

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

**İNSAN SPERMATOGONYAL KÖK HÜCRELERİNİN**  
**DEVAMLILIĞININ VE EKSPANSİYONUNUN *İN VİTRO***  
**KOŞULLARDA SAĞLANMASI**

Pınar ŞAHİN

DOKTORA TEZİ

2018-ANTALYA

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

**İNSAN SPERMATOGONYAL KÖK HÜCRELERİNİN**  
**DEVAMLILIĞININ VE EKSPANSİYONUNUN *İN VİTRO***  
**KOŞULLARDA SAĞLANMASI**

Pınar ŞAHİN

DOKTORA TEZİ

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ**  
**İKİNCİ DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Kyle ORWIG**

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2016-1078 proje numarası ile desteklenmiştir.

"Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir."

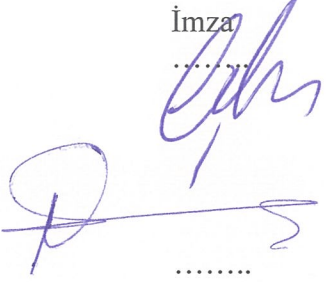
2018-ANTALYA

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;**

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 08/11/2018

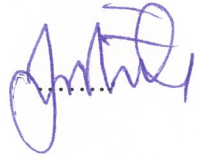
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ  
Akdeniz Üniversitesi

İmza



Üye : Prof. Dr. Necdet DEMİR  
Akdeniz Üniversitesi

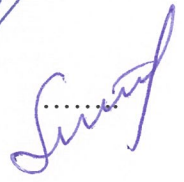
Üye : Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL  
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Petek KORKUSUZ  
Hacettepe Üniversitesi



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



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

Enstitü Müdürü  
Prof. Dr. Narin DERİN

## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Pınar ŞAHİN

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Çiler ÇELİK-ÖZENCİ

İmza

## TEŐEKKÜR

Doktora eğitimim süresince ve tez projemin gerçekleştirilmesinde göstermiş oldukları maddi, manevi ve bilimsel destek için danışman hocalarım Prof. Dr. iler ÇELİK ÖZENCİ ve Prof. Dr. Kyle ORWIG'e,

Tez projemin deneysel sürecinde göstermiş oldukları manevi ve bilimsel destek için University of Pittsburgh'da Magee Womens Research Institute de bulunan Orwig Lab'ın tüm çalışanlarına,

Tez projemin FACS analizlerinin gerçekleştirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Lynda Guzik ve Joan Brozick'e,

2214-A burs programı ile tez projem kapsamında Magee Womens Research Institute'de araştırma yapma şansı tanıyan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB)'e,

Tez projemdeki deneylerin gerçekleşmesi için maddi destek sağlayan Fertility Preservation Programı'na,

Yurt dışında olduğum süre içerisinde göstermiş oldukları tolerans ve destekleri için Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma,

Yardımları için Sağlık Bilimleri Enstitü'nün değerli çalışanlarına,

Hayatımda yapmak istediğim her şey için olanak sağlayan, eğitim hayatımın başından itibaren sonsuz anlayış, sabır ve sevgi ile hep arkamda olan anneme ve babama en içten saygı, sevgi ve teőekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Amaç:** Spermatogonyal kök hücreler (SKH) spermatogenezin devamlılığını sağlarlar ve bu kök hücrelerin kaybı erkeklerde infertiliteye sebep olmaktadır. Bu nedenle bu hücrelerin elde edilip çoğaltılarak kök hücre terapisinde kullanımı büyük önem taşımaktadır. Literatürde insan spermatogonyal kök hücrelerinin (iSKH) tanımlanması ve *in vitro* koşullarda çoğaltılması ile ilgili kısıtlı çalışma bulunmaktadır. Çalışmamızda iSKH'lerinin farklı yöntemler ile izolasyonları ve çeşitli *in vitro* koşullarda kültüre edilmeleri sonrasında hayatta kalma ve çoğalma kapasitelerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Bu çalışmada FACS ile izole edilen SSEA4 ve THY1 belirtecini ekspre eden hücrelerin kök hücre fonksiyonlarının değerlendirilmesi amacı ile ksenotransplantasyon yapılmıştır. Ardından FACS ve MACS yöntemi ile izole edilen THY1<sup>+</sup> destekleyici hücreleri varlığında MACS ile izole edilen ITGA6<sup>+</sup> iSKH'leri kültüre edilmiştir. Kültür sonunda elde edilen UTF1<sup>+</sup> hücre sayıları değerlendirilmiştir. Ayrıca iSKH'leri, tip I kollajen ile kültüre edilerek, sayıları ve bu hücrelerin *in vitro* hayatta kalmaları değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** FACS ile izole edilen SSEA4<sup>+</sup>/THY1<sup>-</sup> hücrelerin koloni oluşturma kapasitelerinin yüksek olduğu ve SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> ve SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>-</sup> hücrelerin koloni oluşturma kapasitelerinin düşük olduğu gözlenmiştir. FACS ve MACS yöntemleri ile izole edilen THY1<sup>+</sup> hücrelerinin, ITGA6<sup>+</sup> iSKH'lerinin *in vitro* hayatta kalımlarını desteklediği gösterilmiştir. Tip I kollajen ile kök hücre zenginleştirme yönteminin iSKH sayısını ve çoğalmasını arttırdığı gözlenmiştir.

**Sonuç:** Çalışmamızda tip I kollajen ile zenginleştirilen iSKH'lerinin THY1<sup>+</sup> destekleyici hücreleri ile kültüre edilmelerinin, bu hücrelerin *in vitro* hayatta kalımlarını desteklediği ilk kez gösterilmiştir. Bulgularımız, iSKH'lerinin ileride infertilite olgularında kök hücre terapisinde kullanılmaları açısından destekleyici sonuçlar ortaya koymuştur.

**Anahtar Kelimeler:** İnsan spermatogonyal kök hücre, *in vitro* kültür, THY1, Tip I Kollajen

## ABSTRACT

**Objective:** Spermatogonial stem cells (SSC) maintain spermatogenesis. When the stem cell pool is depleted this can lead to infertility and successful isolation and expansion of human spermatogonial stem cells (hSSC) are important factors for stem cell therapy. Studies about identification of human spermatogonial stem cells and their culture conditions for successful *in vitro* expansion of them are limited in the literature. In this study, we aimed to evaluate the success of different methods of stem cell isolation and culture conditions on *in vitro* expansion of hSSCs.

**Method:** We isolated stem cells that express SSEA4 and THY1 markers by FACS method. Then we performed xenotransplantation to mice in order to evaluate the stem cell function of the isolated cells. We cultured ITGA6<sup>+</sup> spermatogonial stem cells on THY1<sup>+</sup> cells isolated by MACS and FACS methods. After culture, we determined the number of UTF1<sup>+</sup> stem cells for all conditions. We also analyzed the efficiency of type I collagen on stem cell enrichment and proliferation of hSSCs in culture.

**Results:** We observed that colonizing activity of SSEA4<sup>+</sup>/THY1<sup>-</sup> cells is higher whereas colonizing activity of SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> and SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>-</sup> cells is lower when compared to other groups. We also observed that THY1<sup>+</sup> cells isolated by MACS and FACS can support the maintenance of ITGA6<sup>+</sup> hSSCs. Culturing ITGA6<sup>+</sup> cells with type I collagen increases hSSC number and proliferation of ITGA6<sup>+</sup> spermatogonial stem cells in *in vitro* culture.

**Conclusion:** In our study, it was shown for the first time that culturing of hSSCs enriched with type I collagen with THY1<sup>+</sup> feeder cells support the maintenance of hSSCs in *in vitro* culture. Our study suggest supportive information for future studies that will enable to use hSSCs for stem cell therapy in infertility.

**Key words:** Human spermatogonial stem cell, *in vitro* culture, THY1, Type I collagen

# İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b>	i
<b>ABSTRACT</b>	ii
<b>İÇİNDEKİLER</b>	iii
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	vi
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	vii
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b>	x
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Spermatogenez	3
2.2. Spermatogonyal Kök Hücre Terapisi	3
2.3. Kemirgenlerde Gözlenen Spermatogonyal Kök Hücreler ve Spermatogenik Hücre Serisi ve Bu Hücrelerin Gelişimi	4
2.4. Yüksek Primatlarda Gözlenen Spermatogonyal Kök Hücreler ve Spermatogenik Hücre Serisi ve Bu Hücrelerin Gelişimi	6
2.5. Kemirgen ve Yüksek Primatlarda Klonal Ekspansiyon	8
2.6. Kemirgen Spermatogonyal Kök Hücre Belirteçlerinin Tanımlanması ve İzolasyonu	9
2.7. İnsan Spermatogonyal Kök Hücrelerinin Belirteçlerinin Tanımlanması ve İzolasyonu	11
2.8. Differential Plating (Aşamalı Pasajlama)	12
2.9. Floresan Aktive Hücre İzolasyonu (FACS)	13
2.10. Manyetik Aktive Hücre İzolasyonu (MACS)	13
2.11. Kemirgen Spermatogonyal Kök Hücreleri ile Yapılan <i>İn Vitro</i> Çalışmalar	15
2.12. Spermatogonyal Kök Hücre Gelişimine Etki Eden Faktörler	17
2.12.1. Glial Kökenli Nörotrofik Faktör (GDNF) ve Spermatogonyal Kök Hücre Gelişimindeki Rolü	17



2.12.2. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) ve Spermatogonyal Kök Hücre Gelişimindeki Rolü	18
2.12.3. Lösemi İnhibi Edici Faktör (LIF) ve Spermatogonyal Kök Hücre Gelişimindeki Rolü	19
2.13. İnsan Spermatogonyal Kök Hücreleri ile Yapılan <i>İn Vitro</i> Çalışmalar	20
2.14. Ksenotransplantasyon Modelleri ile Kök Hücre Fonksiyonunun Test Edilmesi	21
2.15. Hipotez ve Amaç	23
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	25
3.1. İnsan Testiküler Dokusunun Hazırlanması ve Hücre Süspansiyonu Elde Edilmesi	25
3.2. FACS (Floresan Aktive Hücre Ayırıştırma) Yöntemi ile İnsan Spermatogonyumu Elde Edilmesi	26
3.3. Ksenotransplantasyon ve Whole Mount İmmünfloresan ile Fare Seminifer Tübüllerinde İnsan Spermatogonyal Kök Hücrelerinin Sayılarının ve Koloni Oluşturma Kapasitelerinin Değerlendirilmesi	27
3.4. Whole Mount İmmünfloresan Yöntemi	28
3.5. SSEA4-/THY1 <sup>+</sup> Hücrelerin <i>İn Vitro</i> Koşullarda Çoğaltılması	28
3.6. Fare STO Hücrelerinin <i>İn Vitro</i> Koşullarda Çoğaltılması	29
3.7. MACS (Manyetik Aktive Hücre Ayırıştırma) Yöntemi ile İnsan Spermatogonyumlarının Elde Edilmesi	29
3.8. MACS (Manyetik Aktive Hücre Ayırıştırma) Yöntemi ile İnsan THY1 <sup>+</sup> Testiküler Hücrelerinin İzole Edilmesi	30
3.9. Tip I Kollajen Kullanılarak İnsan Spermatogonyal Kök Hücrelerinin Zenginleştirilmesi	30
3.10. ITGA6 <sup>+</sup> Spermatogonyal Kök Hücrelerin Kültürü	31
3.11. İmmünohistokimya	32
3.12. İstatistiksel Analizler	33
<b>4. BULGULAR</b>	35
4.1. SSEA4 ve THY1 Belirteçleri ile İşaretlenen İnsan Testiküler Hücre	

Süspansiyonunda 3 Farklı Fraksiyonda Hücre Bulunmaktadır: SSEA4 <sup>+</sup> /THY1 <sup>-</sup> , SSEA4 <sup>-</sup> /THY1 <sup>+</sup> , SSEA4 <sup>-</sup> /THY1 <sup>-</sup> .	35
4.2. FACS ile İzole Edilen Hücre Fraksiyonlarından SSEA4 <sup>+</sup> /THY1 <sup>-</sup> Fraksiyondaki Hücreler Diğer Fraksiyonlara Oranla Daha Fazla Sayıda, SSEA4 <sup>-</sup> /THY1 <sup>+</sup> Fraksiyondaki Hücreler ise Daha Az Sayıda Koloni Oluştururlar.	37
4.3. Elde Edilen SSEA4 <sup>-</sup> /THY1 <sup>+</sup> Hücrelerin <i>İn Vitro</i> Koşullarda 3 ya da 4 Pasaj Sonrasında Çoğalmaları Durur.	38
4.4. MACS ile İzole Edilen ITGA6 <sup>+</sup> Hücrelerin Kontrol ve ITGA6 <sup>-</sup> Oranla Fazla Sayıda UTF1 <sup>+</sup> Spermatogonyal Kök Hücre İçerir.	38
4.5. SSEA4 <sup>-</sup> /THY1 <sup>+</sup> Hücreler <i>İn Vitro</i> Koşullarda ITGA6 <sup>+</sup> İnsan Spermatogonyal Kök Hücrelerini Desteklemektedir.	40
4.6. SSEA4 <sup>-</sup> /THY1 <sup>+</sup> Hücrelerin <i>İn Vitro</i> Koşullarda ITGA6 <sup>+</sup> Spermatogonyal Kök Hücreleri Destekleme Kapasiteleri STO Hücrelerinden Yüksektir.	40
4.7. SSEA4 <sup>-</sup> /THY1 <sup>+</sup> Hücrelerin ve Laminin Materyalinin <i>İn Vitro</i> Koşullarda ITGA6 <sup>+</sup> Spermatogonyal Kök Hücreleri Destekleme Kapasiteleri Benzerdir.	43
4.8. THY1 Belirteci Kullanılarak FACS ile Elde Edilen THY1 <sup>bright</sup> Hücreler SSEA4 <sup>-</sup> /THY1 <sup>+</sup> Hücreler ile Benzer Fenotip Gösterirler ve <i>İn Vitro</i> Koşullarda Çoğaltılabilirler.	43
4.9. MACS Yöntemi ile Elde Edilen THY1 <sup>+</sup> Hücrelerin <i>İn Vitro</i> Koşullarda ITGA6 <sup>+</sup> Spermatogonyal Kök Hücreleri Destekleme Kapasiteleri SSEA4 <sup>-</sup> /THY1 <sup>+</sup> Hücreler ile Benzerdir.	45
4.10. ITGA6 <sup>+</sup> İnsan Spermatogonyal Kök Hücrelerinin Tip I Kollajen Varlığında Kültüre Edilmesi İçerdikleri UTF1 <sup>+</sup> Hücre Sayısını Artırır.	46
<b>5. TARTIŞMA</b>	48
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	54
<b>KAYNAKLAR</b>	56
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	74

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 2.1.</b>	İnsan spermatogonyal kök hücrelerinin <i>in vitro</i> kültürü ile ilgili yapılan çalışmalar	21
<b>Tablo 3.1.</b>	Çalışmada kullanılan insan testiküler dokusunun alındığı donörlere ait bilgiler	26
<b>Tablo 3.2.</b>	Hücre izolasyonu ve immünohistokimya yönteminde kullanılan primer antikörler	33



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b>	Kemirgen, maymun ve insanda gözlenen spermatogonyal kök hücre tipleri ve spermatogenik hücre serisi ve hücrelerin gelişim basamakları	9
<b>Şekil 2.2.</b>	Kemirgenlerde gözlenen spermatogonyal kök hücrelerin ekspresyon etiketleri belirteçler	11
<b>Şekil 2.3.</b>	Kemirgen, maymun ve insanda tanımlanan farklılaşmamış ve farklılaşma sürecine girmiş olan spermatogonyumlarda ekspresyon olan kök hücre belirteçleri	12
<b>Şekil 4.1.</b>	SSEA4 ve THY1 ile işaretlenen insan testisler hücrelerinin FACS analiz raporu	36
<b>Şekil 4.2.</b>	FACS ile izole edilen kontrol, SSEA4 <sup>+</sup> /THY1 <sup>-</sup> , SSEA4 <sup>-</sup> /THY1 <sup>+</sup> , SSEA4 <sup>-</sup> /THY1 <sup>-</sup> hücre fraksiyonlarında gözlenen koloni sayıları	37
<b>Şekil 4.3.</b>	SSEA4 <sup>+</sup> /THY1 <sup>-</sup> hücre fraksiyonunda gözlenen bir koloni görüntüsü	38
<b>Şekil 4.4.</b>	SSEA4 <sup>-</sup> /THY1 <sup>+</sup> hücrelerinin <i>in vitro</i> koşullarda farklı günlerdeki mikroskopik görüntüsü	38
<b>Şekil 4.5.</b>	ITGA6 belirteci kullanılarak MACS yöntemi ile izole edilen hücre fraksiyonlarında (Kontrol, ITGA6 <sup>-</sup> , ITGA6 <sup>+</sup> ) UTF1 <sup>+</sup> hücre sayıları	39
<b>Şekil 4.6.</b>	ITGA6 belirteci kullanılarak MACS yöntemi ile izole edilen hücre fraksiyonlarında (Kontrol, ITGA6 <sup>-</sup> , ITGA6 <sup>+</sup> ) gözlenen UTF1 <sup>+</sup> hücreler	39

<b>Şekil 4.7.</b>	STO ve SSEA4-THY1 <sup>+</sup> destekleyici hücreleri ile kültüre edilen ITGA6 <sup>+</sup> insan spermatogonyal kök hücrelerinin farklı günlerdeki mikroskopik görünümü	40
<b>Şekil 4.8.</b>	STO hücreleri ve SSEA4 <sup>-</sup> /THY1 <sup>+</sup> hücreleri varlığında mSFM medyum ile kültüre edilen hücrelerin kültürü sonunda elde edilen UTF1 <sup>+</sup> hücre sayıları	41
<b>Şekil 4.9.</b>	STO hücreleri ve SSEA4 <sup>-</sup> /THY1 <sup>+</sup> hücreleri varlığında Stem Pro ve mSFM medyumunu ile kültüre edilen ITGA6 <sup>+</sup> hücrelerin kültürü sonunda elde edilen UTF1 <sup>+</sup> hücre sayıları	42
<b>Şekil 4.10.</b>	STO hücreleri ve SSEA4 <sup>-</sup> /THY1 <sup>+</sup> hücreleri varlığında Stem Pro ve mSFM medyumunu ile kültüre edilen ITGA6 <sup>+</sup> hücrelerin kültürü sonunda gözlenen UTF1 <sup>+</sup> hücreler	42
<b>Şekil 4.11.</b>	SSEA4 <sup>-</sup> /THY1 <sup>+</sup> hücreleri ve laminin varlığında Stem Pro medyumunu ile kültüre edilen ITGA6 <sup>+</sup> hücrelerin kültürü sonunda elde edilen UTF1 <sup>+</sup> hücre sayıları	43
<b>Şekil 4.12.</b>	THY1 ile işaretlenen insan testiküler hücrelerinin FACS analiz raporu	44
<b>Şekil 4.13.</b>	FACS ile izole edilen SSEA4 <sup>-</sup> /THY1 <sup>+</sup> hücreler ve THY1 <sup>bright</sup> hücrelerin mikroskopik görünümü	45
<b>Şekil 4.14.</b>	ITGA6 <sup>+</sup> hücrelerin SSEA4 <sup>-</sup> /THY1 <sup>+</sup> hücreler ve MACS ile izole edilen THY1 <sup>+</sup> hücreler ile kültürü sonunda elde edilen UTF1 <sup>+</sup> hücre sayıları	45
<b>Şekil 4.15.</b>	Tip I kollajen kullanılarak kök hücre zenginleştirme yönteminin UTF1 <sup>+</sup> hücre sayısına etkisinin değerlendirilmesi	46

- Şekil 4.16.** ITGA6<sup>+</sup> ve tip I kollajen kullanılarak zenginleştirilmiş ITGA6<sup>+</sup> hücre fraksiyonlarında gözlenen UTF1<sup>+</sup> hücreler 47
- Şekil 4.17.** MACS ile izole edilmiş THY1<sup>+</sup> destekleyici hücreleri ile kültüre edilen ITGA6<sup>+</sup> ve tip I kollajen kullanılarak zenginleştirilmiş ITGA6<sup>+</sup> hücrelerin kültürü sonunda elde edilen UTF1<sup>+</sup> hücre sayıları 47



## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>As</b>	: A <sub>single</sub>
<b>Apr</b>	: A <sub>paired</sub>
<b>Aal</b>	: A <sub>aligned</sub>
<b>A6- integrin</b>	: Integrin Subunit Alpha 6
<b>bFGF</b>	: basic Fibroblast Growth Factor
<b>B1-integrin</b>	: Integrin Subunit Beta 1
<b>BCL6B</b>	: B cell CLL/lymphoma 6 member B
<b>BMI 1</b>	: B cell-specific moloney murine leukemia virus integration site 1
<b>BSA</b>	: Bovine Serum Albumin
<b>cKIT</b>	: Receptor Tyrosine Kinase
<b>CD29</b>	: Integrin Subunit Beta 1
<b>CD49f</b>	: Integrin Subunit Alpha 6
<b>CDH1</b>	: Cadherin 1
<b>CD326</b>	: Epithelial Cell Adhesion Molecule
<b>CD9</b>	: CD9 Molecule
<b>CD90</b>	: Cluster of Differentiation 90
<b>CSF 1</b>	: Colony Stimulating Factor 1
<b>DMSO</b>	: Dimethyl Sulfoxide
<b>EGF</b>	: Epidermal Growth Factor
<b>ERK</b>	: Extracellular Signal-Regulated Kinase-1
<b>ENO2</b>	: Enolase 2
<b>EPCAM</b>	: Epithelial Cell Adhesion Molecule
<b>EOMES</b>	: Eomesodermin
<b>EXOSC10</b>	: Exosome Component 10
<b>ETV5</b>	: Ets Variant 5
<b>GPR125</b>	: G Protein-Coupled Receptor
<b>GDNF</b>	: Glial Derived Neurotrophic Factor
<b>GFRa1</b>	: GDNF Family Receptor Alpha 1
<b>HLA</b>	: Human Leukocyte Antigen

<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen Peroksit
<b>FACS</b>	: Fluorescence Activating Cell Sorting
<b>FBS</b>	: Fetal Bovine Serum
<b>FGF</b>	: Fibroblast Growth Factor
<b>FGF 2</b>	: Fibroblast Growth Factor 2
<b>FGF 8</b>	: Fibroblast Growth Factor 8
<b>FGFR3</b>	: Fibroblast Growth Factor Receptor 3
<b>FOXO1</b>	: Forkhead Box Protein O1
<b>ITGA6</b>	: Integrin Subunit Alpha 6
<b>ITGB1</b>	: Integrin Subunit Beta 1
<b>iSKH</b>	: İnsan Spermatogonyal Kök Hücre
<b>ID4</b>	: DNA Binding Protein 4
<b>IL-6</b>	: Interleukin 6
<b>LHX1</b>	: LIM Homeobox 1
<b>LIF</b>	: Leukemia Inhibitory Factor
<b>LIFR</b>	: Leukemia Inhibitory Factor Receptor
<b>LIN28</b>	: Lin-28 Homolog A
<b>MACS</b>	: Magnetic Activated Cell Sorting
<b>MAP2K1</b>	: Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1
<b>NANOS2</b>	: Nanos Homolog 2
<b>NANOS3</b>	: Nanos Homolog 3
<b>NGN3</b>	: Neurogenin 3
<b>OCT2</b>	: Octamer-Binding Protein 2
<b>OCT4</b>	: Octamer-Binding Protein 4
<b>PAX7</b>	: Paired Box 7
<b>PI3K</b>	: Phosphoinositide 3-kinase
<b>PLZF</b>	: The Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger
<b>POU3F1</b>	: POU Class 3 Homeobox 1
<b>POU5F1</b>	: POU Class 5 Homeobox 1
<b>SALL4</b>	: Sal-Like Protein 4
<b>SHP 2</b>	: The Src homology- 2 domain containing phosphatase



<b>SFK</b>	: Src Family Kinase
<b>SKH</b>	: Spermatogonyal kök hücre
<b>SRY</b>	: Sex-Determining Region Y Protein
<b>SSEA4</b>	: Stage-Specific Embryonic Antigen 4
<b>SOHLH1</b>	: Spermatogenesis And Oogenesis Specific Basic Helix-Loop-Helix 1
<b>SOHLH2</b>	: Spermatogenesis And Oogenesis Specific Basic Helix-Loop-Helix 2
<b>SOX9</b>	: SRY-Box 9
<b>STAT 3</b>	: Signal transducer and activator of transcription 3
<b>STO</b>	: Sandos Inbred Mouse (SIM)-derived 6-thioguanine- and ouabain-resistant
<b>TBR2</b>	: T-box Brain Protein 2
<b>THY1</b>	: Thymus Cell Antigen 1
<b>UCHL1</b>	: Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1
<b>UTF1</b>	: Undifferentiated Embryonic Cell Transcription Factor 1
<b>VEGFA</b>	: Vascular Endothelial Growth Factor A
<b>ZBTB16</b>	: Zinc Finger and BTB Domain Containing 16
<b>WNT 3A</b>	: Wingless-type MMTV integration site family member 3A
<b>WNT 5A</b>	: Wingless-type MMTV integration site family member 5A
<b>WNT 6</b>	: Wingless-type MMTV integration site family member 6

## 1. GİRİŞ

Postpubertal bireylerde spermatogenez ile her gün milyonlarca sperm üretilmektedir. Spermatogenezin temeli olan spermatogonyal kök hücreler kendilerini yenilemeleri ve farklılaşmaları ile kök hücre havuzunun korunmasını ve spermatogenezin devamlılığını sağlamaktadırlar. Spermatogonyal kök hücrelerin çevresel faktörler, genetik sebepler, hastalıklar ya da medikal tedavilerden dolayı kaybedilmesi infertiliteye sebep olmaktadır (Valli ve ark., 2014). İnfertilite toplumda çiftlerin yaklaşık %10-15'ini etkilemektedir. Medikal tedaviler sonucu infertilite görülen erişkin erkeklerde sperm kriyoprezervasyonu ile fertilitate korunması bir avantaj olarak görülmektedir. Ancak sperm üretiminin olmadığı prepubertal hastalarda sperm kriyoprezervasyonu şansı bulunmamaktadır. Ayrıca sperm kriyoprezervasyonun sperm hücresinin fonksiyonunu olumsuz etkileyebileceği bilinmektedir. Sperm kriyoprezervasyonunun mümkün olmadığı hastalarda spermatogonyal kök hücreleri içeren hücre süspansiyonlarının kriyoprezervasyonu fertilitate korunması için alternatif bir yöntem olarak görülmektedir (Ehmcke ve ark., 2006). Bu kök hücre kaynaklı tedavilerin uygulanması için spermatogonyal kök hücrelerin izolasyonu ve yönlendirilmeleri ve bunun sağlanabilmesi için de öncelikle hücre karakterlerinin, izolasyon yöntemlerinin ve hücrelerin *in vitro* koşullarda çoğaltılabilmeleri için gerekli faktörlerin belirlenmesi gerekmektedir.

Spermatogonyumlar ile ilgili birçok bilgi kemirgenler ile yapılan çalışmalardan elde edilmiştir (Gassei ve Orwig, 2013). Bu çalışmalarda kök hücreler ya da progenitör hücrelerin ekspres ettikleri bazı belirteçler gösterilmiştir (Kubota ve ark., 2004b; Ryu ve ark., 2004; Tokuda ve ark., 2007a; Komai ve ark., 2014). Ayrıca kemirgen spermatogonyal kök hücrelerinin uzun süreli kültürü ve transplantasyonları sonrası canlı doğum eldesi sağlanabilmektedir. Bir haftalık fare testisinden alınan Thymus Cell Antigen 1 (THY1<sup>+</sup>) hücrelerin Glial Derived Neurotrophic Factor (GDNF), GDNF Family Receptor Alpha 1 (GFRa1) ve Fibroblast Growth Factor (FGF) içeren medyumda SIM mouse embryo derived thioguanine and ouabain resistant (STO) destekleyici hücreleri ile kültüre edildiklerinde yüksek oranda kök hücre özellikleri taşıyan hücreler içeren germ hücre kümeleri oluşturdukları ve pasajlama sonrası sayılarının arttığı gözlenmiştir (Kubota ve ark., 2004b). Aynı zamanda bu hücrelerin

fonksiyonları transplantasyon ile de gösterilmiştir. Kemirgenler ile ilgili çalışmalardan elde edilen bu sonuçlar insan materyalleri kullanılarak yapılan çalışmalara yansıtılabilirse spermatogonyal kök hücre terapisinin uygulanması mümkün olabilecektir.

Literatürde insan spermatogonyal kök hücrelerinin tanımlanması ve *in vitro* koşullarda hayatta kalımları ve çoğalmaları ile ilgili kısıtlı çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda spermatogonyal kök hücrelerin izolasyonu ve zenginleştirilmesi için farklı belirteçler (Stage-Specific Embryonic Antigen 4 (SSEA4), G Protein-Coupled Receptor (GPR125), Integrin Subunit Alpha 6 (ITGA6), THY1 ve farklı yöntemler (FACS, MACS, Differential plating) kullanılmıştır (Chen ve ark., 2009; Sadri-Ardekani ve ark., 2009; X. Wu ve ark., 2009; He ve ark., 2010; Kokkinaki ve ark., 2011; Mirzapour ve ark., 2012; Smith ve ark., 2014). Bu çalışmalarda GDNF, FGF, Leukemia İnhibitory Factor (LIF) gibi büyüme faktörleri, farklı destekleyici hücreler (C166, insan embriyonik fibroblast, Sertoli hücresi, THY1<sup>+</sup> hücre) ve farklı ekstrasellüler matriks bileşenleri (jelatin, laminin, matrijel) kaplı petripler kullanılmıştır (Chen ve ark., 2009; Sadri-Ardekani ve ark., 2009; X. Wu ve ark., 2009; He ve ark., 2010; Kokkinaki ve ark., 2011; Mirzapour ve ark., 2012; Smith ve ark., 2014). Bu çalışmaların sonuçları insan spermatogonyal kök hücre belirteçlerinin ekspresyonları açısından gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ve immünohistokimya yöntemleri ile değerlendirilmiş ya da kültüre edilen insan spermatogonyal kök hücreleri fare testislerine transplante edilerek germ hücre aktiviteleri açısından değerlendirilmiştir. Literatürdeki bu çalışmalar umut verici sonuçlar sunmakla birlikte birçok çalışmanın sonucu farklı araştırma grupları tarafından tekrarlanamamıştır. Bu sebeple, insan spermatogonyal kök hücrelerinin *in vitro* koşullarda uzun süre çoğaltılmalarını sağlayan bir yöntem henüz mevcut değildir.

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda; insan spermatogonyal kök hücrelerinin farklı belirteçler (SSEA4, THY1, ITGA6) ve yöntemler (floresan aktive hücre izolasyon yöntemi, manyetik aktive hücre izolasyon yöntemi, kollajen ile kök hücre zenginleştirme) ile izolasyonu sonrası farklı *in vitro* koşullarda kültüre edilmesinin ardından, çeşitli izolasyon ve kültür koşullarının hücrelerin hayatta kalması ve çoğalmalarına etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Spermatogenez

Testis dokusunda, germ hücre gelişimi, embriyonik gelişimin erken döneminde başlayarak yetişkinlik dönemine kadar devam eden ve birçok hücresel farklılaşma aşamasını içeren bir olgunlaşma sürecidir. Spermatogenez proliferasyon ve farklılaşma aşamalarından oluşmaktadır. Postpubertal bireylerde spermatogenez ile hergün milyonlarca sperm üretilmektedir (Gupta ve ark., 2000; Thayer ve ark., 2001). Bu üretkenliğin seviyesi bir erkeğin postpubertal yaşamı boyunca sürekli sperm üretmesini sürdüren spermatogonyal kök hücrelere bağlıdır. Spermatogonyal kök hücreler testis dokusuna ait erişkin doku kök hücreleridir ve spermatogenezin temelini oluşturarak erkek fertilitésinin devamlılığını sağlamaktadır (Phillips ve ark., 2010). Spermatogonyal kök hücreler bir taraftan kendilerini yenilemelerini sağlayan bölünmeler geçirerek kök hücre havuzunun devamlılığını sağlarken, diğer taraftan olgun spermleri oluşturmak için bölünmeler geçirmektedirler. Sperm üretimi bu mekanizmanın dengeli bir şekilde çalışması ile sürdürülmektedir (Tegelenbosch ve de Rooij, 1993; D. G. de Rooij ve Grootegoed, 1998; Phillips ve ark., 2010; Aloisio ve Manjunath, 2014; Valli H. ve ark., 2015).

### 2.2. Spermatogonyal Kök Hücre Terapisi

Spermatogonyal kök hücrelerin genetik sebepler, hastalıklar ya da medikal tedavilerden dolayı kaybedilmesi infertiliteye sebep olmaktadır (Clermont ve Antar, 1973; Clifton ve Bremner, 1983; van Alphen ve ark., 1988b; Kanatsu-Shinohara ve ark., 2003; Hermann ve ark., 2007; Hermann ve ark., 2012; Abuelhija ve ark., 2013). İnfertilite toplumda çiftlerin yaklaşık %10-15 ini etkilemektedir. Medikal tedaviler sonucu infertilite görülen erişkin erkeklerde sperm kriyoprezervasyonu ile fertilité korunması bir avantaj olarak görülmektedir (Meng, 2000; J. M. Oatley ve Brinster, 2006; J. M. Oatley ve ark., 2007). Ancak sperm üretiminin olmadığı prepubertal hastalarda sperm kriyoprezervasyonu şansı bulunmamaktadır. Ayrıca, kriyoprezervasyonun sperm hücrelerinin fonksiyonuna kısmen zarar verdiği de göz önünde bulundurulması gereken bir konudur (Valcarce ve ark., 2013). Sperm kriyoprezervasyonunun mümkün olmadığı durumlarda spermatogonyal kök hücreleri içeren hücre süspansiyonlarının kriyoprezervasyonu

alternatif bir yöntem olarak görülmektedir (Brook ve ark., 2001). Son yıllarda çocukluk çağı kanserlerinde sağ kalım oranları sürekli artmaktadır ve pediatrik malignansilerde iyileşme hızı %80'i geçmektedir. Değerlendirmeler 640 genç erkekte 1'inin çocukluk çağı kanserlerinden sağ kalımı olduğunu göstermektedir (Hewitt M, 2003). Gonadal hasar çocukluk çağı kanserlerinin tedavilerinin yaygın bir sonucudur. Henüz sperm üretmeyen prepubertal erkeklerde fertilitenin korunması için bir çözüm yoktur. Bu hastaların fertilitelerinin korunması için gonadotoksik terapi öncesi testiküler biyopsi alınarak spermatogonyal kök hücrelerin izole edilip dondurulması ve tedavi sonrasında tekrar direkt olarak ya da *in vitro* koşullarda çoğaltıldıktan sonra testise verilmesi alternatif olabilmektedir (Clark ve ark., 2011). Bu kök hücre kaynaklı tedavilerin uygulanması için insan spermatogonyal kök hücrelerinin izolasyonu ve yönlendirilmeleri ve bunun sağlanabilmesi için de öncelikle hücre karakterlerinin ve hücrelerin gelişimine etki eden faktörlerin belirlenmesi gerekmektedir. Spermatogonyal kök hücreler ve spermatogenik seriye ait hücreler ve gelişimleri türler arasında farklılıklar göstermektedir.

### **2.3. Kemirgenlerde Gözlenen Spermatogonyal Kök Hücreler ve Spermatogenik Hücre Serisi ve Bu Hücrelerin Gelişimi**

Kemirgenlerde spermatogonyumlar Tip A, İntermediyet ve Tip B spermatogonyum olmak üzere üç kategoride sınıflandırılır (D. G. de Rooij ve Russell, 2000) Tip A farklılaşmamış spermatogonyum, kendi kendini yenileyebilen spermatogonyal kök hücre tipi olup, tek bir hücre ya da A single ( $A_s$ ) spermatogonyum olarak adlandırılmaktadır (D. G. de Rooij ve Russell, 2000). Postnatal kemirgen testisinde spermatogenik aktivite seminifer tübülün bazal membranında yer alan  $A_{single}$  spermatogonyumlar tarafından gerçekleştirilmektedir (D. G. de Rooij, 1973).  $A_{single}$  spermatogonyumlar mitotik bölünmeler geçirerek bir çift spermatogonyumu ( $A_{paired}$ ;  $A_{pr}$ ) oluşturmaktadırlar.  $A_{paired}$  spermatogonyumlar ya ileride sitokinezi tamamlayarak 2 yeni  $A_{single}$  spermatogonyumu (kendini yenileme bölünmesi) ya da intrasitoplazmik bağlantılarını koruyarak 4 hücreli  $A_{aligned}$  ( $A_{al4}$ ) spermatogonyumu oluşturmaktadırlar (Phillips ve ark., 2010; D. G. de Rooij ve Griswold, 2012).  $A_{al4}$  spermatogonyumlar 1 veya daha fazla mitotik bölünme geçirerek 8, 16 ve çoğunlukla 32 hücre içeren  $A_{al}$  spermatogonyumu oluşturmaktadırlar. Bu hücre tiplerinin tamamı ( $A_s$ ,  $A_p$  ve  $A_{al}$  spermatogonyumlar) kemirgen testisinin  $A_{single}$

spermatogonyumlar ise bu farklanmamış spermatogonyum populasyonunun %10'unu oluşturmaktadırlar (Phillips ve ark., 2010; Valli H. ve ark., 2015).  $A_{al}$  spermatogonyumların oluşturduğu hücre kümeleri  $A_1$  spermatogonyumlara farklılıklar ve bu hücrelerde ardarda geçirdikleri mitoz bölünmeler ile  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$ , intermediate ve tip B spermatogonyumları oluşturur. Tip B spermatogonyumlar primer spermatositlere farklılıklar. Ardından primer spermatositler 2 mayoz bölünme geçirerek sekonder spermatositleri oluştururlar ve spermiyogenez sürecine girecek olan yuvarlak spermatidler oluşur. Spermatidler spermiyogenez (morfolojik değişim süreci) ni geçirdikten sonra olgun sperm hücresi oluşur. Böylece, bir seri mitotik ve mayotik bölünme sürecinin ardından kök hücrelerin küçük bir miktarı kemirgen testisinde günde gram başına 40 milyon sperm hücresi üretmektedir (Tegelenbosch ve de Rooij, 1993; Thayer ve ark., 2001; Valli H. ve ark., 2015).

Kemirgen testisindeki farklanmamış spermatogonyum ve progenitor spermatogonyumlar hücre boyutlarına ve ekspresyon ettikleri belirteçlere göre tanımlanmaktadır. Belirteçler histolojik kesitlere immünohistokimyasal boyamalar yapılarak ya da seminifer tübüllerde whole mount immünohistokimya yapılarak gözlenebilmektedir. Buna ek olarak floresan bağımlı hücre izolasyon yöntemi ya da akım sitometrisi yöntemleri ile de hücreler karakterize edilebilmektedir. Fakat hücre boyutları yalnızca seminifer tübüllere whole mount immünohistokimya yöntemi uygulanarak belirlenebilmektedir. Bu belirteçlerin ekspresyonları kök hücrelerin transplantasyonu sonrası hücre serilerinin whole mount immünohistokimya ile izlenmesi ile de gözlenebilmektedir. Fakat bu belirteçlerin hiçbirinin sadece  $A_{single}$  spermatogonyumlarda ya da başka bir spermatogonyum tipinde ekspresyon olduğunu söylemek mümkün değildir. Farklanmamış spermatogonyumlarda gözlenen bu moleküler heterojenite farklı çalışmalar tarafından bildirilmiştir (Suzuki ve ark., 2009; Zheng ve ark., 2009; Nakagawa ve ark., 2010; Gassei ve Orwig, 2013; Hermann ve ark., 2015). Hara ve arkadaşları GFP ile işaretli  $GFRa1^+$  hücreleri canlı görüntüleme ile izledikleri bir çalışmada geniş hücre kümelerinin fragmentasyonun  $A_{single}$  hücrelerin devamlılığı için önemli olduğunu vurgulamaktadır. Örneğin  $A_{aligned4}$  ün fragmentasyonu 2 tane  $A_{pr}$  hücrenin oluşumu, bir  $A_{al3}$  ve bir  $A_{single}$  hücrenin oluşumu ya da 4 tane  $A_{single}$  hücrenin oluşumu şeklinde de olabilmektedir (Hara ve ark., 2014).

Bugüne kadar, bir spermatogonyal kök hücrenin fonksiyonunun net bir şekilde tanımlanması için kullanılan yöntemler, transplantasyon sonrası uzun süre spermatogenezi devam ettirip ettiremediğinin gözlenmesi ya da hücre serisinin canlı görüntüleme ile izlenmesidir (Nakagawa ve ark., 2007; Aloisio ve Manjunath, 2014; Komai ve ark., 2014). Henüz hiçbir çalışma bir spermatogonyal kök hücre tipini spesifik bir boyut ya da spesifik bir belirteç ile tanımlamamaktadır. Bununla birlikte yapılan çalışmalar az hücreden oluşan hücre kümelerinin daha fazla hücre içeren kümelere göre daha az farklılaşmış olduklarını göstermektedir. Ayrıca geniş hücre kümelerinin bir farklılaşma belirteci olan cKIT proteinini ekspres ettikleri ve bu hücrelerin A1 spermatogonyaya dönüşüm aşamasında olduğu bilinmektedir. Kemirgenlerdeki farklılaşmış A1 spermatogonyaya insan olmayan primatlarda tip B1 spermatogonyuma, insanda ise tip B spermatogonyuma karşılık gelmektedir. Bu değerlendirme heterokromatin yapının gözlenmesi ve cKIT ekspresyonunun başlamasına göre yapılmıştır. Bir spermatogonyal kök hücre belirtecinin cKIT ile birlikte lokalizasyonunun whole mount boyanmalarında gözlenmesi farklılaşmamış ya da progenitör hücrelerin boyutları hakkında bilgi vermektedir. Kemirgenlerde farklılaşmaya geçiş 16 hücreli aşamada ya da bazen 8 hücreli aşamada gerçekleşebilirken, (Tokuda ve ark., 2007a; Suzuki ve ark., 2009; Gassei ve Orwig, 2013; Hara ve ark., 2014) insan olmayan primatlarda ve insanda bu geçiş daha erken dönemlerde olmaktadır.

#### **2.4. Yüksek Primatlarda Gözlenen Spermatogonyal Kök Hücreler ve Spermatogenik Hücre Serisi ve Bu Hücrelerin Gelişimi**

İnsan olmayan primatlarda ve insanda nükleer morfolojilerine ve hematoksilen ile boyanma yoğunluklarına göre ayırt edilebilen,  $A_{dark}$ ,  $A_{pale}$  ve tip B spermatogonyumlar olmak üzere 3 farklı spermatogonyum tipi bulunmaktadır (Clermont ve Leblond, 1959; Clermont, 1966; Clermont ve Antar, 1973).  $A_{dark}$  spermatogonyumlar bazal membran üzerine oturmuş olan küçük, yuvarlak ve kısmen oval hücrelerdir ve boyanmış olan nükleusları koyu gözlenir. Ayrıca  $A_{dark}$  spermatogonyumlarda yoğun bir kromatin yapı gözlenmektedir.  $A_{pale}$  spermatogonyumlar daha geniş, oval ve seminifer tübülün bazaline oturmuş çoğunlukla yuvarlak görünen hücrelerdir.  $A_{pale}$  spermatogonyumlar soluk uzamış ve granüler bir kromatin yapısına sahiptir. Tip B spermatogonyumlar kısmen daha geniş, bazal membrana yakın yuvarlak nükleusa sahip hücrelerdir. Granüler

yapısı ve heterokromatin yoğunluğu ile diğer hücre tiplerinden ayırt edilebilmektedirler. B1 spermatogonyumlar heterokromatik bir yapıya sahipken, B4 spermatogonyumlar daha yoğun bir heterokromatik yapıya sahiptir. Bazı çalışmalar  $A_{\text{dark}}$  spermatogonyumların alt populasyonunda rarefraction zone (kromatinden yoksun kavite) tanımlanmıştır. Bu kavitenin gözlenmesinin fiksasyon bağımlı olabileceği düşünülmektedir ve insanlarda  $A_{\text{dark}}$  spermatogonyumları tanımlamak için kullanılmaktadır (Schulze, 1978; Paniagua ve Nistal, 1984; von Kopylow ve ark., 2010; Lim ve ark., 2011). 1959 yılında Clermont ve Leblond'un çalışmasına göre, A1( $A_{\text{dark}}$ ) spermatogonyumların hem kök hücrelerin kendilerini yenilemelerini sağlamak için hem de A2 ( $A_{\text{pale}}$ ) spermatogonyumları oluşturmak için bölünen kök hücreler olduğu bilinmektedir. Ardından A2 ( $A_{\text{pale}}$ ) spermatogonyumlar geçirdikleri bölünmeler ile farklılaşmış B1 spermatogonyumları oluşturmaktadırlar (Clermont ve Leblond, 1959). Clermont bu çalışmayı 10 yıl sonra revize etmiştir ve Vervet maymununun (*Cercopithecus aethiops*) da hücreleri  $^3\text{H}$ -thymidine ile *in vivo* işaretleyerek  $^3\text{H}$ -thymidine inkorporasyonun  $A_{\text{pale}}$  spermatogonyumlarda olduğunu göstermiştir (Clermont, 1969). Bu işaretleme sonrasında  $A_{\text{dark}}$  spermatogonyumların normal koşullarda bölünmediğini göstermiştir. Bu sonuç dahilinde  $A_{\text{pale}}$  spermatogonyumları aktif spermatogonyal kök hücreler olarak,  $A_{\text{dark}}$  spermatogonyumları ise kemoterapi ya da radyasyona maruz kalma gibi durumlarda spermatogenezi tekrar aktive eden rezerv kök hücreler olarak tanımlamıştır (Clermont, 1969). Bu modelin tanımlanması için yapılan deneyler insan olmayan primatlarda yapılmıştır. X irradiasyonu yapılan insan testisinde  $A_{\text{pale}}$  spermatogonyumların kaybedildiği ve  $A_{\text{dark}}$  spermatogonyumlar tarafından bu kaybın geri döndürüldüğü gözlenmiştir (Clifton ve Bremner, 1983; van Alphen ve ark., 1988a). Ehmecke ve Schlatt'ın yapmış olduğu çalışmada da  $A_{\text{dark}}$  spermatogonyumların düşük mitotik indeks ve rejeneratif kapasiteye sahip olmalarının rezerv kök hücre karakteri ile uyumlu olduğunu,  $A_{\text{pale}}$  spermatogonyumların düzenli mitotik indekse sahip olmalarının da progenitör hücre karakteri ile uyumlu olduğunu vurgulanmaktadır (Ehmecke ve ark., 2006).

Son 50 yılda farklı çalışmalarda  $A_{\text{dark}}$  ve  $A_{\text{pale}}$  spermatogonyumların mitotik aktivitelerin gözlenmesi için işaretleme yapılmıştır ve bunlardan yalnız 4 tanesinde  $A_{\text{dark}}$

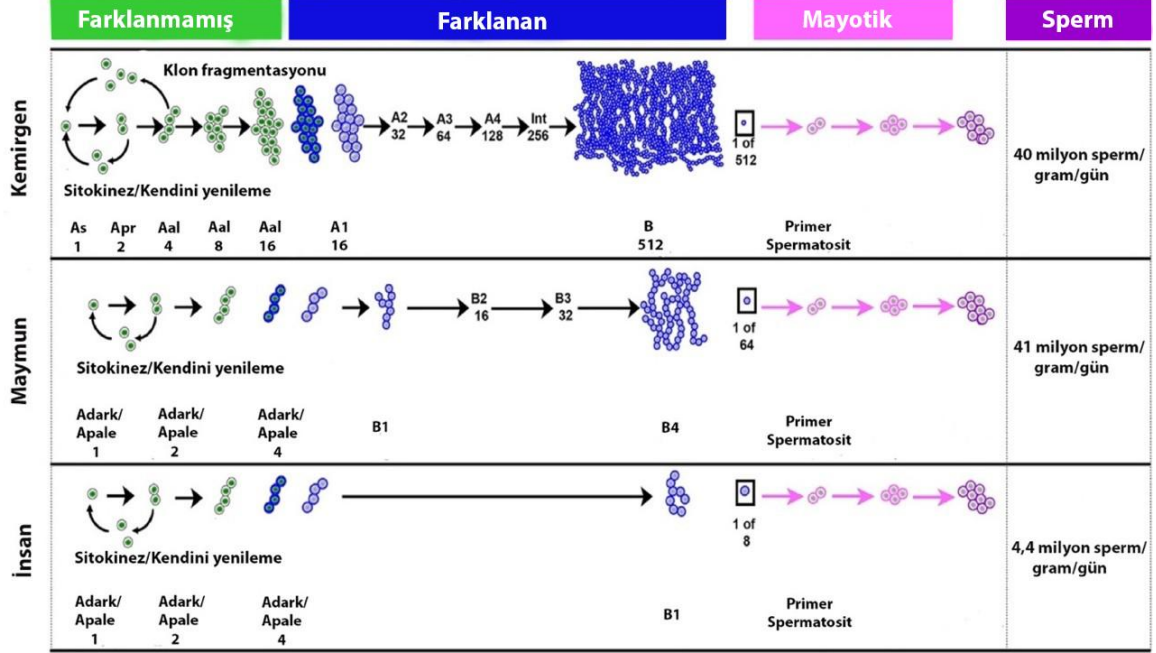


spermatogonyumların hiç işaretlenmediği (D. G. de Rooij ve ark., 1986; Schlatt ve Weinbauer, 1994; Buageaw, 2005; Simorangkir ve ark., 2009) diğerlerinde ise  $A_{dark}$  spermatogonyumların birkaçının ve  $A_{pale}$  spermatogonyumların işaretlendiği gözlenmiştir (Clermont ve Antar, 1973; Kluin ve ark., 1983; Fouquet ve Dadoune, 1986; Ehmcke ve ark., 2005). Bunlara ek olarak Hermann ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada insan spermatogonyal kök hücrelerinden  $A_{dark}$  spermatogonyumların uzun süre hücre siklusunun GO evresinde kaldığı,  $A_{pale}$  spermatogonyumların ise aktif olarak bölünme evrelerinde (G1/G2/M) olduğu gözlenmiştir (Hermann ve ark., 2010). Bu bilgiler ile uyumlu olarak von Kopylow ve arkadaşları insan testisinde  $A_{pale}$  spermatogonyumların KI67 ekspresyonunu fakat  $A_{dark}$  spermatogonyumlarda KI67 ekspresyonunun gözlenmediğini göstermişlerdir (von Kopylow ve ark., 2012). Tüm bu çalışmalardan çıkan sonuç;  $A_{dark}$  spermatogonyumların nadir bölünen ve hücre siklusunun GO aşamasında uzun süre kalan ve proliferasyon ile ilgili belirteçleri düşük ekspresyon eden, rejeneratif özellikleri yüksek olan hücreler olduğu,  $A_{pale}$  spermatogonyumların ise düzenli bölünme geçiren ve proliferasyon ile ilişkili proteinleri yüksek seviyede ekspresyon eden hücreler olduğu yönündedir. Hücre karakterlerinde gözlenen bu değişimlere ek olarak spermatogonyal kök hücrelerin klonal ekspansiyonu da türler arasında farklılıklar göstermektedir.

## **2.5. Kemirgen ve Yüksek Primatlarda Klonal Ekspansiyon**

Spermatogonyal kök hücrelerin geçirdikleri bölünme sayısı, ekspansiyonu ve oluşturdukları matür sperm sayısı türden türe değişkenlik göstermektedir. Seri kesitlerde 3 boyutlu görüntüleme ile maymundaki  $A_{dark}$  ve  $A_{pale}$  spermatogonyumların B1 spermatogonyumlara farklılaşmadan önce 1 veya 2 bölünme geçirerek 1, 2 ve 4 hücreli hücre kümeleri oluşturduğu gösterilmiştir (Clermont ve Leblond, 1959; Clermont, 1969). Farelerde ise A1 spermatogonyaya farklılaşmadan önce daha fazla bölünme gerçekleşmektedir. İnsan olmayan primatlarda farklılaşmadan sonra B1, B2, B3, B4 spermatogonyumlar oluşmakta ve ardından primer spermatositler oluşmaktadır (Clermont ve Leblond, 1959). Dolayısıyla insan olmayan primatlarda ilk farklılaşmadan spermatosite kadar olan bölünme sayısı fareye göre daha az sayıdadır. Kemirgenler ve insan olmayan primatlarda hücre bölünmeleri farklı olmasına rağmen, insan olmayan primatlarda ve kemirgenlerde oluşan matür sperm sayısı, günde gram başına 40 milyon

olmak üzere ve aynıdır. İnsanda ise bir jenerasyon farklılaşmış tip B spermatogonyum bulunmaktadır ve günde gram başına 4.4 milyon matür sperm hücresi üretilmektedir (Valli H. ve ark., 2015) (Şekil 2.1).



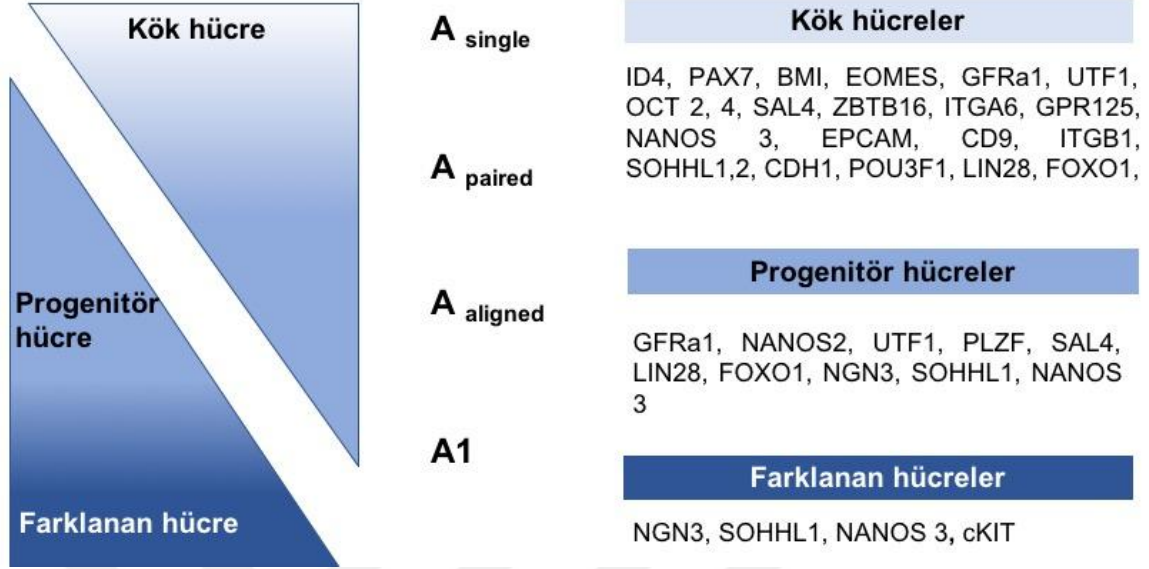
Şekil 2.1. Kemirgen, maymun ve insanda gözlenen spermatogonyal kök hücre tipleri ve spermatogenik hücre serisi ve hücrelerin gelişim basamakları (Fayomi ve Orwig, 2018), modifiye edilmiştir.

## 2.6. Kemirgen Spermatogonyal Kök Hücre Belirteçlerinin Tanımlanması ve İzolasyonu

Spermatogonyal kök hücrelerin karakterlerinin tanımlanması için yapılan morfolojik analizler ve gelişimlerini araştıran çalışmalara ek olarak bu hücrelerin ekspre ettikleri belirteçlerin tanımlanması da bu hücreler ile yapılacak olan çalışmalar için büyük önem arz etmektedir. Yukarı da belirtildiği gibi, spermatogonyal kök hücreler ile ilgili birçok bilgi kemirgenler ile yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Bu çalışmalarda kök hücreler ya da progenitör hücrelerin ekspre ettikleri bazı belirteçler gösterilmiştir. GDNF Family Receptor Alpha 1 (GFRa1), POU Class 3 Homeobox 1 (POU3F1), POU Class 5 Homeobox 1 (POU5F1), Octamer-Binding Protein 4 (OCT4), Zinc Finger ve BTB Domain Containing 16 (ZBTB16), The Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger (PLZF), Neurogenin 3 (NGN3), Nanos homolog 2 (NANOS2), Nanos homolog 3 (NANOS3), Spermatogenesis And Oogenesis Specific Basic Helix-Loop-Helix 1 (SOHLH1), Spermatogenesis And Oogenesis Specific Basic Helix-Loop-Helix 2 (SOHLH2),

Forkhead Box Protein O1 (FOXO1), Integrin Subunit Alpha 6 (ITGA6,  $\alpha$ 6- integrin, CD49f), Lin-28 Homolog A (LIN28), ID4, Undifferentiated Embryonic Cell Transcription Factor 1 (UTF1), Cadherin 1 (CDH1), G protein-coupled receptor (GPR125), Integrin Subunit Beta 1 (ITGB1,  $\beta$ 1-integrin, CD29), Epithelial Cell Adhesion Molecule (EPCAM, CD326), CD9 Molecule (CD9), Thymus Cell Antigen 1 (THY1, CD90), Paired Box 7 (PAX7), B Cell-Specific Moloney Murine Leukemia Virus Integration Site 1 (BMI1) ve Eomesodermin (T Box Brain Protein 2) (EOMES, Tbr2) gibi belirteçler tanımlanmıştır (Shinohara ve ark., 1999; Kubota ve ark., 2003; Tsuda ve ark., 2003; Buaas, 2004; Costoya, 2004; Ohmura ve ark., 2004; Ryu ve ark., 2004; Yoshida ve ark., 2004; Hofmann ve ark., 2005; Ballow ve ark., 2006; Naughton ve ark., 2006; Yoshida ve ark., 2006; He ve ark., 2007; Seandel ve ark., 2007; Tokuda ve ark., 2007a; Kanatsu-Shinohara ve ark., 2008; Lolicato ve ark., 2008; Seandel ve ark., 2008; van Bragt, 2008; Suzuki ve ark., 2009; Toyoda ve ark., 2009; Zheng ve ark., 2009; Goertz ve ark., 2011; Barrios, 2012; Murozono ve ark., 2013) (Şekil 2.2).

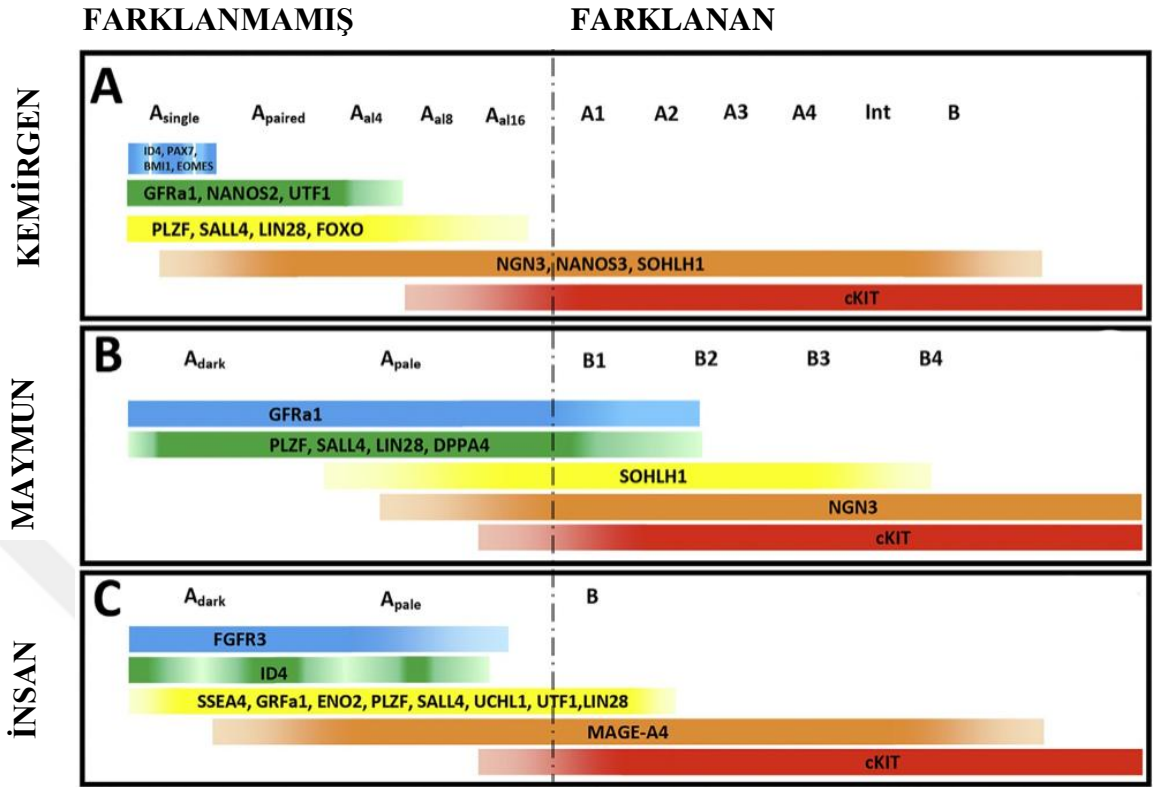
Whole mount immünohistokimya sonuçlarına göre ID4, PAX7, BMI1 ve EOMES belirteçleri en kısıtlı ekspresyon seviyesine sahip olan belirteçler olarak tanımlanmaktadır ve ekspresyonu yalnızca  $A_{single}$  spermatogonyumlarda gözlenmektedir (M. J. Oatley ve ark., 2011; Aloisio ve Manjunath, 2014; Komai ve ark., 2014; Braun ve ark., 2017). GFR $\alpha$ 1, NANOS2 ve UTF1  $A_s$ ,  $A_{pr}$  ve  $A_{al4}$  spermatogonyumlarda ekspre olmaktadır (Meng, 2000; van Bragt, 2008; Suzuki ve ark., 2009). ZBTB16, SAL4, LIN28, CDH1 ve FOXO1 belirteçleri farklılaşmış spermatogonyumlarda ekspre olan cKIT ile birlikte de lokalize olabilen tüm farklılaşmamış spermatogonyumlarda ( $A_{single}$ ,  $A_{paired}$  ve  $A_{aligned}$ ) ekspre olmaktadır (Buaas, 2004; Costoya, 2004; Tokuda ve ark., 2007b; Goertz ve ark., 2011; Eildermann ve ark., 2012; Hobbs, 2012; Gassei ve Orwig, 2013). Kısıtlı ekspresyon seviyelerine sahip olduklarından ID4, PAX7 ve BMI1 belirteçlerini ekspre eden hücrelerin esas spermatogonyal kök hücreler olduğu düşünülmektedir (D.G. de Rooij, 2017; Hesel ve ark., 2017; Lord ve Oatley, 2017). Yukarıda belirtilen belirteçlerden hücre yüzey belirteçleri ve sitoplazmik belirteçler literatürde spermatogonyal kök hücrelerin izolasyonları ve izolasyon sonrası hücre karakterlerinin belirlenmesi için kullanılmaktadır.



**Şekil 2.2.** Kemirgenlerde gözlenen spermatogonyal kök hücrelerin ekspre ettikleri belirteçler (Valli ve ark., 2014; Fayomi ve Orwig, 2018).

## 2.7. İnsan Spermatogonyal Kök Hücrelerinin Belirteçlerinin Tanımlanması ve İzolasyonu

İnsan spermatogonyal kök hücrelerinin moleküler fenotipleri hakkında literatürde oldukça az bilgi mevcuttur. Literatürdeki çalışmalara göre; UTF1, OCT2, EXOSC10, GDNF, GFRA1, CD9, SSEA4, GPR125, UCHL1, ZBTB16, ENO2, SALL4, LIN28, NANOS2, ITGA6 (a6- integrin, CD49f), EPCAM ve Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) gibi belirteçlerin insan spermatogonyal kök hücrelerini tanımlamak için ideal belirteçler olduğu belirtilmiştir (Shinohara ve ark., 2001; C. J. Brinster ve ark., 2003; Ryu ve ark., 2003; He ve ark., 2010; Ishii ve ark., 2012; Mirzapour ve ark., 2012; Sachs ve ark., 2014; Valli ve ark., 2014). Bazı çalışmalarda THY1, ITGA6 ve EPCAM belirteçlerinin insan spermatogonyal kök hücrelerin izolasyonunda kullanıldığı gösterilmektedir (Shinohara ve ark., 1999; Kubota ve ark., 2003; Ryu ve ark., 2004; Hermann ve ark., 2009). THY1'in kemirgenlerde ve insan olmayan primatlarda korunmuş bir spermatogonyal kök hücre belirteci olduğu bilinmektedir (Kubota ve ark., 2003). THY1'in ayrıca insan spermatogonyal kök hücrelerinde ekspre olduğu da gösterilmiştir (He ve ark., 2010). Bu belirteçler deneysel çalışmalarda kök hücreleri tanımlamak ve izole etmek için kullanılabilir. Kemirgenlerde, insan olmayan primatlarda ve insanda farklanmamış ve farklanma sürecine girmiş olan spermatogonyal kök hücrelerde ekspre olan belirteçler karşılaştırılmıştır (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3:** Kemirgen, maymun ve insanda tanımlanan farklanmamış ve farklanma sürecine girmiş olan spermatogonyumlarda ekspre olan kök hücre belirteçleri (Fayomi ve Orwig, 2018), modifiye edilmiştir.

İnsan spermatogonyal kök hücrelerinin izolasyonları; 3 farklı yöntem ile yapılabilmektedir.

## 2.8. Differential Plating (Aşamalı Pasajlama)

Aşamalı pasajlama yöntemi; 2 aşamadan oluşmaktadır; testis dokusundan enzimatik sindirim ile testiküler hücre süspansiyonunun elde edilmesi ve elde edilen hücrelerin standart kültür koşullarında inkübe edilmesinin ardından yüzen hücrelerin spermatogonyal kök hücreler olarak alınmasını içermektedir. Bu amaçla; ilk olarak testis dokusundan 2 aşamalı enzimatik sindirim (kollajenaz, tripsin-edta) ile testiküler hücre süspansiyonu elde edilir. Bu amaçla ilk olarak testis dokusu kollajenaz ile 37°C de 20 dakika inkübe edilerek interstisyel alandaki hücreler ve seminifer tübülün duvarı yıkılır. Ardından hücreler tripsin-EDTA/DNAaz varlığında 37°C de 10-15 dakika inkübe edilerek testiküler hücre süspansiyonu elde edilir. Bu işlemin ardından tüm testiküler hücreleri içeren süspansiyonu petrielerde bir gece standart koşullarda (DMEM ve %10 FBS içeren medyum varlığında) kültüre edilir. Bu aşamada hücrelerden somatik karakterde olan hücreler petriye tutunurken spermatogonyal kök hücreler yüzen hücreler

olarak kalmaktadır. Ertesi gün yüzen hücreler spermatogonyal kök hücre içeren süspansiyon olarak alınır ve 1 gece daha standart koşullarda (DMEM ve %10 FBS içeren medyum varlığında) kültüre edilir. Bir sonraki gün yüzen hücreler spermatogonyal kök hücre süspansiyonu olarak alınır ve karakterize edildikten sonra yapılması planlanan deneyler için kullanılır. Bu yöntemin dezavantajı; minimum seviyede bile olsa spermatogonyal kök hücre süspansiyonunun içerisine somatik hücrelerin kontamine olabilesidir.

### **2.9. Floresan Aktive Hücre İzolasyonu (FACS)**

FACS yöntemi 2 aşamadan oluşmaktadır; testis dokusundan enzimatik sindirim ile testiküler hücre süspansiyonunun elde edilmesi ve spermatogonyal kök hücrelerin uygun bir belirteç için işaretlenerek hücrelerin FACS cihazı ile seçilmesini içermektedir. Bu amaçla; ilk olarak testis dokusundan 2 aşamalı enzimatik sindirim (kollajenaz, tripsin-edta) ile testiküler hücre süspansiyonu elde edilir. Bu amaçla ilk olarak testis dokusu kollajenaz ile 37°C de 20 dakika inkübe edilerek interstisyel alandaki hücreler ve seminifer tübülün duvarı yıkılır. Ardından hücreler tripsin-EDTA/DNAaz varlığında 37°C de 10-15 dakika inkübe edilerek testiküler hücre süspansiyonu elde edilir. Ardından hücreler spermatogonyal kök hücrelerin yüzey belirteçleri ya da stoplazmik belirteçlerinin floresan bağlı antikoları kullanılarak işaretlenmesi ve ilgili belirteç açısından negatif ve pozitif olan hücre popülasyonlarının izole edilmesi şeklinde uygulanmaktadır. Yüksek spesifite de seçim imkanı sağlayan bir izolasyon yöntemidir. Donanımlı bir ekipman ve deneyimli bir operatör gerektirmektedir. Bir günde izole edilebilecek hücre sayısı sınırlıdır ve maliyeti yüksek bir izolasyon yöntemidir.

### **2.10. Manyetik Aktive Hücre İzolasyonu (MACS)**

MACS yöntemi 2 aşamadan oluşmaktadır; testis dokusundan enzimatik sindirim ile testiküler hücre süspansiyonunun elde edilmesi ve spermatogonyal kök hücrelerin uygun bir belirteç için işaretlenerek MACS kolonundan geçirilmesini içermektedir. Bu amaçla; ilk olarak testis dokusundan 2 aşamalı enzimatik sindirim (kollajenaz, tripsin-edta) ile testiküler hücre süspansiyonu elde edilir. Bu amaçla ilk olarak testis dokusu kollajenaz ile 37°C de 20 dakika inkübe edilerek interstisyel alandaki hücreler ve seminifer tübülün duvarı yıkılır. Ardından hücreler tripsin-EDTA/DNAaz varlığında 37°C de 10-15 dakika

inkübe edilerek testiküler hücre süspansiyonu elde edilir. Ardından hücreler spermatogonyal kök hücrelerin yüzey belirteçleri ya da stoplazmik belirteçlerinin manyetik boncuk bağlı antikoları kullanılarak işaretlenmesi ve ilgili belirteç açısından negatif ve pozitif olan hücre popülasyonları izole edilmesi şeklinde uygulanmaktadır. FACS yöntemine göre daha az spesifik bir izolasyon yöntemidir. Laboratuvar benci üzerinde bir tabla ve ayırıştırıcı ile yapılabilir. Teknik açıdan çok tecrübe gerektirmez. Kısa sürede daha fazla hücre izole edilebilir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar da insan spermatogonyal kök hücreleri farklı belirteçler kullanılarak FACS ve MACS yöntemi ile izole edilmiş ve izole edilen hücreler fare testisine transplante edilerek hücrelerin koloni oluşturma kapasiteleri değerlendirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda spermatogonyal kök hücre izolasyonunda kullanılacak belirteçlerden FACS ve MACS için ideal olan bazı belirteçler tanımlanmıştır. Spermatogonyal kök hücre zenginleştirme için MACS izolasyon yöntemi tercih edilecek ise ITGA6, GPR125, CD9, SSEA4 belirteçlerinin kullanılmasının kök hücre zenginleştirme için uygun olduğu belirtilmektedir. FACS yöntemi kullanıldığında ise ITGA6<sup>+</sup>, SSEA4<sup>+</sup>, EPCAM<sup>lo</sup> ve THY1<sup>lo</sup> hücrelerin kullanılmasının kök hücre zenginleştirme için uygun olduğu belirtilmektedir. Birçok çalışmada insan spermatogonyal kök hücrelerinin yüzey belirteçlerine (GPR125, SSEA4, EPCAM, ITGA6 ve CD9) göre izole edilerek zenginleştirildiği gösterilmiştir (He ve ark., 2010; Izadyar ve ark., 2011; Zohni ve ark., 2012; Dovey ve ark., 2013; Valli ve ark., 2014). FACS yöntemi ile EPCAM<sup>+</sup> insan spermatogonyal kök hücrelerinin izole edildiği bir çalışmada bu hücrelerin ksenotransplantasyon sonrasında fare seminifer tübüllerinde kolonizasyonu sağladığı gösterilmiştir (Dovey ve ark., 2013).

İnsan spermatogonyal kök hücrelerinin izolasyonu ve zenginleştirilmesini sağlamak amacıyla yüzey belirteçlerinin tanımlanması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Yüzey belirteçlerine ek olarak araştırmacılar insan seminifer tübüllerinin bazal membran üzerinde bulunan kök hücrelerin SALL4, ZBTB16, UTF, UCHL1 ve ENO2 belirteçlerini ekspre ettiklerini göstermişlerdir (Kristensen ve ark., 2008; X. Wu ve ark., 2009; He ve ark., 2010; von Kopylow ve ark., 2010; Eildermann ve ark., 2012; Kossack ve ark., 2013). SAL4, Sal gen ailesine ait olan ve türler arasında korunmuş bir

transkripsiyon faktörüdür (Kuhnlein ve ark., 1994; Hollemann ve ark., 1996; Kohlhase ve ark., 1996; Ott ve ark., 1996; Camp ve ark., 2003; Sweetman ve ark., 2003; Kossack ve ark., 2013). SAL4'ün insan spermatogonyal kök hücrelerinin belirteci olduğu gösterilmiştir (Dovey ve ark., 2013). Ubiquitin Carboxylterminal Esterase L1 (UCHL1, PGP9.5) insan spermatogonyumların da tanımlanan intraselüler bir belirteçtir. FACS yöntemi her durumda spesifik seçim yapmak için en geçerli yöntemdir fakat elde edilen hücre sayısının az olması ve maliyetinin yüksek olması yöntemin kullanılabilirliğini kısıtlamaktadır. Buna ek olarak spermatogonyal kök hücrelerinin kendilerini yenilemelerini ve proliferasyonlarını sağlayan faktörler bulunmaktadır.

### **2.11. Kemirgen Spermatogonyal Kök Hücreleri ile Yapılan *In Vitro* Çalışmalar**

Kemirgen spermatogonyal kök hücrelerinin izolasyonu ve *in vitro* kültürü ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır ve bu çalışmalar sonucunda oldukça başarılı sonuçlar elde edilebilmiştir. Yapılan çalışmalarda spermatogonyal kök hücrelerin karakterleri yukarıda belirtilen kök hücre belirteçlerini ekspres etmelerine göre, aktiviteleri ise infertil alıcı farelerin testislerine transplante edildikten sonra spermatogenezi devam ettirmelerine göre değerlendirilebilmektedir. Kemirgen spermatogonyal kök hücrelerinin *in vitro* koşullarda çoğaltılabilmeleri ve sonrasında alıcı farelerin testislerine transplante edilerek spermatogenez sürecinin tamamlanabildiği ilk kez 1994 yılında gösterilmiştir. Brinster ve arkadaşları fare spermatogonyal kök hücrelerini alıcı farelere transplante ederek donor kökenli spermatogenez gözlemişler ve canlı yavru elde etmeyi başarabilmişlerdir (R. L. Brinster ve Avarbock, 1994; R. L. Brinster ve Zimmermann, 1994). Fakat bu çalışmada yalnızca 3 alıcı farede transplantasyondan 8 ay sonra canlı doğum gözlenebilmiştir. Canlı doğum başarısının düşük olması nedeni ile hücrelerin uzun süre *in vitro* koşullarda ekspansiyonlarının sağlanabilmesi ve daha kısa süre yavru eldesi için çalışmalar devam etmiştir.

Yıllarca yapılan denemelerden sonra fare SKH lerinin uzun süreli kültür ile ekspansiyonu 2003/2004 yıllarında tanımlanmıştır (Kubota ve ark., 2004b; Takashima ve Shinohara, 2018). Yapılan bir çalışmada bir haftalık testisten alınan fare THY1<sup>+</sup> hücrelerinin GDNF, GFRA1 ve FGF içeren medyumda STO destekleyici hücreleri ile kültüre edildiklerinde yüksek oranda kök hücre özellikleri taşıyan hücreler içeren germ



hücre kümeleri oluşturdukları ve pasajlama sonrası sayılarının arttığı gözlenmektedir (Kubota ve ark., 2004b). Hücrelerin kök hücre özellikleri transplantasyon deneyi ile de gösterilmiştir. Fare SKH lerinin uzun süreli kültür başarısı; (i) kültürde hızlı bir şekilde proliferere olabilecek olan somatik hücrelerin ayrıştırılarak SKH lerin izole edilebileceği ve zenginleştirilebileceği izolasyon yöntemlerinin geliştirilebilmesi (Kubota ve ark., 2004b; Takashima ve Shinohara, 2018), (ii) GDNF nin kullanımının fare SKH lerini uzun süreli kültür sırasında destekleyebileceğinin ortaya konması (Nagano ve ark., 2003; Kubota ve ark., 2004a; J. M. Oatley ve Brinster, 2006; Takashima ve Shinohara, 2018) (iii) Kültürde kullanılan SKH lerin gelişim aşamasında en fazla sayıda elde edilebilecekleri bir haftalık farelerden alınması (Shinohara ve ark., 2001) ve fare STO hücreleri veya fare embriyonik fibroblastları ile kültüre edilmesidir (Kubota ve ark., 2004b; Takashima ve Shinohara, 2018).

Bununla birlikte, SKH kültürü doğumdan erişkine kadar her yaşta (Kubota ve ark., 2004b; Takashima ve Shinohara, 2018) ve destekleyici hücreden yoksun ortamda gerçekleştirilebilir (Kanatsu-Shinohara ve ark., 2005; Kanatsu-Shinohara ve ark., 2014). SKH lerin uzun süreli kültürü ile yöntemler sıçan ve hamster için de tanımlanmıştır ve GDNF nin etkisinin bu türler içinde korunduğu gözlenmiştir (Hamra ve ark., 2005; Ryu ve ark., 2005; Kanatsu-Shinohara ve ark., 2008). Transplantasyon deneylerinin sonuçları uzun süre kültüre edilmiş SKH lerin spermatogenezi yeniden oluşturduğu, fonksiyonel sperm ürettiği ve fertilitiyi restore ettiği gösterilmiştir (Kubota ve ark., 2004b; Hamra ve ark., 2005; Ryu ve ark., 2005; Kanatsu-Shinohara ve ark., 2008). Hayvan modellerinde yapılan çalışmalar (Ogawa ve ark., 2000; Nagano ve ark., 2001; Shinohara ve ark., 2001; C. J. Brinster ve ark., 2003; Honaramooz ve ark., 2003; Ryu ve ark., 2003; Mikkola ve ark., 2006; Kim ve ark., 2008; Herrid, 2009; Hermann ve ark., 2012) kliniğe yansıtılabilirse otolog transplantasyon ile doğal fertilitenin gerçekleştirilmesi sağlanabilecektir. Bunun gerçekleşebilmesi için ilk aşamada insan spermatogonyal kök hücrelerinden homojen hücre izolasyonu yapılabilecek (izolasyon) yöntemlerin belirlenmesi ve en önemlisi az sayıda hücreden fertilitiyi restore edecek sayıda hücre elde edilmesi gerekmektedir. Bu sebeple insan spermatogonyal kök hücrelerinin *in vitro* koşullarda çoğaltılabilmesi, bunun için de spermatogonyal kök hücrelerin gelişimini destekleyen faktörlerin belirlenmesi gerekmektedir.

## 2.12. Spermatogonyal Kök Hücre Gelişimine Etki Eden Faktörler

### 2.12.1. Gliyal Kökenli Nörotrofik Faktör (GDNF) ve Spermatogonyal Kök Hücre Gelişimindeki Rolü

GDNF; böbrek ve periferik sinir sisteminin gelişiminde rol oynayan bir faktördür. GDNF yokluğunda fareler renal ve nöronal bozukluklar nedeni ile doğumda ölmektedirler (Kliesch ve ark., 1996). GDNF rodent spermatogonyal kök hücrelerinin kendini yenilemelerinde temel düzenleyicidir (Kubota ve ark., 2004b; Ryu ve ark., 2004). GDNF; Sertoli hücrelerinden salınan ve *in vivo* ve *in vitro* koşullarda spermatogonyal kök hücrelerin kendilerini yenilemeleri ve devamlılığını sağlayan parakrin bir faktördür. GDNF <sup>+/+</sup> farelerde spermatogonyal kök hücre havuzunun tükenmesi ve ileri aşamada germ hücre kaybı olduğu bilinmektedir. GDNF aşırı ekspresyonun da ise farklanmamış spermatogonyumların seminifer tübüllerde biriktiği gözlenmektedir (Kliesch ve ark., 1996). GDNF koreseptör olarak görev yapan GFRA1'e bağlanarak ve c-RET aracılığı ile spermatogonyal kök hücrelerde hücre içi sinyali başlatmaktadır (Sariola ve Saarma, 2003; Kubota ve ark., 2004b; J. M. Oatley ve ark., 2006). GDNF aynı zamanda spermatogonyal kök hücrelerin kendilerini yenilemelerini ve devamlılığını sağlayan alt sinyal yolları olan fosfatidylinositol-3-kinase/AKT ve Src-family kinase (PI3K/AKT ve SFK) sinyal yollarını da aktive etmektedir (Braydich-Stolle ve ark., 2007; Lee ve ark., 2007; J. M. Oatley ve ark., 2007). GDNF, B cell CLL/lymphoma 6 member B (BCL6B), Ets variant 5 (ETV5), ID4, LIM homeobox 1 (LHX1), POU3F1 gibi transkripsiyon faktörlerini aktive ederek spermatogonyal kök hücre gelişiminde rol oynamaktadır (J. M. Oatley ve ark., 2006).

Yapılan çalışmalarda bu genlerin baskılanması ya da yokluğu durumunda spermatogonyal kök hücrelerin *in vivo* ve *in vitro* gelişimlerinin baskılandığı gösterilmektedir (Coulson ve ark., 2001; J. M. Oatley ve ark., 2007; Tokuda ve ark., 2007a). RET, GFRA1, ETV5, ID4 ve BCL6B'in insan spermatogonyal kök hücrelerinde somatik hücrelere göre daha fazla ekspre olduğu bilinmektedir (X. Wu ve ark., 2009; Sachs ve ark., 2014). Yapılan bir çalışmada bir haftalık testisten alınan fare THY1<sup>+</sup> hücrelerinin GDNF, GFRA1 ve FGF içeren medyumda STO destekleyici hücreleri ile kültüre edildiklerinde yüksek oranda kök hücre özellikleri taşıyan hücreler içeren germ hücre kümeleri oluşturdıkları ve pasajlama sonrası sayılarının arttığı gözlenmektedir

(Kubota ve ark., 2004b). Hücrelerin kök hücre özellikleri transplantasyon deneyi ile de gösterilmiştir. Farklı çalışmalarda GDNF'nin farklı türlere ait spermatogonyal kök hücrelerinin uzun süreli kültüründe etkili olduğu gösterilmiştir (Kubota ve ark., 2004b; Hofmann ve ark., 2005). Başka bir çalışmada ise GDNF'nin sığır spermatogonyal kök hücrelerin gelişimini desteklediği gösterilmiştir (Aponte ve ark., 2008). 2009 yılında yapılan bir çalışmada *in vitro* koşullarda GDNF'nin insan ve fare spermatogonyal kök hücre gelişiminde ortak olan bir faktör olduğu gösterilmiştir (X. Wu ve ark., 2009).

### **2.12.2. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) ve Spermatogonyal Kök Hücre Gelişimindeki Rolü**

Fibroblast büyüme faktörleri (FGF) gelişim faktörlerinden oluşan bir ailedir ve birçok farklı organizmada tanımlanmıştır. FGF' ler mitogenez, farklılaşma, hücre göçü ve hücre canlılığının sağlanması için gerekli olan birçok hücresel süreçte rol oynamaktadırlar (Goldfarb, 1996) ve germ hücre biyolojisinde önemlidirler. FGF9 ilk olarak her iki cinsiyette de gonadlarda ekspre olmaktadır ve gelişen testiste pre-Sertoli hücrelerinde sex-determining region Y (SRY) ve transkripsiyon faktörü SOX9 aktivasyonundan sonra ekspresyonu artmaktadır (Colvin ve ark., 2001; Nef ve ark., 2005). FGF9' dan yoksun XY embriyolarda postkoital 12.5 günde birçok germ hücresi ölürken, aynı etki XX embriyolarda görülmemektedir. Bu durum FGF9'un germ hücre canlılığının sağlanmasında cinsiyete özgün bir rolü olduğunu düşündürmektedir (DiNapoli ve ark., 2006). Aynı zamanda FGF9'un germ hücre pluripotensisini sağlayan genleri aktive ettiği gösterilmiştir ve FGF9 hücrelerin mayoz bölünmeye girişini indükleyerek spermatogenik gelişimi sağlamaktadır.

FGF2, (bFGF, basic fibroblast growth factor) Sertoli hücrelerinden salınan ve spermatogonyal kök hücrelerin kendilerini yenilemelerini düzenleyen önemli bir faktördür. Testiste FGF2 Sertoli hücrelerinde, Leydig hücrelerinde ve germ hücrelerinde, özellikle de tip A spermatogonyumlar, pakiten primer spermatositler ve uzayan spermatidlerde ekspre olmaktadır (Mayerhofer ve ark., 1991). FGF2 Sertoli hücreleri için yaşamlarını sağlayan bir faktör, gonositler için de mitojenik bir faktördür (Van Dissel-Emiliani ve ark., 1996). FGF2 Sertoli hücrelerinin mitojeni olarak da tanımlanmıştır (Jaillard ve ark., 1987; Van Dissel-Emiliani ve ark., 1996). FGF2'nin

Sertoli hücre belirteci olan GATA4 ekspresyonunu ve Sertoli hücre proliferasyonunu artırdığı gösterilmiştir (Kuijk ve ark., 2009). Bazı çalışmalar FGF2 nin testiküler hücrelerin proliferasyon ve farklılaşmalarında rol aldığını ve spermatogenezin düzenlenmesinde rol alabileceğini göstermektedir (Kuijk ve ark., 2009). FGF2'nin Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1 (MAP2K1) aracılığı ile Ets5, Bcl6b ve LHX1 genlerini aktive ettiği bilinmektedir (Ishii ve ark., 2012). *İn vitro* çalışmalarda FGF2'nin GDNF ile birlikte kullanımının spermatogonyal kök hücrelerin uzun süreli kendilerini yenilemelerinde ve ekspansiyonunda önemli olduğu vurgulanmaktadır (Kubota ve ark., 2004b). Bir çalışmada, domuz neonatal testisinin primer kültüründe LIF, GDNF, EGF ve FGF gibi faktörlerin etkisi değerlendirilmiş ve bu çalışmada EGF ve FGF'in spermatogonyal kök hücre benzeri hücre kolonilerinin oluşumunda ve gen ekspresyonlarında önemli bir etkiye sahip oldukları gösterilmiştir (Kuijk ve ark., 2009). Başka bir çalışmada FGF2'nin *in vitro* koşullarda AKT ve ERK in fosforilasyonu ile fare spermatogonyal kök hücrelerin proliferasyonu ve kök hücre aktivitelerini düzenlediği gösterilmiştir (Ishii ve ark., 2012). İnsanda hücre kültürüne FGF2 eklenmesinin spermatogonyal kök hücrelerin proliferasyonuna katkı sağladığı gösterilmiştir (Mirzapour ve ark., 2012).

### **2.12.3. Lösemi İnhibi Edici Faktör (LIF) ve Spermatogonyal Kök Hücre Gelişimindeki Rolü**

Lösemi inhibi edici faktör 38-67 kDa ağırlığında olan ve farklı dokularda birçok biyolojik süreçte rolü olan bir glikoproteindir. LIF ilk olarak 1980 lerde IL-6 sitokin ailesinin bir üyesi olarak tanımlanmıştır ve LIFR ve gp130 transmembran proteinlerini içeren reseptör kompleksine bağlanarak etki göstermektedir (Kubota ve ark., 2004b; Ryu ve ark., 2004; Davey ve ark., 2007). LIF' in reseptörüne bağlanması JAK-STAT ve SHP2-ERK yolları olan iki majör hücre içi sinyal yolağını aktive etmektedir. İlk aşamada LIF reseptörüne bağlanması ile JAK aktive olur ve STAT3'ü fosforile eder. Ardından STAT3 dimerizasyonu gerçekleşir (Friel ve ark., 2005) ve STAT3 dimerleri nükleusa geçerek DNA daki transkripsiyon faktörlerine bağlanır. LIF serumda bulunduğu bu mekanizma ile kök hücrelerin kendilerini yenilemelerini sağlayan genleri aktive etmektedir (Kubota ve ark., 2004b; Friel ve ark., 2005; Davey ve ark., 2007). Bu faktörlere ek olarak ayrıca spermatogonyal kök hücrelerin kendilerini

yenilemelerinde FGF8, CSF1, WNT3A, WNT5A, WNT6, ve VEGFA faktörlerinin de rolü olduğu gösterilmiştir (J. M. Oatley ve ark., 2009; Yeh ve ark., 2011; Lu ve ark., 2013; Hasegawa ve Saga, 2014).

### **2.13. İnsan Spermatogonyal Kök Hücreleri ile Yapılan *In Vitro* Çalışmalar**

Literatürde insan spermatogonyal kök hücrelerinin *in vitro* koşullarda hayatta kalımları ve çoğalmaları ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Nagano ve ark., 2001; Honaramooz ve ark., 2003; Kim ve ark., 2008; Herrid, 2009; Sadri-Ardekani ve ark., 2009; X. Wu ve ark., 2009; He ve ark., 2010; Sadri-Ardekani ve ark., 2011; Smith ve ark., 2014) (Tablo 2.1). İnsan spermatogonyal kök hücreleri ile ilgili çalışmalar farklı gelişim dönemlerindeki (prepubertal, erişkin) erkeklerden testis örnekleri alınarak yapılmıştır ve bu çalışmalardan 2 tanesinde prepubertal erkeklerden alınan testis örnekleri kullanılmıştır (X. Wu ve ark., 2009; Sadri-Ardekani ve ark., 2011). Bu çalışmalarda spermatogonyal kök hücrelerin izolasyonu ve zenginleştirilmesi için farklı belirteçler (SSEA4, GPR125, ITGA6, THY1) ve yöntemler (Differential plating, FACS, MACS) kullanılmıştır. Bu çalışmalarda GDNF, FGF, EGF ve LIF gibi büyüme faktörleri, farklı destekleyici hücreler (C166, insan embriyonik fibroblast, Sertoli hücresi, THY1<sup>+</sup> hücre) ve farklı ekstrasellüler matriks bileşenleri (jelatin, laminin, matrijel) kaplı petripler kullanılmıştır. Çalışmaların sonuçları insan spermatogonyal kök hücre belirteçleri açısından gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ve immünohistokimya yapılarak değerlendirilmiş ya da kültüre edilen insan spermatogonyal kök hücreleri fare testislerine transplante edilerek germ hücre aktiviteleri değerlendirilmiştir (Tablo 2.1).

Literatüre giren bu çalışmalar umut verici sonuçlar sunmakla birlikte birçok çalışmanın sonucu farklı araştırma grupları tarafından tekrarlanamamıştır ve halen insan spermatogonyal kök hücrelerinin uzun süre *in vitro* koşullarda ekspansiyonlarını sağlayan bir yöntem mevcut değildir. Yapılan çalışmaların başarısını kısıtlayan önemli bir konuda kültüre edilen insan spermatogonyal kök hücrelerinin spermatogenik ve fertil potansiyellerini test edecek fonksiyonel bir yöntemin eksikliğidir ve bu sebeple hayvan çalışmalarında alınan sonuçların insana yansıtılması mümkün olamamaktadır. Bu alanda metotların geliştirilmesi ve ilerleme kaydedilmesi gerekmektedir.

**Tablo 2.1.** İnsan spermatogonyal kök hücrelerinin *in vitro* kültürü ile ilgili yapılan çalışmalar

Doku tipi	İzolasyon yöntemi	Büyüme faktörleri	Destekleyici ortam	Değerlendirme yöntemi
Erişkin	Differential plating	EGF, GDNF, FGF, LIF	Matrijel	RT-PCR; EPCAM, GPR125, SSEA4, ITGA6
Prepubertal	Differential Plating	EGF, GDNF, LIF	Laminin	Transplantasyon, RT-PCR; ZBTB16, ITGA6, ITGB1, CD9, GFRa1, GPR125, UCHL1
Erişkin	Differential Plating	EGF, GDNF, LIF	Laminin	Transplantasyon, ICC; ZBTB16 RT-PCR; ZBTB16, ITGA6, ITGB1,
Erişkin	Differential Plating	-	Sertoli hücresi	ICC; OCT4, Vimentin Alkalen fosfataz boyanması
Erişkin	Differential Plating ve MACS	GDNF, Gfra1, NUDT6, EGF, LIF, TGFB	% 0.1'lik jelatin	ICC; GPR125, ITGA6, GFRa1, THY1
Prepubertal	Mikromanipulâtör	GDNF, FGF	C166	ICC; UCHL1
Erişkin	MACS (ITGA6)	FGF, GDNF, LIF	hESCdF lar	ICC; OCT4, SSEA1, ITGA6 RT-PCR; OCT4, Stra8, DAZL, NOTCH1, Ngn3, Kit
Erişkin	Differential plating	FGF, LIF	Sertoli hücresi	Transplantasyon, Alkalen fosfataz boyaması ICC; Oct4, Vimentin, RT-PCR; Oct4, Nanog, Stra8, PIWII2, VASA
Erişkin	FACS (CD45, THY1, SSEA4)	EGF, GDNF, LIF	İnsan THY1+ hücre	ICC; SSEA4, VASA

#### 2.14. Ksenotransplantasyon Modelleri ile Kök Hücre Fonksiyonunun Test Edilmesi

Homolog türler arasında transplantasyon, farede olduğu gibi kültürdeki spermatogonyal kök hücrelerin aktivitelerinin belirlenmesi için en güvenilir yöntemdir. Yapılan çalışmalarda spermatogonyal kök hücrelerin aktiviteleri infertil alıcı farelerin testislerine transplante edildikten sonra spermatogenezi devam ettirmelerine göre değerlendirilebilmektedir. Bu yöntem insan çalışmalarında mümkün değildir. Bu nedenle insandan fareye ksenotransplantasyon yöntemi alternatif olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda insan spermatogonyal kök hücrelerinin fare seminifer tübüllere transplantasyonu ile alıcıdaki spermatogonyal kök hücrelerin kök hücre aktivitelerinin değerlendirilebileceği gösterilmektedir (Nagano ve ark., 2002; Sadri-Ardekani ve ark., 2009; X. Wu ve ark., 2009; He ve ark., 2010; Izadyar ve ark., 2011; Sadri-Ardekani ve ark., 2011; Zohni ve ark., 2012; Dovey ve ark., 2013).

İnsandan fareye spermatogonyal kök hücrelerin ksenotransplantasyonunun ardından alıcıdaki kök hücre sayısının gösterilmesi RT-PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) ve immünohistokimya gibi yöntemler ile mümkündür. İnsan spermatogonyal kök hücrelerinin fare testisine ksenotransplantasyondan sonra fare seminifer tübüllerinde tüm spermatogenez sürecini tamamlayamamaktadırlar fakat spermatogonyal kök hücre aktivitesi ile ilgili birçok fonksiyonu gösterebilmektedirler. Hücreler fare Sertoli hücreleri tarafından fagositoza uğramadan seminifer tübülün bazaline yerleşmekte, spermatogonyumlar gibi hücre dizileri oluşturmakta ve seminifer tübüllerde birkaç ay yaşamlarını sürdürmektedirler (Dovey ve ark., 2013; Valli ve ark., 2014). Bu çalışmalar ksenotransplantasyon gibi fonksiyonel testlerin de kullanılacağı ileri çalışmalar ile gelişim faktörlerinin kök hücre proliferasyonu üzerindeki etkisinin analiz edilebileceğini göstermektedir.

İnsan spermatogonyal kök hücre izolasyonu sırasında gözlenebilen bir başka problem de erkek hastalardan alınan testis örneklerinin malign hücreler içermesi olasılığıdır. Kim ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada lösemi olan erkek hastaların kanser tedavisine başlamadan önce testis dokularında %20 oranında malign hücre olduğu gösterilmiştir (Kazuki ve ark., 2003). Jahnukainen ve arkadaşlarının yapmış olduğu başka bir çalışmada testis hücrelerinin transplantasyonu sonrasında lösemnin alıcıya geçtiği gösterilmiştir. Bu araştırmacılar lösemik hücrelerin hastalığın geçişini sağladığını ve 3 hafta içinde terminal lösemi oluştuğunu göstermişlerdir (Oshikiri ve ark., 2003). Bu araştırmalar; yapılan transplantasyon çalışmalarında alıcıda kanser görülme riskinin de değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir.

İnsan spermatogonyal kök hücreleri ile ilgili Dovey ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada spermatogonyal kök hücre izolasyonu için EPCAM belirteci kullanılmıştır (Dovey ve ark., 2013). Buna ek olarak malign kontaminasyonu engellemek için kontamine olmayan hücrelerin seçilmesi amaçlanmış ve lökosit belirteci (HLA-ABC, CD49e) ekspre etmeyen hücreler izole edilmiştir. Bu çalışmada izolasyon yöntemi olarak FACS yönteminden yararlanılmıştır. Bu çalışmada izole edilen hücreler fare seminifer tübüllerine transplante edildikten sonra “whole mount” yöntemi ile değerlendirilmiş ve izole edilen hücrelerin fare seminifer tübüllerinde koloni

oluşturdukları gözlenmiştir. EPCAM<sup>+</sup>, HLA-ABC<sup>+</sup>, CD49e<sup>+</sup> fenotipindeki hücrelerin transplantasyonu sonrasında tümör oluşumu gözlenirken, EPCAM<sup>+</sup>, HLA-ABC<sup>-</sup>, CD49e<sup>-</sup> fenotipindeki hücrelerin transplantasyonu sonrasında herhangi bir tümör oluşumuna rastlanmamıştır (Dovey ve ark., 2013). Bu çalışma ile kök hücre izolasyonunda kontamine olmayan hücrelerin seçiminin ve transplantasyon sonrasında “whole mount immünofloresan” yöntemi ile değerlendirilme yapılmasının çalışmaların başarısının artırılması açısından önemi görülmektedir.

Literatüre yeni giren başka bir çalışmada insan spermatogonyal kök hücrelerin fare seminifer tübüllerine transplantasyonu sonucunda transplante edilen hücrelerin alıcı seminifer tübüllerinde kök hücre kolonileri oluşturdukları “whole mount immünofloresan” yöntemi ile gösterilmiştir (Valli ve ark., 2014). İnsan spermatogonyal kök hücreleri ile ilgili yapılan birçok çalışmada ksenotransplantasyon deneyinden yararlanılmış ve değerlendirmeler “whole mount immünofloresan” yöntemi ile değil, seri kesitlerde yapılmıştır. Bu şekilde değerlendirilen transplante edilen hücrelerin zincir ve küme oluşumlarının analizi yeterince mümkün değildir. Bu bilgiler dahilinde, insan spermatogonyal kök hücrelerinin izolasyonu ve *in vitro* koşullarda çoğaltılması ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu, bununla birlikte son yıllarda uygulanmaya başlanan ksenotransplantasyon ve “whole mount immünofloresan” yöntemlerinin yapılacak olan çalışmalarda kullanılmasının bu çalışmaların başarısının artırılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

### **2.15. Hipotez ve Amaç**

Bu bilgiler ışığında; bu çalışmanın hipotezi GDNF, FGF ve LIF gibi gelişim faktörlerinin, farklı destekleyici hücrelerin (STO, SSEA4<sup>-</sup>THY1<sup>+</sup>, THY1<sup>+</sup>) ve ekstraselüler matriks materyallerinin (kollajen, laminin) ve ayrıca kollajen ile kök hücre zenginleştirmenin *in vitro* kültür koşullarında insan spermatogonyal kök hücrelerinin çoğalmasını artıracaktır. Bu çalışmanın amacı; farklı belirteçler (SSEA4, THY1, ITGA6) ve yöntemler (floresan aktive hücre izolasyon yöntemi, manyetik aktivasyon bağımlı hücre izolasyon yöntemi, kollajen ile kök hücre zenginleştirme) ile insan spermatogonyal kök hücrelerinin izole edilmesi ve çeşitli *in vitro* koşullarda kültüre edilmesinin ardından kültür koşullarının bu hücrelerin hayatta kalımlarına ve



çoğalmalarına etkisinin değerlendirilmesidir. Bu amaç için aşağıdaki hedefler gerçekleştirilmiştir:

1) İnsan spermatogonyal kök hücreleri farklı belirteçler (SSEA4, THY1, ITGA6) ile izole edildi ve mitotik olarak inaktive edilmiş farklı destekleyici hücreleri (STO, SSEA4<sup>-</sup> THY1<sup>+</sup>, THY1<sup>+</sup>) varlığında GDNF, FGF ve LIF büyüme faktörleri içeren kültür koşullarında kültüre edildi.

2) Yukarıda açıklanan izolasyon yöntemlerinin ve kültür koşullarının insan spermatogonyal kök hücrelerinin hayatta kalımları ve çoğalmalarına etkisini değerlendirmek amacı ile ilk kültürden sonra ve devamında yapılan her pasajda UTF1 kök hücre belirteci kullanılarak immünohistokimya ile spermatogonyal kök hücre sayısı belirlendi.

3) Manyetik aktivasyon bağımlı hücre izolasyon yöntemi ile izole edilen insan spermatogonyal kök hücreleri, kök hücre sayısının zenginleştirilmesi amacı ile tip I kollajen varlığında inkübe edildi ve bu yöntemin UTF1<sup>+</sup> insan spermatogonyal kök hücre sayısına ve bu hücrelerin *in vitro* koşullarda hücre hayatta kalımına ve çoğalmalarına etkisi değerlendirildi.

**Sonuç olarak;** literatürdeki fare spermatogonyal kök hücrelerinin *in vitro* kültür koşullarında başarılı olarak çoğaltılması bilgisi temel alınarak, farklı izolasyon yöntemleri ve destekleyici somatik hücre hatlarının insan spermatogonyal kök hücre sayısına etkisi değerlendirildi.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. İnsan Testiküler Dokusunun Hazırlanması ve Hücre Süspansiyonu Elde Edilmesi

Sağlıklı erişkin insan testis dokusu, Pittsburgh Üniversitesi Sağlık Bilimleri doku bankasından temin edildi (Etik kurul onay numarası: IRB PRO0506140). Dokular elde edildikten sonra Ringer solüsyonu içerisinde buza alınarak laboratuvara ulaştırıldı. İnsan testiküler parankim dokusundan iki aşamalı enzimatik sindirim yöntemi ile hücreler ayrıldı (Hermann ve ark., 2007; Hermann ve ark., 2009; Dovey ve ark., 2013). Bu amaçla, testiküler doku tip IV kollajenaz (#LS004186, Worthington, USA) varlığında 37°C karıştırıcı üzerinde inkübe edildi ve ardından kuvvetli olarak karıştırıldıktan sonra 3-5 dakika daha inkübe edildi. İzole edilen seminifer tübüller 200g'de 5 dakika santrifüj edildi ve HBSS (Hank's balanced salt solution, #14175-095, Invitrogen, USA) solüsyonunda yıkandı. Yıkamanın ardından seminifer tübüller %0.25 tripsin/EDTA (trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid, #25200056, Gibco, USA) ve DNAaz I (#D3159, Sigma, USA) enzimleri ile 5 dakika 37°C inkübe edildi. Bu işlem 5-15 dakika aralığında sürdürüldü. Enzimatik sindirim işlemi %10 FBS (Fetal bovine serum, #10082147, Gibco) eklenerek durduruldu ve hücreler 70mm'lik filtre (Becton Dickson) ile ayrıştırıldı. Ardından hücreler 600g'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen hücre pelleti  $40 \times 10^6$  hücre/mL konsantrasyonunda %10 FBS içeren MEMa (minimal essential medium a, # 30-2002, ATCC) ile süspansiyon haline getirildi. MEMa, %20 FBS ve %20 dimethylsulfoxide (DMSO, #C6164, Sigma) içeren kriyoprezervasyon medyumunu hücelere eşit oranda damla damla eklendi ve MEM a/%15 FBS/%10 DMSO içerisinde  $20 \times 10^6$ /mL son konsantrasyon olacak şekilde hücreler kriyotüplere konuldu. Hücreleri içeren kriyotüpler Nalgene freezing containers (Nalgene-Nunc International) kullanılarak kontrollü bir şekilde donduruldu ve sıvı nitrojende saklandı. Her deney öncesinde hücreler 37°C de çözüldü ve 10% FBS içeren MEM a medyumunu ile yıkandıktan sonra aynı medyumda süspanse edildi. Bu çalışma için; farklı yaş gruplarındaki 10 farklı donore ait kadavralardan testis dokuları alındı. Alınan dokulardan yukarıda açıklanan protokol ile testiküler hücre süspansiyonu elde

edilerek donduruldu (Tablo 3.1). Daha sonraki tüm deneylerde hazırlanan dondurulmuş hücre süspansiyonları çözülerek kullanıldı.

**Tablo 3.1:** Çalışmada kullanılan insan testiküler dokusunun alındığı donörlere ait bilgiler.

Doku tipi	Donor kodu	Donor yaşı	Uygulanan protokol
Erişkin testis	15091105	40-50	Hücre süspansiyonu hazırlama ve dondurma
Erişkin testis	15092201	50-60	Hücre süspansiyonu hazırlama ve dondurma
Erişkin testis	15100605	41	Hücre süspansiyonu hazırlama ve dondurma
Erişkin testis	15100605	30-40	Hücre süspansiyonu hazırlama ve dondurma
Erişkin testis	15101305	19	Hücre süspansiyonu hazırlama ve dondurma
Erişkin testis	15111502	30-40	Hücre süspansiyonu hazırlama ve dondurma
Erişkin testis	15122503	20-25	Hücre süspansiyonu hazırlama ve dondurma
Erişkin testis	16010507	30-40	Hücre süspansiyonu hazırlama ve dondurma
Erişkin testis	16013003	20-30	Hücre süspansiyonu hazırlama ve dondurma
Erişkin testis	16020306	40-45	Hücre süspansiyonu hazırlama ve dondurma

### **3.2. FACS (Floresan Aktive Hücre Ayırıştırma) Yöntemi ile İnsan Spermatozoyunu Elde Edilmesi**

İlk aşamada donörlerden elde edilen ve dondurulan insan testis hücre süspansiyonları 37°C de çözüldü ve hücre izolasyon deneyleri yapıldı (n=6). İnsan testislerinden elde edilen hücre süspansiyonu %10 FBS içeren Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS, #14200075, Gibco) medyumunda ve buz üzerinde floresan bağlı antikorlar (THY1-APC, klon 5E10, 0.5mg/10<sup>6</sup>; #559869, Becton Dickinson ve SSEA4-Alexa Flour klon GoH3, 20ml/10<sup>6</sup> hücre; #560308, Becton Dickinson, USA) ile 20 dakika inkübe edildi. Bağlanmayan antikorlar D-PBS ile yıkandıktan sonra 35 mm'lik filtreden geçirildi ve canlı, ölü hücrelerin ayırt edilmesi için 0.5mg/ml konsantrasyonda propidium iodide (#556463, Becton Dickinson) ile boyandı. FACS yöntemi FACSvantage SE (Beckton Dickinson) cihazı kullanılarak uygulandı. Ayırıştırma açıklıkları ölü hücreler ve nonspesifik bağlanması olan hücreler dışındaki sağlıklı

hücrelerin kullanılan belirteci ekspre etme seviyesine göre belirlendi. FACS analizi sonucunda insan testiküler hücre süspansiyonlarından SSEA4 ve THY1 belirteçlerini ekspre etme seviyelerine göre; SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup>, SSEA4<sup>+</sup>/THY1<sup>-</sup> olmak üzere 3 farklı hücre fraksiyonu olduğu gözlemlendi ve hücreler izole edildi. Buna ek olarak yalnızca THY1 belirteci kullanılarak da destekleyici hücre elde edilip edilemeyeceğinin test edilmesi amacı ile insan testiküler hücreleri yalnızca THY1 belirteci ile işaretlenerek de FACS analizi yapıldı. Bu amaçla floresan bağlı THY1 antikoru kullanıldı. FACS analizi sonunda THY1<sup>-</sup> hücreler ve THY1<sup>dim</sup> ve THY1<sup>bright</sup> olmak üzere 2 farklı hücre popülasyonu içeren THY1<sup>+</sup> hücreler izole edildi. Bu hücrelerden THY1<sup>bright</sup> olan hücrelerin *in vitro* koşullarda bir önceki deneylerde insan spermatogonyal kök hücrelerini destekleme etkilerinin yüksek olduğu gözlenen SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> hücreler ile aynı fenotipi gösterip göstermedikleri değerlendirildi.

### **3.3. Ksenotransplantasyon ve Whole Mount İmmüno Floresan ile Fare Seminifer Tübüllerinde İnsan Spermatogonyal Kök Hücrelerinin Sayılarının ve Koloni Oluşturma Kapasitelerinin Değerlendirilmesi**

FACS ile hücrelerin izole edilmelerinin ardından kontrol (insan testiküler hücre süspansiyonu), SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup>, SSEA4<sup>+</sup>/THY1<sup>-</sup> testiküler hücreler busulfan uygulanmış (40 mg/kg; #B2635, Sigma) ve immün sistemden yoksun 5 ya da 6 haftalık farelerin (NCR nu/nu; Taconic) testislerine transplante edildi (Mayerhofer ve ark., 1991; Hermann ve ark., 2007; Sadri-Ardekani ve ark., 2011) (n=6). Busulfan uygulamasından 5 hafta sonra %10 oranında trypan mavisi (#T8154, Sigma) içeren hücre süspansiyonu alıcı farelerin seminifer tübüllerine efferent kanallardan 7µl enjeksiyon ile transplante edildi. Her gruptan elde edilen hücreler 3 farklı farenin sağ ve sol testislerine transplante edildi. İnsan spermatogonyumlarının kolonizasyonunun sayısal olarak değerlendirilmesi için transplantasyondan sekiz hafta sonra farelerin testis dokuları alındı. Testislerin tunika tabakası ayrıldıktan sonra intakt seminifer tübüller D-PBS içerisinde bulunan Tip IV kollajenaz (1 mg/mL) ve DNAaz I (1 mg/mL) enzimleri ile inkübe edilerek ayrıştırıldı. Tübüller %4'lük paraformaldehit ile fikse edildikten sonra 'whole mount' immüno floresan yöntemi uygulandı.

### 3.4. Whole Mount İmmünfloresan Yöntemi

Testisler, artan dereceli metanollerden geçirilerek sudan kurtarıldı ve MeOH: DMSO: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4:1:1) içeren solüsyon ile 3 saat inkübe edildi. Tübüller rehidrate edildi ve D-PBS içerisinde süt solüsyonu (D-PBS 0.02 mg/mL blotto dry milk powder; #sc2324, Santa cruz % 5 Triton-X; #T8787, Sigma) içinde bloklandı. Ardından tavşan ‘anti-primat’ primer antikoru (Hermann ve ark., 2007) ile 4°C’de gece boyu inkübe edildi. Keçi anti-tavşan IgG AlexaFluor 488 (1:200 dilüsyon; #A11034, Invitrogen) sekonder antikoru ile primer antikor işaretlendi. Son olarak seminifer tübüller DAPI içeren VectaShield kapatma solüsyonu (#H-1200, Vector Laboratories, USA) kullanılarak yüksek lameller ile kapatıldı. Elde edilen sonuçlar floresan mikroskopunda uygun dalga boyunda incelendi. Spermatogonyal koloniler aşağıdaki kriterlere göre değerlendirildi.

- 1) En az dört tane ve bir arada olan hücrenin spermatogonyal hücre morfolojik özelliğini göstermesi (ovoid yapıya sahip olması ve yüksek nükleus sitoplazma oranına sahip olması).
- 2) Hücrelerin alıcı fare testisinde bazal membrana sürekli bir alanda yerleşmiş olmaları.

Seminifer tübüllerde gözlenen ve yukarıda belirtilen özelliklere sahip olan hücre kümeleri Nikon Eclipse E600 Fluorescence mikroskobu (Nikon) ile değerlendirildi ve koloni olarak sayıldı ve sonuçlar MetaView Digital Imaging software kullanılarak kaydedildi. Koloni sayıları excel programına aktarıldı ve her testis için elde edilen koloni sayıları hesaplandı.

### 3.5. SSAE4<sup>+</sup>/THY1<sup>+</sup> Hücrelerin *In Vitro* Koşullarda Çoğaltılması

FACS ile izole edilmiş olan SSAE4<sup>+</sup>/THY1<sup>+</sup> hücrelerin çoğaltılmaları ve daha sonraki *in vitro* deneylerde destekleyici hücreler olarak kullanılmaları amaçlandığından hücreler 0.1% jelatin (#1393, Sigma) ile 37°C de 15 dakika inkübe edilerek kaplanmış petrilere ekildi (n=6). Kültür için izolasyon sonrası elde edilen hücre sayısına göre, 24 kuyucuklu, 48 kuyucuklu ve 6 kuyucuklu petrilere sırası ile 1x10<sup>5</sup>, 2x10<sup>5</sup>, 5x10<sup>5</sup> sayıda hücre ekildi. SSAE4<sup>+</sup>/THY1<sup>+</sup> hücreler Stem Pro 34 medyumunu (#10639011, Life Technologies) içerisinde belirtilen faktörler de eklenerek kültüre edildi: %1 penicillin-streptomycin (#15140122, Gibco) %1 insulin- transferrin- selenyum (ITS) solüsyonu (#25-800-CR Corning), %1 knock out serum replacement (#10828028, Gibco). Hücrelerin medyumunu

her 72 saatte değiştirildi. Hücreler petrinin %80 i oranında çoğaldıktan sonra; 3-4. günde 1:2 ya da 1:3 oranında pasajlandı. Pasajlama işlemleri için medyum uzaklaştırıldı ve HBSS solüsyonu ile hücreler yıkandı. Ardından hücrelerin yüzeyini kaplayacak miktarda 0.05'lik Trypsin/EDTA (#25300054, Gibco) eklendi. Hücrelerin tamamı petriden ayrılanaya kadar mikroskopta gözlenerek tripsinizasyon yapıldı ve reaksiyon %10 FBS eklenerek durduruldu. Ardından hücreler 50'lik falkonlara alındı. Petri kabı aynı miktarda medyum eklenerek yıkandı ve medyum hücrelerin alındığı falkona eklendi. Hücreler 3500 g'de 7 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pelet resüspanse edildi ve uygun miktarda medyum eklenerek yeni petri kaplarına aktarıldı. Hücreler yeterli miktarda çoğaldıktan sonra petri kabındaki medyum miktarının %10 oranında mitomycin C (#M4287, Sigma) eklenerek hücreler mitotik olarak inaktif hale getirildi. Ardından tripsinizasyon ile kaldırılarak %10 DMSO içeren kültür medyumunu ile resüspanse edilerek donduruldu ve sıvı nitrojene aktarıldı. Dondurulmuş olan SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> hücreler sonraki aşamalarda 37°C'de çözülerek kullanıldı.

### **3.6. Fare STO Hücrelerinin *In Vitro* Koşullarda Çoğaltılması**

Fare SIM mouse embryo derived thioguanine and ouabain resistant (STO) hücrelerinin destekleyici hücreler olarak kullanılmaları amaçlandığından STO hücreleri *in vitro* koşullarda çoğaltıldı. Bu amaçla, STO hücre hattı (#SCRC-1049, ATCC) kullanıldı. Hücreler ilk aşamada 75 cm<sup>2</sup> lik petrilere %10 FBS (fetal bovine serum) ve %1 penicillin-streptomycin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, # 30-2002, ATCC) medyumunda kültüre edildi. Ardından hücreler 1:10 oranında pasajlandı ve çoğaltıldı. Hücrelere yukarıda açıklanan protokol ile mytomycin-C uygulaması yapıldı ve donduruldu.

### **3.7. MACS (Manyetik Aktive Hücre Ayırıştırma) Yöntemi ile İnsan Spermatogonyularının Elde Edilmesi**

Donörlerden elde edilen ve dondurulan insan testis hücre süspansiyonları 37°C de çözüldü ve hücre izolasyon deneyleri yapıldı (n=6). MACS yöntemi ile insan testiküler hücre süspansiyonlarından, ITGA6 antikoru kullanılarak kontrol (insan testiküler hücre süspansiyonu), ITGA6<sup>-</sup>, ITGA6<sup>+</sup> olmak üzere 3 farklı hücre grubu izole edildi. İnsan testislerinden elde edilen hücre süspansiyonu %10 FBS içeren Dulbecco's phosphate-

buffered saline (D-PBS) medyumunda ve buz üzerinde PE konjuge sıçan-anti insan ITGA6 antikoruna (ITGA6, 10ml/10<sup>6</sup> hücre; #555736, Becton Dickinson) ile 20 dakika inkübe edildi. Bağlanmayan antikorlar D-PBS ile yıkandı. Ardından hücreler PE konjuge manyetik boncuklar (#130-048-801, Miltenyi Biotec) ile 45 dakika inkübe edildi ve D-PBS ile yıkandı. İşaretlenen hücreler MACS ayırıştırıcı kolonlara (#LS130-042-401, Miltenyi Biotec) yüklenerek manyetik işaretli hücrelerin kolona tutunması ve işaretli olmayanların ayrılması sağlandı. Ardından kolonda tutunan ITGA6<sup>+</sup> hücreler 15 ml'lik falkona aktarıldı.

### **3.8. MACS (Manyetik Aktive Hücre Ayırıştırma) Yöntemi ile İnsan THY1<sup>+</sup> Testiküler Hücrelerinin İzole Edilmesi**

Dondurulmuş insan testiküler hücreleri 37°C de çözüldü ve MACS yöntemi ile insan testiküler hücre süspansiyonlarından THY1 antikoruna kullanılarak hücre izolasyonu yapıldı (n=6). İnsan testislerinden elde edilen hücre süspansiyonu %10 FBS içeren Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS) medyumunda ve buz üzerinde APC konjuge THY1 antikoruna ile 20 dakika inkübe edildi. Bağlanmayan antikorlar D-PBS ile yıkandı. Ardından hücreler APC konjuge manyetik boncuklar (#130-090-855, Miltenyi Biotec) ile 45 dakika inkübe edildi ve D-PBS ile yıkandı. İşaretlenen hücreler MACS ayırıştırıcı kolonlara yüklenerek manyetik işaretli hücrelerin kolona tutunması ve işaretli olmayanların ayrılması sağlandı. Ardından kolonda tutunan THY1<sup>+</sup> hücreler 15 ml'lik falkona aktarıldı. Kontrol (insan testiküler hücre süspansiyonu), THY1<sup>-</sup>, THY1<sup>+</sup> olmak üzere 3 farklı hücre grubu izole edildi.

### **3.9. Tip I Kollajen Kullanılarak İnsan Spermatogonyal Kök Hücrelerinin Zenginleştirilmesi**

İlk olarak MACS yöntemi ile testiküler hücre süspansiyonundan yukarıda detayları belirtilen protokol ile ITGA6<sup>+</sup> hücreler izole edildi (n=6). Hücrelerin kültüre edileceği petri kapları tip I kollajen (Collagen Type I, #08-774-550, Corning) varlığında 2 saat kültüre edildi ve kaplandı. Ardından MACS ile izole edilmiş olan ITGA6<sup>+</sup> hücreler tip I kollajen kaplı petrilere ekildi ve gece boyu 37°C'lik 5% CO<sub>2</sub> inkübe edildi. Ertesi gün yüzen hücreler alındı ve aynı koşullarda gece boyu kültüre edildi. İkinci günün sonunda yüzen hücreler zenginleştirilmiş spermatogonyal kök hücreler olarak alındı. Kültür

sonunda elde edilen zenginleştirilmiş spermatogonyal kök hücreler ve ITGA6<sup>+</sup> hücreler immünositokimya ile içerdikleri UTF1<sup>+</sup> hücre sayısının belirlenmesi için superfrost lamlara alındı. Buna ek olarak hücrelerin bir kısmı da MACS ile izole edilmiş THY1<sup>+</sup> destekleyici hücreleri varlığında 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> de 1 ve 2 hafta süreyle kültüre edildi 1 ve 2 haftalık kültür sonunda iki farklı koşulda kalan UTF1<sup>+</sup> hücre sayısı immünositokimya yöntemi ile belirlendi.

### **3.10. ITGA6<sup>+</sup> Spermatogonyal Kök Hücrelerin Kültürü**

MACS ile izole edilmiş spermatogonyal kök hücreler farklı kültür koşullarında 1 ve 2 hafta kültüre edildi (n=6). İnsan spermatogonyal kök hücrelerini destekleme kapasitelerinin değerlendirilmesi amacı ile aşağıda belirtilen kültür koşulları oluşturuldu;

- 1) ITGA6<sup>+</sup> hücrelerin fare STO hücreleri ve FACS ile izole edilmiş insan SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> hücreleri varlığında ve mSFM medyumunu ile kültürü
- 2) ITGA6<sup>+</sup> hücrelerin fare STO hücreleri ve FACS ile izole edilmiş insan SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> hücreleri varlığında ve mSFM ve Stem Pro medyumları ile kültürü
- 3) ITGA6<sup>+</sup> hücrelerin FACS ile izole edilmiş insan SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> hücreleri ve insan laminin varlığında kültürü
- 4) ITGA6<sup>+</sup> hücrelerin MACS ile izole edilen THY1<sup>+</sup> hücreler ve FACS ile izole edilen SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> hücreleri varlığında kültürü
- 5) MACS ile izole edilen ITGA6<sup>+</sup> hücreler ve tip 1 kollajen ile zenginleştirilmiş ITGA6<sup>+</sup> hücrelerin THY1<sup>+</sup> hücreleri varlığında kültürü

Yukarıda belirtilen tüm kültürlerde SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> hücreler ve THY1<sup>+</sup> hücreler 25.000/cm<sup>2</sup>, STO hücreleri 50.000/cm<sup>2</sup> ve ITGA6<sup>+</sup> hücreler 50.000/cm<sup>2</sup> olacak şekilde ekildi. Bununla birlikte kullanılan medyum içerisine spermatogonyal kök hücre gelişimi için gerekli büyüme faktörleri; %1 penicillin-streptomycin, %1 insulin-transferrin-selenium (ITS) solution, %1 knock out serum replacement, recombinant human fibroblast growth factor (FGF, #CB-40060, Fisher) (20 ng/mL), recombinant human glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF, #12440053, Peprotech) (10 ng/mL), recombinant human leukemia inhibitory factor (LIF, #LIF1010, Millipore) (10 ng/mL) eklenerek hücreler 37°C lik 5% CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde kültüre edildi. İlk kültür koşulunda Stem Pro medyumunun mSFM medyumundan daha etkili olduğu



gözlendiğinden sonraki kültürlerde Stem Pro medyumunu kullanıldı. Her kültür koşulunda medyum 72 saatte bir değiştirildi ve 1 haftanın sonunda hücreler pasajlandı. Pasajlama işlemi için petri kabındaki medyum uzaklaştırıldı ve HBSS ile hücreler 2 kez yıkandı. Ardından petrilere hücrelerin yüzeyini kaplayacak miktarda %0.25'lik Tripsin/EDTA eklendi, tüm hücreler petriden ayrılana kadar inkübe edildi ve tripsin/EDTA miktarının %10'u kadar FBS eklenerek reaksiyon durduruldu. Hücreler 50'lik falkonlara alındı. Petri kabı 2 kez kültür medyumunu ile yıkandı ve medyum hücrelerin bulunduğu falkona eklendi. Tüm bu kültür deneylerinin ardından 1 ve 2 hafta sonunda kültürde kalan UTF1<sup>+</sup> spermatogonyal kök hücre sayısı immünohistokimya ile değerlendirildi.

### **3.11. İmmünohistokimya**

Her hücre izolasyonu sonrasında ve her kültür koşulu için 1 ve 2 haftanın sonunda immünohistokimya ile UTF1<sup>+</sup> hücre sayıları değerlendirildi. Hücreler superfrost lamlara alındı ve metanol (#106009, Merck) ile fikse edildi. Fiksasyon işlemi için 2x10<sup>6</sup>/ml hücre içeren 10 µl'lik hücre süspansiyonu lamlara alındıktan sonra 3 dakika bekletilerek hücrelerin lamlara yapışması sağlandı. Ardından hücrelere 10 µl -20°C de soğutulmuş olan methanol eklendi. 3 dakika methanolün kuruması için bekletildikten sonra 20 µl daha methanol eklenerek methanol tamamen kuruyana kadar bekletildi. Hücreler D-PBS ile sudan uzaklaştırıldı ve özgün olmayan bağlanmaları engellemek için %3'lük bovine serum albumin (BSA, #A9418, Sigma) ve %5'lik normal keçi serumu (#560380, Millipore) içeren bloklama solüsyonu ile bloklandı. Ardından hücreler fare anti UTF1 (1:200 dilüsyon, MAB4337, Millipore) antikoru ile 90 dakika oda ısısında inkübe edildi. Normal fare IgG (#12371, Millipore) negatif kontrol olarak kullanıldı. Keçi anti-fare Alexa Fluor-488 bağlı sekonder antikor (1:200 dilüsyonda, #A11029, Invitrogen) ile primer antikor işaretlendi. Kesitler hücre nükleuslarının boyanması için gerekli olan 6-diamino-2-phenylindole DAPI içeren VectaShield kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Boyanmalar Nikon Eclipse E600 Fluorescence mikroskobu (Nikon) ile değerlendirildi ve sonuçlar MetaView Digital Imaging software kullanılarak kaydedildi. Her grup için toplam 100 DAPI<sup>+</sup> hücre sayıldı. UTF1<sup>+</sup> hücrelerin sayısı belirlendi ve UTF1<sup>+</sup> hücre sayısı DAPI<sup>+</sup> hücre sayısına oranlandı. Sonuçlar excel programına aktarılarak kontrol grubundaki UTF1<sup>+</sup> hücre sayısı 100 olacak şekilde normalize edildi ve tüm gruplardaki UTF1<sup>+</sup> hücre sayıları hesaplandı. Gerçekleştirilen tüm deneylerde tablo 3.1 de belirtilen

farklı yaş gruplarına ait donörlerden elde edilen örnekler kullanıldı ve her deney için datalar bu örneklerden elde edilen sonuçların ortalaması alınarak belirlendi. Hücre izolasyonu ve immünohistokimya yönteminde kullanılan kök hücre belirteçlerine ait antikorlara ait bilgiler aşağıda verilmiştir (Tablo 3.2).

**Tablo 3.2.** Hücre izolasyonu ve immünohistokimya yönteminde kullanılan primer antikorlar.

Kullanılan antikor	Kullanım amacı	Katalog numarası, Firma	Dilüsyon
Stage specific embryonic antigen 4-Alexa flour	Floresan bağımlı hücre izolasyonu	BD 560308, BD Pharmingen	20ml/10 <sup>6</sup> hücre
Thymus cell antigen 1-APC	Floresan bağımlı hücre izolasyonu Manyetik aktivasyon bağımlı hücre izolasyonu	BD 555596, BD Pharmingen	0,5 ml/10 <sup>6</sup> hücre
Integrin Subunit Alpha 6-APC	Manyetik aktivasyon ile hücre ayırıştırma yöntemi	BD 555736, BD Pharmingen	10ml/10 <sup>6</sup> hücre
Undifferentiated Embryonic Cell Transcription Factor 1	İmmünohistokimya	MAB 4337, Millipore	1:200

### 3.12. İstatistiksel Analizler

Elde edilen tüm veriler Sigma Stat 3.5 programı ile analiz edildi. Transplantasyon sonrası elde edilen koloni sayıları Kruskal-Wallis Testi ve ardından Dunn's post hoc analizi yapılarak karşılaştırıldı. ITGA6 belirteci kullanılarak MACS yöntemi ile elde edilen hücre fraksiyonlarının içerdikleri UTF1<sup>+</sup> hücre sayıları One Way ANOVA testi ve ardından Holm-Sidak post hoc analizi yapılarak karşılaştırıldı. STO ve SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> destekleyici hücreleri kullanılarak yapılan kültür sonunda kalan UTF1<sup>+</sup> hücre sayıları One Way ANOVA testi ve ardından Holm-Sidak post hoc analizi yapılarak karşılaştırıldı. SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> destekleyici hücreleri ve laminin kullanılarak yapılan kültür sonunda kalan UTF1<sup>+</sup> hücre sayıları One Way ANOVA testi kullanılarak karşılaştırıldı. FACS ile izole edilen SSEA4<sup>-</sup>THY1<sup>+</sup> ve MACS ile izole edilen THY1<sup>+</sup> hücreler kullanılarak yapılan kültür sonunda kalan UTF1<sup>+</sup> hücre sayıları t-test uygulanarak karşılaştırıldı. ITGA6<sup>+</sup> hücreler ve tip I kollajen kullanılarak zenginleştirilen ITGA6<sup>+</sup> kök hücrelerin içerdikleri UTF1<sup>+</sup> hücre sayıları t-test uygulanarak karşılaştırıldı. THY1<sup>+</sup> destekleyici hücreleri varlığında kültüre edilen ITGA6<sup>+</sup> hücreler ve zenginleştirilmiş ITGA6<sup>+</sup> hücrelerin kültürü sonunda kalan UTF1<sup>+</sup>

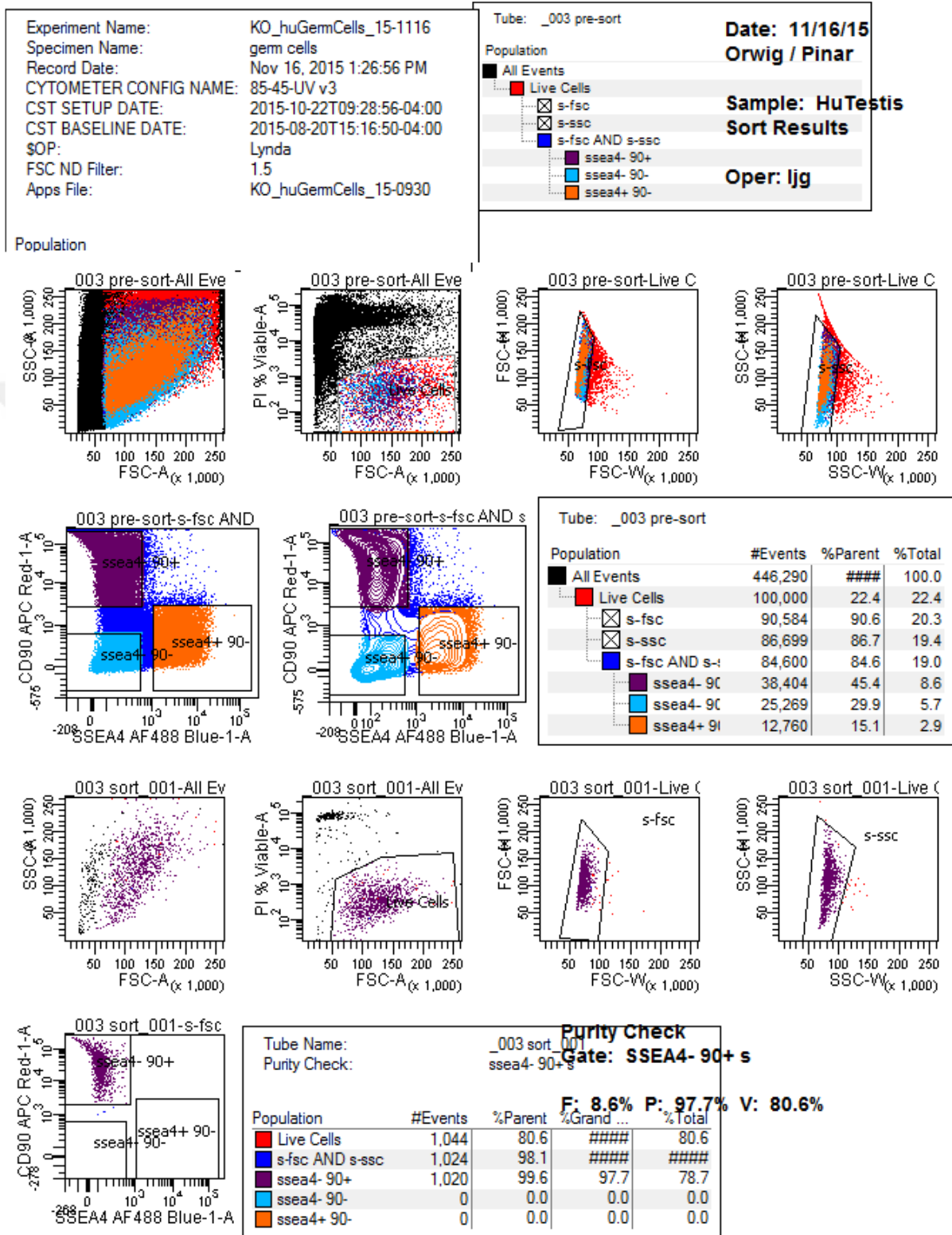
hücre sayıları One Way ANOVA testi ve ardından Holm-Sidak post hoc analizi yapılarak karşılaştırıldı. Tüm analizlerde  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



## 4. BULGULAR

### 4.1. SSEA4 ve THY1 Belirteçleri ile İşaretlenen İnsan Testiküler Hücre Süspansiyonunda 3 Farklı Fraksiyonda Hücre Bulunmaktadır: SSEA4<sup>+</sup>/THY1<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup>, SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>-</sup>.

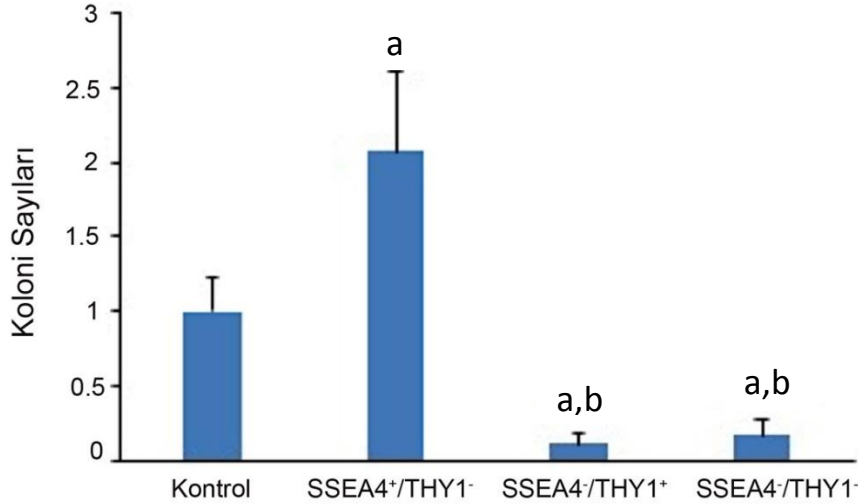
SSEA4 ve THY1 antikorları ile işaretlenen insan testiküler hücreleri bu proteinleri ekspres etmeleri açısından floresan aktive hücre izolasyon yöntemi ile değerlendirildiğinde, SSEA4<sup>+</sup>/THY1<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup>, SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>-</sup> olmak üzere 3 farklı hücre fraksiyonu olduğu gözlemlendi (Şekil 4.1). Bu 3 farklı hücre fraksiyonu izole edildi.



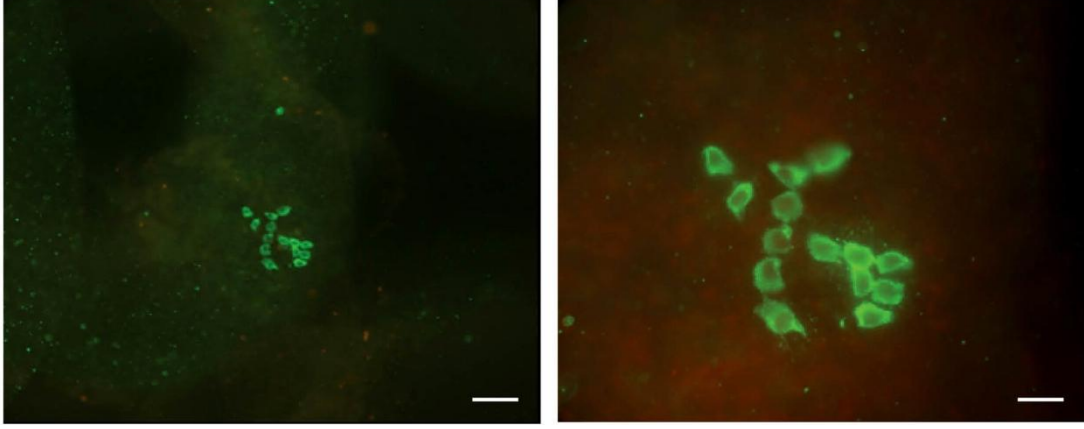
**Şekil 4.1.** SSEA4 ve THY1 belirteçleri ile işaretlenen insan testiküler hücrelerinin FACS analiz raporu. FACS analizi sonucunda SSEA4<sup>+</sup>/THY1<sup>-</sup>, SSEA4<sup>+</sup>/THY1<sup>+</sup>, SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>-</sup> olmak üzere 3 farklı hücre fraksiyonu olduğu gözlemlendi ve bu hücreler izole edildi.

#### 4.2. FACS ile İzole Edilen Hücre Fraksiyonlarından SSEA4<sup>+</sup>/THY1<sup>-</sup> Fraksiyondaki Hücreler Diğer Fraksiyonlara Oranla Daha Fazla Sayıda, SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> Fraksiyondaki Hücreler ise Daha Az Sayıda Koloni Oluştururlar.

Kontrol (testiküler hücre süspansiyonu) ve FACS ile SSEA4 ve THY1 proteinleri ile işaretlenerek izole edilen hücre fraksiyonları (SSEA4<sup>+</sup>/THY1<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup>, SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>-</sup>) busulfan uygulanmış fare testisine transplante edildikten sonra koloni oluşturmaları için gereken süre (8 hafta) sonunda oluşan koloniler insana ait antikor ile boyanarak ve koloni sayıları belirlenerek değerlendirildi. Bu sonuçlara göre, kontrol, SSEA4<sup>+</sup>/THY1<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup>, SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>-</sup> hücre fraksiyonlarında oluşan koloni sayılarının SSEA4<sup>+</sup>/THY1<sup>-</sup> hücre fraksiyonunda kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2, 4.3). SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> ve SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>-</sup> hücre fraksiyonlarındaki koloni sayılarının ise diğer gruplara göre anlamlı düzeyde düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2, 4.3), p<0.05.



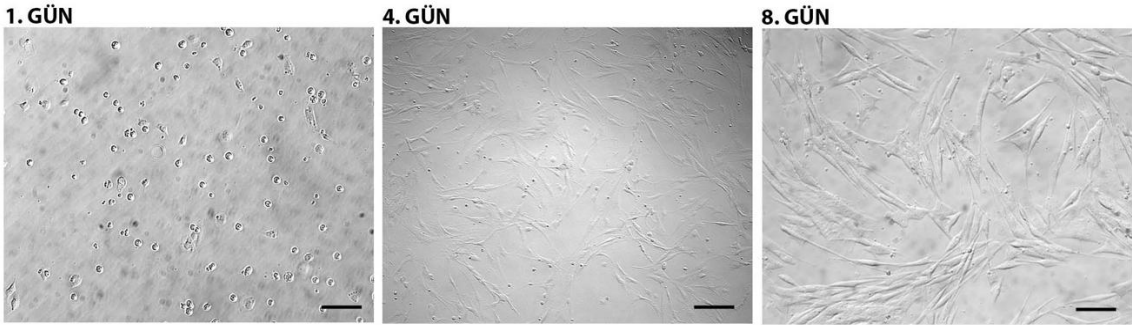
**Şekil 4.2.** FACS ile izole edilen kontrol, SSEA4<sup>+</sup>/THY1<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup>, SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>-</sup> hücre fraksiyonlarında gözlenen koloni sayıları a: Kontrole göre karşılaştırma, b: SSEA4<sup>+</sup>/THY1<sup>-</sup> hücre fraksiyonuna göre karşılaştırılması, p<0.05.



Şekil 4.3. SSEA4<sup>+</sup>/THY1<sup>-</sup> hücre fraksiyonunda gözlenen bir koloni görüntüsü, Bar: 100 µm.

#### 4.3. Elde Edilen SSEA4<sup>+</sup>/THY1<sup>+</sup> Hücrelerin *In Vitro* Koşullarda 3 ya da 4 Pasaj Sonrasında Çoğalmaları Durur.

İzolasyonlarının ardından kültüre alınan SSEA4<sup>+</sup>/THY1<sup>+</sup> hücrelerin bir kısmının somatik hücre davranışı göstererek petrilere tutunduğu ve az miktarda hücrenin de yüzen hücreler olarak petri yüzeyinde kaldığı gözlemlendi. İlk yıkamadan sonra yüzen hücrelerin ayrıldığı ve tutunan hücrelerin sonraki pasajlarda çoğaltılabildiği gözlemlendi. Bununla birlikte SSEA4<sup>+</sup>/THY1<sup>+</sup> hücrelerden tutunan hücrelerin 3 ya da 4 pasajlama sonrası çoğalmalarının durduğu gözlemlendi ve bu hücrelerin çoğalma kapasitelerinin yüksek olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.4).

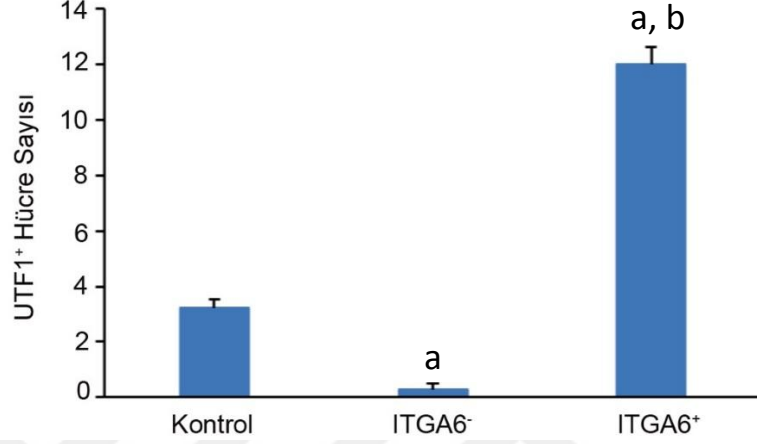


Şekil 4.4. SSEA4<sup>+</sup>/THY1<sup>+</sup> hücrelerinin *in vitro* koşullarda farklı günlerdeki mikroskopik görüntüsü, Bar: 100 µm.

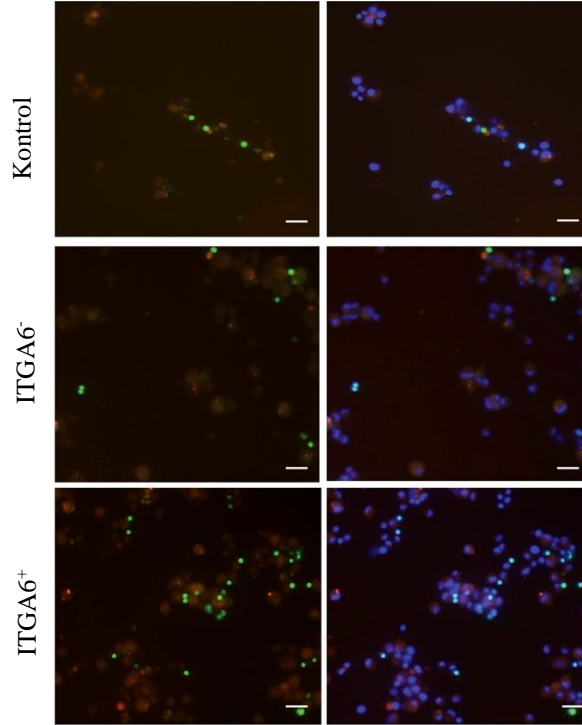
#### 4.4. MACS ile İzole Edilen ITGA6<sup>+</sup> Hücrelerin Kontrol ve ITGA6<sup>-</sup> Oranla Fazla Sayıda UTF1<sup>+</sup> Spermatogonyal Kök Hücre İçerir.

Hazırlanan testiküler hücre süspansiyonundan MACS ile ITGA6 belirteci kullanılarak spermatogonyal kök hücre izolasyonu yapıldı ve ITGA<sup>-</sup> ve ITGA6<sup>+</sup> olmak üzere 2 hücre

fraksiyonu elde edildi. Bu hücre fraksiyonlarındaki UTF1<sup>+</sup> hücre sayıları değerlendirildiğinde, ITGA6<sup>+</sup> fraksiyonda kontrole ve ITGA6<sup>-</sup> fraksiyona göre UTF1<sup>+</sup> hücre sayısının yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 4.5, 4.6), p<0.05.



**Şekil 4.5.** ITGA6 belirteci kullanılarak MACS yöntemi ile izole edilen hücre fraksiyonlarında (Kontrol, ITGA6<sup>-</sup>, ITGA6<sup>+</sup>) UTF1<sup>+</sup> hücre sayıları a: Kontrole göre karşılaştırma, b: ITGA6<sup>-</sup> fraksiyona göre karşılaştırma, p<0.05.

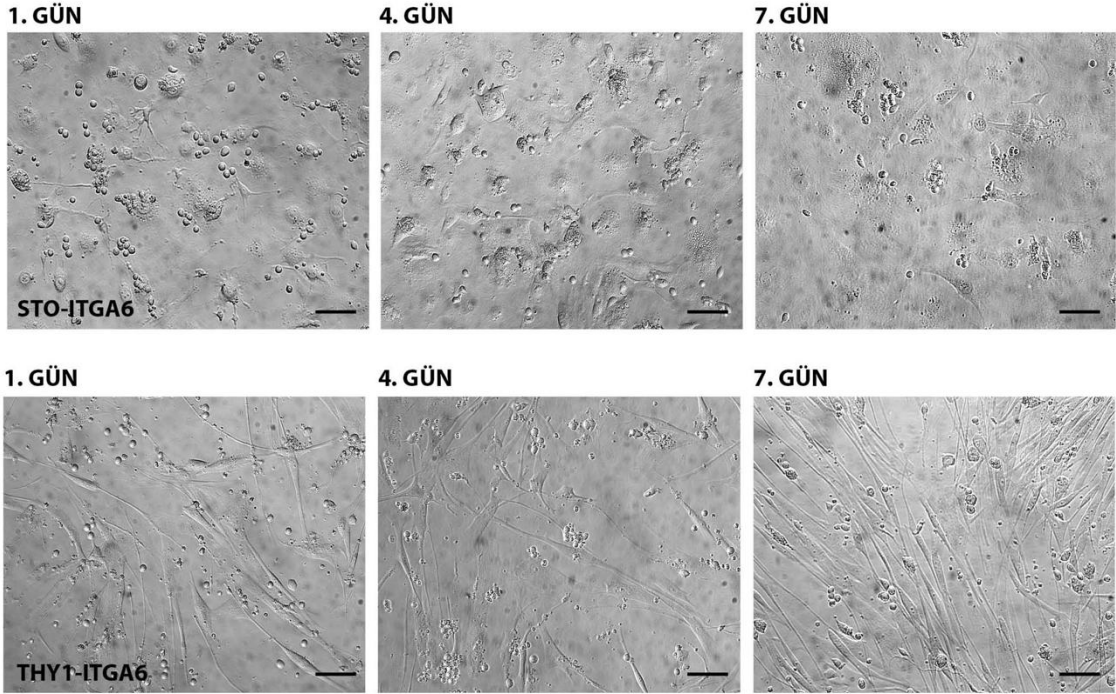


**Şekil 4.6.** ITGA6 belirteci kullanılarak MACS yöntemi ile izole edilen hücre fraksiyonlarında (Kontrol, ITGA6<sup>-</sup>, ITGA6<sup>+</sup>) gözlenen UTF1<sup>+</sup> hücreler, Bar: 40 µm.



#### 4.5. SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> Hücreler *In Vitro* Koşullarda ITGA6<sup>+</sup> İnsan Spermatogonyal Kök Hücrelerini Desteklemektedir.

MACS ile izole edilen ITGA6<sup>+</sup> insan spermatogonyal kök hücreleri, fare STO hücreleri ve bir önceki aşamada FACS yöntemi ile izole edilen ve çoğaltıldıktan sonra mitotik olarak inaktif hale getirilmiş olan SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> destekleyici hücreleri varlığında kültüre edildiğinde, ITGA6<sup>+</sup> hücrelerin SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> hücrelerinin olduğu koşulda destekleyici hücrelere tutunarak 3-4 hücreli hücre kümeleri oluşturduğu gözlemlendi. SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> destekleyici hücrelerin kullanıldığı koşulda, STO hücrelerinin kullanıldığı koşula göre daha fazla hücre kümesi oluştuğu ve bu hücre kümelerinin daha uzun süre devamlılıklarını sağlayabildiği gözlemlendi (Şekil 4.7).

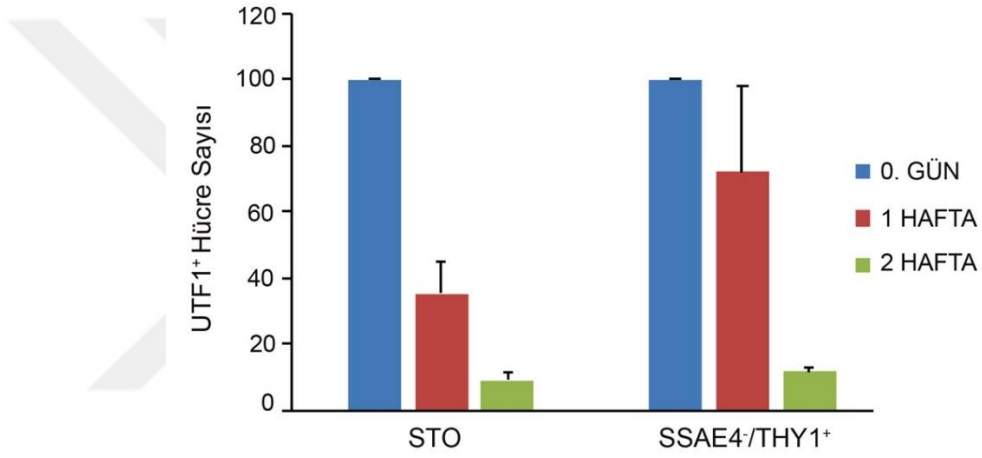


Şekil 4.7. STO ve SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> destekleyici hücreleri ile kültüre edilen ITGA6<sup>+</sup> insan spermatogonyal kök hücrelerinin farklı günlerdeki mikroskopik görüntüsü, Bar: 100 µm.

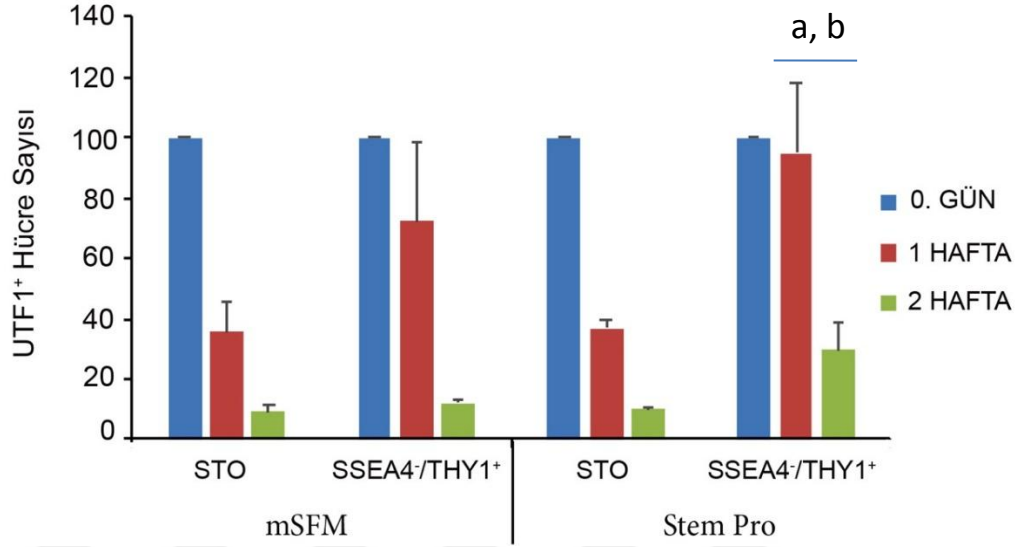
#### 4.6. SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> Hücrelerin *In Vitro* Koşullarda ITGA6<sup>+</sup> Spermatogonyal Kök Hücreleri Destekleme Kapasiteleri STO Hücrelerinden Yükseklerdir.

SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> hücreler ve STO destekleyici hücreleri varlığında mSFM ve Stem Pro medyumları ile kültüre edilen insan spermatogonyal kök hücrelerinin bir ve iki haftalık kültürü sonunda kalan UTF1<sup>+</sup> hücre sayısının SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> destekleyici hücrelerinin kullanıldığı koşulda yüksek olduğu fakat mSFM medyumunun kullanıldığı koşulda bir

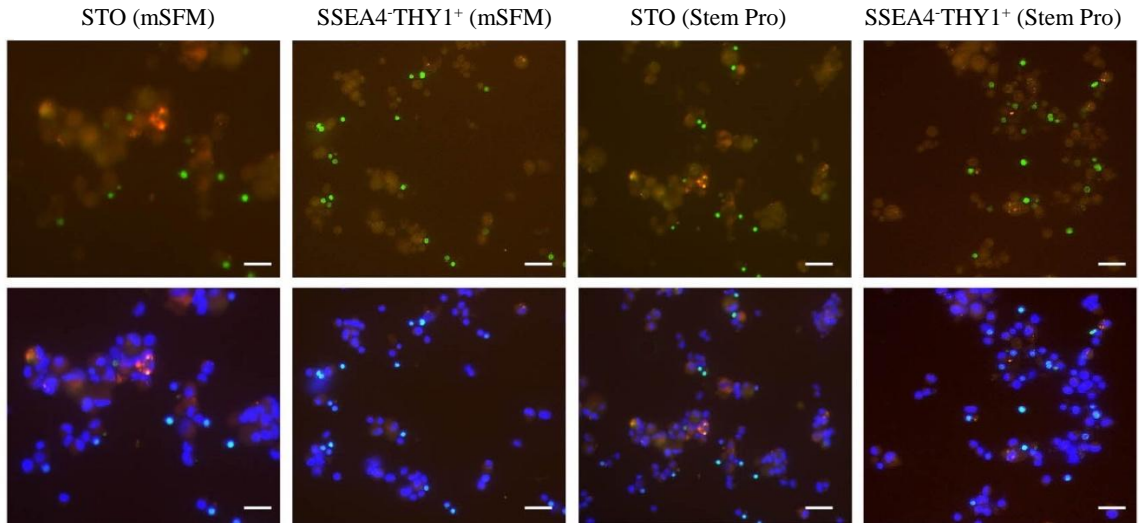
haftadan sonra spermatogonyal kök hücre sayısının azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.8). Bir sonraki kültür denemesinde mSFM ve Stem Pro medyumunun kullanıldığı koşulda Stem Pro medyumunun kullanılmasının SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> hücrelerin destekleyici etkilerini artırdığı gözlemlendi. Kültür sonunda STO hücrelerinin ve mSFM medyumunun kullanıldığı koşula göre SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> hücrelerin ve Stem Pro medyumunun kullanıldığı koşulda UTF1<sup>+</sup> hücre sayısının anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 4.9, 4.10), p<0.05.



**Şekil 4.8.** STO hücreleri ve SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> hücreleri varlığında mSFM medyumunu ile kültüre edilen hücrelerin kültürü sonunda elde edilen UTF1<sup>+</sup> hücre sayıları.



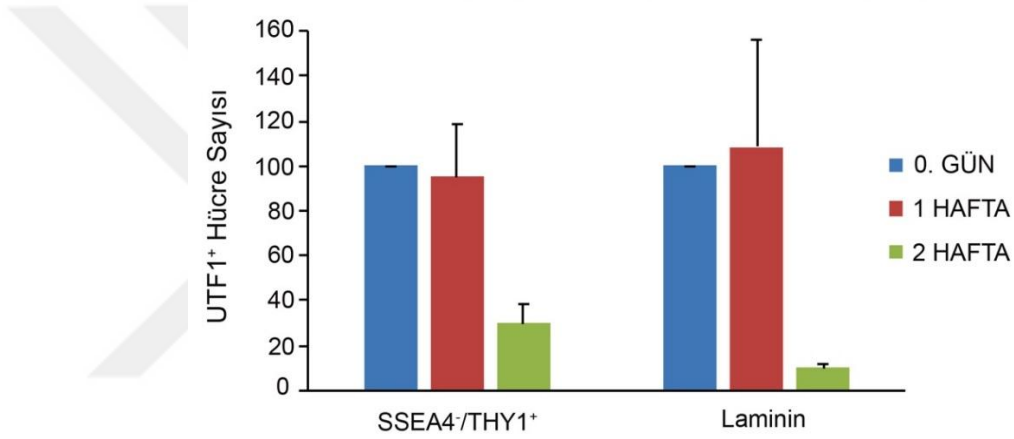
**Şekil 4.9.** STO hücreleri ve SSEA4/THY1<sup>+</sup> hücreleri varlığında Stem Pro ve mSFM medyumunu ile kültüre edilen ITGA6<sup>+</sup> hücrelerin kültürü sonunda elde edilen UTF1<sup>+</sup> hücre sayıları a: STO Stem pro koşuluna göre karşılaştırma, b: STO mSFM koşuluna göre karşılaştırma, p<0.05.



**Şekil 4.10.** STO hücreleri ve SSEA4/THY1<sup>+</sup> hücreleri varlığında Stem Pro ve mSFM medyumunu ile kültüre edilen ITGA6<sup>+</sup> hücrelerin kültürü sonunda gözlenen UTF1<sup>+</sup> hücreler, Bar: 20 µm.

#### 4.7. SSEA4<sup>+</sup>/THY1<sup>+</sup> Hücrelerin ve Laminin Materyalinin *In Vitro* Koşullarda ITGA6<sup>+</sup> Spermatogonyal Kök Hücreleri Destekleme Kapasiteleri Benzerdir.

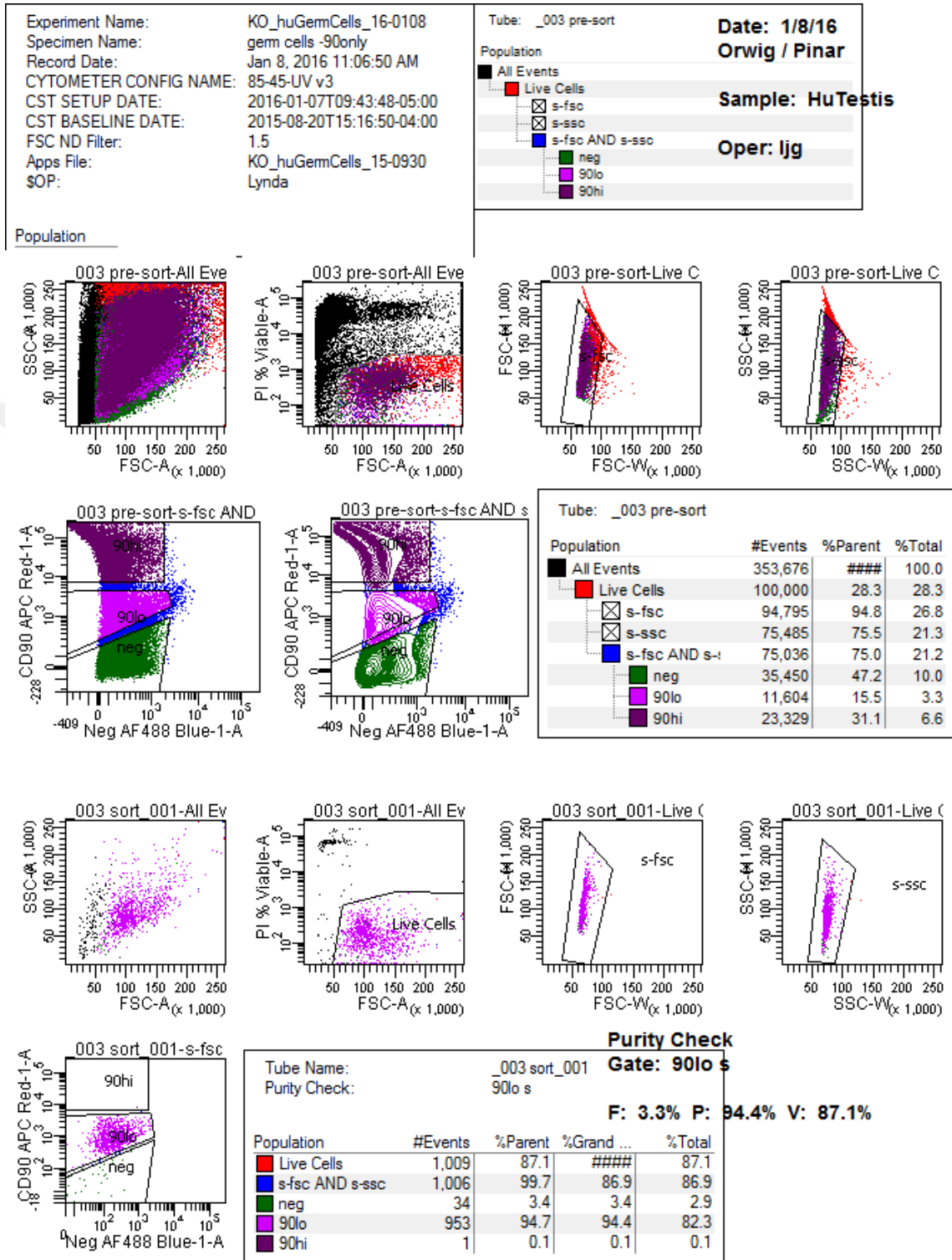
SSEA4<sup>+</sup>/THY1<sup>+</sup> hücreler ile veya laminin varlığında Stem Pro medyumunu ile kültüre edilen ITGA6<sup>+</sup> insan spermatogonyal kök hücrelerinin bir ve iki haftalık kültürü sonunda kalan UTF1<sup>+</sup> hücre sayısının SSEA4<sup>+</sup>/THY1<sup>+</sup> destekleyici hücrelerinin kullanıldığı koşulda yüksek olduğu fakat bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.11).



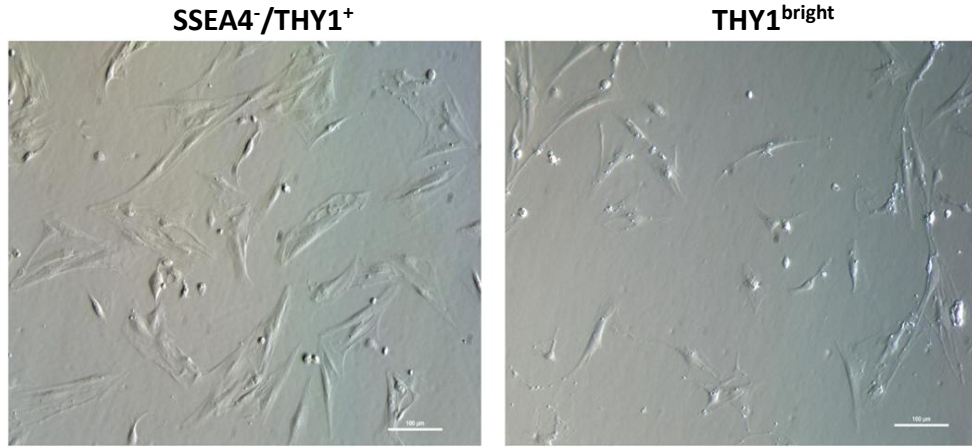
Şekil 4.11. SSEA4<sup>+</sup>/THY1<sup>+</sup> hücreleri ve laminin varlığında Stem Pro medyumunu ile kültüre edilen ITGA6<sup>+</sup> hücrelerin kültürü sonunda elde edilen UTF1<sup>+</sup> hücre sayıları.

#### 4.8. THY1 Belirteci Kullanılarak FACS ile Elde Edilen THY1<sup>bright</sup> Hücreler SSEA4<sup>+</sup>/THY1<sup>+</sup> Hücreler ile Benzer Fenotip Gösterirler ve *In Vitro* Koşullarda Çoğaltılabilirler.

İnsan testiküler hücreleri THY1 antikorunu ile işaretlendiğinde ve FACS ile analizi yapıldığında; THY1<sup>-</sup> hücreler ile THY1'i düşük oranda ekspre eden (THY1<sup>dim</sup>) ve THY1'i yüksek oranda ekspre eden (THY1<sup>bright</sup>) 2 alt popülasyona sahip THY1<sup>+</sup> hücreler olmak üzere toplam 3 farklı hücre fraksiyonu gözlemlendi ve izole edildi. İzole edilen bu üç fraksiyondaki hücrelerden THY1<sup>bright</sup> olanların SSEA4<sup>+</sup>/THY1<sup>+</sup> hücreler ile aynı koşullarda ve benzer şekilde çoğaltılabildiği gözlemlendi (Şekil 4.12, 4.13).



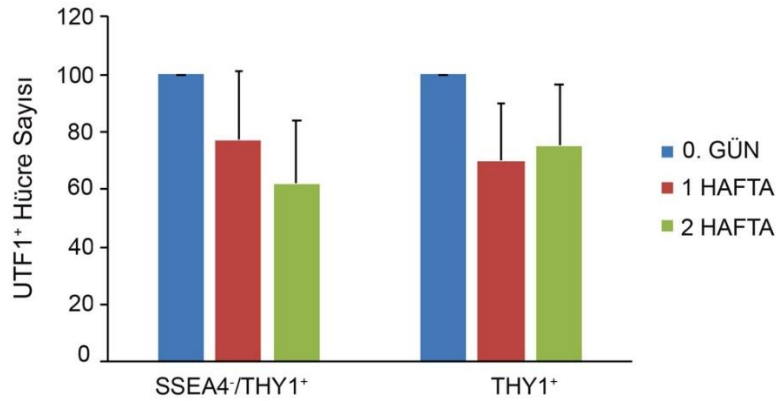
**Şekil 4.12.** THY1 belirteci ile işaretlenen insan testiküler hücrelerinin FACS analiz raporu. FACS analizi sonucunda THY1<sup>-</sup> hücreler ile THY1<sup>i</sup> düşük oranda ekspre eden (THY1<sup>dim</sup>) ve THY1<sup>i</sup> yüksek oranda ekspre eden (THY1<sup>bright</sup>) 2 alt popülasyona sahip THY1<sup>+</sup> hücreler olmak üzere toplam 3 farklı hücre fraksiyonu gözlemlendi ve izole edildi



**Şekil 4.13.** FACS ile izole edilen SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> hücreler ve THY1<sup>bright</sup> hücrelerin mikroskobik görünümü.

#### **4.9. MACS Yöntemi ile Elde Edilen THY1<sup>+</sup> Hücrelerin *In Vitro* Koşullarda ITGA6<sup>+</sup> Spermatogonyal Kök Hücreleri Destekleme Kapasiteleri SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> Hücreler ile Benzerdir.**

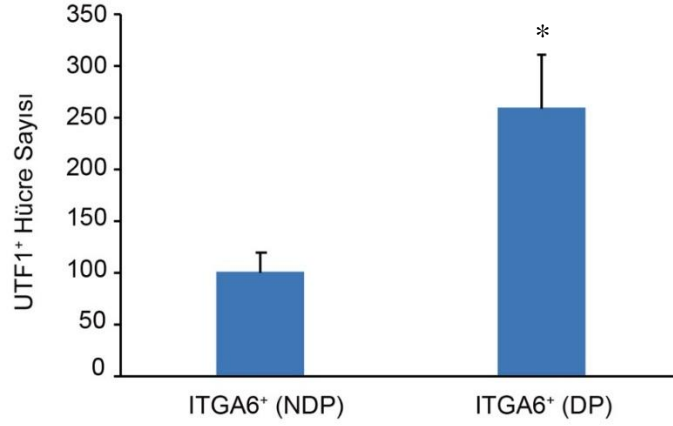
Bir önceki aşamada FACS yöntemi ile izole edilen SSEA4<sup>-</sup>THY1<sup>+</sup> hücrelerin sayılarının az olması ve bu hücrelerin uzun süre çoğaltılamamasından dolayı, daha fazla hücre elde etmek amacı ile MACS yöntemi ile THY1<sup>+</sup> hücreler izole edildi ve SSEA4<sup>-</sup>THY1<sup>+</sup> hücreler ile karşılaştırıldı. THY1<sup>+</sup> hücrelerin FACS ile izole edilmiş olan SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> hücreler ile benzer şekilde çoğaldıkları gözlemlendi. Bu hücrelerin destekleyici hücre olarak kullanıldıkları 1 ve 2 haftalık kültürlerin sonunda, elde edilen UTF1<sup>+</sup> spermatogonyal kök hücre sayısının her iki destekleyici hücre için de benzer olduğu gözlemlendi (Şekil 4.14).



**Şekil 4.14.** ITGA6<sup>+</sup> hücrelerin SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> hücreler ve MACS ile izole edilen THY1<sup>+</sup> hücreler ile kültürü sonunda elde edilen UTF1<sup>+</sup> hücre sayıları.

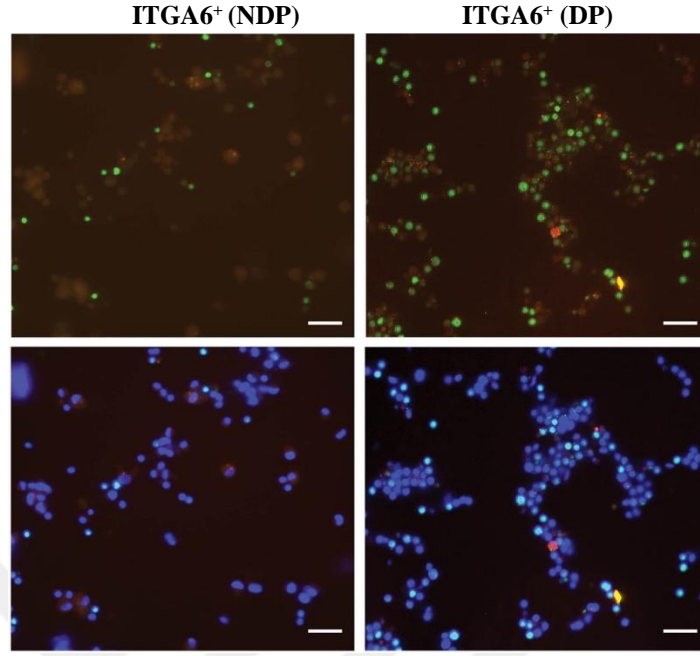
#### 4.10. ITGA6<sup>+</sup> İnsan Spermatogonyal Kök Hücrelerinin Tip I Kollajen Varlığında Kültüre Edilmesi İçerdikleri UTF1<sup>+</sup> Hücre Sayısını Artırır.

Elde edilen sonuçların ardından, spermatogonyal kök hücrelerin sayısının artırılması amaçlandığından, MACS ile izole edilen ITGA6<sup>+</sup> hücreler tip I kollajen kaplı petrilerde inkübe edildiğinde, zenginleştirilmiş ITGA6<sup>+</sup> hücre fraksiyonununda ITGA6<sup>+</sup> fraksiyona göre UTF1<sup>+</sup> hücre sayısının anlamlı düzeyde arttığı gözlemlendi.  $p < 0.05$  Tip I kollajen kullanılarak zenginleştirilmiş ITGA6<sup>+</sup> spermatogonyal kök hücreler ve ITGA6<sup>+</sup> hücreler THY1<sup>+</sup> hücreler ile kültüre edildiğinde, elde edilen UTF1<sup>+</sup> hücre sayısının zenginleştirilmiş kök hücrelerin kullanıldığı koşulda, ITGA6<sup>+</sup> hücrelerin kullanıldığı koşula göre anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 4.15, 4.16, 4.17),  $p < 0.05$ .

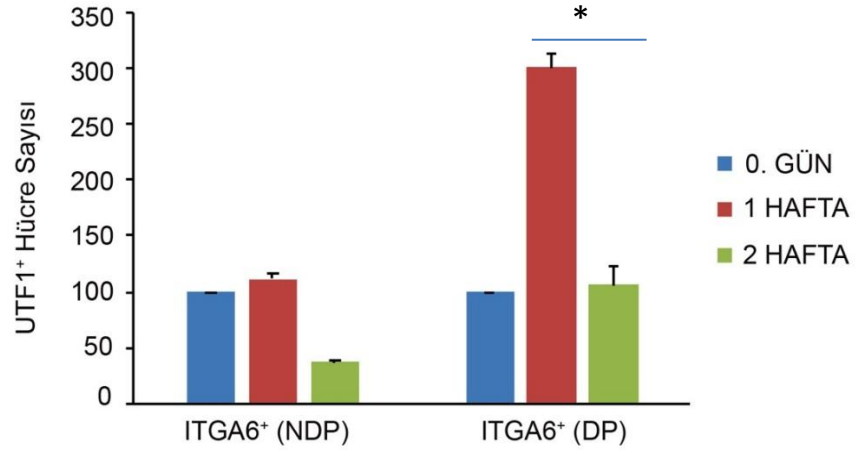


**Şekil 4.15.** Tip I kollajen kullanılarak kök hücre zenginleştirme yönteminin UTF1<sup>+</sup> hücre sayısına etkisinin değerlendirilmesi, NDP: Non-Differential plated, DP: Differential Plated, \* $p < 0.05$ .





**Şekil 4.16.** ITGA6<sup>+</sup> ve tip I kollajen kullanılarak zenginleştirilmiş ITGA6<sup>+</sup> hücre fraksiyonlarında gözlenen UTF1<sup>+</sup> hücreler, NDP: Non-Differential plated, DP: Differential Plated, Bar: 40 µm.



**Şekil 4.17.** MACS ile izole edilmiş THY1<sup>+</sup> destekleyici hücreleri ile kültüre edilen ITGA6<sup>+</sup> ve tip I kollajen kullanılarak zenginleştirilmiş ITGA6<sup>+</sup> hücrelerin kültürü sonunda elde edilen UTF1<sup>+</sup> hücre sayıları NDP: Non-Differential plated, DP: Differential Plated, \*p<0.05.



## 5. TARTIŞMA

Postpubertal bireylerde spermatogenez ile günde 40 milyon/gram sperm üretilmektedir. Spermatogonyal kök hücreler testis dokusuna ait erişkin doku kök hücreleridir ve spermatogenezin temelini oluşturarak erkek fertilitésinin devamlılığını sağlamaktadırlar (Phillips ve ark., 2010). Spermatogonyal kök hücrelerin çevresel faktörler, genetik hastalıklar ya da medikal tedavi süreçlerinden dolayı kaybedilmesi bireyin reproduktif yaşamını olumsuz etkilemektedir. Bununla birlikte prepubertal erkeklerde üreme fonksiyonu henüz kazanılmamıştır veya erişkin bireylerde görülen söz konusu fonksiyon bozukluğu geri dönüşümsüz olabilmektedir. Bu bağlamda spermatogonyal kök hücreler erkek reproduktif fonksiyonunun devamlılığı açısından büyük önem arz etmektedir. Kök hücreler spermatogonyal kök hücre terapisi için alternatif oluşturmaktadır. Spermatogonyal kök hücre terapisinin uygulanabilir olması için spermatogonyal kök hücrelerin homojen bir şekilde izole edilebilmeleri, *in vitro* koşullarda çoğaltılabilmeleri ve ardından bireye otograft yöntemi ile transplante edilebilmeleri gerekmektedir.

Bu konudaki ilk çalışmalar kemirgenlerde yapılmıştır. İlk olarak kemirgenlerdeki spermatogenik hücre tipleri ve bu hücrelerin belirteçleri tanımlanmıştır (R. L. Brinster ve Avarbock, 1994). 1994 yılında Brinster ve arkadaşlarının geliştirmiş oldukları transplantasyon tekniği fare spermatogonyal kök hücre çalışmalarına yeni bir boyut kazandırmıştır. Bu teknik ile spermatogonyal kök hücrelerin fonksiyonel olarak karakterize edilmeleri ilk kez gösterilmiştir. Ardından hücrelerin *in vitro* koşullarda devamlılıklarını sağlayan gelişim faktörleri belirlenmiştir. Kemirgenlerde yıllardır süregelen çalışmalarda THY1<sup>+</sup> spermatogonyal kök hücrelerin MACS yöntemi ile izolasyonlarının ardından GDNF, FGF ve LIF varlığında kültüre edilmeleri sonucunda *in vitro* koşullarda koloni oluşumlarının sağlandığı ve bu kolonilerin yeni kültür ortamına alınarak devamlılıklarının uzun bir süre sağlanabildiği gösterilmiştir (Kubota ve ark., 2004b). Ayrıca bu kolonilerin immün sistemden yoksun farelere verilmesi sonucunda spermatogonyal kök hücrelerden köken alan yavruların dünyaya geldiği gösterilmiştir (Kubota ve ark., 2004b).

Literatürde kemirgenlerde yapılmış olan çalışmalar, bu çalışmaların asıl amacı olan spermatogonyal kök hücre terapisinin klinikte kullanımını açısından referans oluşturmaktadır. Bununla birlikte, spermatogonyal kök hücre terapisinin klinikte kullanımını ile ilgili olarak insan spermatogonyal kök hücrelerinin belirteçlerinin, izolasyon yöntemlerinin ve *in vitro* koşullarda devamlılıklarının sağlanması için gerekli faktörlerin tanımlanması gerekmektedir. İnsan spermatogonyal kök hücrelerinin izolasyonları ve *in vitro* koşullarda devamlılıklarının sağlanması ile ilgili çalışmalar olmakla birlikte bu çalışmalar oldukça kısıtlıdır (Hermann ve ark., 2010; von Kopylow ve ark., 2010; Aloisio ve Manjunath, 2014; Valli ve ark., 2014; von Kopylow ve Spiess, 2017). Yapılan çalışmalar umut verici olmakla birlikte henüz literatürde insan spermatogonyal kök hücrelerinin *in vitro* koşullarda uzun süre devamlılıklarını sağlayan bir yöntem mevcut değildir. Bu problemin en önemli sebeplerinden biri halen hücrelerin homojen bir şekilde izole edilememesidir. Buna ek olarak insan örnekleri kullanılarak yapılan çalışmalarda diğer önemli bir handikap ise otolog transplantasyon mümkün olmadığından insan hücrelerinin fertil potansiyellerini gösterecek bir yöntem henüz bulunmamaktadır. Literatürde insan spermatogonyal kök hücrelerinin aktivitelerinin gösterilmesi için kullanılan tek yöntem ksenotransplantasyondur. İnsan spermatogonyal kök hücreler ile ilgili yapılan güncel çalışmalarda THY1<sup>+</sup> hücrelerin insan testisinde ekspre olduğu hücreler ve bu hücrelerin karakterleri ile ilgili bilgilerin yetersiz olduğu vurgulanmaktadır.

Bu sebeple çalışmamızda THY1 belirteci ekspre eden insan testiküler hücrelerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla ilk olarak SSEA4 ve THY1 belirteçleri kullanılarak FACS yöntemi ile SSEA4<sup>+</sup>/THY1<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> ve SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>-</sup> hücre fraksiyonları izole edilmiştir. Ardından elde edilen hücreler busulfan uygulanmış infertil alıcı farelerin testislerine transplante edilerek koloni oluşumları değerlendirilmiştir. Kök hücre belirteci SSEA4 açısından negatif olan ve THY1 belirteci açısından pozitif olan hücre fraksiyonunun kök hücreler gibi koloni oluşturmadığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar çalışmamız ile ilk kez gösterilmiştir. Bu hücrelerin kültüre alınmasının ardından hücrelerin somatik hücreler gibi petri kaplarına tutunduğu ve 3 ya da 4 pasaj kültürde çoğaltılabildiği gözlenmiştir. Ardından çalışmamızda MACS ile ITGA6 belirteci kullanılarak hücre izolasyonu yapılmış ve ITGA6<sup>+</sup> hücrelerin içerdikleri

spermatogonyal kök hücre sayısının anlamlı düzeyde arttığı gözlenmiştir. Bu sonuç, MACS yöntemi ile ITGA6 belirteci kullanılarak spermatogonyal kök hücrelerin zenginleştirilebileceğini göstermektedir. Aynı zamanda SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> hücrelerin ITGA6<sup>+</sup> insan spermatogonyal kök hücrelerini *in vitro* koşullarda desteklediği gösterilmiştir. Literatürde insan laminin ekstrasellüler matris materyalinin insan spermatogonyal kök hücrelerini destekleyici etkisinin yüksek olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Hooman Sadri-Ardekani ve ark., 2011). Bu sebeple SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> hücrelerin *in vitro* koşullarda destekleyici etkisi laminin materyali ile karşılaştırılmıştır. İki haftalık kültür sonunda SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> destekleyici hücrelerinin kullanıldığı koşulda daha fazla spermatogonyal kök hücre kaldığı, fakat bu etkinin istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmadığı gözlenmiştir. Bu kültür deneylerinde ITGA6<sup>+</sup> spermatogonyal kök hücreler kullanıldığından ve ITGA6 laminin reseptörü olduğundan, bu iki kültür koşulunun karşılaştırılmasının başka bir SKH belirteci açısından pozitif olan hücreler ile tekrarlanmasının hangi koşulun kullanımının daha efektif olduğunun belirlenmesi açısından uygun olacağı düşünülmektedir. Buna ek olarak çalışmamızda THY1<sup>+</sup> hücrelerin elde edilmesi için yalnızca THY1 belirteci kullanılarak THY1<sup>bright</sup> hücrelerin ya da MACS ile izole edilen THY1<sup>+</sup> hücrelerinde çoğaltılarak kullanılabilirliği gösterilmiştir. FACS yönteminin spesifik hücre izolasyonu için uygun bir yöntem olduğu bilinmekle birlikte, maliyeti yüksek olduğundan ve elde edilen hücre sayısı az olduğundan, sadece THY1 belirteci kullanılarak FACS ya da MACS ile hücre izole edilebilmesi ileri çalışmalar için önem arz etmektedir. MACS yöntemi ile daha fazla hücre izole edilerek bu hücrelerin karakterlerinin ve fonksiyonlarının tanımlanması ile ilgili ileri çalışmalar planlanabilecektir. Aynı zamanda SSEA4<sup>-</sup>THY1<sup>+</sup> hücreler ve THY1<sup>+</sup> hücrelerin iSKH lerini destekleme etkilerinin benzer olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar THY1 ekspre eden hücrelerden insan spermatogonyal kök hücrelerini destekleyici olanların seçilimi için ikinci bir belirtece gerek olmadan izolasyon yapılabileceğini göstermektedir. Bu sonuçlar dahilinde, insan testisinde THY1<sup>+</sup> hücrelerin heterojen bir popülasyon olduğu gözlenmiştir. THY1 belirtecinin insan testisinde spermatogonyal kök hücrelerde ve aynı zamanda somatik hücrelerde ekspre olduğu anlaşılmaktadır. Bununla birlikte MACS sonrasında elde edilen THY1<sup>+</sup> hücre fraksiyonundan kök hücre karakterinde olanların ve somatik karakterde olanların

ayrıştırılması için *in vitro* kültür yapılması gerektiği gözardı edilmemelidir. *In vitro* kültür yapıldığında tutunan ve kültürde çoğalan hücreler somatik hücreler olarak, yüzen hücreler ise spermatogonyal kök hücreler olarak tanımlanabilir. Aynı zamanda bazı donörlerden elde edilen örneklerde yapılan deneylerde THY1<sup>+</sup> hücrelerin iSKH'lerini destekleyici etkilerinin diğer donörlerin örneklerine göre yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu heterojenitenin gözlenmesi bu hücrelerin kendi içerisinde de farklı tipte somatik hücreler içerebileceğini düşündürmektedir. Buna ek olarak bu hücrelerin kültürde çok az sayıda pasaj ile çoğaltılabiliyor olmaları Sertoli hücre benzeri fenotipe sahip olabileceklerini düşündürmektedir. Bu bağlamda bu hücrelerin insan testisinde bulunan somatik hücre belirteçleri açısından değerlendirilmelerinin hücre karakterlerinin aydınlatılması açısından uygun olacağı düşünülmektedir. Ardından insan spermatogonyal kök hücrelerinin *in vitro* koşullarda desteklenmelerinin artırılması amaçlanarak kök hücre zenginleştirme yapılmıştır. Elde edilen kök hücrelerin artırılması amacı ile MACS ile izole edilmiş ITGA6<sup>+</sup> hücreler tip I kollajen varlığında kültüre edildikten sonra içerdikleri spermatogonyal kök hücre sayısının anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar, tip I kollajen varlığında kök hücrelerin inkübe edilmesinin, kök hücrelerin sayısının artırılması için ileri çalışmalar da kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca bu sonuç insanda homojen hücre izolasyonu yapabilmek için ya yeni ve daha etkili bir belirteç bulunması gerektiğini ya da MACS ile seçilen hücrelerin kullanılmadan önce içerisindeki somatik hücrelerden ayrıştırılması gerektiğini göstermektedir ve insan spermatogonyal kök hücre çalışmaları açısından büyük önem arz etmektedir. Aynı zamanda ITGA6<sup>+</sup> hücrelere göre tip I kollajen ile zenginleştirilmiş olan hücrelerin *in vitro* koşullarda THY1<sup>+</sup> hücreler ile kültüre edildiklerinde hayatta kalımlarının daha yüksek olduğu ve hatta proliferasyon olabildikleri gözlenmektedir. THY1<sup>+</sup> hücreler ile kültüre edilen ITGA6<sup>+</sup> hücrelerin ve tip I kollajen ile zenginleştirilmiş olan ITGA6<sup>+</sup> hücrelerin ksenotransplantasyonunun gerçekleştirilmesi bu koşulların etkinliğinin daha kuvvetli sonuçlar ile açıklanmasına olanak sağlayabilecektir.

Kemirgen spermatogonyal kök hücrelerinin izolasyonu ile ilgili literatüre giren birçok çalışmada kemirgen spermatogonyal kök hücrelerinin izolasyonu için THY1 belirteci kullanılmaktadır. Bu sonuçlar insan THY1<sup>+</sup> hücrelerinin karakter ve fonksiyonlarının fare testisinden izole edilen THY1<sup>+</sup> hücrelerden farklı olduğunu da ortaya koymaktadır.

Aynı zamanda bu sonuçlar kemirgenler ile yapılan çalışmaların tam anlamı ile insanda gözlenmesi beklenen sonuçları göstermediğinin de kanıtı niteliğindedir. Türler arasındaki benzerliklerin ve farklılıkların ortaya konması ile ilgili çalışmaların yapılmasının insan spermatogonyal kök hücreleri ile ilgili yapılan çalışmaların başarısının artırılması için de kaynak oluşturacağı göz önünde bulundurulmalıdır. Aynı zamanda kemirgenler ile yapılan birçok çalışmada elde edilen sonuçlarda farklı örneklerde yüksek benzerlik gözlenirken insan örnekleri ile yapılan çalışmalarda bu mümkün değildir. İnsan örnekleri ile yapılan çalışmalarda örnekler arasında yüksek oranda değişkenlik gözlenmektedir ve gözlenen bu değişkenlik bu çalışmalardan başarılı sonuçlar elde edilmesinin önünde bir engel oluşturmaktadır. Bu bağlamda örneklerin elde edildiği vericinin yaşı, yaşam koşulları ve genetik yapısı büyük önem arz etmektedir. Bu çalışmaların yaygın etkilerinin yüksek olması için farklı örneklerden elde edilen sonuçların benzerlik göstermesi gerekmektedir. Diğer önemli bir nokta ise kemirgen ve insan olmayan primatlarda gözlenen hücre tipleri ve gelişim basamaklarının insan hücreleri ile aynı olmamasıdır. Kemirgenlerde gözlenen başarının elde edilebilmesi için insan spermatogonyal kök hücrelerinin kullanıldığı çalışmaların ilerletilebilmesi gerekmektedir.

Buna ek olarak literatürde spermatogonyal kök hücrelerinin kök hücre terapisinde kullanımına olanak sağlayabilmesi için yeni teknolojiler tanımlayan çalışmalar bulunmaktadır. İnsan testis dokusunun doku parçası halinde transplantasyonu ya da gen terapi uygulamaları yeni araştırma alanlarıdır. Örneğin CRISPR-Cas9 teknolojisinin kemirgenlerde genetik manipülasyon için oldukça etkili olduğu bildirilmiştir (Yang ve ark., 2013; Chapman, 2015; Sato ve ark., 2015; Y. Wu ve ark., 2015), fakat bu tekniğin farklı türlerde kullanımının sağlanması için hücrelerin kendilerini yenilemelerini sağlayan faktörlerin belirlenmesi gerekmektedir. Kemirgenlerde üzerinde çalışılmaya başlanan serum içermeyen kültür tekniğinin geliştirilmesinin bu konunun çözümlenebilmesi için yararlı olacağı düşünülmektedir (Kanatsu-Shinohara ve ark., 2013; Kanatsu-Shinohara ve ark., 2014). Sato ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada sıvı-hava arayüzü sağlanan bir organ kültür sisteminin kullanımının yavru ve erişkin farelerin ve hatta Kit ligand mutant farelerin seminifer tübüllerinde *in vitro* spermatogenezini indüklediği bildirilmiştir (Sato ve ark., 2011; Sato ve ark., 2012;

Yokonishi, 2014; Sato ve ark., 2015). Buna ek olarak Komeya ve arkadaşları mikroakışkan teknolojisini kullanarak spermatogenezi sağlamanın etkili olduğunu göstermişlerdir (Komeya, 2016). Bu çalışmalar bu alanda kullanılacak yeni alternatif teknolojilerin olduğunu göstermektedir. Yeni teknolojilerin geliştirilmesinin insan spermatogonyal kök hücre çalışmalarına yeni bir boyut kazandıracığı öngörülmektedir.

Çalışmamızın sonuçları, insan spermatogonyal kök hücrelerinin izolasyonu ve *in vitro* koşullarda hayatta kalımlarını destekleyen koşullar ile ilgili yeni bilgiler sunmaktadır. Bu sonuçların literatürde kısıtlı bilgi bulunan insan spermatogonyal kök hücrelerinin izolasyonu ve *in vitro* ekspansiyonlarının sağlanması ile ilgili çalışmalara katkı sağlayacağı ve ileri çalışmalar için referans olabileceği düşünülmektedir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tezde, çeşitli izolasyon yöntemleri ile insan spermatogonyal kök hücrelerinin (iSKH) izole edilmesi ve bu hücrelerin farklı destekleyici hücreler varlığında *in vitro* koşullarda kültüre edilmesinin ardından, izolasyon ve kültür ortamı koşullarının iSKH'lerinin *in vitro* koşullarda hayatta kalma ve çoğalmalarına etkisi araştırılmış ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1. Floresan aktive hücre izolasyon yöntemi ile SSEA4 ve THY1 belirteçleri kullanılarak, SSEA4<sup>+</sup>/THY1<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup>, SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>-</sup> olmak üzere 3 farklı hücre fraksiyonu elde edilmiştir.

2. Kontrol (insan testiküler hücre süspansiyonu) ve FACS yöntemi ile izole edilen SSEA4<sup>+</sup>/THY1<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup>, SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>-</sup> hücre fraksiyonlarından SSEA4<sup>+</sup>/THY1<sup>-</sup> hücre fraksiyonunu en yüksek sayıda koloni oluştururken, diğer fraksiyonlarda neredeyse hiç koloni oluşmamıştır. Bu sonuç ile THY1<sup>+</sup> hücrelerin kök hücre karakterinde olmadığı ve heterojen bir hücre popülasyonu olduğu ortaya konmuştur.

3. FACS ile izole edilen SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> hücrelerin kültürde 3 ya da 4 pasaj çoğaltılabildiği ve bu hücrelerin ITGA6<sup>+</sup> iSKH'lerini *in vitro* koşullarda desteklediği gösterilmiştir.

4. FACS yöntemi ile yalnızca THY1 belirteci kullanılarak elde edilen THY1<sup>bright</sup> hücrelerin ve MACS yöntemi ile izole edilen THY1<sup>+</sup> hücrelerin de ve SSEA4<sup>-</sup>/THY1<sup>+</sup> hücreler ile benzer fenotipe sahip olduğu ve benzer şekilde kültürde çoğaltılabildikleri gösterilmiştir. MACS ile izole edilen THY1<sup>+</sup> hücrelerin de iSKH'lerini desteklediği gözlenmiştir.

5. MACS ile izole edilen ITGA6<sup>+</sup> hücrelerin tip I kollajen ile inkübe edilmelerinin ardından elde edilen hücre süspansiyonunda bulunan UTF1<sup>+</sup> spermatogonyal kök hücre sayısının ITGA6<sup>+</sup> hücre süspansiyonun içerdiği UTF1<sup>+</sup> spermatogonyal kök hücre sayısına göre anlamlı düzeyde arttığı gözlenmiştir.

6. ITGA6<sup>+</sup> hücrelerin ve tip I kollajen ile zenginleştirilmiş ITGA6<sup>+</sup> hücrelerin THY1<sup>+</sup> hücreler varlığında kültüre edildiklerinde, UTF1<sup>+</sup> hücre sayısının kollajen ile zenginleştirilmiş kök hücrelerin olduğu koşulda anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir.

7. Çalışmamızda tip I kollajen ile zenginleştirilen iSKH'lerinin THY1<sup>+</sup> destekleyici hücreleri ile kültüre edilmelerinin, bu hücrelerin *in vitro* hayatta kalımlarını desteklediği gösterilmiştir.

Sonuç olarak, bu doktora tez projesi kapsamında insan spermatogonyal kök hücrelerinin *in vitro* koşullarda devamlılıklarını sağlayan çeşitli koşulların iSKH elde etmesi ve çoğaltılması başarılarının karşılaştırılması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar literatürde kısıtlı bilgi bulunan insan spermatogonyal kök hücrelerinin *in vitro* koşullarda yeterince çoğaltılması ve ileride infertil erkeklerde spermatogonyal kök hücre terapisinde kullanılmasını araştıracak yeni çalışmalar açısından aydınlatıcı bilgiler sunmaktadır.



## KAYNAKLAR

Abuelhija, M., Weng, C. C., Shetty, G., & Meistrich, M. L. Rat models of post irradiation recovery of spermatogenesis: Interstrain differences. *Andrology*. 2013; 1 (2): 206-215.

Aloisio, G. M. N., Y. Saatcioglu, H. D. Pena, C. G. Baker, M. D. Tarnawa, E. D. Mukherjee, J., & Manjunath, H. B., A. Sengupta, A. L. Amatruda, J. F. Cuevas, I.Hamra, F. K. Castrillon, D. H. Pax7 expression defines germline stem cells in the adult testis. *J Clin Invest*. 2014; 124 (9): 3929-3944.

Aponte, P. M., Soda, T., Teerds, K. J., Mizrak, S. C., van de Kant, H. J., & de Rooij, D. G. Propagation of bovine spermatogonial stem cells in vitro. *Reproduction*. 2008; 136 (5): 543-557.

Ballow, D. J., Xin, Y., Choi, Y., Pangas, S. A., & Rajkovic, A. Sohlh2 is a germ cell-specific bhlh transcription factor. *Gene expression patterns: GEP*. 2006; 6 (8): 1014-1018.

Barrios, F. F., D. Campolo, F. Gori, M. Bramucci, F. Pellegrini, M. Ottolenghi, S. Rossi, P. Jannini, E. A. Dolci, S. Sohlh1 and sohlh2 control kit expression during postnatal male germ cell development. *J Cell Sci*. 2012; 125 (Pt 6): 1455-1464.

Braun, R. E., Sharma, M., Srivastava, A., Fairfield, H. E., & Bergstrom, D. E. (2017). Identification of slow-cycling long-term spermatogonial stem cells and their regulation by plzf. In *Society for the study of reproduction* (pp. 279). Washington DC, .

Braydich-Stolle, L., Kostereva, N., Dym, M., & Hofmann, M. C. Role of src family kinases and n-myc in spermatogonial stem cell proliferation. *Developmental biology*. 2007; 304 (1): 34-45.

Brinster, C. J., Ryu, B. Y., Avarbock, M. R., Karagenc, L., Brinster, R. L., & Orwig, K. E. Restoration of fertility by germ cell transplantation requires effective recipient preparation. *Biology of reproduction*. 2003; 69 (2): 412-420.

Brinster, R. L., & Avarbock, M. R. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91 (24): 11303-11307.

Brinster, R. L., & Zimmermann, J. W. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91 (24): 11298-11302.

Brook, P. F., Radford, J. A., Shalet, S. M., Joyce, A. D., & Gosden, R. G. Isolation of germ cells from human testicular tissue for low temperature storage and autotransplantation. *Fertility and sterility*. 2001; 75 (2): 269-274.

Buaas, F. W. K., A. L. Sharma, M. McLean, D. J. Morris, J. L. Griswold, M. D. de Rooij, D. G. Braun, R. E. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet*. 2004; 36 (6): 647-652.

Buageaw, A. S., M. Ben-Yehudah, A. Ehmcke, J. Rawe, V. Y. Pholpramool, C. Orwig, K. E. Schlatt, S. Gdnf family receptor alpha1 phenotype of spermatogonial stem cells in immature mouse testes. *Biol Reprod*. 2005; 73 (5): 1011-1016.

Camp, E., Hope, R., Kortschak, R. D., Cox, T. C., & Lardelli, M. Expression of three spalt (sal) gene homologues in zebrafish embryos. *Development genes and evolution*. 2003; 213 (1): 35-43.

Chapman, K. M. M., G. A. Jaichander, P. Chaudhary, J. Waits, A. E. Nobrega, M. A. Hotaling, J. M. Ober, C. Hamra, F. K. Targeted germline modifications in rats using crispr/cas9 and spermatogonial stem cells. *Cell Rep*. 2015; 10 (11): 1828-1835.

Chen, B., Wang, Y. B., Zhang, Z. L., Xia, W. L., Wang, H. X., Xiang, Z. Q., Wang, Z. Xeno-free culture of human spermatogonial stem cells supported by human embryonic stem cell-derived fibroblast-like cells. *Asian J Androl*. 2009; 11 (5): 557-565.

Clark, A. T., Phillips, B. T., & Orwig, K. E. Fruitful progress to fertility: Male fertility in the test tube. *Nature medicine*. 2011; 17 (12): 1564-1565.

Clermont, Y. Spermatogenesis in man. A study of the spermatogonial population. *Fertil. Steril*. 1966; (17): 705-721.

Clermont, Y. Two classes of spermatogonial stem cells in the monkey (*Cercopithecus aethiops*). *Am. J. Anat.* 1969; 126: 57-71.

Clermont, Y., & Antar, M. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and the spermatogonial renewal in the monkey *Macaca arctoides*. *Am J Anat.* 1973; 136 (2): 153-165.

Clermont, Y., & Leblond, C. P. Differentiation and renewal of spermatogonia in the monkey, *Macacus rhesus*. *Am. J. Anat.* 1959; (104): 237-273.

Clifton, D. K., & Bremner, W. J. The effect of testicular x-irradiation on spermatogenesis in man. A comparison with the mouse. *J Androl.* 1983; 4 (6): 387-392.

Colvin, J. S., Green, R. P., Schmahl, J., Capel, B., & Ornitz, D. M. Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell.* 2001; 104 (6): 875-889.

Costoya, J. A. H., R. M. Barna, M. Cattoretti, G. Manova, K. Sukhwani, M. Orwig, K. E. Wolgemuth, D. J. Pandolfi, P. P. Essential role of *plzf* in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet.* 2004; 36 (6): 653-659.

Coulson, C., Kershaw, H., Radford, J., & Larcher, V. Semen collection from young cancer patients. *Human fertility.* 2001; 4 (3): 131-134.

Davey, R. E., Onishi, K., Mahdavi, A., & Zandstra, P. W. LIF-mediated control of embryonic stem cell self-renewal emerges due to an autoregulatory loop. *FASEB J.* 2007; 21 (9): 2020-2032.

de Rooij, D. G. Spermatogonial stem cell renewal in the mouse. I. Normal situation. *Cell Tissue Kinet.* 1973; 6 (3): 281-287.

de Rooij, D. G. The nature and dynamics of spermatogonial stem cells. *Development.* 2017; 144: 3022-3030.

de Rooij, D. G., & Griswold, M. D. Questions about spermatogonia posed and answered since 2000. *J Androl.* 2012; 33 (6): 1085-1095.

de Rooij, D. G., & Grootegoed, J. A. Spermatogonial stem cells. *Curr Opin Cell Biol.* 1998; 10 (6): 694-701.

de Rooij, D. G., & Russell, L. D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl.* 2000; 21 (6): 776-798.

de Rooij, D. G., van Alphen, M. M., & van de Kant, H. J. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and its stages in the rhesus monkey (*macaca mulatta*). *Biol Reprod.* 1986; 35 (3): 587-591.

DiNapoli, L., Batchvarov, J., & Capel, B. Fgf9 promotes survival of germ cells in the fetal testis. *Development.* 2006; 133 (8): 1519-1527.

Dovey, S. L., Valli, H., Hermann, B. P., Sukhwani, M., Donohue, J., Castro, C. A., Orwig, K. E. Eliminating malignant contamination from therapeutic human spermatogonial stem cells. *J Clin Invest.* 2013; 123 (4): 1833-1843.

Ehmcke, J., Simorangkir, D. R., & Schlatt, S. Identification of the starting point for spermatogenesis and characterization of the testicular stem cell in adult male rhesus monkeys. *Hum Reprod.* 2005; 20 (5): 1185-1193.

Ehmcke, J., Wistuba, J., & Schlatt, S. Spermatogonial stem cells: Questions, models and perspectives. *Hum Reprod Update.* 2006; 12 (3): 275-282.

Eildermann, K., Gromoll, J., & Behr, R. Misleading and reliable markers to differentiate between primate testis-derived multipotent stromal cells and spermatogonia in culture. *Hum. Reprod.* 2012; 27: 1754-1767.

Fayomi, A. P., & Orwig, K. E. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem Cell Res.* 2018; 29: 207-214.

Fouquet, J. P., & Dadoune, J. P. Renewal of spermatogonia in the monkey (*macaca fascicularis*). *Biol Reprod.* 1986; 35 (1): 199-207.

Friel, R., van der Sar, S., & Mee, P. J. Embryonic stem cells: Understanding their history, cell biology and signalling. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005; 57 (13): 1894-1903.

Gassei, K., & Orwig, K. E. Sall4 expression in gonocytes and spermatogonial clones of postnatal mouse testes. *PLoS One.* 2013; 8 (1): 53976.

Goertz, M. J., Wu, Z., Gallardo, T. D., Hamra, F. K., & Castrillon, D. H. Foxo1 is required in mouse spermatogonial stem cells for their maintenance and the initiation of spermatogenesis. *J. Clin. Invest.* 2011; 121: 3456-3466.

Goldfarb, M. Functions of fibroblast growth factors in vertebrate development. *Cytokine & growth factor reviews.* 1996; 7 (4): 311-325.

Gupta, G., Maikhuri, J. P., Setty, B. S., & Dhar, J. D. Seasonal variations in daily sperm production rate of rhesus and bonnet monkeys. *Journal of medical primatology.* 2000; 29 (6): 411-414.

Hamra, F. K., Chapman, K. M., Nguyen, D. M., Williams-Stephens, A. A., Hammer, R. E., & Garbers, D. L. Self renewal, expansion, and transfection of rat spermatogonial stem cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102 (48): 17430-17435.

Hara, K., Nakagawa, T., Enomoto, H., Suzuki, M., Yamamoto, M., Simons, B. D., & Yoshida, S. Mouse spermatogenic stem cells continually interconvert between equipotent singly isolated and syncytial states. *Cell Stem Cell.* 2014; 14 (5): 658-672.

Hasegawa, K., & Saga, Y. Fgf8-fgfr1 signaling acts as a niche factor for maintaining undifferentiated spermatogonia in the mouse. *Biol Reprod.* 2014; 91 (6): 145.

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

He, Z., Kokkinaki, M., Jiang, J., Dobrinski, I., & Dym, M. Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia. *Biol Reprod.* 2010; 82 (2): 363-372.

Helsel, A. R., Yang, Q. E., Oatley, M. J., Lord, T., Sablitzky, F., & Oatley, J. M. Id4 levels dictate the stem cell state in mouse spermatogonia. *Development* 2017; 144: 624-634.

Hermann, B. P., Mutoji, K. N., Velte, E. K., Ko, D., Oatley, J. M., Geyer, C. B., & McCarrey, J. R. Transcriptional and translational heterogeneity among neonatal mouse spermatogonia. *Biol Reprod.* 2015; 92 (2): 54.

Hermann, B. P., Sukhwani, M., Hansel, M. C., & Orwig, K. E. Spermatogonial stem cells in higher primates: Are there differences from those in rodents? *Reproduction.* 2010; 139 (3): 479-493.

Hermann, B. P., Sukhwani, M., Lin, C. C., Sheng, Y., Tomko, J., Rodriguez, M., Orwig, K. E. Characterization, cryopreservation, and ablation of spermatogonial stem cells in adult rhesus macaques. *Stem Cells.* 2007; 25 (9): 2330-2338.

Hermann, B. P., Sukhwani, M., Simorangkir, D. R., Chu, T., Plant, T. M., & Orwig, K. E. Molecular dissection of the male germ cell lineage identifies putative spermatogonial stem cells in rhesus macaques. *Hum Reprod.* 2009; 24 (7): 1704-1716.

Hermann, B. P., Sukhwani, M., Winkler, F., Pascarella, J. N., Peters, K. A., Sheng, Y., Orwig, K. E. Spermatogonial stem cell transplantation into rhesus testes regenerates spermatogenesis producing functional sperm. *Cell Stem Cell.* 2012; 11 (5): 715-726.

Herrid, M. O., J. Jackson, M. Suchowerska, N. Stockwell, S. Davey, R. Hutton, K. Hope, S. Hill, J. R. Irradiation enhances the efficiency of testicular germ cell transplantation in sheep. *Biol Reprod.* 2009; 81 (5): 898-905.

Hewitt M. (2003). Childhood cancer survivorship. In S. JV (Ed.), *Improving care and quality of life*. Washington, DC: National Academies Press.

Hobbs, R. M., Fagoonee, S., Papa, A., Webster, K., Altruda, F., Nishinakamura, R., Chai, L., Pandolfi, P.P., Functional antagonism between sall4 and plzf defines germline progenitors. *Cell Stem Cell.* 2012; 10: 284-298.

Hofmann, M. C., Braydich-Stolle, L., & Dym, M. Isolation of male germ-line stem cells; influence of gdnf. *Developmental biology*. 2005; 279 (1): 114-124.

Holleman, T., Schuh, R., Pieler, T., & Stick, R. *Xenopus xsal-1*, a vertebrate homolog of the region specific homeotic gene *spalt* of *drosophila*. *Mechanisms of development*. 1996; 55 (1): 19-32.

Honaramooz, A., Behboodi, E., Megee, S. O., Overton, S. A., Galantino-Homer, H., Echelard, Y., & Dobrinski, I. Fertility and germline transmission of donor haplotype following germ cell transplantation in immunocompetent goats. *Biology of reproduction*. 2003; 69 (4): 1260-1264.

Hooman Sadri-Ardekani, M., Mohammad A. Akhondi, P., Fulco van der Veen, M., PhD;, Sjoerd Repping, P., & Ans M. M. van Pelt, P. In vitro propagation of human prepubertal spermatogonial stem cells. *JAMA*. 2011; 305 (23): 2416-2418.

Ishii, K., Kanatsu-Shinohara, M., Toyokuni, S., & Shinohara, T. Fgf2 mediates mouse spermatogonial stem cell self-renewal via upregulation of *etv5* and *bcl6b* through *map2k1* activation. *Development*. 2012; 139 (10): 1734-1743.

Izadyar, F., Wong, J., Maki, C., Pacchiarotti, J., Ramos, T., Howerton, K., Copperman, A. Identification and characterization of repopulating spermatogonial stem cells from the adult human testis. *Hum Reprod*. 2011; 26 (6): 1296-1306.

Jaillard, C., Chatelain, P. G., & Saez, J. M. In vitro regulation of pig sertoli cell growth and function: Effects of fibroblast growth factor and somatomedin-c. *Biology of reproduction*. 1987; 37 (3): 665-674.

Kanatsu-Shinohara, M., Miki, H., Inoue, K., Ogonuki, N., Toyokuni, S., Ogura, A., & Shinohara, T. Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum-or feeder-free conditions. *Biol Reprod*. 2005; 72 (4): 985-991.

Kanatsu-Shinohara, M., Mori, Y., & Shinohara, T. Enrichment of mouse spermatogonial stem cells based on aldehyde dehydrogenase activity. *Biol Reprod*. 2013; 89 (6): 140.

Kanatsu-Shinohara, M., Muneto, T., Lee, J., Takenaka, M., Chuma, S., Nakatsuji, N., Shinohara, T. Long-term culture of male germline stem cells from hamster testes. *Biol Reprod.* 2008; 78 (4): 611-617.

Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Matoba, S., Morimoto, H., Ogura, A., & Shinohara, T. Improved serum- and feeder-free culture of mouse germline stem cells. *Biol Reprod.* 2014; 91 (4): 88.

Kanatsu-Shinohara, M., Toyokuni, S., Morimoto, T., Matsui, S., Honjo, T., & Shinohara, T. Functional assessment of self-renewal activity of male germline stem cells following cytotoxic damage and serial transplantation. *Biology of reproduction.* 2003; 68 (5): 1801-1807.

Kazuki, Y., Schulz, T. C., Shinohara, T., Kadota, M., Nishigaki, R., Inoue, T., Oshimura, M. A new mouse model for down syndrome. *J Neural Transm Suppl.* 2003; (67): 1-20.

Kim, Y., Turner, D., Nelson, J., Dobrinski, I., McEntee, M., & Travis, A. J. Production of donor-derived sperm after spermatogonial stem cell transplantation in the dog. *Reproduction.* 2008; 136 (6): 823-831.

Kliesch, S., Behre, H. M., Jurgens, H., & Nieschlag, E. Cryopreservation of semen from adolescent patients with malignancies. *Medical and pediatric oncology.* 1996; 26 (1): 20-27.

Kluin, P. M., Kramer, M. F., & de Rooij, D. G. Testicular development in macaca irus after birth. *Int J Androl.* 1983; 6 (1): 25-43.

Kohlhase, J., Schuh, R., Dowe, G., Kuhnlein, R. P., Jackle, H., Schroeder, B., Stick, R. Isolation, characterization, and organ-specific expression of two novel human zinc finger genes related to the drosophila gene spalt. *Genomics.* 1996; 38 (3): 291-298.

Kokkinaki, M., Djourabchi, A., & Golestaneh, N. Long-term culture of human ssea-4 positive spermatogonial stem cells (sscs). *J Stem Cell Res Ther.* 2011; 2 (2).



Komai, Y., Tanaka, T., Tokuyama, Y., Yanai, H., Ohe, S., Omachi, T., Ueno, H. Bmi1 expression in long-term germ stem cells. *Sci Rep.* 2014; 4: 6175.

Komeya, M. K., H. Nakamura, H. Yokonishi, T. Sato, T. Kojima, K. Hayashi, K. Katagiri, K. Yamanaka, H. Sanjo, H. Yao, M. Kamimura, S. Inoue, K. Ogonuki, N. Ogura, A. Fujii, T. Ogawa, T. Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device. *Sci Rep.* 2016; 6: 21472.

Kossack, N., Terwort, N., Wistuba, J., Ehmcke, J., Schlatt, S., Scholer, H., Gromoll, J. A combined approach facilitates the reliable detection of human spermatogonia in vitro. *Hum Reprod.* 2013; 28 (11): 3012-3025.

Kristensen, D. M., Nielsen, J. E., Skakkebaek, N. E., Graem, N., Jacobsen, G. K., Rajpert-De Meyts, E., & Leffers, H. Presumed pluripotency markers *utf-1* and *rex-1* are expressed in human adult testes and germ cell neoplasms. *Hum Reprod.* 2008; 23 (4): 775-782.

Kubota, H., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2003; 100 (11): 6487-6492.

Kubota, H., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biol Reprod.* 2004a; 71 (3): 722-731.

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

Kuhnlein, R. P., Frommer, G., Friedrich, M., Gonzalez-Gaitan, M., Weber, A., Wagner-Bernholz, J. F., Schuh, R. Spalt encodes an evolutionarily conserved zinc finger protein of novel structure which provides homeotic gene function in the head and tail region of the drosophila embryo. *EMBO J.* 1994; 13 (1): 168-179.

Kuijk, E. W., Colenbrander, B., & Roelen, B. A. The effects of growth factors on in vitro-cultured porcine testicular cells. *Reproduction*. 2009; 138 (4): 721-731.

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

Lim, J., Goriely, A., Turner, G. D., Ewen, K. A., Jacobsen, G. K., Graem, N., Rajpert-De Meyts, E. Oct2, ssx and sage1 reveal the phenotypic heterogeneity of spermatocytic seminoma reflecting distinct subpopulations of spermatogonia. *J Pathol*. 2011; 224 (4): 473-483.

Lolicato, F., Marino, R., Paronetto, M. P., Pellegrini, M., Dolci, S., Geremia, R., & Grimaldi, P. Potential role of nanos3 in maintaining the undifferentiated spermatogonia population. *Developmental biology*. 2008; 313 (2): 725-738.

Lord, T., & Oatley, J. M. A revised asingle model to explain stem cell dynamics in the mouse male germline. *Reproduction* 2017; 154: 55-64.

Lu, N., Sargent, K. M., Clopton, D. T., Pohlmeier, W. E., Brauer, V. M., McFee, R. M., Cupp, A. S. Loss of vascular endothelial growth factor a (vegfa) isoforms in the testes of male mice causes subfertility, reduces sperm numbers, and alters expression of genes that regulate undifferentiated spermatogonia. *Endocrinology*. 2013; 154 (12): 4790-4802.

Mayerhofer, A., Russell, L. D., Grothe, C., Rudolf, M., & Gratzl, M. Presence and localization of a 30-kda basic fibroblast growth factor-like protein in rodent testes. *Endocrinology*. 1991; 129 (2): 921-924.

Meng, X., Lindahl, M., Hyvonen, M.E., Parvinen, M., de Rooij, D.G., Hess, M.W., Raatikainen-Ahokas, A., Sainio, K., Rauvala, H., Lakso, M., Pichel, J.G., Westphal, H., Saarma, M., Sariola, H., Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by gdnf. *Science*. 2000; 287: 1489-1493.

Mikkola, M., Sironen, A., Kopp, C., Taponen, J., Sukura, A., Vilkki, J., Andersson, M. Transplantation of normal boar testicular cells resulted in complete focal spermatogenesis in a boar affected by the immotile short-tail sperm defect. *Reprod Domest Anim.* 2006; 41 (2): 124-128.

Mirzapour, T., Movahedin, M., Tengku Ibrahim, T. A., Koruji, M., Haron, A. W., Nowroozi, M. R., & Rafieian, S. H. Effects of basic fibroblast growth factor and leukaemia inhibitory factor on proliferation and short-term culture of human spermatogonial stem cells. *Andrologia.* 2012; 44 Suppl 1: 41-55.

Murozono, Y., Yufu, K., Takahashi, N., Okada, N., Shinohara, T., Nakagawa, M., Saikawa, T. Combined assessment of baroreflex sensitivity with iodine 123 metaiodobenzylguanidine scintigraphic findings strengthens the power of predictive value for cerebral and cardiovascular events in type 2 diabetic patients. *Circ J.* 2013; 77 (1): 130-136.

Nagano, M., Brinster, C. J., Orwig, K. E., Ryu, B. Y., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ-line stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2001; 98 (23): 13090-13095.

Nagano, M., Patrizio, P., & Brinster, R. L. Long-term survival of human spermatogonial stem cells in mouse testes. *Fertility and sterility.* 2002; 78 (6): 1225-1233.

Nagano, M., Ryu, B. Y., Brinster, C. J., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. *Biol Reprod.* 2003; 68 (6): 2207-2214.

Nakagawa, T., Nabeshima, Y., & Yoshida, S. Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Dev Cell.* 2007; 12 (2): 195-206.

Nakagawa, T., Sharma, M., Nabeshima, Y., Braun, R. E., & Yoshida, S. Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenic stem cell compartment. *Science.* 2010; 328 (5974): 62-67.

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

Nef, S., Schaad, O., Stallings, N. R., Cederroth, C. R., Pitetti, J. L., Schaer, G., Vassalli, J. D. Gene expression during sex determination reveals a robust female genetic program at the onset of ovarian development. *Dev Biol*. 2005; 287 (2): 361-377.

Oatley, J. M., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. Glial cell line-derived neurotrophic factor regulation of genes essential for self-renewal of mouse spermatogonial stem cells is dependent on src family kinase signaling. *J Biol Chem*. 2007; 282 (35): 25842-25851.

Oatley, J. M., Avarbock, M. R., Telaranta, A. I., Fearon, D. T., & Brinster, R. L. Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006; 103 (25): 9524-9529.

Oatley, J. M., & Brinster, R. L. Spermatogonial stem cells. *Methods Enzymol*. 2006; 419: 259-282.

Oatley, J. M., Oatley, M. J., Avarbock, M. R., Tobias, J. W., & Brinster, R. L. Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Development*. 2009; 136 (7): 1191-1199.

Oatley, M. J., Kaucher, A. V., Racicot, K. E., & Oatley, J. M. Inhibitor of DNA binding 4 is expressed selectively by single spermatogonia in the male germline and regulates the self-renewal of spermatogonial stem cells in mice. *Biol Reprod*. 2011; 85 (2): 347-356.

Ogawa, T., Dobrinski, I., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. *Nature medicine*. 2000; 6 (1): 29-34.

Ohmura, M., Yoshida, S., Ide, Y., Nagamatsu, G., Suda, T., & Ohbo, K. Spatial analysis of germ stem cell development in oct-4/egfp transgenic mice. *Archives of histology and cytology*. 2004; 67 (4): 285-296.

Oshikiri, T., Miyamoto, M., Shichinohe, T., Suzuoki, M., Hiraoka, K., Nakakubo, Y., Katoh, H. Prognostic value of intratumoral cd8+ t lymphocyte in extrahepatic bile duct carcinoma as essential immune response. *J Surg Oncol*. 2003; 84 (4): 224-228.

Ott, T., Kaestner, K. H., Monaghan, A. P., & Schutz, G. The mouse homolog of the region specific homeotic gene spalt of drosophila is expressed in the developing nervous system and in mesoderm-derived structures. *Mechanisms of development*. 1996; 56 (1-2): 117-128.

Paniagua, R., & Nistal, M. Morphological and histometric study of human spermatogonia from birth to the onset of puberty. *J Anat*. 1984; 139 ( Pt 3): 535-552.

Phillips, B. T., Gassei, K., & Orwig, K. E. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2010; 365 (1546): 1663-1678.

Ryu, B. Y., Kubota, H., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102 (40): 14302-14307.

Ryu, B. Y., Orwig, K. E., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. Stem cell and niche development in the postnatal rat testis. *Developmental biology*. 2003; 263 (2): 253-263.

Ryu, B. Y., Orwig, K. E., Kubota, H., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. Phenotypic and functional characteristics of spermatogonial stem cells in rats. *Dev Biol*. 2004; 274 (1): 158-170.

Sachs, C., Robinson, B. D., Andres Martin, L., Webster, T., Gilbert, M., Lo, H. Y., Seandel, M. Evaluation of candidate spermatogonial markers id4 and gpr125 in testes of adult human cadaveric organ donors. *Andrology*. 2014; 2 (4): 607-614.

Sadri-Ardekani, H., Akhondi, M. A., van der Veen, F., Repping, S., & van Pelt, A. M. In vitro propagation of human prepubertal spermatogonial stem cells. *Jama*. 2011; 305 (23): 2416-2418.

Sadri-Ardekani, H., Mizrak, S. C., van Daalen, S. K., Korver, C. M., Roepers-Gajadien, H. L., Koruji, M., van Pelt, A. M. Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro. *JAMA*. 2009; 302 (19): 2127-2134.

Sariola, H., & Saarma, M. Novel functions and signalling pathways for gdnf. *Journal of cell science*. 2003; 116 (Pt 19): 3855-3862.

Sato, T., Katagiri, K., Gohbara, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Ogura, A., Ogawa, T. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature*. 2011; 471 (7339): 504-507.

Sato, T., Sakuma, T., Yokonishi, T., Katagiri, K., Kamimura, S., Ogonuki, N., Ogawa, T. Genome editing in mouse spermatogonial stem cell lines using talen and double-nicking crispr/cas9. *Stem Cell Reports*. 2015; 5 (1): 75-82.

Sato, T., Yokonishi, T., Komeya, M., Katagiri, K., Kubota, Y., Matoba, S., Ogawa, T. Testis tissue explantation cures spermatogenic failure in c-kit ligand mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109 (42): 16934-16938.

Schlatt, S., & Weinbauer, G. F. Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen as a tool to study cell proliferation in rodent and primate testes. *Int J Androl*. 1994; 17 (4): 214-222.

Schulze, W. Light and electron microscope studies of the morphology of a spermatogonia in men with normal spermatogenesis and in patients treated with antiandrogens. *Andrologia*. 1978; 10 (4): 307-320.

Seandel, M., Falciatori, I., Shmelkov, S. V., Kim, J., James, D., & Rafii, S. Niche players: Spermatogonial progenitors marked by gpr125. *Cell Cycle*. 2008; 7 (2): 135-140.

Seandel, M., James, D., Shmelkov, S. V., Falciatori, I., Kim, J., Chavala, S., Rafii, S. Generation of functional multipotent adult stem cells from gpr125+ germline progenitors. *Nature*. 2007; 449 (7160): 346-350.

Shinohara, T., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. Beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999; 96 (10): 5504-5509.

Shinohara, T., Orwig, K. E., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. Remodeling of the postnatal mouse testis is accompanied by dramatic changes in stem cell number and niche accessibility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98 (11): 6186-6191.

Simorangkir, D. R., Marshall, G. R., & Plant, T. M. A re-examination of proliferation and differentiation of type a spermatogonia in the adult rhesus monkey (*macaca mulatta*). *Hum Reprod*. 2009; 24 (7): 1596-1604.

Smith, J. F., Yango, P., Altman, E., Choudhry, S., Poelzl, A., Zamah, A. M., Tran, N. D. Testicular niche required for human spermatogonial stem cell expansion. *Stem Cells Transl Med*. 2014; 3 (9): 1043-1054.

Suzuki, H., Sada, A., Yoshida, S., & Saga, Y. The heterogeneity of spermatogonia is revealed by their topology and expression of marker proteins including the germ cell-specific proteins nanos2 and nanos3. *Dev Biol*. 2009; 336 (2): 222-231.

Sweetman, D., Smith, T., Farrell, E. R., Chantry, A., & Munsterberg, A. The conserved glutamine-rich region of chick csal1 and csal3 mediates protein interactions with other spalt family members. Implications for townes-brocks syndrome. *The Journal of biological chemistry*. 2003; 278 (8): 6560-6566.

Takashima, S., & Shinohara, T. Culture and transplantation of spermatogonial stem cells. *Stem Cell Res*. 2018; 29: 46-55.

Tegelenbosch, R. A., & de Rooij, D. G. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the c3h/101 f1 hybrid mouse. *Mutat Res*. 1993; 290 (2): 193-200.

Thayer, K. A., Ruhlen, R. L., Howdeshell, K. L., Buchanan, D. L., Cooke, P. S., Preziosi, D., vom Saal, F. S. Altered prostate growth and daily sperm production in male mice exposed prenatally to subclinical doses of 17 $\alpha$ -ethinyl oestradiol. *Hum Reprod.* 2001; 16 (5): 988-996.

Tokuda, M., Kadokawa, Y., Kurahashi, H., & Marunouchi, T. Cdh1 is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testes. *Biol Reprod.* 2007a; 76 (1): 130-141.

Tokuda, M., Kadokawa, Y., Kurahashi, H., & Marunouchi, T. Cdh1 is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testes. . *Biol. Reprod.* 2007b; 76: 130-141.

Toyoda, S., Miyazaki, T., Miyazaki, S., Yoshimura, T., Yamamoto, M., Tashiro, F., Miyazaki, J. Sohlh2 affects differentiation of kit positive oocytes and spermatogonia. *Dev Biol.* 2009; 325 (1): 238-248.

Tsuda, M., Sasaoka, Y., Kiso, M., Abe, K., Haraguchi, S., Kobayashi, S., & Saga, Y. Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science.* 2003; 301 (5637): 1239-1241.

Valcarce, D. G., Carton-Garcia, F., Riesco, M. F., Herraez, M. P., & Robles, V. Analysis of DNA damage after human sperm cryopreservation in genes crucial for fertilization and early embryo development. *Andrology.* 2013; 1 (5): 723-730.

Valli, H., Sukhwani, M., Dovey, S. L., Peters, K. A., Donohue, J., Castro, C. A., Orwig, K. E. Fluorescence- and magnetic-activated cell sorting strategies to isolate and enrich human spermatogonial stem cells. *Fertil Steril.* 2014; 102 (2): 566-580 e567.

Valli H., Phillips, B. T., Gassei K., Nagano MC., & KE., O. (2015). Spermatogonial stem cells and spermatogenesis. In I. Z. A. P. TM (Ed.), *Knobil and neill's physiology of reproduction.* (Vol. 1, pp. 295-635). San Diego: Elsevier.

van Alphen, M. M., van de Kant, H. J., & de Rooij, D. G. Depletion of the spermatogonia from the seminiferous epithelium of the rhesus monkey after x irradiation. *Radiat Res.* 1988a; 113 (3): 473-486.



van Alphen, M. M., van de Kant, H. J., & de Rooij, D. G. Repopulation of the seminiferous epithelium of the rhesus monkey after x irradiation. *Radiation research*. 1988b; 113 (3): 487-500.

van Bragt, M. P., Roepers-Gajadien, H.L., Korver, C.M., Bogerd, J., Okuda, A., Eggen, B.J., de Rooij, D.G., van Pelt, A.M. Expression of the pluripotency marker *Utf1* is restricted to a subpopulation of early spermatogonia in rat testis. *Reproduction*. 2008; 136: 33-40.

Van Dissel-Emiliani, F. M., De Boer-Brouwer, M., & De Rooij, D. G. Effect of fibroblast growth factor-2 on sertoli cells and gonocytes in coculture during the perinatal period. *Endocrinology*. 1996; 137 (2): 647-654.

von Kopylow, K., Kirchhoff, C., Jezek, D., Schulze, W., Feig, C., Primig, M., Spiess, A. N. Screening for biomarkers of spermatogonia within the human testis: A whole genome approach. *Hum Reprod*. 2010; 25 (5): 1104-1112.

von Kopylow, K., & Spiess, A. N. Human spermatogonial markers. *Stem Cell Res*. 2017; 25: 300-309.

von Kopylow, K., Staeger, H., Spiess, A. N., Schulze, W., Will, H., Primig, M., & Kirchhoff, C. Differential marker protein expression specifies rarefaction zone-containing human spermatogonia. *Reproduction*. 2012; 143 (1): 45-57.

Wu, X., Schmidt, J. A., Avarbock, M. R., Tobias, J. W., Carlson, C. A., Kolon, T. F., Brinster, R. L. Prepubertal human spermatogonia and mouse gonocytes share conserved gene expression of germline stem cell regulatory molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106 (51): 21672-21677.

Wu, Y., Zhou, H., Fan, X., Zhang, Y., Zhang, M., Wang, Y., Li, J. Correction of a genetic disease by crispr-cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells. *Cell Res*. 2015; 25 (1): 67-79.

Yang, H., Wang, H., Shivalila, C. S., Cheng, A. W., Shi, L., & Jaenisch, R. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by crispr/cas-mediated genome engineering. *Cell*. 2013; 154 (6): 1370-1379.

Yeh, J. R., Zhang, X., & Nagano, M. C. Wnt5a is a cell-extrinsic factor that supports self-renewal of mouse spermatogonial stem cells. *J Cell Sci*. 2011; 124 (Pt 14): 2357-2366.

Yokonishi, T. S., T. Komeya, M. Katagiri, K. Kubota, Y. Nakabayashi, K. Hata, K. Inoue, K. Ogonuki, N. Ogura, A. Ogawa, T. Offspring production with sperm grown in vitro from cryopreserved testis tissues. *Nat Commun*. 2014; 5: 4320.

Yoshida, S., Sukeno, M., Nakagawa, T., Ohbo, K., Nagamatsu, G., Suda, T., & Nabeshima, Y. The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. *Development*. 2006; 133 (8): 1495-1505.

Yoshida, S., Takakura, A., Ohbo, K., Abe, K., Wakabayashi, J., Yamamoto, M., Nabeshima, Y. Neurogenin3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis. *Dev Biol*. 2004; 269 (2): 447-458.

Zheng, K., Wu, X., Kaestner, K. H., & Wang, P. J. The pluripotency factor lin28 marks undifferentiated spermatogonia in mouse. *BMC Dev Biol*. 2009; 9: 38.

Zohni, K., Zhang, X., Tan, S. L., Chan, P., & Nagano, M. Cd9 is expressed on human male germ cells that have a long-term repopulation potential after transplantation into mouse testes. *Biology of reproduction*. 2012; 87 (2): 27.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Pınar	<b>Uyruğu</b>	T.C.
<b>Soyadı</b>	ŞAHİN	<b>Tel no</b>	05375114713
<b>Doğum tarihi</b>	11.05.1985	<b>e-posta</b>	psahin@akdeniz.edu.tr

### Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı	
<b>Lise</b>	Devrek Anadolu Lisesi	2003
<b>Lisans</b>	Akdeniz Üniversitesi	2008
<b>Yüksek Lisans</b>	Akdeniz Üniversitesi	2009
<b>Doktora</b>	Akdeniz Üniversitesi	2018

### İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
<b>Araştırma Görevlisi</b>	Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2013-2018

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
<b>İngilizce</b>	ÜDS	75

### Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Sıçan torasik aortunda endotelin 1 ET 1 ile indüklenen endotel disfonksiyonunda poli ADP riboz polimeraz PARP yolağının rolünün fonksiyonel ve yapısal olarak incelenmesi,	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) Proje no: 2010.04.0103.012	2010-2011
Poli adp riboz polimeraz parp inhibisyonunun varikösel ile indüklenen testiküler hasar ve infertiliteye etkisi,	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) Proje No: 2010.04.0103.006	2010-2012

Rapamisin uygulamasının fare spermatogenez hücrelere etkisi	TÜBİTAK 1002 Projesi, Proje no: 110S309	2011-2012
Alopesi areata hastalarında difenilsiklopropenon (DCP) ile kontakt immünoterapi tedavisi ve bu tedavinin IL-17 protein düzeylerine etkisi,	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) Proje No: 2013.04.0103.012	2013-2015
Supraspinatus Onarımı Sırasındaki Gerilimin ve Kronisitenin Akt/mTOR Yolağı Üzerine Etkisi	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) Proje No: 2013.01.0103.013	2013-2017
Primer Sikatrisyel Alopesilerde, Kıl Folikülünde Kök Hücre Belirteçlerinin (CK15, CD34, Nestin ve CD200) ve mTOR Sinyal Yolağı Proteinlerinin Ekspresyonları	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) Proje No: 2012.12.0103.001	2012-2016
Fare Postnatal Testis Gelişim Sürecinde ve Erişkinde In Vivo Rapamisin Uygulamasının Spermatogenez ve Fertilite Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi,	Tübitak 1002 Projesi Proje No: 113S490	2013-2014
İnsan Spermatogonyal Kök Hücrelerinin Devamlılığının ve Ekspansiyonunun İn Vitro Koşullarda Sağlanması	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) Proje No: TDK-2016-1078	2015-2018
Doksorubisin ile indüklenen	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi	2014-2016

seminifer tübül hasarının spektroskopik ve görsel görüntüleme yöntemleriyle değerlendirilmesi,	(BAP) Proje No: 2014.01.0103.005	
Kompozit doku nakillerinde alıcı ve verici dokularındaki yaşlanma sürecinin değerlendirilmesi	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) Proje No: TSA-2018-3334	2018-

### **Burslar-dller:**

- 1- En İyi Bildiri dl, Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği, 2012
- 2- En İyi Poster dl, Turkish Society of Reproductive Medicine, 2012
- 3- Seyahat dl, American Society of Andrology, Amerika Birleşik Devletleri, 2014
- 4- Genç Araştırmacı Seyahat dl, IFPA (International Federation of Placenta Associations), Fransa, 2014
- 5- 2214-A TBTAK-BDEB Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Bursu, Temmuz 2015.

### **Yayınlar ve Bildiriler:**

#### **Uluslararası Yayınlar:**

- 1- Dicle zlem, elik-zenci iler, **şahin Pınar**, Pfannes Eva Katharina Barbosa, Vogt Annika, Altınok Berna Nazlım, Blume-Peytavi Ulrike. Differential expression of mTOR signaling pathway proteins in lichen planopilaris and frontal fibrosing alopecia. **Acta Histochemica, 2018**, (Basım aşamasında).
- 2- Ercan Kelek Sevim, **şahin Pınar**, Kencebay Manas Ceren, Derin Narin, elik Özenci iler Evaluation of mTOR signaling pathway proteins in rat gastric mucosa exposed to sulfite and ghrelin. **Turkish Journal of Gastroenterology, 2018**, 90-96., Doi: 10.5152/tjg.2017.17294 (Yayın No: 4177733)
- 3- Dicle zlem, elik zenci iler, **şahin Pınar**, Altınok Berna Nazlım, iftioğlu

Mehmet Akif, Expressions of CK15, CD34, Nestin and CD200 in Lichen Planopilaris. **Turkish Journal of Dermatology / Türk Dermatoloji Dergisi**, 2017, 11(2), 70-74., Doi: 10.4274/tdd.3225 (Yayın No: 3997526)

4- Çelik Özenci Çiler, Kuşcu Nilay, Ordueri Nazlı Ece, Taşatargil Arda, **Şahin Pınar**, Durmuş Haney, Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase may have preventive potential for varicocoele-associated testicular damage in rats. **Andrology**, 2017, 5(2), 362-369., Doi: 10.1111/andr.12305 (Yayın No: 4021488)

5- Yaba Uçar Aylin, Ordueri Nazlı Ece, Tanrıöver Gamze, **Şahin Pınar**, Demir Necdet, Çelik Özenci Çiler Expression of CCM2 and CCM3 during mouse gonadogenesis. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, 2015, 32(10), 1497-1507., Doi: 10.1007/s10815-015-0559-2 (Yayın No: 4188818)

6- **Şahin Pınar**, Şahin Zeliha, Güngör Ordueri Nazlı Ece, Dönmez Barış Özgür, Çelik Özenci Çiler Inhibition of mammalian target of rapamycin signaling pathway decreases retinoic acid stimulated gene 8 expression in adult mouse testis. **Fertility and Sterility**, 2014, 102(5), 1482- 14903., Doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.08.004 (Yayın No: 3303796)

7- Taşatargil Selvinaz, **Şahin Pınar**, Taşatargil Arda, Çelik Özenci Çiler, Pravastatin improves the impaired nitric oxide mediated neurogenic and endothelium dependent relaxation of corpus cavernosum in aged rats. **The Aging Male**, 2014, 17(4), 259-266., Doi: 10.3109/13685538.2013.832194 (Yayın No: 3319448).

8- Yılmaz Bedriinam, **Şahin Pınar**, Ordueri Nazlı Ece, Çelik Özenci Çiler, Taşatargil Arda Poly (ADP-ribose) polymerase inhibition improves endothelin-1-induced endothelial dysfunction in rat thoracic aorta. **Upsala Journal of Medical Sciences**, 2014, 215-222., Doi: 10.3109/03009734.2014.908253 (Yayın No: 4212681).

9- Ordueri Nazlı Ece, Şahin Zeliha, **Şahin Pınar**, Çelik Özenci Çiler, The expression pattern of PARP-1 and PARP-2 in the developing and adult mouse testis. **Acta Histochemica**, 2014, 116(5), 958-964., Doi: 10.1016/j.acthis.2014.03.010 (Yayın No: 4188838)

**10-** Ercan Kelek Sevim, Başaranlar Göksun, Güngör Ordueri Nazlı Ece, Kencebay Manas Ceren, **Şahin Pınar**, Çelik Özenci Çiler, Derin Narin, Ghrelin inhibits sodium metabisulfite induced oxidative stress and apoptosis in rat gastric mucosa. **Food and Chemical Toxicology**, **2013**, 56, 154-161., Doi: 10.1016/j.fct.2013.02.019 (Yayın No: 3304608)

**11-** Taşatargil Selvinaz, **Şahin Pınar**, Güngör Ordueri Nazlı Ece, Çelik Özenci Çiler, Taşatargil Arda, Potential Role of Poly ADP Ribose Polymerase PARP Activation in Methotrexate Induced Nephrotoxicity and Tubular Apoptosis. **International Journal of Toxicology**, **2012**, 31(5), 430-440., Doi: 10.1177/1091581812457430 (Yayın No: 3305110)

#### **Ulusal Yayınlar:**

**1-** **Şahin Pınar**, Çelik Özenci Çiler, Rapamisin ve Erkek Fertilitesi: Literatürdeki yeni bulgulara kısa bir bakış. *Androloji Bülteni*, 2013 (Derleme Makale) (Yayın No: 4213344)

#### **Uluslararası Bildiriler:**

**1-** Adıgüzel Dileyra, Gürsoy Merve, Çelik Soner, **Şahin Pınar**, Çelik Özenci Çiler. Expression of circadian clock proteins during peri-implantation period in mice. 15th **International Congress of Histochemistry and Cytochemistry**, **2017**, (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4025908)

**2-** Adıgüzel Dileyra, **Şahin Pınar**, Özkavukcu İskender Sinan, Çelik Özenci Çiler Distinct spatiotemporal expression of FoxO1 in periimplantation mouse uterus and reduced embryo implantation after its functional blockage. **ASRM**, **2017**, (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:3769602)

**3-** Altınok Berna Nazlım, Dicle Özlem, Demir Dora Devrim, **Şahin Pınar**, Çelik Özenci Çiler, Diphenylcyclopropenone immunotherapy and Il-17 levels in patients with alopecia areata. **26. EADV Congress**, **2017**, (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:3997703)

**4-** Dicle Özlem, Çelik Özenci Çiler, **Şahin Pınar**, Phannes Eva Katherina Barbosa,

Vogt Annika, Altınok Berna Nazlım, Blume Peytavi Ulrike, Differential expression of mTOR signaling pathway proteins in lichen planopilaris and frontal fibrosing alopecia. **15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 2017**, (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:3998046)

**5-** Satı Güler Leyla, Soygür Gül Bikem, **Şahin Pınar**, Çelik Özenci Çiler, Demir Ramazan, Expression of mTOR and downstream target components in normal and gestational diabetic human term placenta. **IFPA EPG, 2014**, (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4213782)

**6-** **Şahin Pınar**, Şahin Zeliha, Ordueri Nazlı Ece, Çelik Özenci Çiler, Inhibition of mTOR signaling decreases stra8 expression in adult mouse testis. **ASA 39th annual conference, 2014**, (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4213770)

**7-** **Şahin Pınar**, Ordueri Nazlı Ece, Çelik Özenci Çiler, Taşatargil Arda, The Role of Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) Pathway on Endothelin-1 (ET-1)- Induced Endothelial Dysfunction in Rat Thoracic Aorta. **11th EACPT Congress, 2013**, (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4193910)

#### **Ulusal Bildiriler:**

**1-** **Şahin Pınar**, Sukhwani Meena, Çelik Özenci Çiler, Orwig Kyle, İnsan spermatogonyal kök hücrelerinin kollajen ile zenginleştirilmesi ve THY1 testiküler hücreler ile kültüre edilmesi in vitro hayatta kalma kapasitelerini artırır. **14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 2018**, (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:4291919)

**2-** Taşatargil Selvinaz, **Şahin Pınar**, Taşatargil Arda, Çelik Özenci Çiler, Chronic Treatment with Pravastatin Improves the Impaired Nitric Oxide-Mediated Neurogenic and Endothelium- Dependent Relaxation of Corpus Cavernosum in Aged Rats. **11th EACPT Congress, 2013**, (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4193912)

**3-** **Şahin Pınar**, Ordueri Nazlı Ece, Çelik Özenci Çiler, Postnatal Fare Ovaryum Gelişiminde Apoptoz İndükleyici Faktör (AIF) Ekspresyonunun Değerlendirilmesi. **21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 2013**, (Özet Bildiri/Poster) (Yayın



No:4193810)

**4** Çelik Özenci Çiler, Ordueri Nazlı Ece, Sırcan Küçüksayan Aslınur, **Şahin Pınar**, Canpolat Murat, Normal ve Germ Hücre Hasarı Olan Sıçan Seminifer Tübüllerinin Görüntüleme ve Spektroskopik Yöntemlerle İn Vivo ve Gerçek Zamanlı Değerlendirilmesi: TESE İçin Yeni Bir Yaklaşımın Ön Bulguları. **5. Ulusal Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite Kongresi, 2012**, (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:4193833)

**5** Çelik Özenci Çiler, Kuşcu Nilay, Ordueri Nazlı Ece, **Şahin Pınar**, Taşatargil Arda Doksorubisin uygulanan PARP-1 geni silinmiş farelerde FOXO transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonları spermatogenez sürecinde değişiklik gösterir. **IV. Üreme Tıbbi Derneği Kongresi, 2012**, (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:4193794)

**6** **Şahin Pınar**, Şahin Zeliha, Ordueri Nazlı Ece, Kuşcu Nilay, Çelik Özenci Çiler, Rapamisin Uygulamasının Fare Spermatogenik Hücrelere Etkisinin Seminifer Tübül Kültüründe Gösterilmesi. **XI. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 2012**, (Uluslararası Katılımlı) (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:4193846)

**7** Ordueri Nazlı Ece, **Şahin Pınar**, Kuşcu Nilay, Çelik Özenci Çiler Postnatal Fare Testis Gelişiminde Caspase-Bağımlı ve Caspase -Bağımsız Apoptozun Değerlendirilmesi. **XI. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 2012**, (Uluslararası Katılımlı) (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4193842)

**8** Kuşcu Nilay, **Şahin Pınar**, Ordueri Nazlı Ece, Taşatargil Arda, Çelik Özenci Çiler, Doksorubisin ile indüklenen testiküler hasarda SIRT1, p53 ve p21 ekspresyonlarının değerlendirilmesi. **XI. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 2012**, (Uluslararası Katılımlı) (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4193835)

**9** Kuşcu Nilay, **Şahin Pınar**, Ordueri Nazlı Ece, Çelik Özenci Çiler Fare Testis Gelişim Sürecinde mTOR Sinyal Yolağı Proteinlerinin Ekspresyonları. **20. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 2011**, (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4193881)

**10** Ordueri Nazlı Ece, **Şahin Pınar**, Kuşcu Nilay, Çelik Özenci Çiler. Fetal ve Postnatal Fare Testisinde Testiküler Kordon Oluşumunun Ultrastrüktürel Analizi. **20.**

**Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 2011,** (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4193887)

**11-** Çelik Özenci Çiler, Ordueri Nazlı Ece, Yaba Uçar Aylin, Tanrıöver Gamze, **Şahin Pınar**, Demir Necdet, Fare postnatal ovaryum ve testis gelişim sürecinde CCM2 ve CCM3 ekspresyonları. **20. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 2011,** (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4193876)

**12-** **Şahin Pınar**, Ordueri Nazlı Ece, Kuşcu Nilay, Çelik Özenci Çiler, Doksorubisin ile İndüklenen Testiküler Hasarda Germ Hücre Proliferasyonu ve Seminifer Epitelin Ultrastrüktürel Değerlendirilmesi. **20. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 2011,** (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4193872)

**13-** Taşatargil Selvinaz, **Şahin Pınar**, Çelik Özenci Çiler, Taşatargil Arda, Metotreksatın Neden Olduğu Nefrotoksisitede Poli (ADP-Riboz) Polimeraz Yolağının Rolünün Değerlendirilmesi. **21. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 2011,** (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4193863)

**14-** Kuşcu Nilay, **Şahin Pınar**, Ordueri Nazlı Ece, Taşatargil Arda, Çelik Özenci Çiler, Poli ADP-Riboz Polimeraz (PARP) İnhibisyonunun Varikosel ile İndüklenen Germ Hücre Apoptozuna Etkisi. **Klinik Embriyoloji Derneği II. Kongresi, 2011,** (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4193895)

**15-** **Şahin Pınar**, Şahin Zeliha, Ordueri Nazlı Ece, Kuşcu Nilay, Çelik Özenci Çiler, Seminifer Tübül Kültürüne Rapamisin Uygulamasının Germ Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi. **Klinik Embriyoloji Derneği II. Kongresi, 2011,** (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4193891)

**16-** Çelik Özenci Çiler, Taşatargil Arda, **Şahin Pınar**, Ordueri Nazlı Ece, Doksorubisin Kemoterapisi Sonucu Gelişen Testiküler Hasarda Poli (ADP-Riboz) Polimeraz (PARP) Aktivasyonunun Değerlendirilmesi. **4. Ulusal Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite Kongresi, 2010,** (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:4193898)

**17-** **Şahin Pınar**, Tanrıöver Gamze, Ordueri Nazlı Ece, Demir Necdet, Çelik Özenci

Çiler Fare Embriyonik ve Postnatal Testis Gelişim Sürecinde CCM2 ve CCM3 Protein Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi. **X. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 2010**, (Uluslararası Katılımlı) (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4193909)

**18-** Çelik Özenci Çiler, **Şahin Pınar**, Ordueri Nazlı Ece, Şahin Zeliha, Hücre Büyümesi ve Çoğalmasını Düzenleyen mTOR Sinyal Yolağı Proteinleri Erken Spermatogenik Hücrelerde Ekspre Olurlar. **X. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 2010**, (Uluslararası Katılımlı) (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:4193905)

**19-** Ordueri Nazlı Ece, Şahin Zeliha, **Şahin Pınar**, Çelik Özenci Çiler, Fare Testis Gelişim Sürecinde PARP-1, PARP-2 ve PAR Ekspresyonlarının Araştırılması. **X. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 2010**, (Uluslararası Katılımlı) (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:4193907)