

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

SIÇAN TESTİSLERİNDE BİYOPSİNİN OLUŞTURDUĞU TRAVMATİK HASARIN
ONARIMINA KÖK HÜCRELERİN KATKISININ MİKROSKOPİK OLARAK
İNCELENMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Raşit Gökay GÜLAY

TRABZON-2006

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

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

**SIÇAN TESTİSLERİNDE BİYOPSİNİN OLUŞTURDUĞU TRAVMATİK HASARIN
ONARIMINA KÖK HÜCRELERİN KATKISININ MİKROSKOPİK OLARAK
İNCELENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Raşit Gökay GÜLAY

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Engin YENİLMEZ

TRABZON-2006

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

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

**SIÇAN TESTİSLERİNDE BİYOPSİNİN OLUŞTURDUĞU TRAVMATİK HASARIN
ONARIMINA KÖK HÜCRELERİN KATKISININ MİKROSKOPİK OLARAK
İNCELENMESİ**

Raşit Gökay GÜLAY

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 21.07.2006

Tezin Sözlü Savunma Tarihi: 09.08.2006

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Engin YENİLMEZ

Jüri Üyesi: Prof.Dr. Murat ERTÜRK

Jüri Üyesi: Doç.Dr. Sevim AYDIN

Enstitü Müdürü: Prof.Dr. Orhan DEĞER

Trabzon-2006

TEŞEKKÜR

Tez konumun seçimi, yürütülmesi ve değerlendirilmesinde bilgilerini, desteğini ve sabrını esirgemeyen değerli danışman hocam Doç.Dr. Engin YENİLMEZ'e, yüksek lisans yaptığım dönem içerisinde bilgilerini sunan değerli hocalarımız Prof. Dr. Haluk ARVAS, Doç.Dr. Sevim AYDIN, Doç.Dr. Yavuz TEKELİOĞLU ve Yrd.Doç.Dr. Esin YULUĞ'a, kök hücrelerin üretilmesinde bilgi ve kaynak desteği sağlayan sayın Prof.Dr. Murat ERTÜRK ve sayın Prof.Dr. Ercüment OVALI'ya, hücre kültürü çalışmalarında yardımını esirgemeyen hematoloji çalışanlarına, ışık ve elektron mikroskop çalışmalarında yardımını esirgemeyen Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarı çalışanlarına ve Patoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof.Dr. Yavuz ÖZORAN'a, Sağlık Bilimleri Enstitüsü yönetici ve çalışanlarına, Cerrahi Araştırma Merkezi yöneticilerine, tezde kullandığımız sıçanları sağlayan Farmakoloji Anabilim Dalı yönetici ve çalışanlarına, tezimin istatistiksel sonuçlarının değerlendirilmesinde katkılarını esirgemeyen Halk Sağlığı Anabilim Dalı asistanı Dr. Emine ÇAN'a, değerli asistan arkadaşlarım Dr. Erkan ERDEM, Dr. Serdar YARAR ve Dr. Özlem İPCİ'ye, tüm eğitim öğretimim boyunca bütün olanakları ile manevi ve maddi desteğini esirgemeyen ailem ve kardeşlerime minnettarlığımı sunarım.

Gökay Raşit GÜLAY
Trabzon-2006

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
3. MATERYAL VE METOD	9
4. BULGULAR	14
5. TARTIŞMA	25
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	29
7. ÖZET	30
8. İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY)	31
9. KAYNAKLAR	32

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Skrotum içinde bir çift organ olarak yerleşmiş olan testisler spermatozoanın üretimi, testosteron ve diğer bazı erkeklik seks hormonlarının sekresyonundan sorumludurlar (1, 2). Testisler tarafından üretilen spermatozoonlar spermatogenez adı verilen bir süreçte oluşurlar (2). Memeli spermatogenezi, germ hücrelerinin uygun zamanda uygun bir gelişim aşamasına ulaşmasını garantiye almak için gerekli olan bir çok olayın yer aldığı hormon-bağımlı karmaşık bir gelişim programıdır. Bu olayların çoğu, hücre tipi- ve safha- spesifik transkripsiyon faktörleri tarafından denetlenir (3).

Kök hücreler, kendilerini yenileme, bir organizmanın yaşamı boyunca kayıp hücrelerin yerini doldurabilme ve fonksiyonel olarak farklılaşmış hücreleri oluşturabilme kapasitesine sahip hücrelerdir (4). Her ne kadar kök hücrelerin kendini yenileyerek bölünmeleri ile sonsuz bölünebildiklerine inanılsa da, onların sonsuz çoğalabilme yeteneklerini gösteren çok az delil vardır (5). Kök hücreler vücutta, epitel yenilenmesi, hematopoez ve spermatogenez gibi rejenerasyon ile ilgili birçok işlemde yer alırlar (6).

İlik stromal kök hücreleri, doku kültür plastiklerine yapışma eğilimleriyle ilikteki diğer hücrelerden ayrılabilirler ve bu hücrelerin, hücre ve gen tedavisi için potansiyel olarak kullanışlı olan bir çok özellikleri vardır. Bu hücreler dokulara özgü kök hücrelerin bir çok özelliklerini taşıdıklarından mezenşimal olarak tanımlanmakta (7) ve kültürlerde, osteoblastlara, kondrositlere, adipositlere, myoblastlara (7, 8), tendon ve ilik stromasını içeren mezenşimal dokulara farklılaşma potansiyelinde olan multipotent hücrelerdir (8).

Transplantasyon tedavilerinin gelişmesinde doku veya organın hasara uğramış kısmının farklılaşmamış kök hücrelerin transplantasyonu ile tamiri en heyecan verici hususlardan biridir (9). Dokunun histolojik mimarisini ve fonksiyonunu düzeltmek için, dokuya çok çeşitli hücreler yerleştirilir. Pluripotent kök hücrelerin, doku yenilenmesi işleminde yeniden ve bir diğer hücreye farklılaşabilecekleri bildirilmektedir (10).

Önemli bir değerlendirme aracı olan testis biyopsisi (11, 12, 13) tek taraflı inmemiş testis modelinde (14), geleneksel çoklu biyopsi uygulaması ile mikrodiseksiyon tekniği kullanılarak (13, 15) ve deneysel olarak, olgunluk öncesi farelerde (16) uygulanmaktadır.

Bu çalışma, sıçan testisinde aspirasyon biyopsisi ile oluşan travmatik etkiye karşı kök hücrelerin iyileştirici etkilerinin olup olmadığının araştırılması amacıyla gerçekleştirildi.

2. GENEL BİLGİLER

TESTİSLERİN GELİŞİMİ

Embriyonun genetik ve kromozomal cinsiyeti, ovumu dölleyen sperm çeşidi ile, fertilizasyon sırasında belirlenir; ancak erkek ve dişi morfolojik özellikleri embriyonal dönemin 7. haftasına kadar izlenmez (17, 18). Testis gelişimi, birçok hücre çeşidinin yeniden düzenlenmesi ve farklılaşması gibi komplike işlemleri içerir (19). Testis farklılaşmasında yer alan testis belirleyici genler, sadece gonad hücrelerinde eksprese edilirler ve muhtemelen bunlar düzenleyici genler olarak görev yapmaktadırlar (20, 21, 22). Morfogenler ise embriyonal ve erişkin dokularda farklı doku oluşumu, proliferasyonu, farklılaşması veya yeniden şekillenmesi işlemlerini düzenleyen gelişim regülatörleridirler (23).

İntrauterin 4. hafta başında, allantoise yakın, vitellus kesesi yüzey epitelinden ayrılan endodermal **primordial germ hücreleri** mezonefrozun medialinde, mezotel ve altındaki mezenşimin proliferasyonu ile oluşan gonadal (genital) kabartı (**Plica genitalis**) içine göç ederler. 6. haftada, Plica genitalis yüzey epitelinden (mezotel) ayrılan hücreler altındaki mezenşim içerisine doğru gelişen parmak şeklindeki **primer seks kordonlarını** oluştururlar. Primordial germ hücreleri bu kordonların içine girer. Bu durumda farklılaşmamış gonad, dışta bir korteks ve içte bir medulladan oluşmaktadır. Eğer embriyo XY seks kromozom kompleksini içermektedirse, medulla testise farklılaşır; korteks bir takım kalıntıları dışında geriler ve dejenere olur. Testiste primordial germ hücrelerinden spermatogoniumlar, Plica genitalis mezotelinden Sertoli hücreleri, bu mezotel altındaki mezenşimden Leydig hücreleri gelişir (17,18). Leydig hücreleri 8. haftadan itibaren testosteron ve androstenodion salgılamaya başlar. Bu hormonlar mezonefrik kanalların ve dış genitalerin erkeklik yönünde farklılaşmasını sağlarlar.

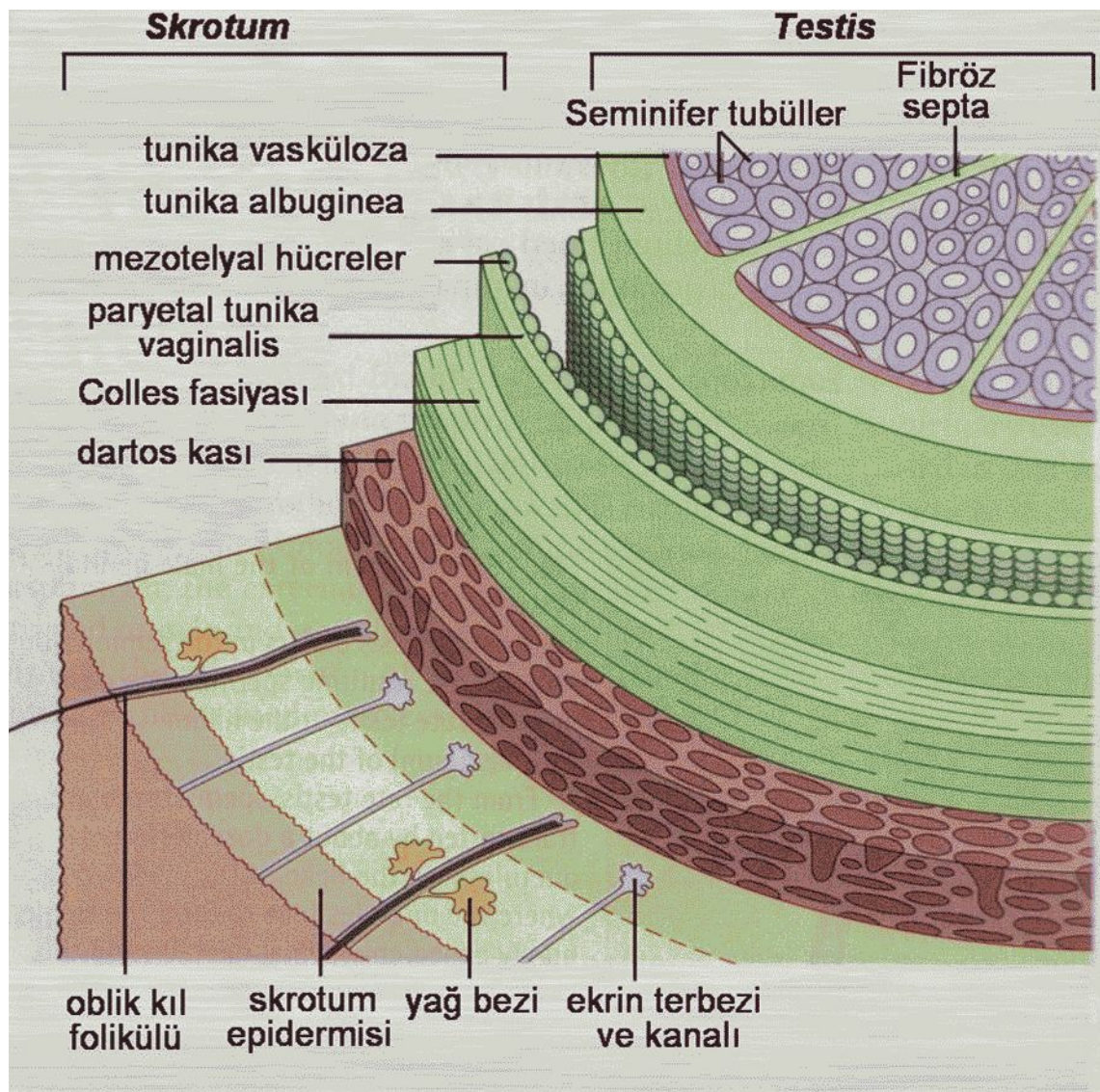
Primer seks kordonları farklılaşmamış gonad medullasının derinlerine uzar, burada dallanarak birbirleriyle anastomozlar yaparlar. Seks kordonları, seminifer tubuller, tubuli rekti ve rete testis'e farklılaşırlar.

Puberteye kadar, seminifer tubuller solid halde kalırlar; seminifer tubulde sadece Sertoli hücreleri ve spermatogoniumlar bulunur. Tubullerin lümenleri yoktur ve lümenler puberte döneminde oluşur (17).

TESTİS HİSTOLOJİSİ

Testis **Tunica albuginea** denilen kalın bir kollagenöz bağ dokusu kapsülü ile çevrilidir. Tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşarak **mediastinum testis**'i oluşturur. Buradan bezin içine giren fibröz septalar, bu yapıyı **testis lobulleri** denilen yaklaşık 250 adet piramidal bölmeye ayırırlar. Her lobulde gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 seminifer tubul yer alır.

Testisler skrotum içinde asılı olarak bulunurlar. Bunların her biri **tunica vaginalis** denilen seröz bir kese taşır. Bu tunika, dışta pariyetal ve içte ise visseral tabakadan oluşur; bu testisi ön ve yanlarından sarar (Şekil 1) (1, 2, 24).



Şekil 1. Testisin skrotumla birlikte şematik görünümü (24).

Testislerin karın içinden daha düşük bir ısıda saklanmalarında skrotumun önemli bir rolü vardır (24). Spermatogenez için, skrotum ısısının vücut ısısından daha düşük olması gerekmektedir (25).

Seminifer tubuller karmaşık yapıdaki çok katlı bir epitel ile döşelidir. **Kıvrımlı tubuller** (tubuli seminiferi contorti) bir şebeke oluştururlar. Bu şebekedeki her tubul başlangıçta kör uçludur, daha sonra dallara ayrılır. Her bir tubul sonlanırken lümeni daralır ve **düz tubul** (tubulus seminiferus rectus) adıyla bilinen kısa kanal halinde sürer. Bunlar **rete testise** bağlanırlar (1, 24). Seminifer tubuller ile rete testis arasındaki bölgede, uzun geçiş hücreleri bulunmaktadır (26). Rete testis, 10-20 **ductuli efferentes** ile **epididymis**'in baş kısmına bağlanmaktadır (2, 24).

Bazal membran, dokuların yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünün korunmasında önemli bir rol oynar. Bazal membran yapısının değişmesi ile bir çok testis fonksiyon bozukluğu gelişebilir (27). Seminifer tubülü saran fibröz **tunica propria** (peritubuler doku) bazal membran özelliğinde olup, birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur ve düz kas özelliği gösteren, yassılaştırmış **myoid hücreleri** içerir. Seminifer tubuller bu fibröz bağ dokusu kılıfının içinde, belirgin bir bazal laminaya oturmuş, kompleks bir **germinal** (seminifer) **epitelden** oluşur. (24). Seminifer tubuldeki bazal lamina, Sertoli hücreleri tarafından üretilir (28).

Germinal epitel iki hücre çeşidinden meydana gelmektedir: **Spermatogenik hücreler** ve **Sertoli** (destek) **hücreleri**. Spermatogenik hücreler, bazal lamina ve tubul lümeni arasında, 4-8 tabaka halinde düzenlenmişlerdir. Bu hücrelerin birkaç bölünmeden sonra farklılaşıp spermatozoonları oluşturdıkları sürece **spermatogenez** adı verilir (24).

Spermatogenez, spermatogonial kök hücrelerin olgun spermilere geliştiği (29), apoptozu da içeren (30), hormon-bağımlı kompleks bir gelişim sürecidir (3). Yüksek organizasyonlu bu süreçte yer alan spermatogonial kök hücreler (5, 6, 31) diğer yetişkin kök hücreler gibi kendini yenileyebilme, spermatogenezi devam ettirebilme ve çok sayıda fonksiyonel farklılaşmış hücreler oluşturabilme yeteneklerine sahiptirler (4, 32, 33). Bu hücreler diğer yetişkin kök hücreler arasında eşsizdirler; çünkü bunlar genetik bilgiyi bir sonraki nesile aktarırlar (6, 32). Bu hücreler Sertoli hücrelerinin bazal kısımları ve bazal lamina ile yakın kontakt içindedirler; bunlar gerileyen seminifer epiteli yeniden oluşturmaktadırlar (34). Spermatogonial kök hücre serilerinin alıcı sıçana transplantasyonu ile, bu hücrelerin bazal membrana göç edebildikleri ve seminifer tubullerde kolonize oldukları bulunmuştur (35).

Testiste, Sertoli hücreleri ile germ hücreleri etkileşim halindedirler ve Sertoli hücrelerindeki bozukluklar, erkek infertilitesine kadar varan spermatogenez bozukluklarına yol açmaktadır (36). Yaşlanma sürecinde hem spermatogonial kök hücreler hem de Sertoli hücreleri yer almaktadırlar (37).

Erkeğin üretkenliğinin devamı ve korunması için germ hücre nakli ve testis doku ksenogrefti yapılmaktadır (38). Fertil donör fareden infertil alıcı fareye germ hücre transplantasyonu ile donörün genetik materyalinin alıcı hayvanın yavrularına geçişi ve donör-kökenli spermatogenez oluşumu sağlanmaktadır (39). Spermatogenez çevresel hasarlı infertil testiste, endojen kök hücrelerden yeniden oluşturulamamış, ancak erkek germ hücreleri mikroçevresindeki bozuklukların, Sertoli hücre transplantasyonu ile düzeltilebileceği bildirilmiştir (36).

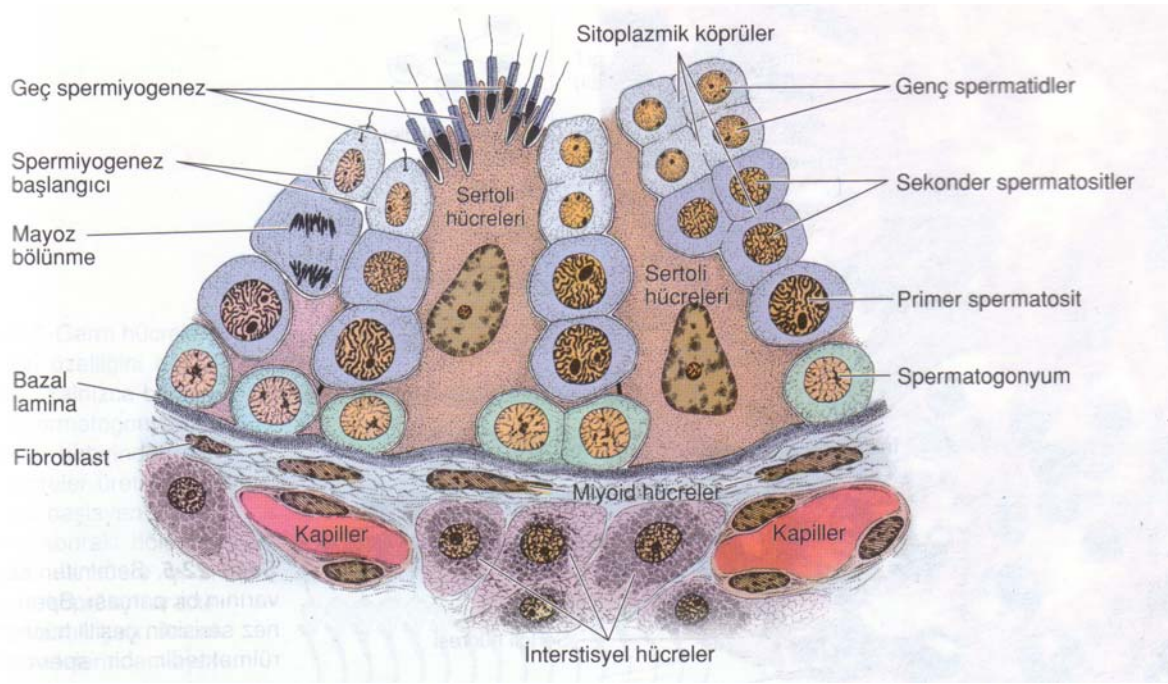
Spermatogenez 3 safhaya ayrılır: **Spermatogonium**ların mitozla bölünmeleri sonucu **spermatosit**lerin oluştuğu **spermatositogenez**; spermatositlerin ardı ardına 2 bölünme geçirerek, kromozom sayılarının ve DNA miktarının yarıya düştüğü, **spermatid**lerin oluştuğu **mayoz**; spermatidlerin hücre farklılaşma süreci geçirerek **spermatozoon**ları oluşturduğu **spermiogenez** (2).

Spermatogoniumlar, bazal lamina boyunca yerleşmiş (40), mitoz bölünme ile çoğalan hücrelerdir (1, 24). Bunlar yaklaşık 12 µm çapında nispeten küçük hücrelerdir. Başlıca 2 çeşit spermatogonium vardır: Kök hücreler olan **tip A spermatogonium**'lar ve bunların mitoz bölünmeleriyle oluşan **tip B spermatogonium**'lar.

Tip B spermatogoniumlar, **primer spermatositleri** oluştururlar. Bu hücreler oluştuktan hemen sonra birinci mayoz bölünmenin profazına girerler. Bu sırada primer spermatositin 46 (44+XY) kromozomu vardır ve DNA'sı da 4 N'dir. Bu hücreler, profazda leptoten, zigoten, pakiten, diploten ve diakinez safhalarını geçirerek metafaza ulaşırlar. Daha sonra anafaz safhasında, bu hücre kromozomlarının her biri, farklı kutba gider. Spermatogenik serideki en büyük hücreler primer spermatositlerdir; bunlar nükleuslarında, kangal yapma sürecinin değişik safhalarındaki kromozomları ile tanınırlar.

1. mayoz bölünmeden sonra **sekonder spermatositler** denilen ve yalnızca 23 kromozom (22+X veya 22+Y) içeren daha küçük hücreler oluşur. Sekonder spermatositler testis kesitlerinde çabucak 2. mayoz bölünmeye girdikleri için bunların gözlenmesi zordur. Sekonder spermatositlerin bölünmesi ile 23 kromozomlu spermatidler oluşur.

Spermatidler, diğer hücrelerden daha küçük boyutları (7-8 μm çapında), yoğunlaşmış kromatin bölgeleri taşıyan çekirdekleri ve tubul lümenine yakın yerleşimleri ile tanınırlar. Spermatidler **spermiogenez** denilen akrozom şekillenmesini içeren karmaşık bir farklılaşma süreci geçirirler; spermiogenezde bu hücrelerin nükleusları yoğunlaşır, uzar, kuyruk oluşur ve sitoplazmanın çoğu kaybolur. Sonuçta seminifer tubulün lümenine salgılanan olgun spermatozoon meydana gelir (2). Geç spermatidler, erişkin sıçanlarda, Sertoli hücre fonksiyonunun kontrolünde önemli rol oynamaktadırlar (41).



Şekil 2. Seminifer tubul ve interstisyel bağ dokusunun şematik görünümü (2).

Sertoli hücreleri spermatogenik seri hücrelerini kısmi olarak saran, uzamış piramidal hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin tabanları bazal laminaya tutunur; apikal uçları ise sıklıkla seminifer tubulün lümenine bakar. Sertoli hücrelerinin çok sayıdaki lateral uzantıları spermatogenik seri hücrelerini sardığı için bunların sınırları ışık mikroskopta kolay seçilemez (Şekil 2). Bu hücreler, elektron mikroskop düzeyinde, bol miktarda düz endoplazma retikulumu, iyi gelişmiş Golgi kompleksi, çok sayıda mitokondri ve lizozom içermektedir. Sıklıkla üçgen biçiminde olan, uzamış nükleusunda çok sayıda kıvrımlar, belirgin bir nükleolus ve az miktarda heterokromatin görülür (2).

Somatik hücre olan Sertoli hücreleri birbirlerine sıkı bağlantı kompleksleri ile birleşmişlerdir (2, 42). Bu bağlantılar seminifer tubul epitelini bazal ve lümenaltı kompartmanlara ayırırlar; moleküllerin germinal hücrelere geçişini sınırlandırır. Bunlar fonksiyonu ve dinamik regülasyonu çok az anlaşılan kan-testis (Sertoli hücre) bariyerini oluştururlar (42). Bu bariyer Sertoli hücreleri sıkı bağlantıları tarafından, sıkı bağlantı organizasyonu ise hücre iskeleti tarafından düzenlenmektedir (43). Kan-testis bariyeri, spermatogenezin daha ileri safhalarındaki germinal hücreleri kandan gelen zararlı ürünlere karşı korur. Spermatogoniumlar bu bariyerin altında (bazal kompartmanda) yerleşmiş olup kandaki maddelerden serbestçe yararlanabilmektedirler. Spermatogenez sırasında, spermatogonia serisi, buradan geçerek lümenaltı (adluminal) kompartmana çıkarlar. Kan-testis bariyeri gelişen spermiler ile immün sistem arasındaki doğrudan etkileşimi engeller. Bu bariyer seminifer tubullere immünoglobulinlerin geçmesini önler ve bu sayede serumlarında yüksek düzeylerde sperm antikorları bulunan hastalarda, herhangi bir fertilité bozukluğu görülmez. Sertoli hücre bariyeri, bu şekilde, seminifer epiteli herhangi bir otoimmün reaksiyondan da korumuş olur (2). Spermatozoonlar, immün toleransın belirlendiği ergenliğe kadar seminifer epitelde görülmez. Bu yüzden, bunlar kendi bağışıklık sistemleri tarafından yabancı olarak tanınan çeşitli otoimmünojenik maddeleri taşırlar. Kan-testis bariyeri otoimmünojenik spermatozoayı kendi bağışıklık sistemi tarafından gelebilecek olan saldırıya karşı korumaktadır (44).

Spermatisitler ve spermatidler, Sertoli hücrelerinin apikal kısımlarında ve lateral derin girintilerde yerleşmişlerdir. Spermatidlerin kuyrukları lümene püsküller şeklindeki çıkıntılar oluştururlar. Sertoli hücreleri gap junction'larla germinal hücrelere iyon ve kimyasal geçişini sağlarlar (2). Spermatogenez esnasında, gelişmekte olan germ hücrelerinin seminifer epiteldeki hareketi, Sertoli ile germ hücreleri ve Sertoli hücreleri arasındaki yaygın yapışma bağlantılarıyla sağlanır (45). Tubulobulbar kompleksler, Sertoli hücreleri tarafından Sperm salınımı için kullanılabilir. Bu kompleksler, Sertoli hücrelerinin ektoplazmik özelleşmeleri olan interselüler yapışma bağlantılarıdır ve komşu hücrelerle yakınlığı bölgelerde gelişmişlerdir. Bunlar, Sertoli hücre plazma zarının invajinasyonlarına uyan spermatid plazma zarının parmaksı çıkıntılarında meydana gelir (46).

Sertoli hücresi, spermatogenez için uygun bir çevre oluşturmak amacıyla, germ hücreleriyle sıkı iletişim sağlar (47). Germ hücreleri, Sertoli hücreleri tarafından oluşturulan çevrede yaşadıklarından, Sertoli hücreleri ile germ hücreleri arasındaki parakrin uyarılar,

germ hücre ölüm işlemini de düzenler. Germ hücre apoptozu, ya Sertoli hücre ön-yaşam faktörlerinde azalma, ya da Sertoli hücre pro-apoptotik faktörlerinde artış veya her ikisi tarafından uyarılabilir (48).

Sertoli hücreleri gelişmekte olan spermatozoonları destekler, korur ve onların beslenmesini sağlar (1, 2); spermiogenez sırasında fazla spermatid sitoplazmasını (2), apoptoza giden spermatogonik hücreleri fagosite eder, parçalar (49); seminifer tubul lümen sıvısı, inhibin (2) ve androgen-bağlayıcı protein (ABP)'i (2, 50) üretirler. Seminifer tubuller içinde, spermatogenezin normal devamı için, çok fazla miktarda testosteron bulunmaktadır (51). Sertoli hücreleri, embriyonal gelişme sırasında, erkek fötusta anti-Müllerian hormon sentezler (2). Bu hücreler içerisindeki testosteron, seminifer epitel mikroçevresini kontrol ederek, germ hücre farklılaşmasını düzenlemektedir (42). Testiküler androjen, seminifer tubullerde spermatogenezin tamamlanması ve epididimiste spermatozoa matürasyonu için esastır (50). Sertoli hücreleri üreme periyodu süresince bölünmezler.

Testisin seminifer tubulleri arasında, bağ dokusu, Leydig hücreleri, fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, Mast hücreleri, makrofajlar, sinirler, kan ve lenf damarları bulunur (2). Leydig hücreleri sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üretirler (1, 2). İnterstisyel bağ dokusunda bulunan makrofajlar, organ-spesifik fonksiyonel kan-testis bariyerinin oluşumu ile lokal hormonal dengenin düzenlenmesinde rol oynarlar (52).

Spermatogenez, hipofizden salınan lüteinizan hormon (LH) ve follikül stimulan hormon (FSH) etkisi altında sürer. LH Leydig hücreleri üzerine etki ederek normal spermatogonik hücrelerin gelişimi için gerekli olan testosteron yapımını stimule eder. FSH ise Sertoli hücrelerini etkiler ve bu hücreler tarafından androjen-bağlayıcı protein (ABP) sentezini sağlar. ABP testosteronun seminifer tubulde yoğunlaşmasını sağlar ve testosteronu bağlayarak seminifer tubullerin lümenine taşır (2).

3. MATERYAL VE METOD

Bu araştırma Karadeniz Teknik Üniversitesi (K.T.Ü.) Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji, Mikrobiyoloji ve Hematoloji Anabilim Dallarında gerçekleştirildi. Bu araştırmada 200-250 gr ağırlığında, erişkin Sprague Dawley erkek sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar K.T.Ü. Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalından sağlandı. Tüm sıçanlar özel fare yemi ile beslendiler. 500 ml'lik içme suyu şişelerine her sabah aynı saatte 300 ml taze su kondu ve yeterince su almaları sağlandı. Su konmadan hemen önce, günlük içtikleri su, yedikleri yem ve vücut ağırlıkları ölçüldü. Sağlık değişiklikleri her gün düzenli olarak kontrol edildi. Bu hayvanların kafesleri, içme suyu şişeleri ve alt temizliklerinin düzenli bir şekilde yapılması sağlandı.

Hayvanların hepsi 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık fotoperiyotlarına tabi tutuldu. Daha önce gerçekleştirilen bir araştırmada, testis ağ enjeksiyonu ile yapılan fare kemik iliği kök hücre (MSC)'lerinin ksenogenetik naklinde, nakilden sonraki 18. günde MSC'lerin floresanının zayıfladığı ve 21. günde bunların floresanının kaybolduğu (53) bildirildiği için biz bu çalışma süresini 16 gün olarak belirledik.

Kök hücreler Hematoloji ve Mikrobiyoloji Anabilim Dallarında üretildi. Sıçanların cerrahi operasyonları ve cerrahi operasyondan sonraki bakımları Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında gerçekleştirildi.

Kök Hücrelerin Kültürü ve Mikroskopisi

Aynı kafeste beslenen kardeş sıçanlardan birinin, eter anestezisi altında, sağ bacağı antiseptik solüsyon (betadin) ile temizlendikten sonra, sağ femuru eklem yerlerinden ayrılarak çıkarıldı. Çıkarılan kemiğin her iki ucu steril kabin (laminar flow)'de kesildi ve bundan sonraki kültür işlemleri bu kabin içinde gerçekleştirildi. Enjektöre RPMI 1640 medyumunu çekildi ve kemik iliğinin bulunduğu kemiğin bir başından enjektörle basınç uygulanarak, kemik iliğinin RPMI medyumuna bulunan tas içerisine çıkması sağlandı.

Tas içindeki RPMI ile karışık halde bulunan kemik iliği materyali falkon tüpüne alınarak 350 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı; dipte kalan pellet vortekslenerek dağıtıldı. Pellet üzerine RPMI ilave edilerek flaşlandı ve hücrelerin homojen hale gelmesi sağlandı. Karışım tekrar 350 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı, pellet üzerine yeniden RPMI medyumuna konarak vortekslendi. Bunun üzerine % 80'i RPMI %20'si fetal buzağı serumu (FCS) olan karışım ilave edilerek homojen bir karışım elde edildi.

Homojen karışım pipetle 25'lik flask içine aktarıldı ve %5'lik CO₂'li etüv içerisinde inkübasyona bırakıldı.

1. pasajda flask yüzeyini kaplamış MSC'ler üzerindeki artık medyum alındı. Flask içine tripsin (100 ml PBS içine 50 mg EDTA ve 200 mg tripsin) katıldı. Hücrelerin anastomozlarından ve flask yüzeyinden tripsin ile ayrılmaları sağlandı. Hücreler yuvarlak hale geldikten sonra flaskın her iki yanına elle vurularak hücrelerin flask yüzeyinden tamamen ayrılmaları sağlandı. Flaska FCS eklenerek medyumun nötralize edilmesi sağlandı. Flask içeriği pipet yardımı ile falkon tüpüne alındı ve 350 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra dip kısımda oluşan hücre pelleti vortekslendi ve pelletin homojen dağılması sağlandı. Pellete 10 ml RPMI medyumunu eklendi ve daha sonra, karışım yeniden 350 g'de 10 dakika santrifüj edildi.

2., 3., 4. ve 5. pasajlar 1. pasaj gibi yapıldı. Buradaki kök hücrelerin flask içerisinde üremesi ve farklılaşması sağlandı.

Cerrahi Operasyon ve Kök Hücre Uygulaması

Bu çalışmada kullanılan 18 adet erişkin erkek sıçan 3 gruba ayrıldı. Tüm sıçanlara anestezi amacıyla 60 mg/kg ketamin, intramüsküler olarak, uygulandı. Cerrahi grupların uygulamasına anesteziden 20 dakika sonra başlandı.

Kontrol Grubu: Sıçanların skrotumlarına dışardan sadece antiseptik solüsyon (betadin) sürüldü ve cerrahi olarak herhangi bir işlem yapılmadı.

Cerrahi + PBS Grubu: Sıçanların skrotum derileri antiseptik solüsyon ile temizlendi. Sonra bunların sağ testisleri üzerindeki skrotum derileri, cerrahi makasla testis boyuna paralel olarak kesildi ve sağ testis Tunica albuginea'sı yaklaşık 5 mm boyunda bir insizyonla açıldı. Bu açılan kısımdan, 1 ml'lik enjektörün iğnesi çıkarıldıktan sonra, enjektör ucu ile testise girilip 0.25 ml'lik testis aspirasyonu yapıldı (Resim 1). Bu aspire edilen yerden enjektörle girildi; bu kısmın sağ, solu, aşağı ve yukarısına, 45 derecelik bir eğimle 0.25 ml fosfat tamponlu steril çözelti (PBS), enjekte edildi. Tunika albuginea ve skrotum derisi dikilerek cerrahi işleme son verildi.

Cerrahi + Kök Hücre Grubu: Cerrahi operasyon, aspirasyon biyopsisi ve kök hücre enjeksiyonu, Cerrahi + PBS Grubundaki sıçanların uygulamalarına benzer şekilde yapıldı. Aspire edilen testis kısmına enjektörle 0.25 ml MSC süspansiyonu (medyum ile birlikte), literatüre uygun olarak testis ağ enjeksiyonu (53) ile verildi.

Deney uygulamalarından onaltı gün sonra, hayvanlar dekapite edildi ve mikroskopik değişikliklerin incelenmesi için, skrotumları açılarak, testisleri çıkarıldı.



Resim 1. Sıçan testisinden aspirasyonla doku örneğinin çıkarılması.

Kök Hücreler ve Testislerin Mikroskopisi

Kök hücrelerin ışık mikroskopisi için 5. pasajdan 2 gün ve 5 gün sonra bu hücrelerin flask içindeki ışık mikroskopik resimleri çekildi.

Testislerin ışık mikroskopik incelemesi için alınan parçalar Bouin ve %10'luk formaldehit (formalin) fiksatiflerine kondu. Testis parçaları Bouin'de 18 saat, formalinde 48 saat tutuldu; doku parçaları alkol ve ksilen serilerinden geçirildi ve dokuların parafin blokları hazırlandı. Bloklar mikrotom ile 4-5 mikrometre kalınlığında kesildi; kesitler deparafinizasyondan sonra hematoksilin-eozin ve Verhoeff boyaları ile boyandı. Hazırlanan preparatlarda gerekli incelemeler yapıldıktan sonra resimler çekildi.

Kök hücrelerin elektron mikroskopik incelemesi için, bu hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması amacıyla flask içine tripsin eklendi; bunlar 1 ml FCS ile nötralize edildi. Hücreler kendi medyumları ile 350 g'de 2 kere 10'ar dakika santrifüj edildi ve her santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Santrifüj tüpü içerisinde kalan hücre pelleti içine 1 ml %2'lik glutaraldehit konuldu.

Testislerin elektron mikroskop incelemesi için yaklaşık 1 mm³ büyüklüğündeki testis parçaları alınıp % 2'lik gluraldehitte kondu. Testisler ve kök hücreler 18 saat glutaraldehit içerisinde tutuldu. Daha sonra bunların rutin elektron mikroskopik doku takipleri, Tablo 1'de belirtilen prosedüre göre yapıldı. Epona gömülen parçalardan önce 700-900 nm kalınlığında yarı-ince kesitler alındı; toluidin mavisi ile boyandı ve ışık mikroskopta incelendi. İstenen bölgelerden 70-90 nm kalınlığında ince kesitler alındı. İnce kesitler kurşun sitrat ve uranil asetat ile kontrastlandıktan sonra JEOL 1010 marka transmisyon elektron mikroskop ile incelendi. Değerlendirmelerden sonra resimler çekildi.

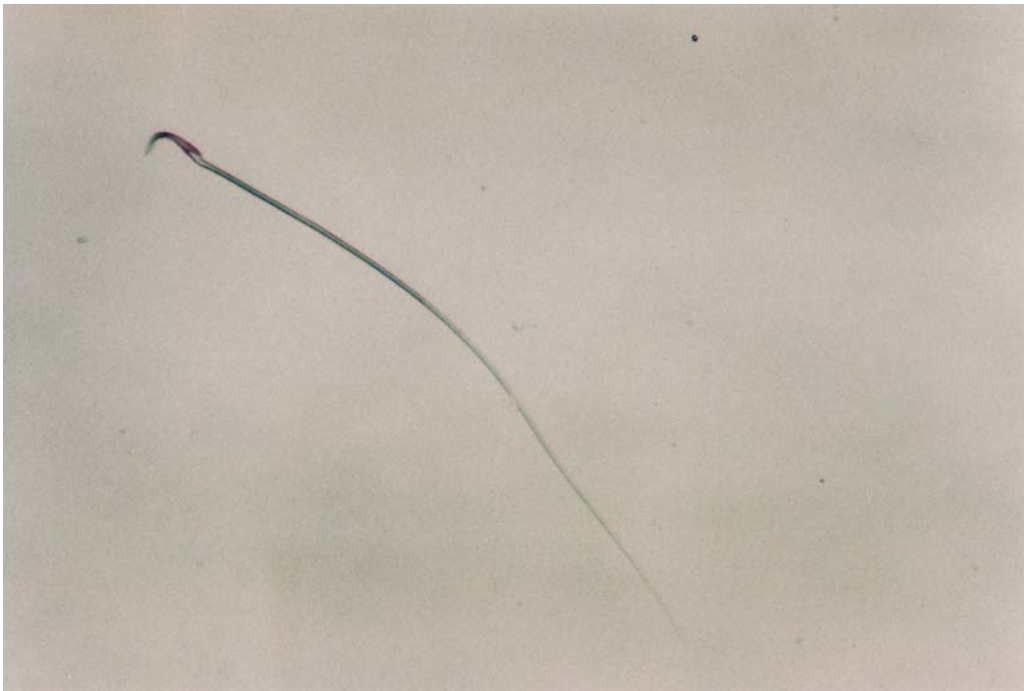
Madde	Konsantrasyon	Süre	Isı
Glutaraldehit	%2	>2 saat	4 °C
PBS	pH=7.4	10 dakika	Oda ısısı
OsO ₄	%1	60 dakika	Oda ısısı
PBS	pH=7.4	10 dakika	Oda ısısı
Uranil asetat	%1	60 dakika	Oda ısısı
PBS	pH=7.4	10 dakika	Oda ısısı
Alkol	%50	10 dakika	Oda ısısı
Alkol	%70	10 dakika	Oda ısısı
Alkol	%96	10 dakika	Oda ısısı
Alkol	%100	10 dakika	Oda ısısı
Propilen oksit	Saf	10 dakika	Oda ısısı
Propilen oksit: Epon	1:1	60 dakika	Oda ısısı
Propilen oksit: Epon	1:3	60 dakika	Oda ısısı
Epon	Saf	60 dakika	Oda ısısı
Epon (Kapsül içinde)	Saf	18 saat	60 °C

Tablo 1: Rutin elektron mikroskopik doku takip yöntemi.

Işık mikroskopik incelemelerde her bir testis kesitinde total seminifer tubul sayısı, dejenerasyon izlenen ve izlenmeyen tubul sayıları, dejenerasyon şekli ve kaç tubulde hangi çeşit dejenerasyon görüldüğü belirlendi. Bulgular resimlerle belgelendi ve istatistiksel veriler çıkarıldı.

Sperm Motilite ve Vitalite Değerlendirmesi

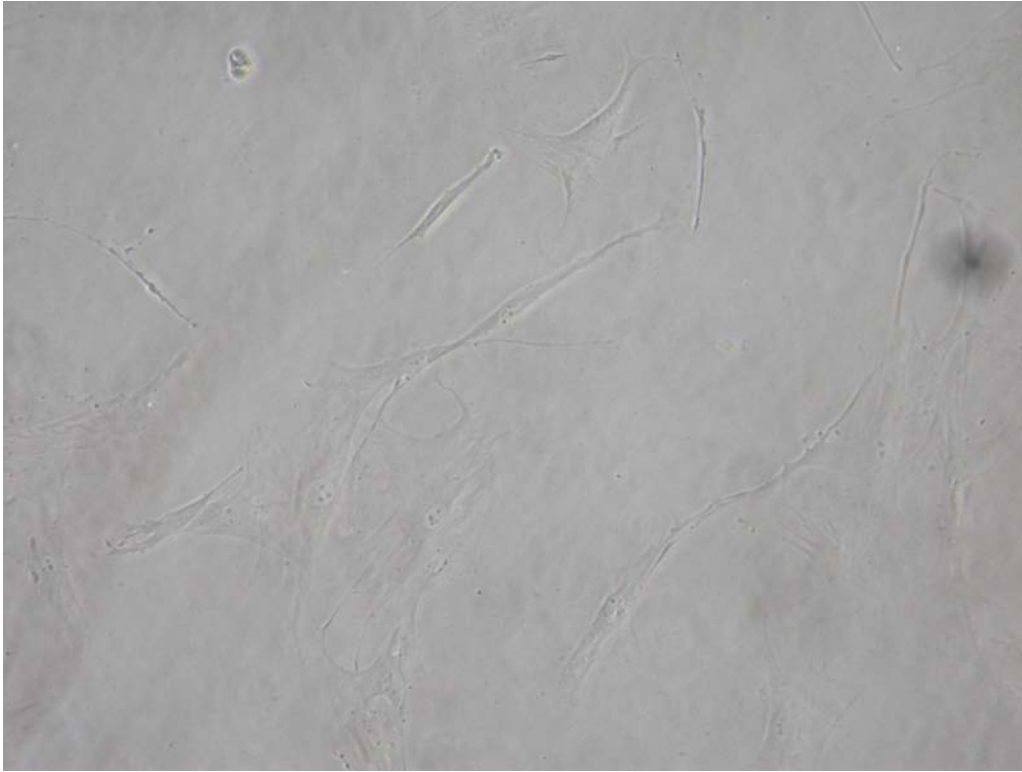
Sağ epididimisler çıkarılarak üç parçaya ayrıldı ve santrifüj tüpündeki PBS solüsyonuna kondu. Bu parçalar 37 derecedelik etüvde 15 dakika bekletildikten sonra disposable pipetle 10 defa vortekslendi. Epididim parçaları tüplerden çıkarıldı; bundan sonraki 1., 2. ve 24. saatlerde epididimal spermilerin motilite ve vitalitesine bakıldı. Spermatozoonların vitalitesine bakmak için Eozin Y boyası kullanıldı (Resim 2).



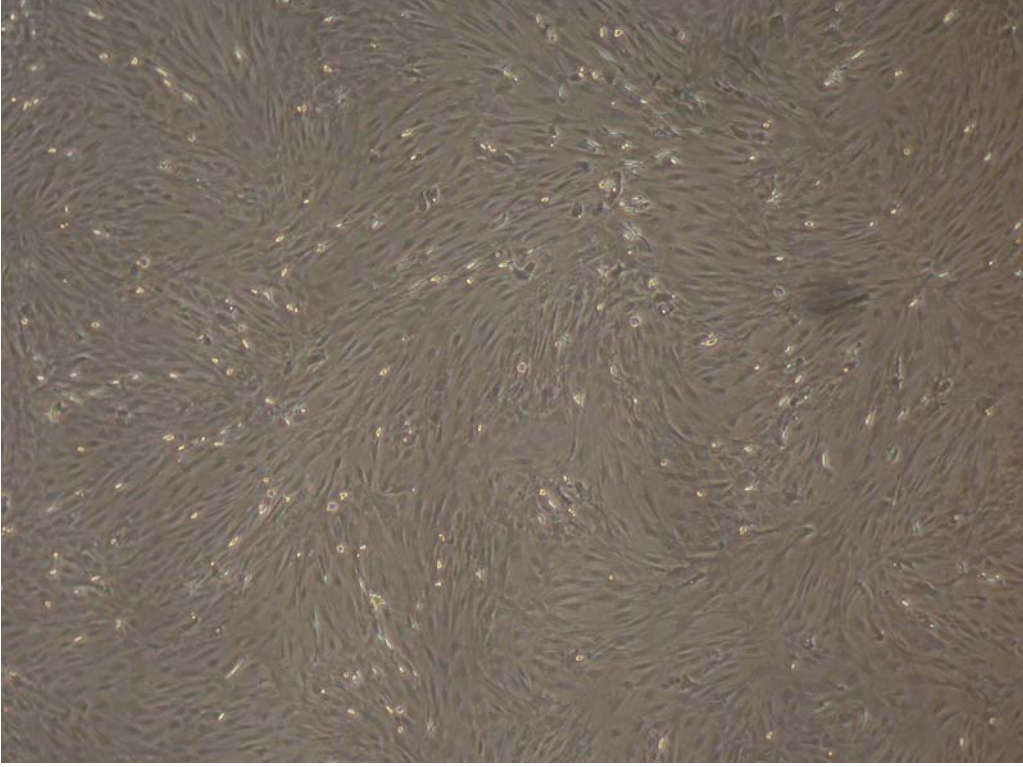
Resim 2. Mikrofotografı X400: Sıçan epididimisinden alınan spermatozoon görünümü. Boya: Eozin Y.

4. BULGULAR

Kök Hücrelerin Işık Mikroskopik Bulguları: Bu hücreler primer kültürden veya diğer pasajlardan sonra yapılan kültürlerinde ökromatik nükleusa sahiptir ve çok sayıda uzun uzantıları ile flask iç yüzeyine yapışmışlardır. Bu hücreler bazı uzantıları ile de birbirleriyle anastomozlar yapmaktadırlar. Bu hücreler bu görünümüleriyle aktif fibroblastlara benzemektedirler (Resim 3). Bu hücrelerin flask içinde çoğalmaları ve yoğunlaşmaları sonucu, bunların yapılarının olgun dokulardakine benzer, fuziform bir şekil aldığı görüldü (Resim 4).

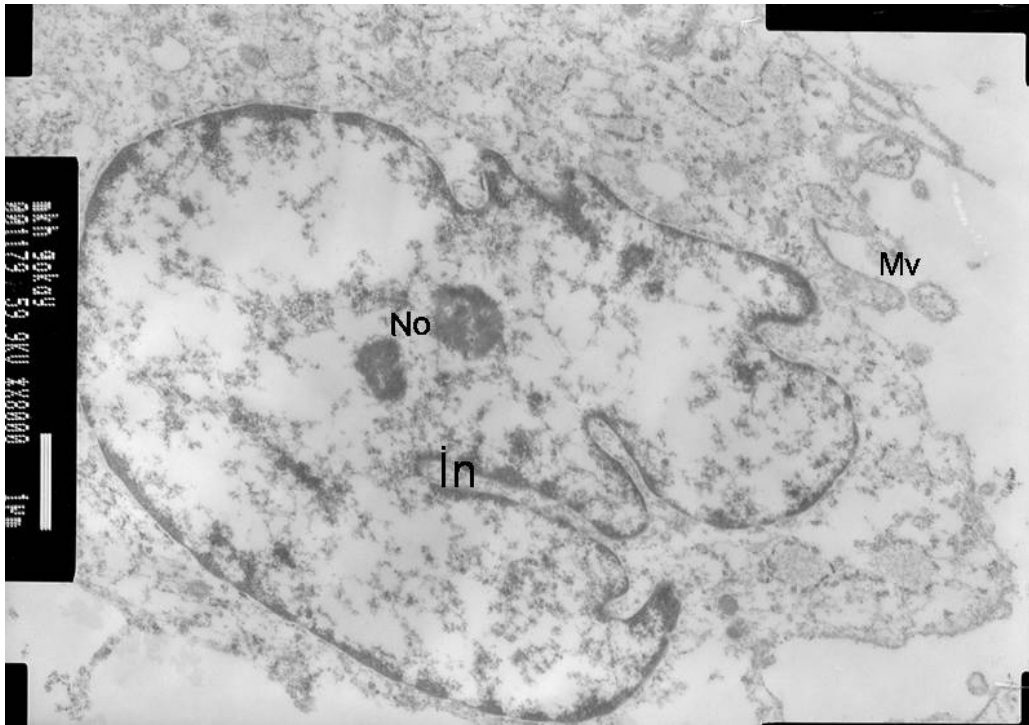


Resim 3. Beşinci pasaj sonrası 2. gündeki kök hücrelerin kültür ortamındaki görünümü. Mikrofotografi X400.



Resim 4. Beşinci pasaj sonrası 5. gündeki kök hücrelerin kültür ortamındaki görünümü. Mikrofotografi X40.

Kök Hücrelerin Elektron Mikroskopik Bulguları: Kök hücreler santrifüj edildiklerinde, uzantıları kısalmakta ve yuvarlağa yakın, nükleusları aşırı girintili çıkıntılı (indent nükleus) yapısı göstermektedirler. Nükleoplazma açık (ökromatik) olup nükleoluslar kolay seçilmektedir (Resim 5).



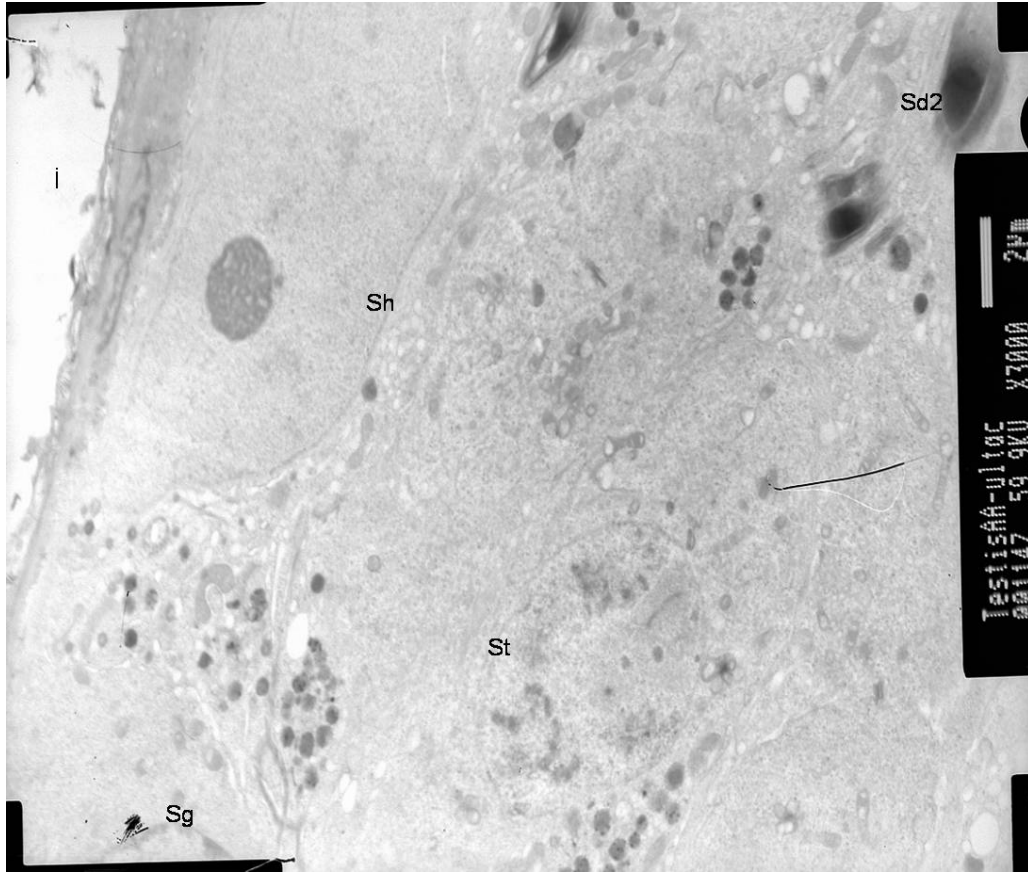
Resim 5. Kök hücrenin elektron mikroskopik görünümü. Elektronmikrograf X 8000. Mikrovillus benzeri hücre uzantıları (Mv), indent nükleus (In), nükleolus (No).

Kontrol Grubu Işıık Mikroskopik Bulguları: Seminifer tubuller arasındaki interstisyel baē dokusu, bu dokudaki Leydig hücreleri, seminifer tubul epiteli, tubulu saran peritubuler doku, myoid hücreler, seminifer tubulun peritubuler dokuya çok yakın kısmında koyu nükleuslu spermatogoniumlar, peritubuler dokuya yakın olan ökromatik (açık)  ekilsiz nükleuslu Sertoli hücreleri, spermatogoniumlara göre daha büyük ve lümene daha yakın primer spermatositler, spermatositlere göre daha küçük, lümene en yakın açık boyanmış, parça parça kromatinli nükleusları ile yuvarlak spermatidler, uzun, koyu nükleuslu uzamış spermatidler ve tubul lümeninde spermatid kuyrukları normal yapıda görülmektedir (Resim 6).



Resim 6. Kontrol Grubu. Mikrofotografi X400: İnterstisyel baē dokusu (İ), seminifer tubul (ST), tubul lümeni (L), Leydig hücresi (Lh), peritubuler doku (PD), myoid hücre (Mh), spermatogonium (Sg), Sertoli hücresi (Sh), primer spermatosit (St), yuvarlak spermatid (Sd1) uzamış spermatid (Sd2).

Kontrol Grubu Elektron Mikroskopik Bulguları: İnterstisyel bağ dokusu, peritubuler doku, myoid hücreler, Sertoli hücreleri, spermatogoniumlar, spermatositler (Resim 7) ve spermatidler normal yapıda izlendi.



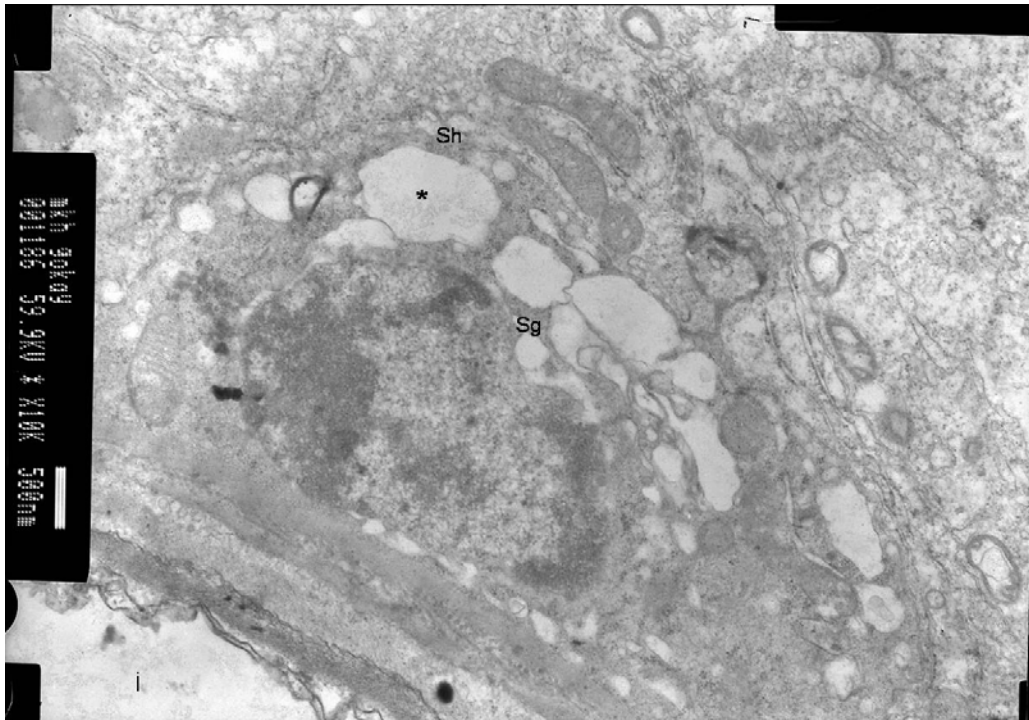
Resim 7. Kontrol Grubu. Elektronmikrograf X3000: İnterstisyel doku (İ), Sertoli hücresi (Sh), spermatogonium (Sg), spermatosit (St), uzamış spermatid (Sd2).

Cerrahi + PBS Grubu Işık Mikroskopik Bulguları: Leydig hücreleri spermatogoniumlar, spermatositler ve spermatidlerde atrofi, bunların nükleuslarında piknozis, peritubuler doku ile Sertoli hücreleri ve spermatogoniumlar arasında açılmalar, germinal hücrelerde eozinofilik dejenerasyon, eozinofil dejenerasyonlu germinal hücrelerin eozinofilik yuvarlak hücre grupları oluşturması, germinal hücre sayıları ve seminifer epitel kat sayısında azalma, tubul lümeninde olgunlaşmasını tamamlamamış, döküntü, germinal hücreler görülmektedir (Resim 8).



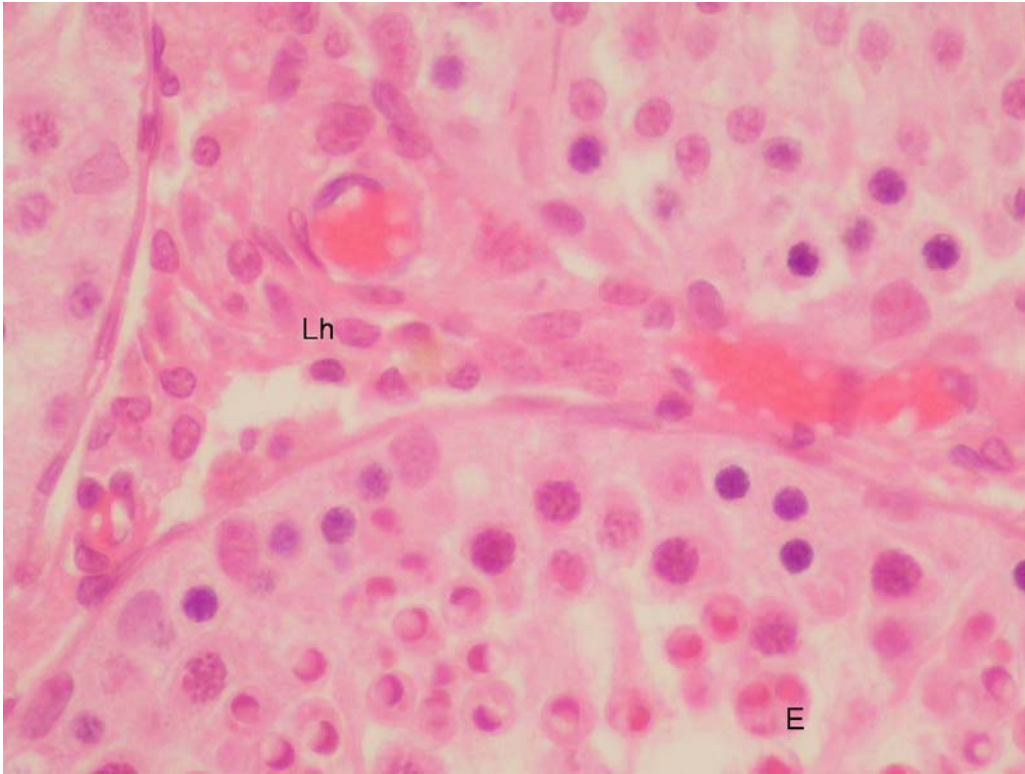
Resim 8. Cerrahi + PBS Grubu. Mikrofotografi X400: Hücreler arası açılma (*), atrofi (→), eozinofilik dejenerasyonlu germinal hücre (E), eozinofilik dejenerasyonlu hücre grupları (EG), lümende olgunlaşmasını tamamlamamış germinal hücreler (=>).

Cerrahi + PBS Grubu Elektron Mikroskopik Bulguları: Spermatogoniumlarda atrofi, bunların nükleuslarında piknozis, spermatogoniumlarla Sertoli hücreleri arasında açılma, Sertoli hücresi sitoplazması içinde bol vakuol oluşumu, lipid ve lipofuksin inklüzyonu izlendi. Mitokondriler uzamış, krista tipli olarak seçildiler (Resim 9).

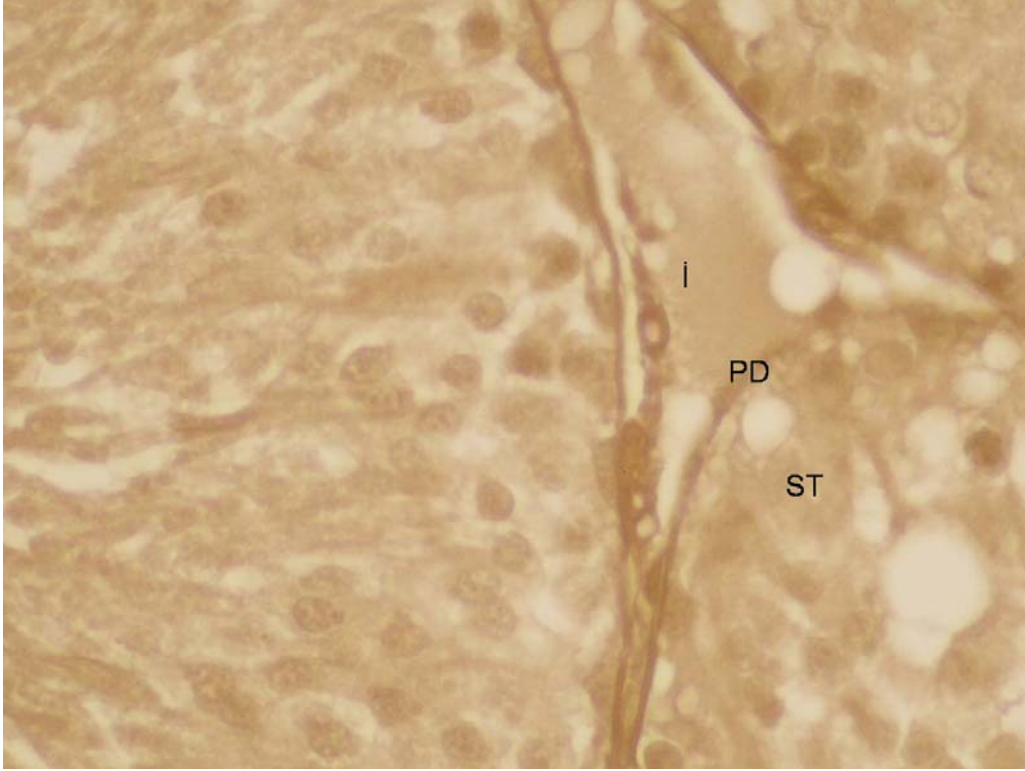


Resim 9. Cerrahi + PBS Grubu. Elektronmikrograf X10.000. Spermatogoniumda (Sg) atrofi, Sertoli hücresi (Sh) ile spermatogoniumlar arasında açılma (*).

Cerrahi + Kök Hücre Grubu Işık Mikroskopik Bulguları: Leydig hücreleri sayılarında artış, bazı spermatogoniumlar, spermatositler ve spermatidlerde bir miktar atrofi, peritubuler doku ile Sertoli hücreleri ve spermatogoniumlar arasında biraz açılma, germinal hücrelerde bir miktar eozinofilik dejenerasyon, tubul lümeninde olgunlaşmasını tamamlamamış germinal hücreler görüldü. Bir çok tubuldeki germinal hücreler ve Leydig hücreleri normale yakın yapıda izlendi (Resim 10, 11). Bazı tubullerde az sayıda eozinofilik dejenerasyonlu germinal hücre grupları oluşumu ve kontrollere göre germinal epitel katında biraz azalma izlendi.

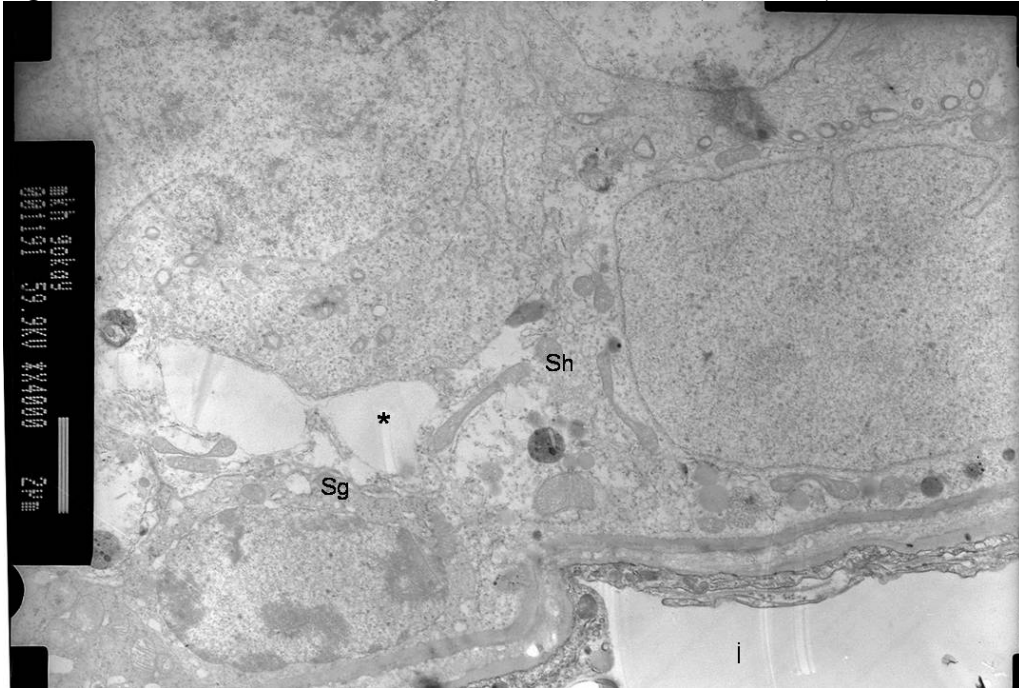


Resim 10. Cerrahi + Kök Hücre Grubu. Mikrofotografı X400: Leydig hücresi (Lh), eozinofilik dejenerasyonlu germinal hücre (E).



Resim 11. Cerrahi + Kök Hücre Grubu. Boya: Verhoeff. Mikrofotografı X400: Peritubuler doku (PD), seminifer tubul (ST) ile interstisyel doku (İ)'yu birbirinden ayırıyor.

Cerrahi + Kök Hücre Grubu Elektron Mikroskopik Bulguları: Sertoli hücresi ile spermatogoniumlar arasında bir miktar açılma izlenmektedir (Resim 12).



Resim 12. Cerrahi + Kök Hücre Grubu. Elektronmikrograf X4000. Sertoli hücresi (Sh) ile spermatogonium (Sg) arasında bir miktar açılma (*).

Gruplara Ait İstatistiksel Bulgular:

	Kontrol Grubu		Cerrahi + PBS Grubu		Cerrahi + Kök Hücre Grubu		p
	Ort	ss	Ort	ss	Ort	ss	
Ağırlık (gr)	260.0	4.6	268.7	5.8	270.7	3.3	0.008
Yem yeme (gr)	383.2	8.5	334.7	6.2	340.7	23.9	0.004
Su içme (ml)	503.7	16.4	491.5	12.9	499.0	15.8	0.445
Dökülme (*)	10.0	1.8	23.7	2.0	9.7	3.1	0.003
Motil sperm (**)	21.8	2.6	8.3	1.4	15.2	2.0	0.001
İmmotil sperm (**)	2.8	1.0	1.7	0.8	2.3	0.5	0.090
Canlı sperm (**)	19.8	2.6	2.2	1.2	6.2	1.2	0.001
Ölü sperm (**)	3.3	1.6	20.0	3.3	20.5	6.8	0.003

Tablo 2: Gruplar arası farklılıkların bazı parametreler açısından karşılaştırılması.

* : Olgunlaşmasını tamamlamamış germinal hücrelerin lümene döküldüğü seminifer tubul sayısı.

** : milyon sperm/ml.

$p < 0.05$ anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

Deney gruplarına ait istatistiksel veriler Tablo 2’de özetlenmiştir. Bu verilere göre;

Üç grup kendi arasında karşılaştırıldığında, ağırlık ($p=0.008$), yem yeme ($p=0.004$), dökülme ($p=0.003$), motil sperm ($p=0.001$), canlı sperm ($p=0.001$), ölü sperm ($p=0.003$) değerleri açısından anlamlı, su içme ($p=0.445$) ve immotil sperm ($p=0.090$) değerleri açısından ise anlamsız bulunmuştur. Anlamlılık $p < 0.05$ /karşılaştırma sayısı olarak belirlenmiştir.

Grupların ikili karşılaştırmalarında, ağırlık açısından, Kontrol Grubuna göre Cerrahi + PBS Grubu ($p=0.016$) ve Cerrahi + Kök Hücre Grubunda ($p=0.005$) anlamlı bir artış bulunmuş, Cerrahi + PBS Grubuna göre Cerrahi + Kök Hücre Grubunda ($p=0.470$) ise bu artış istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.

Sıçanların yedikleri yem miktarı, kontrol grubuna göre, Cerrahi + PBS Grubunda ($p=0.004$) ve Cerrahi + Kök Hücre Grubunda ($p=0.006$) azalmış, Cerrahi + PBS Grubuna göre Cerrahi + Kök Hücre Grubunda ($p=0.423$) ise anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Su içme ve immotil sperm sayısı, üçlü karşılaştırmalarda anlamlı bulunmadığı için bu değerlerin ikili karşılaştırmaları yapılmamıştır.

Kruskal-Wallis testine göre, olgunlaşmasını tamamlamamış germinal hücrelerin lümenine döküldüğü seminifer tubul sayısı, Kontrol Grubuna göre Cerrahi + PBS Grubu ve Cerrahi + PBS Grubuna göre Cerrahi + Kök Hücre Gruplarında ($p=0.004$), anlamlı olarak fazla bulunmuş, kontrol grubu ile Cerrahi + Kök Hücre Grubu ($p=0.624$) karşılaştırıldığında ise fark anlamsız bulunmuştur.

Motil sperm sayısı, kontrol grubuna göre, Cerrahi + PBS Grubunda ($p=0.004$) ve Cerrahi + Kök Hücre Grubunda ($p=0.006$) azalmış, Cerrahi + PBS Grubuna göre Cerrahi + Kök Hücre grubunda ($p=0.004$) ise artmıştır.

Canlı sperm sayısı, Kontrol Grubuna göre, Cerrahi + PBS Grubunda ($p=0.004$) ve Cerrahi + Kök Hücre Grubunda ($p=0.003$) azalmış, Cerrahi + PBS Grubuna göre Cerrahi + Kök Hücre Grubunda ($p=0.004$) ise artmıştır.

Ölü sperm sayısı, Kontrol Grubuna göre, Cerrahi + PBS Grubunda ve Cerrahi + Kök Hücre Grubunda ($p=0.004$) önemli derecede artmış, Cerrahi + PBS Grubuna göre Cerrahi + Kök Hücre Grubunda ($p=0.810$) ise önemli farklılık bulunmamıştır.

5. TARTIŞMA

Testislerin temel fonksiyonu spermatozoon ve testosteron üretmektir (1, 2). Testis fonksiyonları dış etkilere kolaylıkla etkilenmektedir. Bu etkilere biri de ışık periyodudur. Uzun fotoperiyotlar testis fonksiyonlarını artırırken, kısa fotoperiyotlar bu organ fonksiyonlarını azaltmaktadır (54). Araştırmamızda farklı ışık miktarından kaynaklanan gruplar arası herhangi morfolojik değişikliğin olmaması için sıçanların hepsi 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık fotoperiyotlarına tabi tutulmuştur.

Sıçan testislerinde sperm üretimi 75. güne kadar ve testis ağırlığı ise 100. güne kadar giderek artış gösterir. Sıçanların epididimis kuyruğunda ilk spermatozoa bulunduğu zaman, yani sıçanlar 50 günlük olduklarında, erişkin olarak kabul edilirler. (55). Araştırmamızda kullandığımız tüm sıçanlar, sperm üretiminin en fazla olduğu 3 veya 4 aylık erişkin sıçanlar arasından seçildi. Bu şekilde sperm üretimi ve epididimal sperm sayısında yaşa bağlı farklılıkların ortadan kaldırılması amaçlandı.

Yetişkin dokuya-spesifik kök hücreler, fonksiyonel olarak farklılaşmış hücreleri oluşturma kapasitesine sahip hücrelerdir (4). Doku veya organın hasara uğramış kısmının farklılaşmamış kök hücrelerin transplantasyonu ile tamiri çok önemlidir (9). Dokunun histolojik mimarisini ve fonksiyonunu düzeltmek için, dokuya çok çeşitli hücreler yerleştirilir. Pluripotent kök hücrelerin doku yenilenmesi işleminde diğer hücrelere farklılaşabilecekleri ileri sürülmektedir (10). Kök hücreler kendi mikroçevre veya nişleriyle sıkı etkileşim gösterirler ve nişteki anomaliler kendini yenileyebilen dokular ile uyum gösterirler (36). Araştırmamızda MSC'lerin testis hücrelerine farklılaşıp farklılaşmadığına bakılmamış, sadece bu hücrelerin rejenerasyona katkıları değerlendirilmiştir. Bu kök hücrelerin herhangi bir testis hücresine farklılaşıp farklılaşmadıkları ileri araştırmalarla immün işaretleyicilerle işaretlenerek belirlenebilir.

Kök hücreler epitel yenilenmesi, hematopoezis ve spermatogenezis gibi rejenerasyon ile ilgili birçok işlemde yer alırlar (6). Kök hücrelerin en önemli kaynaklarından biri de kemik iliğidir. İlik, bir çok hücre çeşidi ve yoğun ekstraselüler matriksten oluşan üç-boyutlu kompleks bir yapıdır (56). Kemik iliği stromal hücrelerinden biri olan kök hücreleri, doku kültür plastiklerine yapışma eğilimleriyle ilikteki diğer hücrelerden ayrılabilir (7). Bu hücreler dokulara özgü kök hücrelerin bir çok özelliklerini taşıdıklarından mezenşimal olarak tanımlanmaktadırlar (7). Bunlar kültürlerde, osteoblastlara, kondrositlere, adipositlere,

myoblastlara (7, 8), tendon ve ilik stromasını içeren mezenşimal dokulara farklılaşma potansiyelinde olan multipotent hücrelerdir (8). Hücre ve gen tedavisi için, kök hücreleri potansiyel olarak kullanışlı yapan bir çok özellikleri vardır (7). Testis ağ enjeksiyon ile ksenogenetik fare testisine fare kemik iliği MSC nakli yapılmış, herhangi bir immünoreaksiyon olmamış ve MSC'ler nakil sonrası canlı kalmışlardır. Araştırmacılar bu yöntemin etkili ve geçerli bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. (53). Bizim çalışmamızda da sıçan kemik iliğinden alınıp in vitro olarak çoğaltılan MSC'ler belli yoğunluğa ulaştıktan sonra aspirasyon travması oluşturulmuş testise ağ enjeksiyonu yöntemiyle verilmiş ve bunların testiste travma sonrası rejenerasyonu hızlandırdığı belirlenmiştir.

Mekanik, enfeksiyöz veya kan-testis bariyerinin bozulmasına yol açan travma (57) ve bazı tek taraflı testis lezyonları, spermatogenezi bozarak infertiliteye sebep olmaktadır. Bu lezyonlarda dejeneratif değişikliklerden sorumlu olan hücresel mekanizma henüz belli değildir (58). Araştırmamızda tek taraflı olarak yapılan aspirasyon biyopsisi sırasında oluşan testis travması, belirgin testis lezyonlarına neden olmuştur. Bu lezyonlardan en önemlisi eozinofil dejenerasyonlu germinal hücrelerin büyük, yuvarlak eozinofilik gruplar oluşturmasıdır. Testis aspirasyonu sırasında oluşan negatif basınç, testiste bir travmaya neden olabilir. Testiste oluşan dejeneratif değişiklikler bu travma sonucu oluşmuş olabilir.

Tek taraflı travma sonrası testiste, histolojik olarak, spesifik olmayan inflamasyon, seminifer tubullerde küçülme, spermatogenez ve fertilitede bozulma izlenmiş, karşı testis ise normal bulunmuştur (59). Testis rejenerasyonunun stimülasyonu ile testis travması sonrası spermatogenezin korunmasının gerçekleşebileceği bildirilmiştir (57). Bizim çalışmamızda tek taraflı aspirasyon biyopsisi sonrası oluşan histolojik bozukluklar, kök hücrelerin bu aspirasyonlu kısma enjeksiyonu ile bir miktar düzelmiştir. Burada kök hücre, operasyon yapılan testiste rejenerasyonu stimüle ederek aspirasyon sonucu oluşan travmatik bozuklukları belli ölçüde düzeltmiştir.

Geçici iskemi, geminal epitelde bir çok spesifik hücre tipinin ölümüyle sonuçlanan harabiyete yol açar. Etkilenen en genç hücre, mitoz geçirmekte olan tip A spermatogoniumdur (60). Bu araştırmada, Cerrahi + PBS Grubunda spermatogoniumlarda daha ileri derecede atrofi izlendi. Cerrahi operasyon nedeniyle testiste geçici bir iskemi olması ve bu iskemiden en çok spermatogoniumların etkilenmesi doğaldır. Spermatogoniumlar kan-testis bariyerinden önceki, kan-testis bariyerinin koruyuculuğu dışında, yani bazal kompartmanda yer alan germinal hücreler oldukları için kanın ilk ve doğrudan ulaştığı germinal hücrelerdir. Spermatozitler ve spermatidler kan testis bariyerinden sonraki hücreler oldukları için iskemi

nedeniyle kandan gelen zararlı maddeler, besin maddeleri ve oksijenin doğrudan bu hücrelere ulaşmaları mümkün değildir. Ancak bunlar spermatogoniumların bölünmeleri sonucu oluştukları için spermatogoniumlar üzerine olan dejeneratif etkiler, lümenaltı kopartmandaki diğer germinal hücreleri de etkilemektedir. Bu nedenle spermatogoniumların diğer germinal hücrelerden daha fazla etkilenmesi söz konusudur. Cerrahi + PBS Grubunda spermatogoniumlardaki atrofi yanında, özellikle spermatidlerde eozinofilik dejenerasyon oluşmuş ve bu dejenerasyon daha ileri şekilde eozinofilik dejenerasyonlu hücre grupları şeklinde kendini göstermiştir. Cerrahi + Kök Hücre Grubunda ise bu dejeneratif değişikliklere daha az oranda rastlanmıştır.

Önemli bir değerlendirme aracı olan testis biyopsisi (11, 12, 13, 14) tek taraflı inmemiş testis modelinde yapılmış, fertilizasyonu etkilemeden sınırlı histolojik değişikliklere sebep olmuştur (14). Olgunluk öncesi yapılan testis biyopsisi, erişkin farelerde, spermatogenezi, üretkenliği ve yavru sahibi olmayı etkilememiştir (16). Geleneksel çoklu biyopsi uygulaması ve mikrodiseksiyon tekniği kullanılarak testiküler sperm alınması gerçekleştirilmektedir (13, 15). Mikrodiseksiyon prosedürü nispeten konvansiyonel teknikten daha güvenli ve non-obstrüktif azoospermili hastalarda sperm iyileşme oranını önemli derecede geliştirmektedir (13). Spermatozoonları bulmak için daha büyük miktarlarda doku alınması gerektiği durumlarda bile, mikrocerrahi yöntemi kan akımını koruyup ağrı ve testis basıncı artışından kaynaklanan atrofiyi önleyerek sekonder testis harabiyetini engellemektedir (61). Araştırmamızda özellikle testis travması oluşturmak amacıyla mikrocerrahi biyopsisi yerine aspirasyon biyopsisini tercih ettik. Bu uygulamadaki asıl amacımız aspirasyonla oluşturulan travmatik etki ile kök hücrelerin bu etkiye karşı rejeneratif etkilerinin bulunup bulunmadığını araştırmaktır. Bu yöntemle sadece aspirasyon biyopsisi yapıp PBS verilen sıçanların testislerinde belirgin histolojik bozukluklar izledik. Aspirasyon biyopsisine ek olarak kök hücre verdiğimiz grupta, testisteki bu bozuklukların bir miktar düzeldiğini belirledik.

İstatistiksel veriler, olgunlaşmasını tamamlamamış germinal hücrelerin seminifer tubul lümenine dökülme sıklığının, kontrol grubuna göre, cerrahi + PBS grubunda arttığını, cerrahi + PBS grubuna göre cerrahi + kök hücre grubunda ise azaldığını; ölü sperm sayısının, kontrol grubuna göre, cerrahi + PBS grubu ve cerrahi + kök hücre gruplarında arttığını, cerrahi + PBS grubuna göre cerrahi + kök hücre grubunda ise önemli farklılık olmadığını göstermektedir. Bu bize cerrahi operasyonun, olgunlaşmasını tamamlamamış germinal hücrelerin seminifer tubul lümenine dökülmesini hızlandırdığını, kök hücrelerin muhtemelen rejenerasyonu

hızlandırarak bu dökülmeyi azalttığını, ancak bu hücrelerin epididimdeki ölü sperm miktarını azaltmadığını göstermektedir. Bu çalışmada motil sperm sayısı ile canlı sperm sayısı, kontrol grubuna göre, cerrahi + PBS grubunda ve cerrahi + kök hücre grubunda azalmış, cerrahi + PBS grubuna göre cerrahi + kök hücre grubunda ise artmıştır. Bu sonuçlar, kök hücrelerin epididimal sperm motilitelerini de artırdığını göstermektedir.

Testiste meydana gelen fizyolojik apoptozis, bu dokunun olgunlaşması için gereklidir. Bu yüzden, apoptotik dalganın inhibisyonu, spermatogoniumlarda toplanma ve daha sonraki yaşamda kısırlığa neden olmaktadır (62). Isı, spermatogenetik hücrelerin apoptozunu artırır. Isıya en hassas hücre de spermatositlerdir (63). Bu çalışmada testis aspirasyonundan sonra, belli ölçüde kan akımı engellendiği için fizyolojik apoptoza ilaveten testis içi ısısının artması ve iskemiden kaynaklanan apoptoz da beklenebilir. Bu nedenle daha ileri araştırmalarla apoptotik değerlerin de değerlendirilmesi çalışmaya katkı sağlayacaktır.

Azoospermik matürasyon bozukluğu, spermiogenezden ziyade mayozda daha çok izlenmiştir (64). Bizim çalışmamızda da matürasyon bozuklukları izlenmiş ve bu bozukluklar daha çok spermiogenez aşamasında görülmüştür. Ancak bu bozukluklar azoospermiye neden olmamıştır.

Bulgularımız, testis aspirasyon biyopsisinden sonra, testiste germinal hücrelerin dejenerasyonunu ve olgunlaşmış germinal hücrelerin seminifer tubul lümenine dökülmesinin arttığını, bu biyopsiden sonra testise verilen kemik iliği mezenşimal kök hücrelerinin bu bozuklukları belli ölçüde düzelterek epididimal sperm motilitelerini artırdığını göstermektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın sonuçları aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

1-Kemik iliği kökenli mezenşimal kök hücreler, kültürde nükleolusları belirgin ve girintili-çıkıntılı ökromatik nükleusa sahip, çok sayıda uzun uzantıları ile birbirleriyle anastomozlar yapan, flask iç yüzeyine yapışan ve yoğunlaştıklarında fuziform şekilli hücrelerdir.

2-Cerrahi + PBS Grubunda Leydig hücreleri spermatogoniumlar, spermatositler ve spermatidlerde atrofi, bunların nükleuslarında piknozis, peritubuler doku ile Sertoli hücreleri ve spermatogoniumlar arasında açılmalar, Sertoli hücresi sitoplazmasında, vakuol ve lipofuksin oluşumu, germinal hücrelerde eozinofilik dejenerasyon, eozinofil dejenerasyonlu germinal hücrelerin eozinofilik yuvarlak hücre grupları oluşturması, germinal hücre sayıları ve seminifer epitel kat sayısında azalma, tubul lümeninde olgunlaşmasını tamamlamamış germinal hücreler görülmüştür

3-Cerrahi + Kök Hücre Grubunda Leydig hücreleri sayılarında artış, bazı spermatogoniumlar, spermatositler ve spermatidlerde bir miktar atrofi, peritubuler doku ile Sertoli hücreleri ve spermatogoniumlar arasında biraz açılma, germinal hücrelerde bir miktar eozinofilik dejenerasyon, tubul lümeninde olgunlaşmasını tamamlamamış germinal hücreler görüldü. Bir çok tubuldeki germinal hücreler ve Leydig hücreleri normale yakın yapıda izlendi

4-İstatistiksel veriler, olgunlaşmasını tamamlamamış germinal hücrelerin seminifer tubul lümenine dökülme sıklığının Cerrahi + PBS Grubunda arttığını, Cerrahi + PBS Grubuna göre Cerrahi + Kök Hücre Grubunda ise azaldığını; epididimal ölü sperm sayısının Cerrahi + PBS Grubunda ve Cerrahi + Kök Hücre Grubunda arttığını göstermektedir.

5- Bu çalışmada motil sperm sayısı ile canlı sperm sayısı, Cerrahi + PBS ve Cerrahi + Kök Hücre Gruplarında azalmış, bu değerler Cerrahi + PBS Grubuna göre Cerrahi + Kök Hücre Grubunda ise artmıştır.

Bu araştırma kök hücrelerin aspirasyon biyopsisi sonrası, testiste rejenerasyonu hızlandırarak iyileştirici etki yaptığını göstermektedir. Ancak bu verilerin uygulamada kullanılması için konunun daha ileri ve daha çok sayıda çalışmalarla desteklenmesi gerektiğine inanıyoruz.

9. KAYNAKLAR

- 1-Young B, Heath JW, Stevens A, Lowe JS, Deakin PJ. Wheater's Functional Histology. A Text and Color Atlas. p. 328-336. Churchill Livingstone, Edinburgh, 2000.
- 2-Janqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji (Basic Histology, 10th Edition, 2003. Çev. Ed. Aytekin Y, Solakoğlu S) s. 431-442, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2006.
- 3-Maclean JA 2nd, Wilkinson MF. Gene regulation in spermatogenesis. Curr Top Dev Biol. 2005;71:131-97.
- 4-Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. Annu Rev Cell Dev Biol. 2005;21:605-31.
- 5-Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Iwano T, Lee J, Kazuki Y, Inoue K, Miki H, Takehashi M, Toyokuni S, Shinkai Y, Oshimura M, Ishino F, Ogura A, Shinohara T. Genetic and epigenetic properties of mouse male germline stem cells during long-term culture. Development. 2005 Sep;132(18):4155-63.
- 6-Orwig KE, Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. Functional analysis of stem cells in the adult rat testis. Biol Reprod. 2002, 66(4): 944-9.
- 7-Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science. 1997 Apr 4;276(5309):71-4.
- 8-Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
- 9-Kroupova J, Horak D, Pachernik J, Dvorak P, Slouf M. Functional polymer hydrogels for embryonic stem cell support. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2006 Feb;76(2):315-25.
- 10-Young HE, Duplaa C, Romero-Ramos M et al. Adult reserve stem cells and their potential

for tissue engineering. *Cell Biochem Biophys*. 2004; 40(1):1–80.

11-Purohit TM, Purohit MB, Dabhi BJ.: Study of semen analysis and testicular biopsy in infertile male. *Indian J Pathol Microbiol*. 2004, 47(4):486-90.

12- Aridogan IA, Bayazit Y, Yaman M, Ersoz C, Doran S. Comparison of fine-needle aspiration and open biopsy of testis in sperm retrieval and histopathologic diagnosis. *Andrologia*. 2003 Apr;35(2):121-5.

13-Ramasamy R, Yagan N, Schlegel PN. Structural and functional changes to the testis after conventional versus microdissection testicular sperm extraction. *Urology*. 2005 Jun;65(6):1190-4.

14-Iskit SH, Tugtepe H, Tugay M, Kiyan G, Kotiloglu E, Dagli TE. Testicular biopsy during orchidopexy procedure: does it have an adverse effect on fertility? *Urol Int*. 2005;75(3):227-30.

15-Schlegel PN. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Hum Reprod*. 1999 Jan;14(1):131-5.

16-Nakane A, Kojima Y, Hayashi Y, Kurokawa S, Mizuno K, Kohri K. Effect of testicular biopsy in childhood on spermatogenesis, fertility, and paternity in adulthood--a mouse model study. *Urology*. 2005 Sep;66(3):682-6.

17-Moore KL, Persaud TVN. *The Developing Human*. Fifth edition. p. 281-301. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1993.

18-England MA, Waddell H. *Life Before Birth*. Second Edition. p.166-170, Mosby Wolf, London, 1996.

19-Taketo-Hosotani T, Merchant-Larios H, Thau RB, Koide SS. Testicular cell differentiation in fetal mouse ovaries following transplantation into adult male mice. *J Exp Zool*. 1985 Nov;236(2):229-37.

20-Jost A, Magre S. Control mechanisms of testicular differentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1988 Dec 1;322(1208):55-61.

21-Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, Fellous M. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature.* 1990 Nov 29;348(6300):448-50.

22-Mittwoch U. Sex determination and sex reversal: genotype, phenotype, dogma and semantics. *Hum Genet.* 1992 Jul;89(5):467-79.

23-von Schalburg KR, McCarthy SP, Rise ML, Hutson JC, Davidson WS, Koop BF. Expression of morphogenic genes in mature ovarian and testicular tissues: Potential stem-cell niche markers and patterning factors. *Mol Reprod Dev.* 2006 Feb;73(2):142-52.

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

25-Ishii T, Matsuki S, Iuchi Y, Okada F, Toyosaki S, Tomita Y, Ikeda Y, Fujii J. Accelerated impairment of spermatogenic cells in SOD1-knockout mice under heat stress. *Free Radic Res.* 2005 Jul;39(7):697-705.

26-Hermo L, Dworkin J. Transitional cells at the junction of seminiferous tubules with the rete testis of the rat: their fine structure, endocytic activity, and basement membrane. *Am J Anat.* 1988 Feb;181(2):111-31.

27-Richardson LL, Kleinman HK, Dym M. Altered basement membrane synthesis in the testis after tissue injury. *J Androl.* 1998 Mar-Apr;19(2):145-55.

28-Sawada H, Esaki M. Electron microscopic observation of ¹³⁷Cs-irradiated rat testis: production of basal laminae for germ cells, despite their absence. *J Electron Microsc (Tokyo).* 2003;52(4):391-7.

29-Chen C, Ouyang W, Grigura V, Zhou Q, Carnes K, Lim H, Zhao GQ, Arber S, Kurpios N, Murphy TL, Cheng AM, Hassell JA, Chandrashekar V, Hofmann MC, Hess RA, Murphy KM. ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche.

Nature. 2005 Aug 18;436(7053):1030-4.

30-Ohta H, Aizawa S, Nishimune Y. Functional analysis of the p53 gene in apoptosis induced by heat stress or loss of stem cell factor signaling in mouse male germ cells. *Biol Reprod*. 2003 Jun;68(6):2249-54. Epub 2003 Jan 22.

31-Huckins C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *Anat Rec*. 1971 Mar;169(3):533-57.

32-Ryu BY, Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 4;102(40):14302-7. Epub 2005 Sep 23.

33- Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov 23;101(47):16489-94.

34-Jiang FX. Behaviour of spermatogonia following recovery from busulfan treatment in the rat. *Anat Embryol (Berl)*. 1998 Jul;198(1):53-61.

35-van Pelt AM, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS et al: Establishment of cell lines with rat spermatogonial stem cell characteristics. *Endocrinology*. 2002, 143(5):1845–50.

36-Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, Ogonuki N, Toyokuni S, Ogura A, Shinohara T. Germline niche transplantation restores fertility in infertile mice. *Hum Reprod*. 2005 Sep;20(9):2376-82.

37-Zhang X, Ebata KT, Robaire B, Nagano MC. Aging of male germ line stem cells in mice. *Biol Reprod*. 2006 Jan;74(1):119-24.

38-Dobrinski I. Germ cell transplantation. *Semin Reprod Med*. 2005 Aug;23(3):257-65.

- 39-Dobrinski I. Germ cell transplantation and testis tissue xenografting in domestic animals. *Anim Reprod Sci.* 2005 Oct;89(1-4):137-45.
- 40-Chiarini-Garcia H, Raymer AM, Russell LD. Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reproduction.* 2003 Nov;126(5):669-80.
- 41- Pineau C, Velez de la Calle JF, Pinon-Lataillade G, Jegou B. Assessment of testicular function after acute and chronic irradiation: further evidence for an influence of late spermatids on Sertoli cell function in the adult rat. *Endocrinology.* 1989 Jun;124(6):2720-8.
- 42-Meng J, Holdcraft RW, Shima JE, Griswold MD, Braun RE. Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Nov 15;102(46):16696-700.
- 43-Wiebe JP, Kowalik A, Gallardi RL, Egeler O, Clubb BH. Glycerol disrupts tight junction-associated actin microfilaments, occludin, and microtubules in Sertoli cells. *J Androl.* 2000 Sep-Oct;21(5):625-35.
- 44-Itoh M, Terayama H, Naito M, Ogawa Y, Tainosho S. Tissue microcircumstances for leukocytic infiltration into the testis and epididymis in mice. *J Reprod Immunol.* 2005 Oct;67(1-2):57-67.
- 45-Lui WY, Mruk DD, Cheng CY. Interactions among IQGAP1, Cdc42, and the cadherin/catenin protein complex regulate Sertoli-germ cell adherens junction dynamics in the testis. *J Cell Physiol.* 2005 Jan;202(1):49-66.
- 46-Guttman JA, Takai Y, Vogl AW. Evidence that tubulobulbar complexes in the seminiferous epithelium are involved with internalization of adhesion junctions. *Biol Reprod.* 2004 Aug;71(2):548-59.
- 47-Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL. Restoration of spermatogenesis in infertile mice by Sertoli cell transplantation. *Biol Reprod.* 2003 Mar;68(3):1064-71.

- 48-Boekelheide K, Fleming SL, Johnson KJ, Patel SR, Schoenfeld HA. Role of Sertoli cells in injury-associated testicular germ cell apoptosis. *Proc Soc Exp Biol Med*. 2000 Nov;225(2):105-15.
- 49-Nakagawa A, Shiratsuchi A, Tsuda K, Nakanishi Y. In vivo analysis of phagocytosis of apoptotic cells by testicular Sertoli cells. *Mol Reprod Dev*. 2005 Jun;71(2):166-77.
- 50-Hansson V, Ritzen EM, French FS. Androgen transport mechanisms in the testis and epididymis. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)*. 1974;191:191-8.
- 51-Zirkin BR, Santulli R, Awoniyi CA, Ewing LL. Maintenance of advanced spermatogenic cells in the adult rat testis: quantitative relationship to testosterone concentration within the testis. *Endocrinology*. 1989 Jun;124(6):3043-9.
- 52-Bryniarski K, Szczepanik M, Ptak M, Ptak W. Modulation of testicular macrophage activity by collagenase. *Folia Histochem Cytobiol*. 2005;43(1):37-41.
- 53-Liu FH, Yang DZ, Wang YF, Liang XP, Peng WM, Cao CA, Li Q, Ma Y, Chen XG, Guo ZM. Transplantation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells into the xenogeneic testis *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2005 Jul;11(7):499-502.
- 54-Kus I, Songur A, Ozogul C, Kavakli A, Zararsiz I, Sarsilmaz M Effects of photoperiod on the ultrastructure of Leydig cells in rat. *Arch Androl*. 2004 May-Jun;50(3):193-200.
- 55-Robb GW, Amann RP, Killian GJ. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fertil*. 1978 Sep;54(1):103-7.
- 56-Clark BR, Keating A. Biology of bone marrow stroma. *Ann N Y Acad Sci*. 1995 Dec 29;770:70-8.
- 57-Bozhedomov VA, Teodorovich OV. Epidemiology and causes of autoimmune male infertility *Urologiia*. 2005 Jan-Feb;(1):35-44.

58-Paredes Esteban RM, Ramirez Chamond R, Carracedo Anon J, Rodriguez Portillo M, Garrido Perez JI, Ocana Losa JM, Pizarro de Celis F. Apoptosis of the contralateral testis after unilateral testicular injury. Experimental study. *Cir Pediatr*. 2000 Jan;13(1):3-6.

59-Shaul DB, Xie HW, Diaz JF, Mahnovski V, Hardy BE. Surgical treatment of testicular trauma: effects on fertility and testicular histology. *J Pediatr Surg*. 1997 Jan;32(1):84-7.

60-Steinberger E, Tjioe DY. Spermatogenesis in rat testes after experimental ischemia. *Fertil Steril*. 1969 Jul-Aug;20(4):639-49.

61-Silber SJ. Microsurgical TESE and the distribution of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod*. 2000 Nov;15(11):2278-84.

62-Jahnukainen K, Chrysis D, Hou M, Parvinen M, Eksborg S, Soder O. Increased apoptosis occurring during the first wave of spermatogenesis is stage-specific and primarily affects midpachytene spermatocytes in the rat testis. *Biol Reprod*. 2004 Feb;70(2):290-6.

63-Xu D, Qin DN, Wang Y, Zhuang CX, Li WQ. Effect of local testicular heating on spermatogenic cell apoptosis in rat. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2003 Jun;9(3):170-4.

64-Silber SJ, van Steirteghem A, Nagy Z, Liu J, Tournaye H, Devroey P. Normal pregnancies resulting from testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection for azoospermia due to maturation arrest. *Fertil Steril*. 1996 Jul;66(1):110-7.