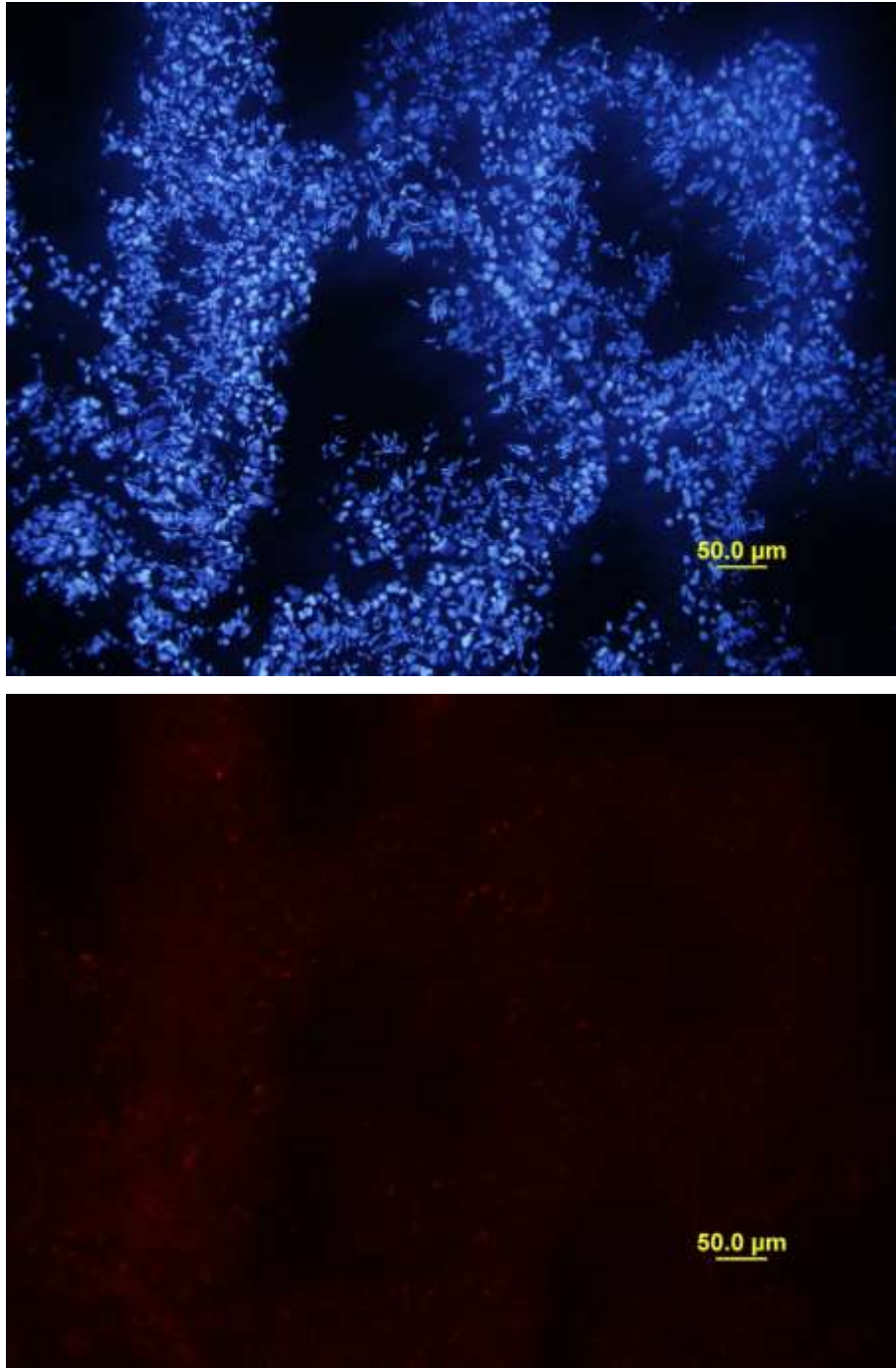


Şekil 17: Mezenkimal kök hücre verilmiş sıçan akciğer dokusundaki CD34 sayımı.

Şekil 17a'da totalde (%63.37) oranında canlı hücre sayıldı. Şekil 17b'de totaldeki canlı hücre içerisinde CD45 oranının (%90.79); Şekil 17d'de ise CD45 içerisindeki CD34 oranının (%0,00) olduğu görüldü.

4.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Varlığının RFP pozitifliği ile llmesi

MTX ve kök hücre verdiğimiz hücre grubuna ait sıçanlardan alınan örneklerde RFP ile işaretli mezenkimal kök hücrelerin fluoresan mikroskopta görüntülendi. RFP ve DAPI için farklı filtreler kullanıldı. Fluoresan mikroskopta (Leica DMI 4000 Microsystems) görüntüleme yapıldı (Resim 5).



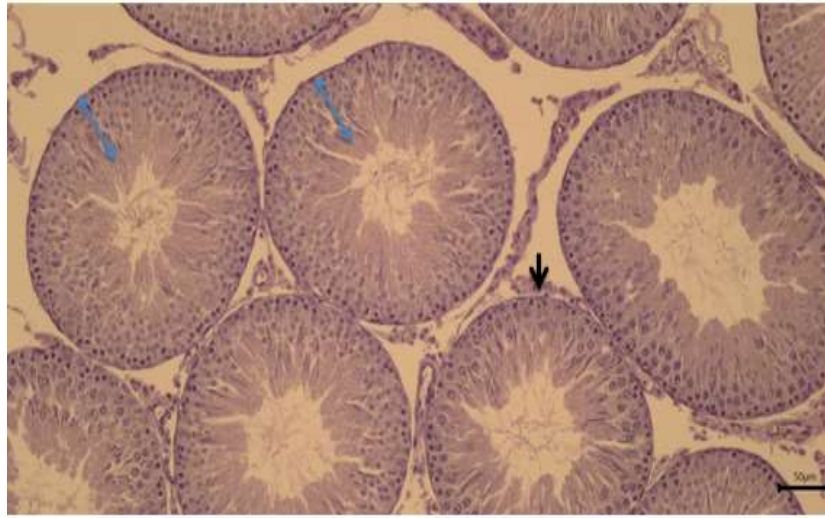
Resim 3: Sıçan testisinde mezenkimal kök hücre varlığının immünofloresan mikroskobuyla görüntülenmesi.

4.4. Hematoksilen-Eozin ve PAS Histokimyasal Bulguları

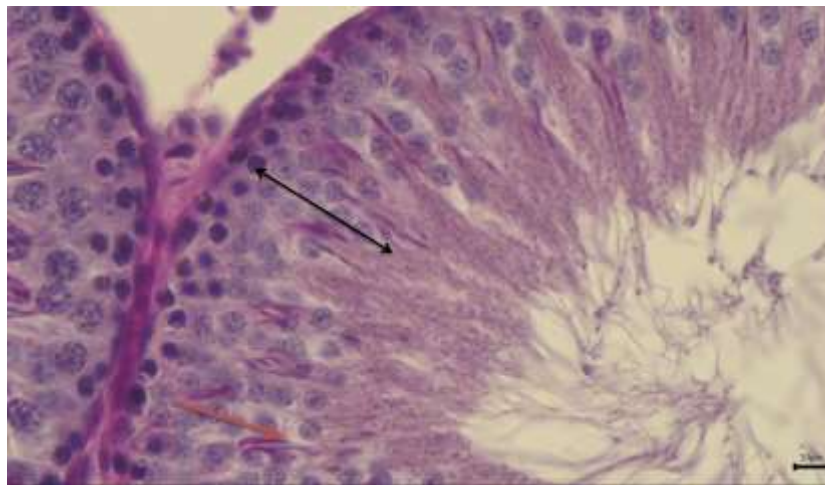
4.4.1.Kontrol grubu bulguları

Kontrol grubunu oluşturan sıçanların testis örneklerinde ışık mikroskopik incelemelerinde

H-E ve PAS boyamalarında, gerek interstisyel alan gerekse seminifer tübüllerde normal histolojik yapı gözlemlendi. Seminifer tübülde bulunan spermatogenik seri hücreleri ve lümendeki spermier morfolojik olarak normal gözlemlendi.



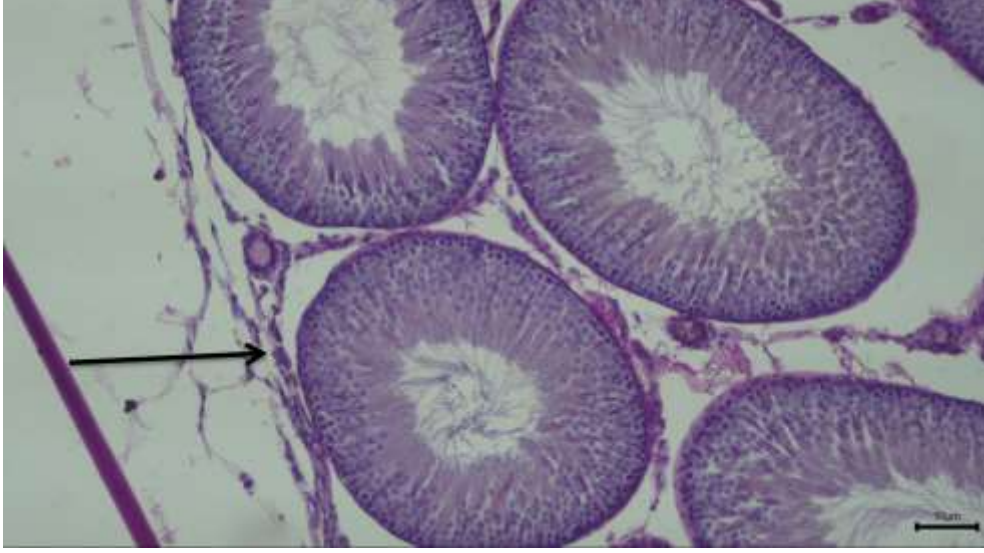
Resim 4: Kontrol grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Spermatogenik seri hücreleri (çift ok), bazal membran (tek uçlu ok) X10, H-E boyama.



Resim 5: Kontrol grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Spermatogenik seri hücresi (çift uçlu ok), sertoli hücresi (tek uçlu ok) X40, PAS boyama.

İnterstisyel alanda özellikle damarlar etrafında gruplar halinde bulunan Leydig hücreleri, koyu boyanan çok sayıda çekirdekçik içeren oval şekilli çekirdekleri ile gözlemlendi.

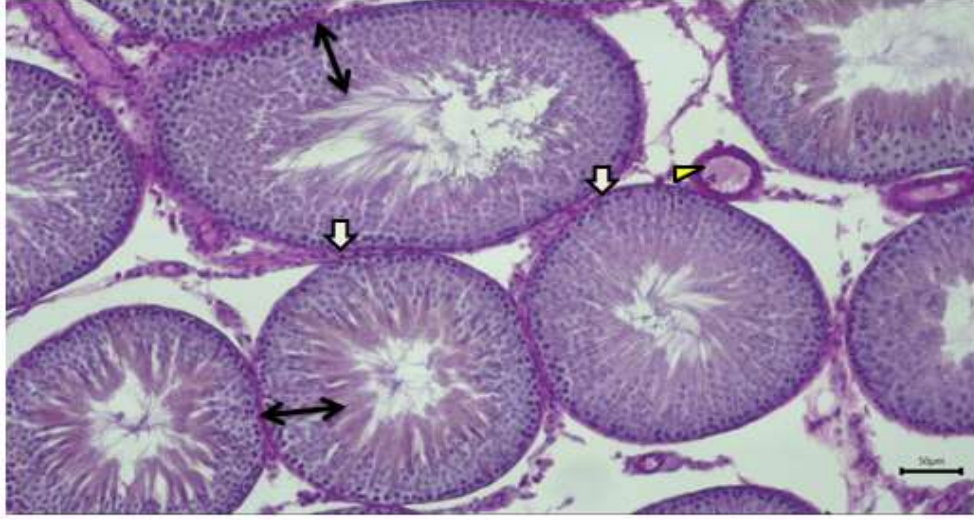
İnterstisyel alandaki damarlar normal yapıda gözlemlendi.



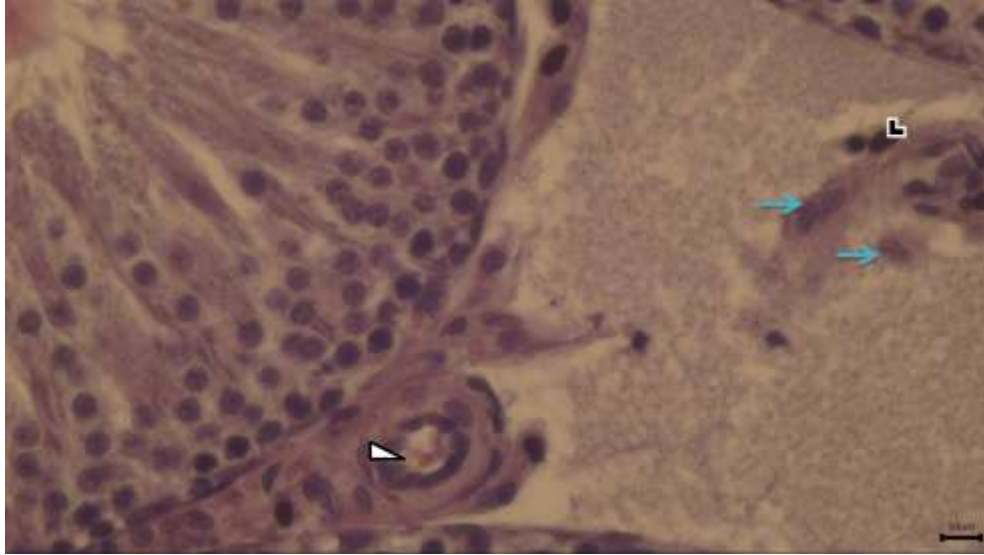
Resim 6: Kontrol grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Tunika albuginea X10, PAS boyama.

PAS pozitif boyanmış bazal membran ve tunika albuginea yapısı normal yapıda gözlemlendi.

Düzenli bir spermatogenezin olduğu tübül duvarı, sertoli hücreleri, belirgin spermatogonyumları ve spermatojenik seri hücreleri ile normal yapıda gözlemlendi. Gelişmekte olan spermatidler, normal yapıdaki gibi kuyruk lümeninde, baş tübül duvarında, sertoli hücrelerinin arasında gözlemlendi.



Resim 7: Kontrol grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Bazal membran (tek başlı ok), spermatogenik seri hücreleri (çift başlı ok), kapiller (ince uçlu üçgen) X10 PAS boyama.



Resim 8: Kontrol grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Kapiller (ince uçlu üçgen), Leyding (ince ok), Makrofaj (ok başı) X40, H-E boyama.

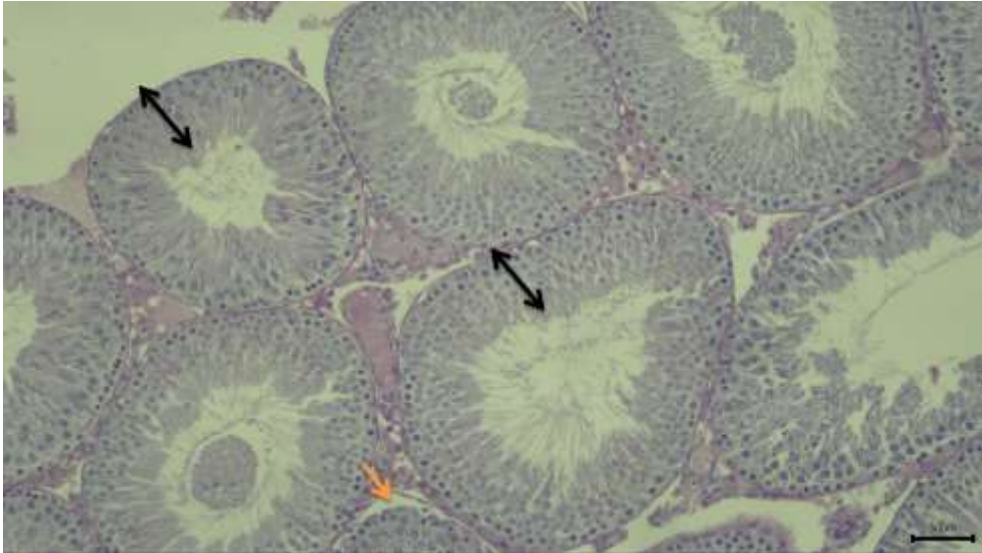


Resim 9: Kontrol grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Hiperkromazi X40, PAS boyama.

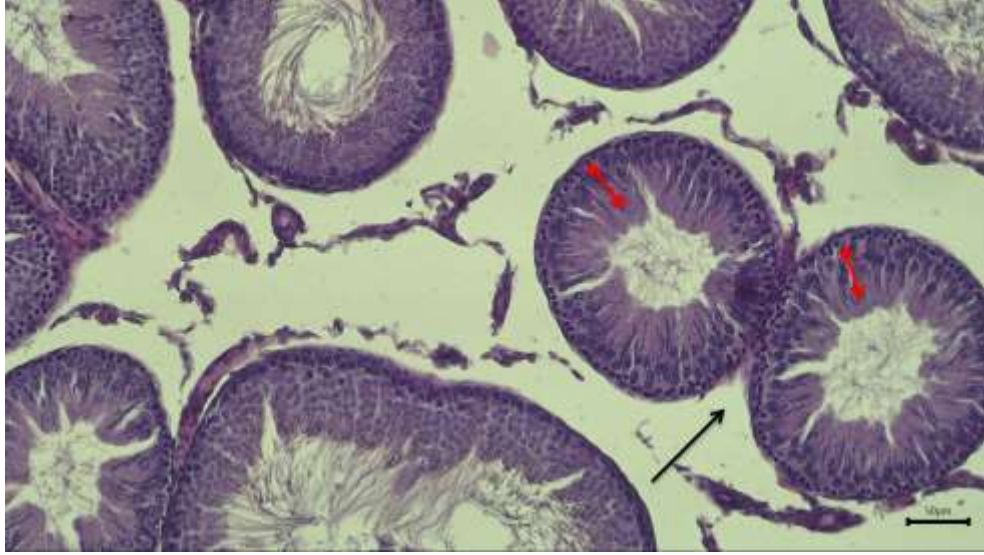
4.4.2. MTX Grubu Bulguları

MTX ile tedavi edilen grupta kontrol grubuna kıyasla sonuçtaki toplam vücut ağırlığında ve vücut ağırlığındaki değişim yüzdesinde belirgin bir düşüş görülmüştür.

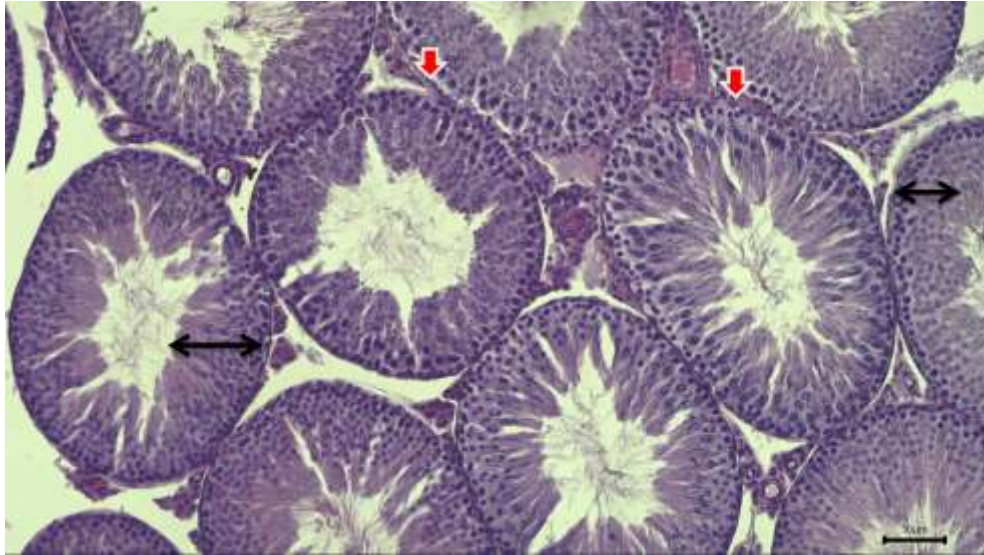
Spermatogenik seri hücrelerinde ve seminifer tübül çapında azalma gözlemlendi.



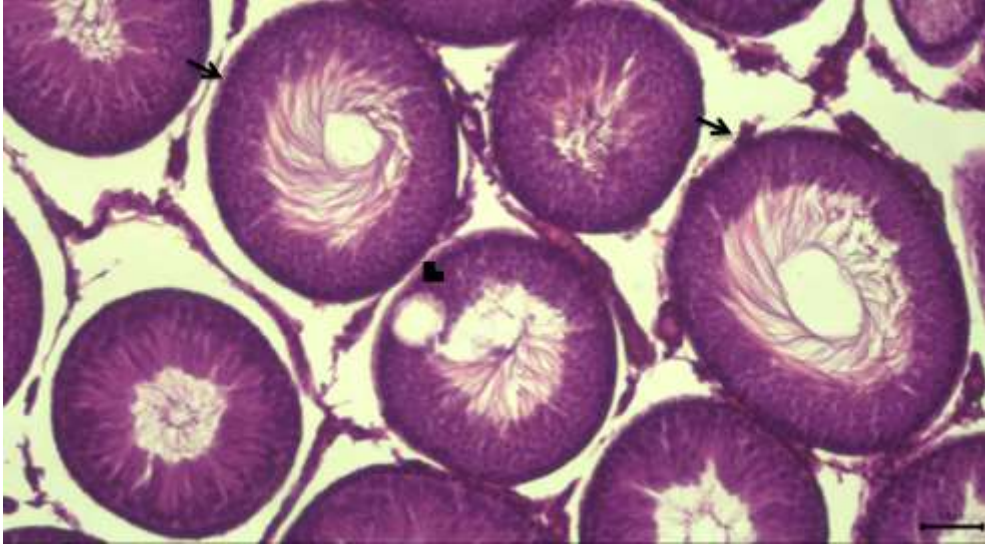
Resim 10: MTX grubu ışık mikroskopik görüntüsü, spermatogenik seri hücreleri (çift uçlu ok), ondülasyon (tek uçlu ok) X10, PAS boyama.



Resim 11: MTX grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Spermatogenik seri hücrelerinde azalma (çift uçlu ok), interstisyel alan (tek uçlu ok) X10, H-E boyama.

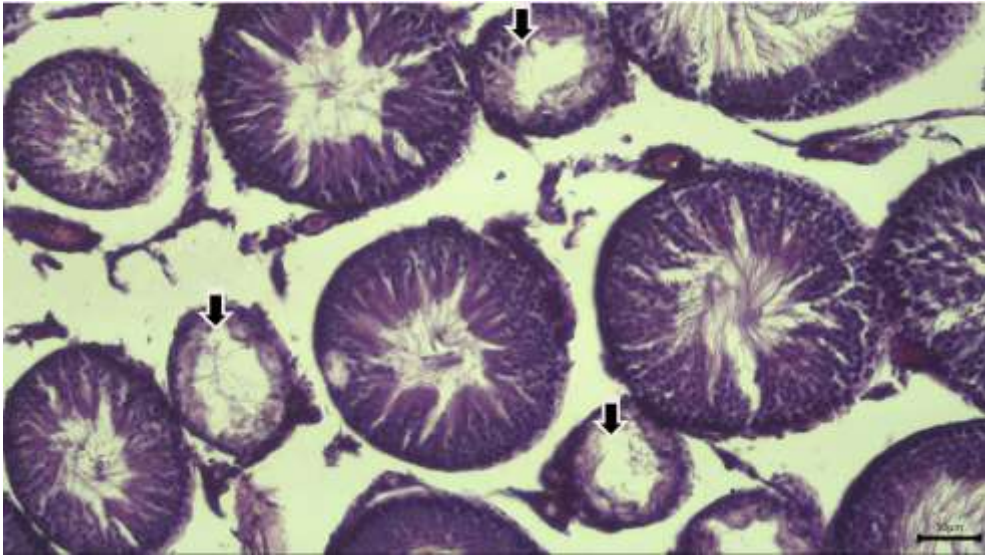


Resim 12: MTX grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Küçük spermatogenik seri hücreleri (çift uçlu ok), seminifer tübüller (tek uçlu ok) X10, H-E boyama.

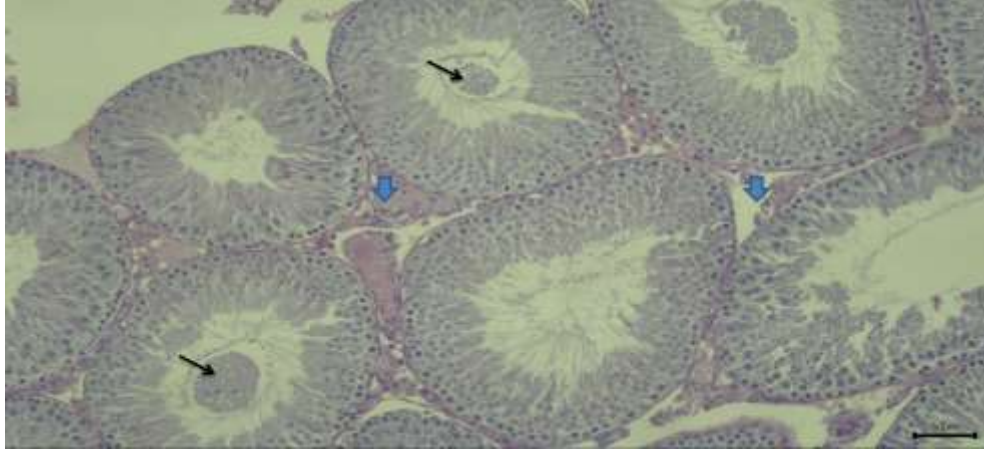


Resim 13: MTX grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Vakuol (ok başı), seminifer tübüller (tek uçlu ok) X10, H-E boyama.

İnterstisyel alanda ödem olduğu ve interstisyel alanın genellikle genişlediği saptandı. Testislerde yer yer atrofik tübüllere rastlandı.

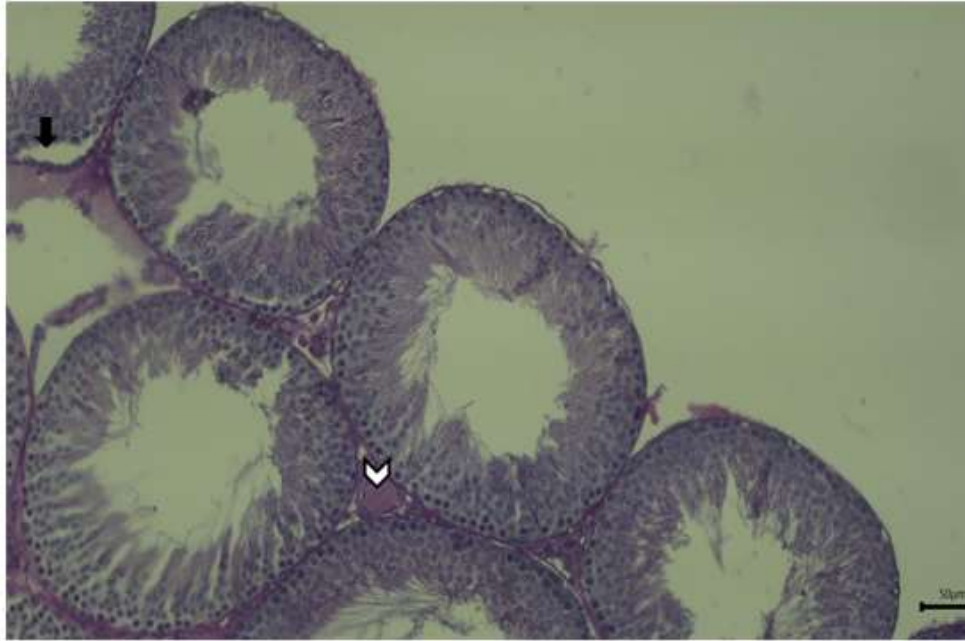


Resim 14: MTX grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Dejenere tübül X10, H-E boyama.



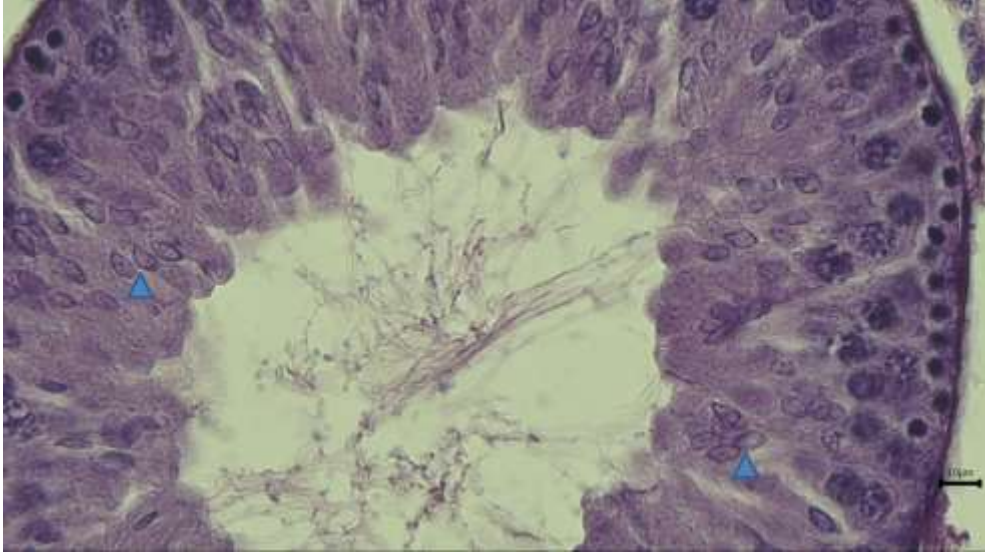
Resim 15: MTX grubu ışık mikroskopik görüntüsü, interstisyel alan (kalın ok), dev hücreler (ince ok) x10, PAS boyama.

Ayrıca damarlarda dilatasyon ve konjesyon gözlemlendi.

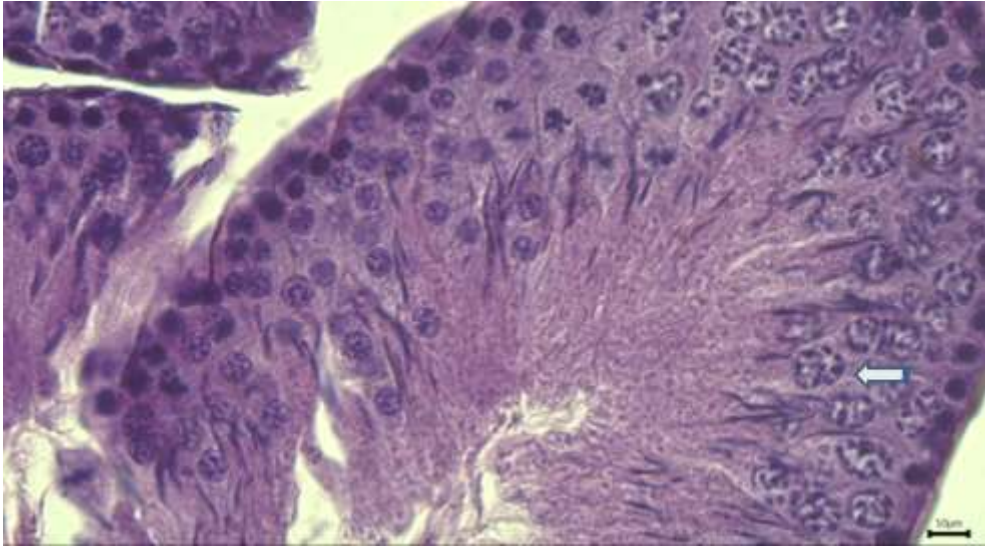


Resim 16: MTX grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Konjesyon (ok başı), ondülasyon (tek uçlu ok) X10, PAS boyama.

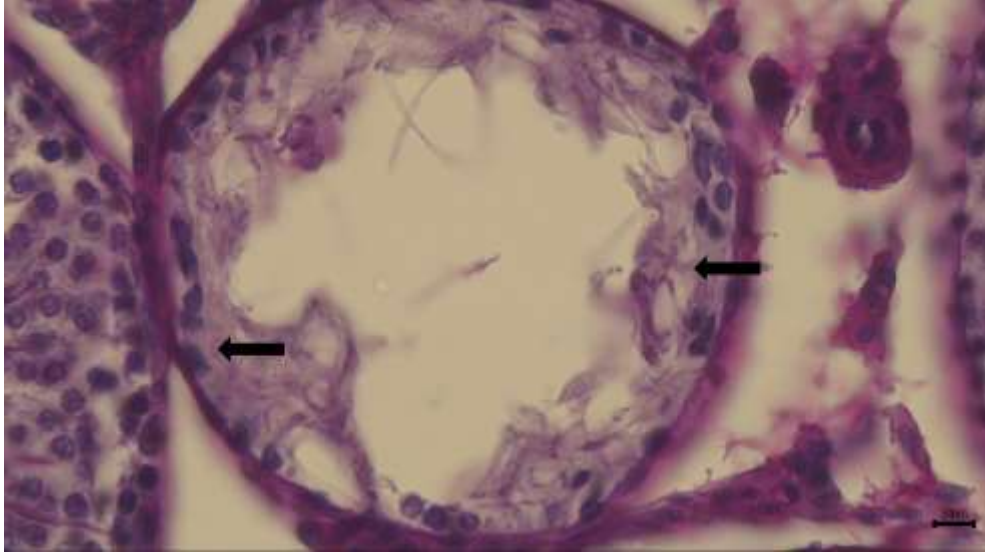
Bazal membranda ayrılma ve ondülasyon izlendi. Spermatogonyumlarda hiperkromazi gözlemlendi. Sertoli ve Leydig hücreleri normal yapıda izlendi. Yer yer vakuoller gözlemlendi.



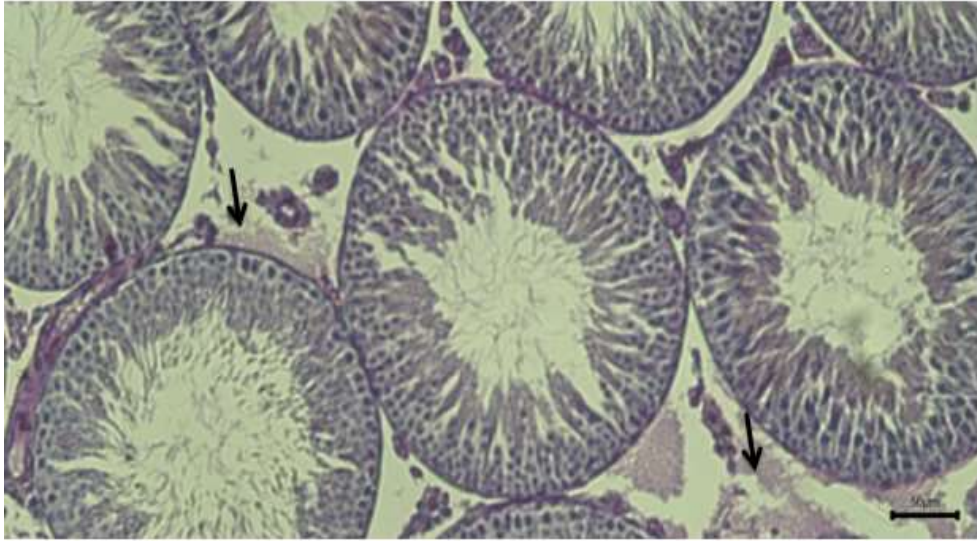
Resim 17: MTX grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Damla şeklinde hücreler X40, H-E boyama.



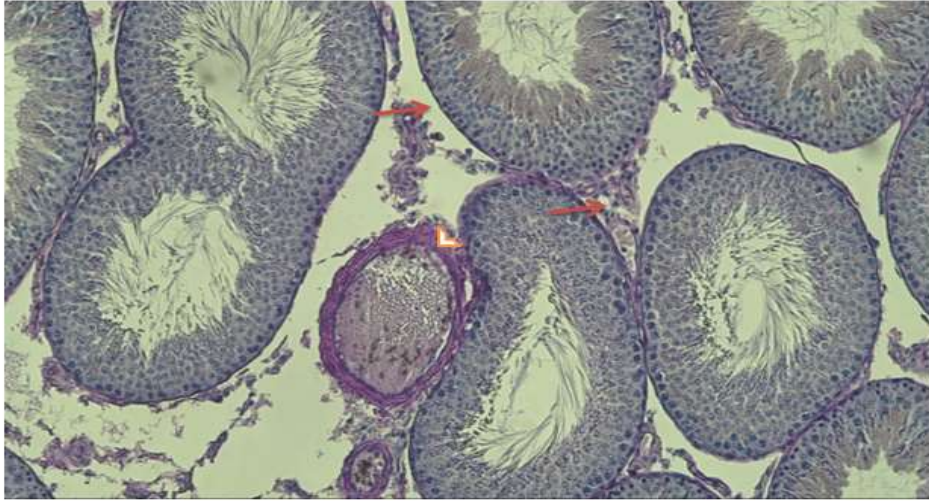
Resim 18: MTX grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Spermatogenik seri hücrelerinde hipertrofi X40, H-E boyama.



Resim 19: MTX grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Spermatogenik seri hücrelerinde hiperkromazi X40, PAS boyama



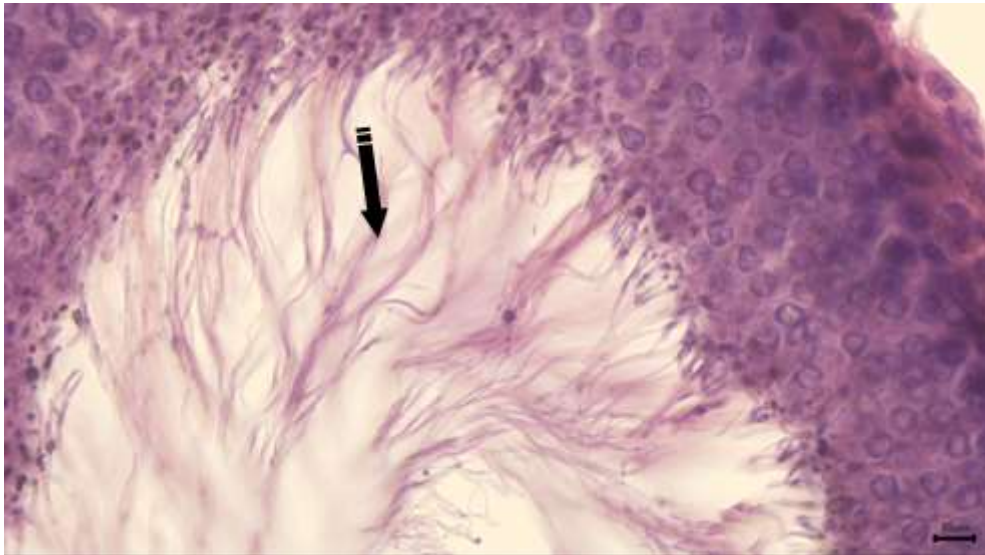
Resim 20: MTX grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Ödem oluşumu X10, PAS boyama.



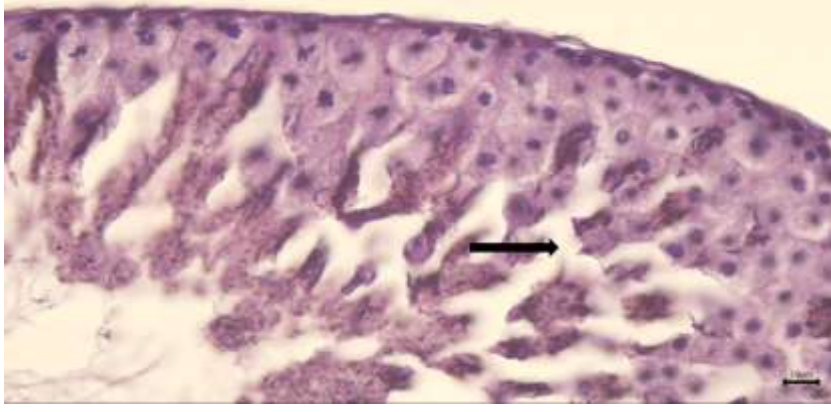
Resim 21: MTX grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Konjesyon (ok başı), lümen (tek uçlu ok) X10, PAS boyama.

4.4.3. Kök Hücre Bulguları

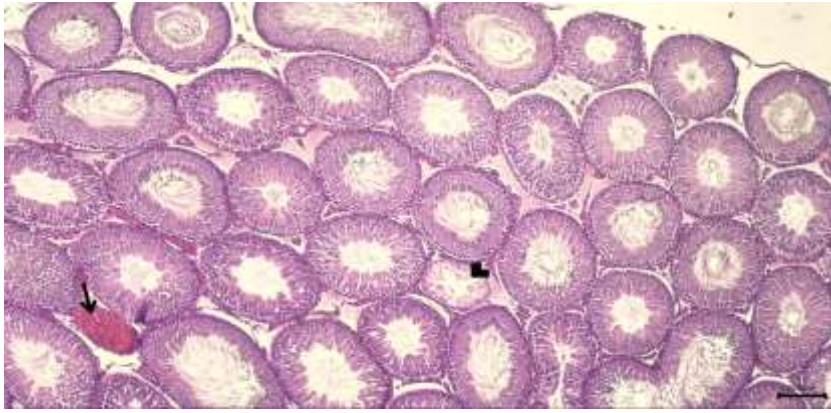
Kök hücre grubunda, tüm sıçanların dokuları incelendiğinde çok az dejenere tübül gözlemlendi. Seminifer tübül çapı istatistik sonucuna göre anlamlıdır. İnterstisyel alanda ödem ve konjesyon çok az gözlemlendi. Bazal membranda ayrılma ve ondülasyon birkaç yerde görüldü. Sertoli ve Leydig hücreleri normal yapıda izlendi. Birkaç tane küçük vakuoller görüldü.



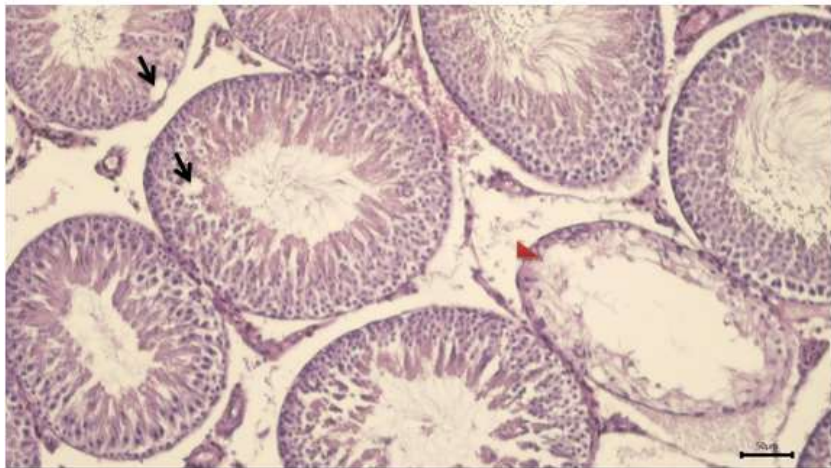
Resim 22: Kök hücre grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübül lümeni X40, H-E boyama.



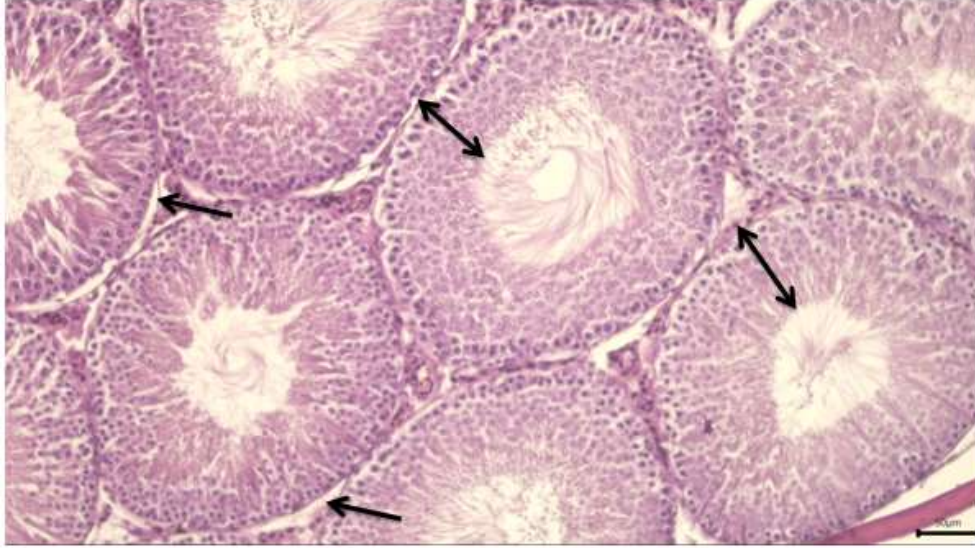
Resim 23: Kök hücre grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Hipertrofi X40, H-E boyama.



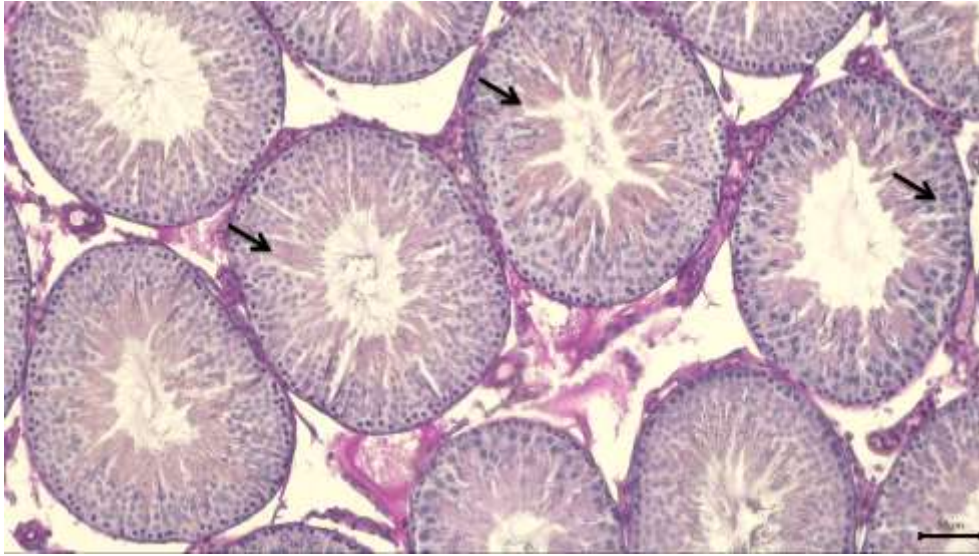
Resim 24: Kök hücre grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Konjesyon (tek uçlu ok), H-E boyama, dejenere tübül (ok başı) X4, H-E boyama.



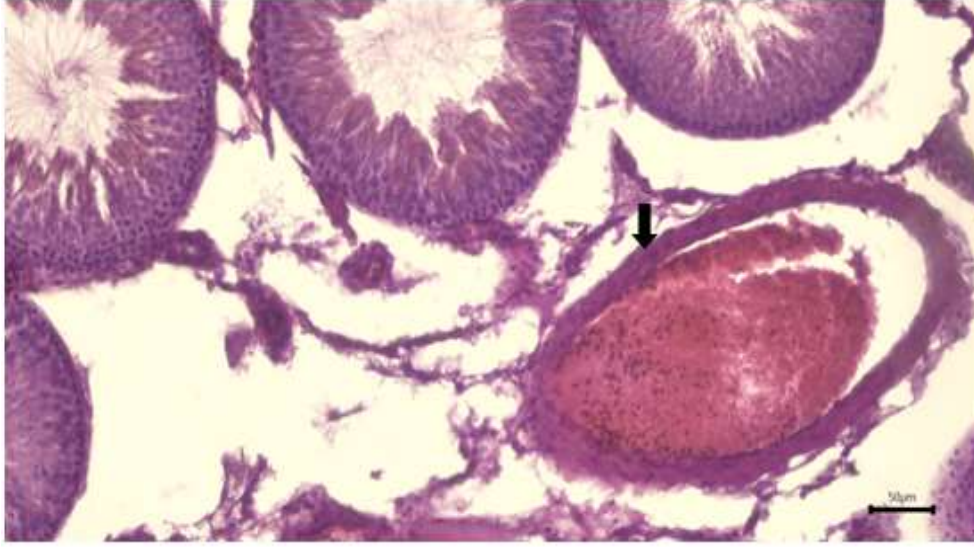
Resim 25: Kök hücre grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Dejenere tübül (ok başı), vakuol (tek uçlu ok) x10, H-E boyama.



Resim 26: Kök hücre grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Spermatogenik seri hücreleri (çift uçlu ok), bazal membranda ayrılma (tek uçlu ok) X10, H-E boyama.



Resim 27: Kök hücre grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Seri hücrelerinde ayrışma X10, PAS boyama.



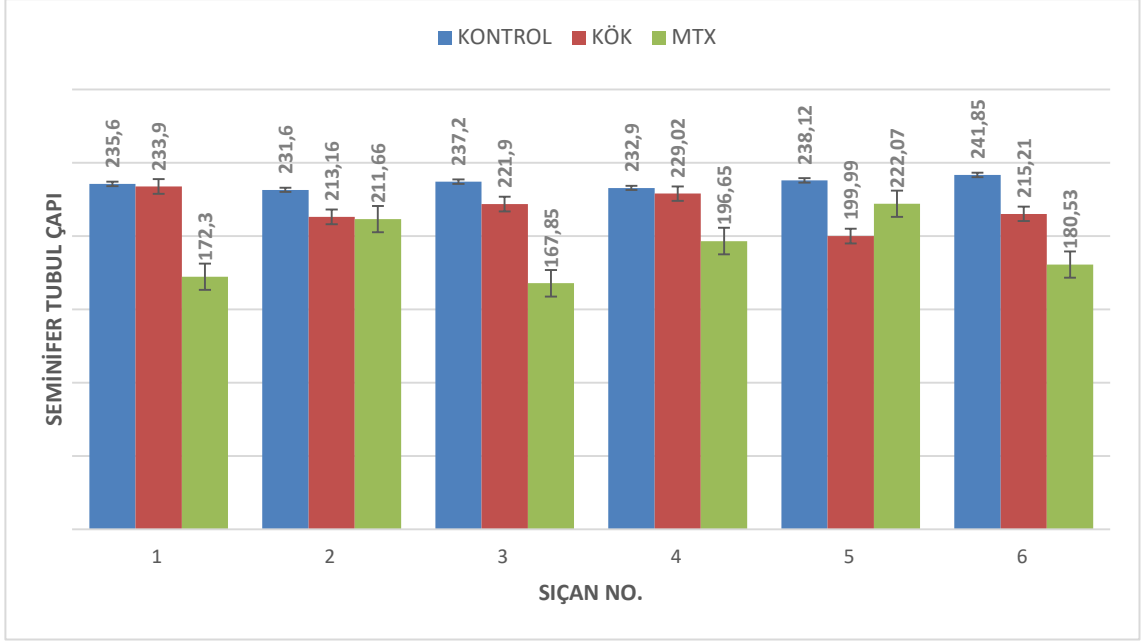
Resim 28: Kök hücre grubu ışık mikroskopik görüntüsü. Konjesyon X10, H-E boyama.

4.4.4. İstatistiksel Analiz

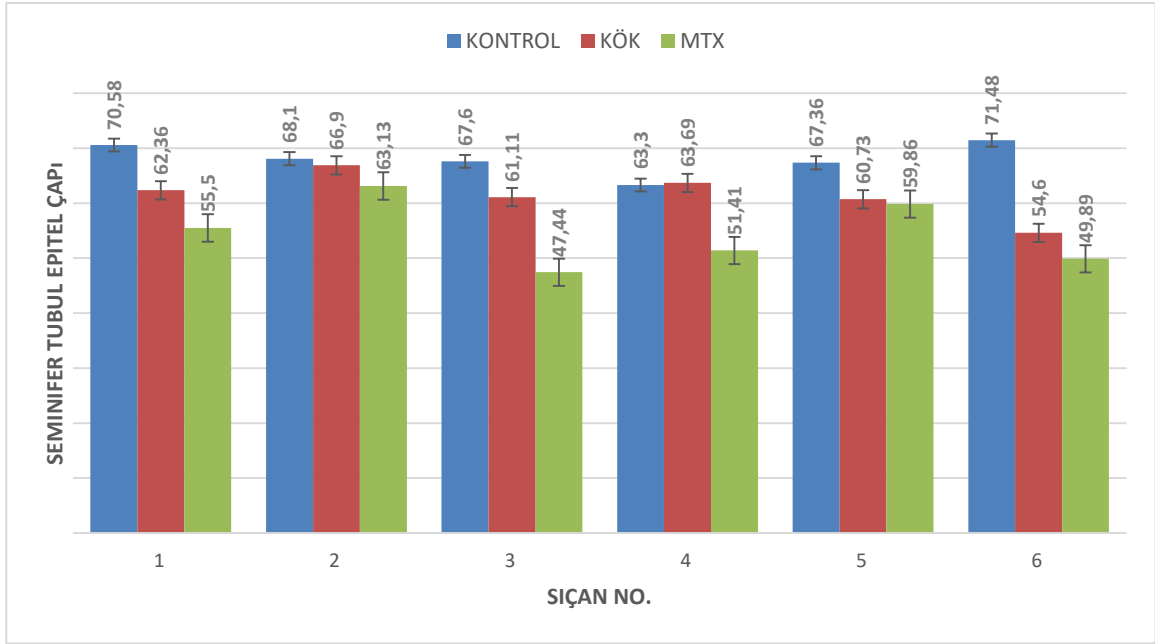
Seminifer tübül çapı ve seminifer tübül epitel çapı ölçüm değerlerinde kontrol, kök ve mtx grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlemlendi. Seminifer tübül çapı ölçümleri ve seminifer tübül epitel çapı ölçümlerinde en yüksek değerler kontrol grubunda gözlemlendi. Kök ve MTX gruplarının değerleri kontrol grubuna göre daha düşüktür. En düşük değerleri MTX grubu almıştır ve diğer gruplara göre oldukça düşüktür.

Tablo 5: Seminifer tübül çapı ve seminifer tübül epitel çapı ölçümleri

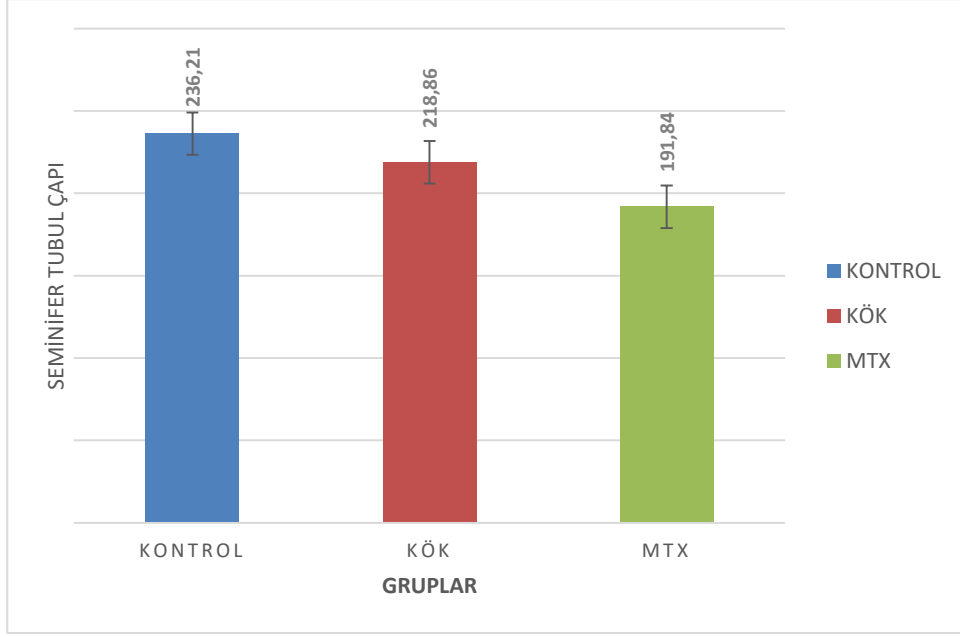
Gruplar	STÇ	STEÇ
Kontrol	236,2117±5,2049	68,0700±2,2187
Kök	218,8633±9,0274	61,5650±3,1187
MTX	191,8433±11,8238	54,5383±4,2315
P değeri	0,0001	0,0003



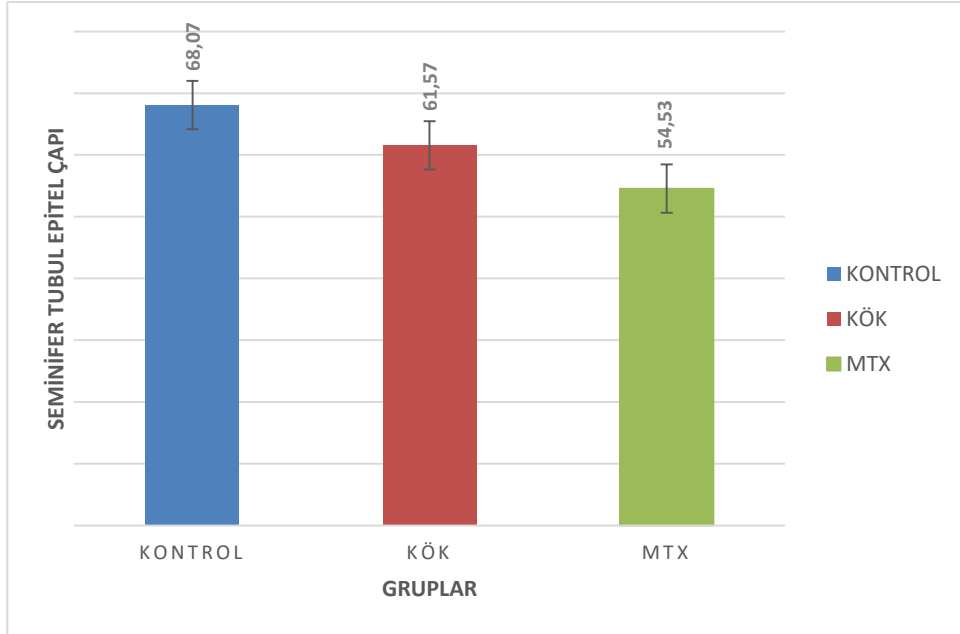
Şekil 18: Her bir sıçanın kök, kontrol ve MTX grubunda seminifer tübül çapı ortalamaları.



Şekil 19: Her bir sıçanın kök, kontrol ve MTX grubunda seminifer tübül epitel çapı ortalamaları.



Şekil 20: Her bir sıçanın kök, kontrol ve MTX grubunda seminifer tübül çapı genel ortalamaları.



Şekil 21: Her bir sıçanın kök, kontrol ve MTX grubunda seminifer tübül epitel çapı genel ortalamaları.

Tablo 6: Sıçan ağırlıklarının, sağ ve sol testis ağırlığının ortalama ve standart sapmaları

	Kontrol		
	Sıçan ağırlıkları	Sağ testis ağırlığı	Sol testis ağırlığı
Ortalama	399,667	1,8833	1,8833
Standart Sapma	44,8092	0,1472	0,1472

	Kök Hücre		
	Hayvan kiloları	Sağ Testis ağırlığı	Sol testis ağırlığı
Ortalama	414,517	1,85	1,8833
Standart Sapma	37,2129	0,19748	0,18619

	MTX		
	Hayvan kiloları	Sağ Testis ağırlığı	Sol testis ağırlığı
Ortalama	408,167	1,71667	1,71667
Standart Sapma	34,9881	0,17224	0,17224

5. TARTIŞMA

Metotreksat (MTX) bir folik asit antagonisti, antiproliferatif, antiinflamatuvar ve immünomodilatör etkilere sahiptir (Sönmez ve ark, 2016).

Akut lenfoblastik lösemi, non-hodgkin lenfoma, meme kanseri ve baş, boyun kanserlerinin tedavisinde kullanıldığı gibi kanser olmayan hastalıklarda da (romatoid artrit) kullanılmaktadır (Yuluğ ve ark, 2013).

MTX neden olduğu oksidatif strese bağlı testiküler hasarı spermatojenik hücreleri ve sertoli hücreleri üzerinde olmaktadır. Aynı zamanda leydig hücrelerinde de fonksiyon bozukluğuna ve buna bağlı olarak testosteron seviyesinde azalmaya neden olmaktadır. Kemoterapötik ilaçların zararlı etkilerine çok duyarlı olan spermatojenik hücrelere verdiği zararlar sonucu MTX infertiliteye yol açabilecek ajanlar arasında belirtilmiştir (Oktar ve ark (2010); Vardı ve ark, 2010).

MTX uygulanmasından sonra testisin seminifer tübül duvarlarında incelme, sperm sayısında azalma ve sperm DNA'sında hasarlar olduğu bildirilmiştir. (Yuluğ ve ark, 2013).

Metotreksat, doğurganlığa zarar vermektedir. Bozuk oogenez ve spermatogeneze sebep olmaktadır. Erkek bireylerde önemli yan etkilerinin infertilite ve kalıcı azospermi olduğu bildirilmiştir (Gökçe ve ark, 2011).

Oktar ve arkadaşlarının (2010), sıçan testisi üzerinde yapmış oldukları 7 günlük bir çalışmada; ilk gün 10 mg/kg dozunda uygulanan MTX'in; vakuolizasyon, seminifer tübül atrofi ve hücrel deskuamasyona sebep olduğu, fakat interstisyel alan ve Leydig hücrelerinde herhangi bir değişim gözlenmediği bildirilmiştir (Oktar ve ark, 2010).

Yüncü ve arkadaşlarının (2015), yaptığı bir çalışmada 3. ve 10. gün MTX uygulaması yapılmıştır. Işık mikroskop bulgularında ise tübül hücrelerinde vakuol, bazal laminada ayrılma, interstisyel alanda ödem ve konjesyon, gibi bulgular olduğu bildirilmiştir (Yüncü ve ark, 2015).

Denelerimiz sonucunda elde edilen histopatolojik bulgularda seminifer tübül çapında ve spermatojenik seri hücrelerinde azalma gözlenmiştir. Ayrıca kontrol grubundaki

sıçanlara göre vücut ağırlıklarında azalma meydana gelmiştir. İnterstisyel alanda ödem ve testislerde atrofik tübüllere rastlanmıştır. Damarlarda dilatasyon ve konjesyon gözlenmiştir.

Hayder Gaeed Oufi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada sıçanlara 20 mg/kg metotreksat tek doz uygulanmıştır. MTX ve kontrol grupları arasında seminifer tübül çapını ve sperm anomalilerini incelemişlerdir. MTX grubunun tübül çapında kontrole göre %5.24 oranında azalma gözlemişlerdir (Oufi ve Al-Shawi, 2014).

Bizim çalışmamızda bazal membranda ayrılma, ondülasyon ve sperm ana hücrelerinde hiperkromazi gözlenmiştir. Mikroskopik olarak tübül çapı (STÇ) ve tübül epitel kalınlığı (STEÇ) ölçümleri yapılmıştır. Bulgular sonucunda STÇ ve STEÇ değerlerinin litaretürü destekler yönünde olduğu gözlemlenmiştir.

Vardı ve arkadaşlarının (2009), yaptığı çalışmada kontrol ve karoten grubunda hiçbir lezyon gözlenmemiştir. MTX grubunda atrofi, germ hücre dejenerasyonu gibi seminifer tübül dejenerasyonu gözlenmiştir (Vardı ve arkadaşları).

Bizim çalışmamızda da kontrol grubunda seminifer tübül yapısı, spermatogenik seri hücreleri ve interstisyel alan normal histolojik yapı göstermiştir. MTX grubunda ayrıca vakuollere rastlanmıştır.

Özetle, çalışmamızda yalnızca MTX verilen grupta deney sonrasında dokular histolojik olarak incelendiğinde interstisyel alanda ödem ve konjesyon, seminifer tübüllerdeki germ hücrelerinde azalma, seminifer tübülde vakuolleşme ve bazal laminada ayrılma şeklinde hasarlara rastlanmıştır. Mikroskopik olarak STÇ ve STEÇ ölçümlerinin bulguları incelendiğinde değerlerin ışık mikroskop görüntülerini destekler yönünde olduğu gözlemlenmiştir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Mezenkimal kök hücrenin testis hasarı üzerine etkisini içeren bir çalışmaya literatürde rastlamadık. Bizim çalışmamızda MTX üzerine kök hücrenin olumlu etkisi gözlenmiştir. Kök hücre verilen sıçanlarda MTX'in oluşturduğu hasarın onarıldığı, yalnızca bazı seminifer tübüllerin interstisyel alanında ödem ve konjesyonun çok az gözlemlendiği sonucuna ulaşıldı. Ayrıca küçük vakuollere ve birkaç yerde bazal membranda ayrılmaya rastlanıldı. MTX verilen canlılarda mezenkimal kök hücrenin testis hasarı üzerinde olumlu etki etmiştir, başka dokular üzerinde de mezenkimal kök hücrenin olumlu etkisinin olup olmayacağı araştırılabilir.

KAYNAKLAR

- Abraham, L.** Üreme Sistemi, Histoloji ve Hücre Biyolojisi, (Çev.: Demir, R.), 1.Baskı, Palme Yayıncılık, 2006, Ankara, 531-564 s.2.
- Ağras K.** Embryology of Undescended Testis and Mechanisms of Testicular Descent Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Üroloji Kliniği, Ankara Turk Urol Sem 2012, 3: 17-22
- Arıncı K, Elhan A,** Anatomi, 1. Cilt, Güneş Kitabevi, Ankara, 2006, 330-332
- Arıncı K.** Sobotta İnsan anatomisi Atlası, Cilt 2, Beta basım, 1990
- Armagan A, Uzar E,Uz E, Yılmaz HR, Kutluhan S, Koyuncuoglu HR, Soyupek S, Cam H, Serel TA.** Caffeic acid phenethyl ester modulates methotrexate-induced oxidative stress in testes of rat. Human & Experimental Toxicology. 2008, 27, 547–552.
- Cakici C, Buyrukcu B, Duruksu G, Haliloglu AH, Aksoy A, Isık A, Uludag O, Ustun H, Subası C, Karaoz E.** Recovery of fertility in azoospermia rats after injection of adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells: the sperm generation. BioMed Research International, 2013, 529589, 18.
- Can A.** Mezenkimal Kök Hücreler, İn:Kök Hücre Biyolojisi,Türleri ve Tedavide Kullanımları,1.Baskı, Akademisyen Tıp Kitabevi, 2014,s169-170, 363-374
- Carlos L.** Temel Histoloji, Nobel Tıp Kitabevleri, 2009, 421-428
- Cole PD, Zebala JA, Alcaraz MJ, Smith AK, Tan J, Kamen BA.** Pharmacodynamic properties of methotrexate and Aminotrexate during weekly therapy. Cancer Chemother Pharmacol 2006, 57, 826-34.
- Daggulli M, Dede O, Utangac MM, Bodakci MN, Hatipoglu NK, Penbegul N, Sancaktutar AA, Bozkurt Y, Türkçü G, Yüksel H.** Protective effects of carvacrol against methotrexate-induced testicular toxicity in rats. International journal of Clinical and Experimental Medicine, 2014, 7(12), 5511-5516

Demir R. diFiore Histoloji atlası, Palme Yayıncılık, Ankara, 2014,482

Dominici M1, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006, 8(4), 315-7.

Drake, Vogl & Mitchell, Gray's Anatomi, Güneş Kitabevi, Ankara, 2007

El-Sheikh AA, Morsy MA, Al-Taher AY. Multi-drug resistance protein (Mrp) 3 may be involved in resveratrol protection against methotrexate-induced testicular damage. *Life Sciences*, 2014, 119, 40–46.

Gartner, L.P., Hiatt, J.L. Color textbook of histology, 3. Baskı, 2007, W.B., SaundersCompany, Philadelphia, 489-511.

Gökmen G.F Sistematik Anatomi, Güven Kitabevi, İzmir, 2008, 396-552

Hatipoğlu T. Anatomi ve Fizyoloji Kitabı, 2005

Hatipoğlu, M.T. ve M.G. Anatomi ders kitabı, Selvi yayınevi, 2006, ISBN, 975-7711-38-1, Ankara.

Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Iwano T, Lee J, Kazuki Y, Inoue K, Miki H, Takehashi

Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005, 21,605-31.

M, Toyokuni S, Shinkai Y, Oshimura M, Ishino F, Ogura A, Shinohara T. Genetic and epigenetic properties of mouse male germline stem cells during long-term culture. *Development*. 2005, 132(18), 4155-63.

Moore Anatomi, Güven Kitabevi, İzmir, 2009, 176-186

Nouri HS, Azarmi Y, Movahedin M. Effect of growth hormone on testicular dysfunction induced by methotrexate in rats. *Andrologia* 2009, 41, 105-10.

Oktar S, Gökçe A, Aydın M, Davarci M, Meydan S, Öztürk OH, Koç A. Beneficial effect of erdosteine on methotrexate-induced testicular toxicity in mice. *Toxicology and Industrial Health*, 2010, 26(7), 433–438.

Orwig KE, Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. Functional analysis of stem cells in the adult rat testis. *Biol Reprod.* 2002, 66(4), 944–9.

Ovalle W.K ve Nahırney P.C. Netter Temel Histoloji; Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, 2009, 378-387.

Pawlina R. Histoloji konu anlatımı ve atlas, Palme Yayıncılık, 2010

Sadler T.W. Medikal Embriyoloji, Palme Yayıncılık, Ankara, 2011, 247-260.

Sancak, B. ve Cumhuri, M. Fonksiyonel anatomi (Baş-boyun ve iç organlar), Odtü yayıncılık, 2004, ISBN, 975-7064-14-9, Ankara.

Sayılmaz A, Yuyucu Karabulut, Y, Özgörgülü A. The histopathological evaluation of healing effects of vitamin C administered before methotrexate therapy on testicular injury induced by methotrexate. *Turk J Urol* 2016, 42(4), 235-9.

Sheikhbahaei F, Khazaei M, Rabzia A, Mansouri K, Ghanbari A. Protective effects of thymoquinone against methotrexate-induced germ cell apoptosis in male mice. *Int J Fertil Steril.* 2016, 9(4), 541-547.

Sönmez MF, . Çilenk KT, Karabulut D, Ünalmış S, Deligönül E, Öztürk İ, Kaymak E. Protective effects of propolis on methotrexate-induced testis injury in rat. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2016, 79, 44–51

Stevens A, Lowe J. Human Histology. Second edition. p. 309-319. Mosby, London, 1997.

Şener G, Eksioğlu-Demiralp E, Çetiner M, Ercan F, Şirvancı S, Gedik N, Yeğen B.Ç. L-Carnitine ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury and inhibits leukocyte death. *Cell Biology and Toxicology.* 2006, 22, 47–60.

Vardı N, Parlakpınar H, Ateş B, Otlu A. Metotreksatın Neden Olduğu Testiküler Hasara Karşı Klorojenik Asidin Koruyucu Etkileri. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences.* 2010, 30(2), 507-13.

Vardi N, Parlakpınar H, Ates B, Cetin A, Oflu A. Antiapoptotic and antioxidant effects of beta carotene against methotrexate-induced testicular injury. *Fertil Steril*, 2009, 92, 2028–2033.


William F.G. A Lange Medical Book. In: Dođan A. 16. baskı. Cerrah Paşa İstanbul. Barış Kitabevi. 1995.

World Health Organization (WHO), <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>, 2015.


Yuluğ E, Türedi S, Alver A, Kahraman C. Effects of Resveratrol on Methotrexate-Induced Testicular Damage in Rats. Hindawi Publishing Corporation *The ScientificWorld Journal* Volume 2013, Article ID 489659

EKLER

Ek 1: Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleti Etik Kurul



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK
KURULU
(ADÜ-HADYEK)



Aydın 17.Ocak. 2017

Oturum : Hayvan Deneyleti Yerel Etik Kurulu 2017 Yılı I. Oturum

Sayı : 64583101/2017/012

Proje Başlığı : Sıçanlarda metotreksat kaynaklı testis hasarı üzerine mezenkimal kök hücrenin histopatopatolojik etkisi.

Proje Yürütücüsü : N.Tülin BOYLU


Proje Ekibi : Meltem HALAT

Bu çalışmanın hiçbir bölümünde:


- İnsan embriyosu ve fötusu kullanılması
- İnsan embriyosu ve fötusu dokularının kullanılması
- Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması

Hayvan Çalışması İnsanlarda araştırma
İnsan olmayan primatların kullanılması
Transgenik hayvanların kullanılması
Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.


Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır



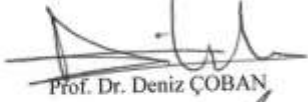
Prof. Dr. M. Dinçer BİLGİN
Başkan




Prof. Dr. Tufhan DOST
Başkan Yardımcısı




Prof. Dr. İsmail SÖNMEZ
Üye




Prof. Dr. Deniz ÇOBAN
Üye



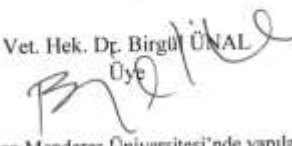
Prof. Dr. Yücel KOCA
Üye




Yrd. Doç. Dr. Eyrım DERELİ
FİDAN
Üye



Vet. Hek. Serdar AKTAŞ
Üye



Vet. Hek. Dr. Birgül ÜNAL
Üye



Yurdagül ALTINBAŞ
Üye

Bu rapor, sadece Adnan Menderes Üniversitesi'nde yapılacak çalışmalar için geçerlidir

ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı : Meltem HALAT
Doğum yeri ve tarihi: Söke 03.10.1989
Medeni Durumu : Bekar
Telefon : 0 534 969 33 37
E-mail : meltemhalat@hotmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı	2013-2018
Lisans	Ege Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2008-2012

BURSLAR ve ÖDÜLLER:

İŞ DENEYİMİ

AKADEMİK YAYINLAR

1.MAKALELER

2. PROJELER

Proje Adı	Kurum	Bütçe	Tarih	Görev	Proje Türü
Sıçanlarda metotreksat kaynaklı testis hasarı üzerine mezenkimal kök hücrenin histopatolojik etkisi	Adnan Menderes Üniversitesi	7500	17.01.2017	Araştırmacı	BAP

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler