

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDINASYON BİRİMİ KOORDİNATÖRLÜĞÜNE

Proje Türü : Lisansüstü Tez Projesi (Doktora)
Proje No : 15L0230006
Proje Yöneticisi : Prof. Dr. Özgür Çınar
Proje Başlığı : Testiküler Sperm Ekstraksiyon (TESE) sonrası seminifer tübülüslerde spermatogenik hücre varlığının araştırılması

Yukarıda bilgileri yazılı olan projemin sonuç raporunun e-kütüphanede yayınlanmasını;

STAYORUM

STEM YORUM GEREKÇES

..... / / 20
Prof. Dr. Özgür Çınar

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
SONUÇ RAPORU**

Testiküler Sperm Ekstraksiyon (TESE) sonrası seminifer tübülüslerde spermatogenik hücre varlığının araştırılması

Prof. Dr. Özgür Çınar

Doktora Öğrencisi Masoud Afshani Uzm. Dr. Skender Kaplanoğlu

15L0230006

28.05.2015 - 28.11.2016

22.02.2017

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Ankara - 2017

I. Projenin Türkçe ve İngilizce Adı ve Özetleri

Türkçe Adı : Testiküler Sperm Ekstraksiyon (TESE) sonrası seminifer tübülüslerde spermatogenik hücre varlığının araştırılması

İngilizce Adı : Investigation of presence of spermatogenic cells in post Testicular Sperm Extraction (TESE) material

Spermatozoonlar seminifer tübülüslerde öncül hücreleri olan spermatogonyum adı verilen kök hücrelerden, spermatogenez olarak adlandırılan bir sürecin sonunda olurlar. Spermatogonyumlardan primer spermatositler ve bunlardan birbirini izleyen iki mayoz bölünme sonucunda da spermatit oluşur. Bu hücreler spermiyogenez adı verilen bir dizi değişim sonucu olgun spermatozoon haline gelir. Bu değişim boyunca, farklı olgunlaşma aşamalarına özgün çeşitli proteinlerin ekspresyonları da izlenebilmektedir. Bu proteinler seminifer tübülüslerdeki spermatogenik kök hücrelerin varlığının saptanmasına ve farklanmasının izlenmesinde kullanılabilir.

Azoospermi olguları erkek infertilitesinin %10-15'ini ve dolayısıyla tüm infertilite olgularının %1'ini oluşturmaktadır. Azoospermiye bağlı infertilite olgularında spermatozoon, TESE (Testiküler Sperm Ekstraksiyonu) işlemi sonrasında elde edilmektedir. TESE işleminden sonra artı kalan seminifer tübülüs parçaları ise usulüne uygun bir şekilde atılmaktadır.

Bu çalışmada, azospermik olgulara uygulanan TESE işlemi sonrasında atılacak olan seminifer tübülüslerde, spermatogenik seriye ait hücrelerin kalıp kalmadığının gösterilmesi amaçlandı ve bu doğrultuda spermatogenik kök hücrelere ait belirteçler olan Anti-DDX4, Anti-MAGEA4, Anti-SSEA4 ve Anti-OCT4 immünohistokimya ve immünfluoresan yöntemleriyle araştırılıp değerlendirildi. Yapılan incelemeler sonucunda çeşitli olgunlaşma aşamalarında spermatozoon öncülü hücrelerin bu atılan dokular içinde kaldığı gösterildi.

Yapılan bu proje, i) zaten kısıtlı sayıda bulunan bu önemli hücrelerin, rutin uygulamalarla TESE işlemi sonrası kalan dokunun atılması nedeniyle kaybedildiğini, ii) bu hücrelerin toplanıp dondurulması ve/veya olgunlaştırılmasını konu edecek başka çalışmalara yol gösterici olması bakımından büyük önem taşımaktadır.

ABSTRACT

Spermatozoa consist of spermatogonial stem cells inside the seminiferous tubules via a process known as spermatogenesis. These precursor cells turn to spermatogonia after puberty and subsequently change to primary spermatocyte, secondary spermatocyte and then round spermatid, respectively. Eventually, spermatid turn into the mature spermatozoon with a process called spermiogenesis. During these changes, stage specific protein expressions can be detected. These proteins can be used to distinguish the presence and monitoring the differentiation process from spermatogonial stem cells to spermatozoa.

Spermatozoa in patients with azoospermia can be collected via TESE (Testicular Sperm Extraction) a method based on the collecting these cells after a surgical technique. After this procedure the remaining parts of the seminiferous tubules are routinely discarded.

The aim of this study is to detect and monitor spermatogenic cells by applying spermatogonial stem cell markers including Anti-DDX4, Anti-MAGEA4, Anti-SSEA4 and Anti-OCT4 with immunohistochemistry and/or immunofluorescence to identify and characterize the potential presence of spermatogonial stem cells in post TESE seminiferous tubules from azospermic patients. We found that spermatogenic cells have been discarded during this routine application.

This project has a great importance since i) it is underlying the lose of these precious cells during routine TESE applications, ii) it shows the necessity of advance studies focusing on the establishment of methods to obtain, freeze and

mature those cells for further treatment applications.

II. Amaç ve Kapsam

Spermatozoon ve oosit, insan ve di er memelilerde üreme ve fertilizasyon için gerekli üreme (germ) hücrelerdir ve bu hücrelerin yokluğu veya yetersizliği infertiliteye yol açmaktadır. Çalışmalarla göre insanlarda infertilite, çiftlerin %10-15'ini etkilemektedir ve erkek bireye bağlı infertilite bu oranın yaklaşık %40'ını oluşturmaktadır (Hessel, Ramos et al. 2013, Hou, Yang et al. 2014). Azoospermi olguları erkek infertilite vakalarının %10-15'ini ve tüm infertilite olgularının %1'ine karşılık gelmektedir.

Günümüzde doğ al nedenlerden dolayı infertil olan olguların yanı sıra kanser gibi bazı hastalıkların tedavi sürecinde de üreme hücreleri hasar görüp infertiliteye neden olmaktadır (Goharbaksh, Mohazzab et al. 2013). Azoospermi olgularında sperm hücreleri cerrahi bir yöntem ile seminifer tübüllerin elde edilmesi ve laboratuvara transferi sonrasında yapılan seminifer tübüllden sperm hücrelerinin dı arı alınması (ekstraksiyonu) işlemi ile elde edilebilmektedir. Bu süreç testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) olarak isimlendirilmektedir.

Spermatogonial kök hücreler, erkek bireyin hayatı boyunca, kendilerini yenileme yeteneğine sahip olup spermatozoon üretiminden sorumludur. Başka bir deyişle spermatogenezisin temelini oluşturan hücrelerdir. İnsan testis dokusunun histolojik ve ince yapı incelemelerinde seminifer tübülüslerin bazalinde iki tür farklılaşmamış spermatogonium hücresi bulunduğu izlenir ve bu hücreler A koyu ve A soluk spermatogonium olarak adlandırılır. Bu hücrelerden A koyu spermatogonium nadiren bölünür ve kök hücre özelliğini taşır; A soluk spermatogonium öncü hücre olarak görev alır ve spermatogenezisi başlatır (Izadyar, Wong et al. 2011). Daha sonra normal spermatogenezde spermatogonium, primer spermatosit (diploiddir) ve bu da mayoz bölünmenin ikinci aşamasından sonra haploid spermatide dönüşür ve bu hücreler spermiyogenezis evresinden sonra olgun spermatozoonlara farklılaşırlar. İnsan testis dokusunda bulunan spermatogonial kök hücrelerin fenotipik ve moleküler özellikleri ortaya konulmaya başlanmıştır (Hua, Pan et al. 2009). Bu doğrultuda; testis dokusundan spermatogonial kök hücre ayrıştırılması fiziksel ve mekanik parçalamanın yanı sıra enzimatik sindirme ve daha sonra FACS, MACS ve/veya FlowCytometry gibi farklı yöntemlerle yapılabilmektedir (Hanna et al. 2014). Çalışmalarda spermatogonial kök hücre belirteçleri olarak UTF1, DDX4, OCT3/4, CD49f, CD133, GFR-1, GPR-125, MAGE-A4, PLZF, SSEA-4 ve CD90 gibi bir takım proteinlerin varlığı rapor edilmiştir (Kossack, Terwort et al. 2013, West, Shirazi et al. 2013).

TESE uygulamasında seminifer tübülüslerden sperm hücreleri ayrıştırılmakta ve sonrasında in vitro fertilizasyon uygulamalarında kullanılmaktadır. Öte yandan kalan seminifer tübülüsler usulüne uygun olarak atılmaktadır. Bununla birlikte bu atılan seminifer tübülüslerde spermatogenik seri hücrelerinin kalıyor olması ve dolayısıyla seminifer tübülüslerle beraber atılıyor olması çok olasıdır.

Bir doktora tezi projesi olan bu çalışmada amaç, azoospermi tanısı alarak yardımla üreme tedavileri uygulanan çiftlerden, erkek hastalara uygulanan TESE işlemi sonrası arta kalan dokuda spermatogonial kök hücre ve spermatozoon öncü hücrelerinin varlığının araştırılmasıdır.

Bu doğrultuda; spermatozoon çıkmış ve çıkmamış TESE sonrası kalan ve atılacak olan seminifer tübülüsler, alınarak uygun tespit solüsyonlarıyla fikse edildi ve ardından MAGE-A4, DDX4, OCT3/4, SSEA-4 gibi spermatogonial kök hücre belirteçleri kullanılarak, bu kalan dokuda spermatogenetik hücrelerin kalıp kalmadığı, kalanların miktar ve dağılımı ve erkek infertilitesiyle ilişkisi araştırıldı.

Çalışmamızda T.C. Sağlık Bakanlığı Etlik Zübeyde Hanım Kadın Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Yardımla Üreme Tedavileri Merkezinden, TESE işlemi sonrası arta kalan atılacak materyaller alınıp ayrıntılı sunulan yöntemlerle spermatogenik hücre varlığı bakımından değerlendirilirken; bu olgularla ilişkili hastaların demografik verileriyle, oosit sayısı, fertilizasyon oranı ve gebelik oranı verileri ilgili merkez tarafından sağlandı. Histolojik de erlendirmelerle bu olgularla ilişkili klinik çıktıların karşılaştırılması bu projenin kapsamı olarak ele alındı.

III. Materyal ve Yöntem

Kullanılan Dokuların Elde Edilmesi

Bu çalışmada, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 28.08.2014 tarih ve 13-582-14 karar numaralı onayı ve T.C. Sağlık Bakanlığı Etlik Zübeyde Hanım Kadın Hastalıkları Eritim ve Araştırma Hastanesi Eritim Planlama ve Koordinasyon Başkanlığı'nın 17.09.2015 tarih ve 199 karar numaralı onayı alındıktan sonra gerçekleştirilmiştir.

Bu araştırma için Etlik Zübeyde Hanım Kadın Hastalıkları Eritim ve Araştırma Hastanesi Infertilite Merkezine müracaat eden 18-45 yaş arasında, azoospermi tanısı almış, ilk kez TESE yapılan ve bilinen herhangi bir sistemik ve/veya tanı almış kan yoluyla bulaşan bir hastalığı olmayan olgular çalışmaya alındı. TESE işlemi sonrası arta kalan ve atılacak olan materyal, en az 10 katı hacimde, % 10'luk tamponlu formalin içinde 24-72 saat süreyle tespit edildi ve daha sonra ileri araştırmaları için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji anabilim dalı laboratuvarlarına taşındı.

İlk Mikroskopik (IM) incelemeler için Yapılan Çalışmalar

%10'luk Tamponlu Formalin için Uygulanan Takip Protokolü

Fiksasyonu takiben dokular rutin uygulama prosedürü çerçevesinde artan deri imlerde etanollerde tutulup sonrasında ksilol ile effaflandırdı ve ardından iki deri im sıvı parafinle 60 °C'lik etüvde 3 saat inkübe edildi. Sıvı parafin infiltrasyonundan sonra doku örnekleri sert parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklar buzdolabında (+4 °C) kesit alınana kadar bekletildi. Kesit işlemine başlamadan önce -20 °C'ye alınan bloklardan Leica RM 2125RT model sliding mikrotom ile 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Sıcak su banyosundan lam üzerine alınan kesitler 60 °C'lik etüvde 1 gece bekletildi. Daha sonra preparatlar 1 gece 60 °C sıcaklıkta olan ksilol'de ve en az 3 saat soğuk ksilol'de bekleterek deparafinizasyon işlemi yapıldı. Histolojik boyamaya hazır hale getirilen doku kesitlerine önce Hematoksilen-Eozin boyası uygulandı.

Hematoksilen-Eozin (H-E) Boyama Protokolü

- Ksilol ile deparafinizasyon
- %100, %96 ve %75 etanol
- Yıkama (çeme suyu)
- Mayer'in hematoksileni solüsyonu, 1 dakika
- Yıkama (çeme suyu)
- Eozin solüsyonu, 1 dakika
- Yıkama (çeme suyu)
- %75, %96 ve %100 etanol serisi ile dehidratasyon
- Ksilol ile effaflandırma
- Entellan kullanarak lamelle kapama

İmmünohistokimyasal inceleme için Yapılan Çalışmalar

Rutin takip işlemlerinden sonra sert parafin bloklara gömülen TESE dokularından 4 µm kalınlığında alınan kesitler poli-L-lizin kaplı lamalar üzerine alınarak gece boyunca 60 °C'lik etüvde deparafinize edildi. Anti-DDX-4, Anti-MAGE-A4, Anti-OCT-4 ve Anti-SSEA-4 primer antikollarının boyanmaları aşağıdaki protokole göre gerçekleştirildi.

İmmünohistokimya Boyama Protokolü

- Ksilen ile deparafinizasyon
- %95, %80, %70 ve %60 etanol serisinde hidratasyon
- Yıkama (distile su)
- Sitrat buffer ile antijenik maskelenmenin engellenmesi
- Yıkama (3 x 5 dakika PBS; Phosphate buffered saline,)
- Hidrojen peroksidaz ile endojen peroksidaz aktivitesinin bloke edilmesi (5 dakika)
- Yıkama (3 x 5 dakika PBS)
- Bloking solüsyonu (kullanılan kite göre 5 dakika)
- Primer antikor (oda sıcaklığı nda, 1 saat)
- Yıkama (3 x 5 dakika PBS)
- Biotinlenmiş sekonder antikor (1 saat)
- Yıkama (3 x 5 dakika PBS)
- Streptavidin-peroksidaz kompleksi (kullanılan kite göre 10 dakika)
- Yıkama (3 x 5 dakika PBS)
- DAB (3,3'-diaminobenzidine) boyaması (kullanılan kite göre 3 dakika)
- Yıkama (distile su)
- Mayer'in hematoksileni ile karşı boyama (1-2 dakika)
- Yıkama (distile su)
- %70-%96 ve %100 etanol serisinde dehidratasyon
- Ksilen ile effaflandırma
- Entellan kullanarak lamelle kapama

immünofluoresan tceleme için Yapılan Çalışmalar

TESE dokularına %4 paraformaldehit (PFA) solüsyonu ile 1-24 saat boyunca tespit işlemi yapıldı. Tespit işlemi sonrasında dokular, kriyoprotektan olarak 1,2 M sükröz solüsyonundan (%0,1 paraformaldehit içinde) geçirildikten sonra kriyomatriks içiibe gömüldü. Kriyomikrotom ile 10 µm kalınlığında alınan kesitler poli-L-lizin kaplı lamellar üstüne alındı. Preparatlar 5-20 dakika oda sıcaklığında kurutuldu ve -20°C'de saklandı. Anti-DDX-4, Anti-MAGE-A4, Anti-OCT-4 ve Anti-SSEA-4 primer antikorlarının boyanmaları a a ıdaki protokole göre gerçekleştirildi.

immünofluoresan Boyama Protokolü

- Yıkama (3x5 dakika PBS)
- Bloklama (Kullanılan kite göre, bu çalışma mada 5 dakika)
- Primer antikor (4°C'de 1gece ya da 37°C'de 90 dakika)
- Yıkama (3x5 dakika PBS)
- Sekonder antikor (37°C'de 90 dakika)
- Yıkama (3x5 dakika PBS)
- Çekirdek boyası Hoechst 33248 içeren kaplama medyumu ile kapatmak

Görüntüleme ve istatistik De erlendirme

Histokimyasal ve immünohistokimyasal yöntem ile boyanan preparatlar, Zeiss Axio Scope A1 marka ışık mikroskopuyla incelendi ve foto raflandı (ekil 1).

immünofluoresan yöntem ile boyanan preparatlar Zeiss LSM510 konfokal mikroskop ile görüntülenip ve de erlendirildi.

Grupların immünohistokimyasal boyanmalarında, boyanma yoğunluğu (intensity, i) 1 (az), 2 (orta) ve 3 (çok) olarak belirlendi. Boyanan Semifer tübülüs epitel hücrelerinin yüzdesi (Pi) %0-100 arasında de erlendirildi. immünboyanma histolojik skorlama sistemiyle (H-skor = H-SCORE) u

denkleme göre hesaplandı: $H\text{-SCORE} = \sum P_i (i + 1)$. 1 optik yo unlu un düzeltilmesi için kullanıldı. Sonuçlar hiç boyanmayan için 0 ve en çok boyanma için 4 olarak elde edildi. Elde edilen veriler dijitalle tirilerek veriler için tanımlamalar ve gruplar arasındaki farkın anlamlılı ı SPSS programıyla bir istatistik uzmanı tarafından de erlendirildi. statistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

IV. Analiz ve Bulgular

Veri analizleri

Çalı maya 60 non-obstrüktif, 15 obstrüktif azospermi olgusunun dahil edilmesi planlanmı tı. Proje süresi içinde ilgili merkeze hiç obstrüktif azospermi olgu ba vurmadı ı bildirildi i için bu grup sa lanamazken hedeflenen non-obstrüktif azospermi tanısı olan 60 olgudan TESE sonrası arta kalan doku kalan doku çalı maya alındı. Çalı ma kapsamında planlandı ı üzere rutin hematoksilen ve eozin boyaması yapılarak doku bütünlü ünün korunumu incelendi. Bunun nedeni TESE i leminin doku için travmatik bir uygulama olması nedeniyle dokuların ileri incelemeler için uygun olup olmayaca ını de erlendirmektir. ncelemeler sonucunda elde edilen 15 dokunun ileri çalı malar için uygun olmadı ı saptanarak uygun olarak de erlendirilen 45 doku spermatogenik kök hücre belirteçleri ile boyanarak ık mikroskobu incelemelerine alındı. aretleme sonrası her bir preparatta bulunan tüm seminifer tübülüslerdeki hücreler sayılarak farklı yo unlukta boyanmı olanları çok, orta, az ve hiç olarak sınıflandırıldı ve veriler önceden hazırlanmı olan formlara kayıt altına alındı.

Elde Edilen Bulgular

Çalı mada her bir hastadan elde edilen TESE dokusu i leme alınıp immünohistokimyasal de erlendirmeden sonra seminifer tübül sayısı ve elde edilen H-skor de eri hesaplanmı tır, ayrıca ilgili infertilite merkezinden alınan i) uygulamada spermatozoonun çıkıp çıkmaması, ii) e inden toplanan oosit sayısı iii) elde edilen fertilizasyon oranı ve iv) gebelik oranı bilgileri istatistiksel analizlerde de erlendirilmi tir.

Verilerin De erlendirilmesi

Çalı mamızda yer alan sayısal de i kenler için Shapiro-Wilk normal da ılıma uygunluk testi yapıldı. Normal da ılım göstermedi i belirlenen tüm sayısal de i kenlere ait tanımlayıcı istatistikler hem ortanca (minimum; maksimum), hem de ortalama \pm standart sapma ($ort \pm SS$) gösterimleriyle belirtildi. Ek olarak, her sayısal de i ken için de i im katsayısı (DK, coefficient of variation) hesaplandı (Tablo 1). De i im katsayısı verilerin ortalamadan sapmasının yüzde cinsinden kar ılı ıdır ve çalı madaki verilerin ne kadar geni bir aralıkta (range) olduklarını ifade eder. Antikor grupları bazında hesaplanan tanımlayıcı istatistikler H-skor ve seminifer tübül sayısı de i kenleri Tablo 2'de sunulmu tur.

Ara tırmada yer alan kategorik de i kenler olan sperm varlı ı ve gebelik durumu için frekans analizi sonuçlarına göre; 45 olgunun 27'sinde (%60) sperm çıkmı ve olguların 9'unda (%20) gebelik olu mu tur. Spermatozoon çıkı ı gözlemlenen 27 bireyin e lerinden alınan oosit sayısı ortancası 8 (min=0; maks=31) ve ortalaması 10.26 ± 7.32 bulunmu tur. Ek olarak; sperm varlı ı gözlemlenen 27 bireyin 9'unun (%33,3) e lerinde gebelik olu mu tespit edilmi tir.

TESE sonrası spermatozoon bulunmasıyla spermatogenik hücreler arasındaki ili kinin H-Skor de erlerine göre analizi

Çalı manın en önemli sorularından birisi olan TESE sonrası kalan ve atılan dokularda kalan spermatogenik hücrelerin varlı ı ve miktarı ile TESE i lemi sonrasında spermatozoon bulunması arasında bir farkın olup olmadı ı, ara tırıldı ında; her ne kadar genel olarak sperm hücresi bulunan gruba ait seminifer tübüllerden elde edilen spermatogenik hücrelerin H-skor de erleri ortalaması daha yüksek olsa da; her bir antikor bazında kar ıla tırmalar istatistik olarak anlamlı düzeylere ula mamı tır (Tablo 3).

Testiste kalan spermatogenik hücrelerinden elde edilen H-skor verileriyle fertilizasyon ve gebelik arasındaki ili ki

Bu gruptaki de erlendirme sperm ve/veya oosit elde edilemeyen olgular analiz dı ına alındıktan sonra yapıldı. Her bir spermatogenik belirteçten elde edilen H-skor ile bu olgulardan elde edilen spermatozoonlarla yapılan mikroinjeksiyon i lemi sonrası de erlendirilen fertilizasyon oranları incelendi inde; hiç bir protein düzeyi ile fertilizasyon arasında anlamlı bir ili ki bulunamamı tır (Tablo 4).

Öte yandan gebelik olup olmamasıyla H-skor ili kisi ele alındı ında; anti-SSEA4 düzeylerinin gebelik olu an olgularda (121.0 ± 51.8) olu mayanlara göre (74.4 ± 49.5) anlamlı olarak ($p=0.037$)

yüksek çıktı ı izlenirken; di er proteinlerde genel olarak gebe olan grupta yüksek bir oran olmakla birlikte aralarında anlamlı bir fark olmadı ı saptandı (Tablo 5). SSEA4 düzeyleri gebe gruplarında yüksek çıktı ı için seminifer tübüllerde bu proteinin tübülde ve hücre içinde yerle iminin ileri analizi amacıyla yapılan flüoresan görüntüler (ekil 2) incelendi inde, tübüllerin bazal kısmında yaygın olarak hücrelerden sinyaller alındı. Hücre içinde de özellikler perinükleer sitoplazma boyanması olarak izlendi.

V. Sonuç ve Öneriler

Çalı mamızda nonobstrüktif azoospermi olgularından TESE yöntemi sonucu elde edilen testis örneklerinden i lem sonrası arta kalan dokuları sperm bulunan (n=27) ve bulunmayan (n=18) olarak iki gruba ayrıldı. Ayrıca bu olgulara uygulanan yardımla üreme tedavilerine ili kin oosit sayısı, fertilizasyon ve gebelik oranları verileri elde edilerek spermatogenik hücrelerle aralarındaki ili ki ara tırıldı.

Bu ili ki ara tırılmasında ele alınan temelde 4 protein söz konusu oldu. Bunlar ve öne çıkan özellikleri u ekilde sıralanabilir;

1) DDX4 (DEAD box protein 4, VASA), germ hücrelerinin olu umunda ve spermatozoonların hareket kazanmasında rol alır. Sadece ovaryum ve testislerde ifadelenir. Embriyon döneminde gonadal kabartılara göç eden primordiyal germ hücrelerinde ifadelenir. Literatürde anti-DDX4 antikorunu germ hücreleri belirtmek için kullanılmaktadır.

2) MAGEA4 (Melanoma-associated antigen 4) proteini insanda melanoma, ba ve boyun yassı hücre karsinomu, akci er karsinomu ve gö üs karsinomu gibi hastalıklarda ifadelenir. Di er taraftan normal dokuda, plasenta ve testiste ifadelenmesi de beklenmektedir. Literatürde spermatogonyum hücrelerinin spesifik i aretleycisi olarak bilinmektedir.

3) SSEA4 (Stage Specific Embryonic Antigens-4), “Stage specific antigen”, pluripotensi gen ailesine aittir ve üç germ yapra ma dönü ebilen kök hücrelerde ve ayrıca IPS hücrelerinde ifadelenir.

Çalı malarda Anti-SSEA4 antikorunu genelde IPS hücreleri belirteci ve spermatogonyal kök hücrelerin belirteci olarak kullanılmaktadır.

4) OCT4 (Octamer-binding Transcription factor 4), POU5F1 geni tarafından ifadelenen POU5F1 proteini (POU domain, class 5, transcription factor 1), POU transkripsiyon faktörü ailesine aittir ve farklanmamı embriyonik kök hücrelerin belirteci olarak bilinmektedir. Testis çalı malarında spermatogonyal kök hücrelerde varlı ı saptanmı tır.

Bu proteinlerin dokudaki miktar, lokalizasyon ve da ılımını vermesi bakımından histolojik skorlama yöntemiyle incelenmesi tercih edildi. Bu kapsamda yukarıda bulgular kısmında sunulan verilere ula ıldı.

TESE i lemleri sırasında testisten seminifer tübüllerin çıkarılmasında, iki a amalı bir yakla ım sergilenmesi yaygın olarak rutin uygulamalarda söz konusudur. Bunlardan birisi organda kanlanmasının iyi oldu u yerlerden dokuyu almak amacıyla o bölgeye yönelik cerrahi müdahaleyi planlamak, ikincisiyse, operasyon sırasında makroskopik (ve/veya mikroskopik –mikroTESE) olarak sa lıklı görünen seminifer tübülleri almak eklinde sıralanabilir. Dolayısıyla, sperm hücreleri bulabilmek için organın olabildi ince sa lıklı bölgeleri hedeflenerek buralardan seminifer tübüller cerrahi giri imle alınıp laboratuvara transfer edilmektedir. Öte yandan, operasyon sonrası kalan bölgede klasik bir doku hasarı-tamiri mekanizmaları devreye girerek, bu bölge ço unlukla ba dokusu yapıcı hücrelerin artı ı ve i lev göstermesi sonucu fibrozisle iyile mektedir. Bu çerçevede ister istemez, bu iyile me mekanizmalarının çalı tı ı sırada da doku/organ hasarı ortaya çıkarak zaten sperm üretme kapasitesi sınırlı olan testislerde bu kapasite iyice azaltılmı olmaktadır. Bu durum, elde edilen seminifer tübüllerdeki hücrelerin de erinin daha da artmasına neden olmaktadır. Laboratuvara alınan seminifer tübüller mekanik olarak parçalanmakta ve böylece içindeki spermatozoonlar dı arı çıkarılarak, elde edilmektedir. Bu hücrelerden bazıları (toplanan oosit sayısı kadarı), eldeki oositlere mikroinjeksiyon yöntemiyle verilmekte, kalanları sayı ve kalitesi uygunsu dondurulmakta ya da uygun ekilde imha edilmektedir. Öte yandan spermatozoonların çıkarılması sonrasında kalan seminifer tübül parçaları ço unlukla imha edilmektedir. Yukarıda belirtildi i gibi testis içinde zaten spermatogenez sürecine katkısı yüksek olan bu dokunun alınıp sonrasında imhası adeta “altın yumurtlayan tavu un kesilmesi” gibi bir duruma neden olmaktadır. Bu kapsamda, dokuda kalan ve hala kök hücre özelli i olan hücreler de imha edilmektedir.

Bu projenin konusu, her ne kadar teorik olarak yukarıda sunulan dü ünceler söz konusu olsa da, gerçekten kalan seminifer tübüllerde bu hücreler bulunuyor mu? Bulunuyorsa bunların miktarlarıyla elde edilen sperm hücrelerinin IVF uygulaması sonrasında IVF ba arısı arasında bir korelasyon söz konusu mu? sorularına yanıt aramak oldu. Bulgularımız gösterdi ki, elde edilen dokulardan spermatozoon bulunsa da bulunmasa da belli düzeyde sperm öncülü hücreler bulunmaktadır. Bu durum, o veya sonraki IVF uygulamasında sperm hücresi çıkmayan hastalar için, dokunun yine de

önemli bir kök hücre havuzu oldu unu ortaya koyması bakımından çok büyük de er ta ımaktadır. A a ıda, “gelece e li kin öngörüler” kısmında belirtildi i gibi, bu öncül hücrelerin izole edilip matürasyonu sonrasında, bu hastaların, kendi hücrelerinin kullanılması ve biyolojik anlamda baba olma ansları hala söz konusu olabilecektir.

Ayrıca yukarıda “Bulgular” kısmında sunuldu u üzere, spermatozoon çıkan olgularda uygulanan IVF sonrası, gebelik olu masıyla kalan seminifer tübüldeki SSEA4 düzeylerinin yüksekli i arasındaki ili ki, di er spermatogenez belirteçleri yanında özellikle SSEA4’ün belki de embriyon geli iminde ve bunun gebeli e ilerlemesinde de etkisinin olabilece ini göstermesi bakımından, daha önce literatürde bu konuda hiç bir ön görünün olmadı ı bir noktada, önemli bir bulgu olarak kar ımıza çıkmaktadır.

Tüm bulgular alt alta konuldu unda yapılan proje;

1. TESE sonrası imha edilen dokuların kök hücre potansiyelini,
2. Dokudan spermatozoon ve öncülü hücrelerin izole edilmesinin önemini,
3. Elde edilecek spermatogenez hücrelerinin olgunla tırılmasının önemini ve gere ini,
4. Her ne kadar spermatogenez sürecinde varlıkları biliniyor olsa da, burada i lev gösteren ve varlı ıyla tanı kıstası olan proteinlerin sperm olgunla masının ileri a amalarında ve embriyo geli iminde ba ka i levler de gösterebilece ini dü ündürmesi, bakımından bu projenin önemini ortaya koymaktadır.

Bu çalı ma, doktora tezi kapsamında projelendirilmi , tez yazımına ba lanmı olup ardından bilimsel platformlarda sunulurken, makale haline getirilecektir. Bulguların yeni ba ka çalı maların önünü açacak olması bakımından ayrıca de er ta ımaktadır.

VI. Gelece e li kin Öngörülen Katkıları

Çalı ma sonucunda elde edilen bulgular, TESE sonrası atık materyal muamelesi gören dokuların aslında önemli bir sperm öncülü hücre rezervi oldu unu göstermesi bakımından önemlidir. Tamamlanan bu çalı ma, gelecekte a a ıda sıralanan çalı maların yapılmasının önemini göstermesi bakımından de erlidir.

1. Atılmakta olan TESE dokusundan sperm öncülü hücrelerin izolasyon yöntemlerinin belirlenmesi ve optimize edilmesi,
2. Kalan bu TESE dokusunun do rudan doku dondurma yöntemleriyle ve/veya içindeki sperm öncülü hücrelerin izolasyonu sonrası dondurarak saklanma yöntemlerinin geli tirilmesi,
3. izole edilen sperm öncülü hücrelerinin matürasyonunun sa lanarak en azından spermatid a masında sperm hücresi, hatta daha iyisi olgun spermatozoon a masında hücre elde edilmesini sa layabilecek matürasyon a amalarını gerçekle tirebilecek sonuçlar veren çalı maların yapılması
4. SSEA4 düzeylerinin embriyogenez sürecindeki etkilerini ve gebelik olu masına katkısını ara tıran yeni çalı malara olan gereksinimi göstermesi bakımından önemlidir.

VII. Sa lanan Altyapı Olanakları ile Varsa Gerçekle tirilen Projeler

Proje kapsamında bir altyapı deste i alınmamı tır.

VIII. Sa lanan Altyapı Olanaklarının Varsa Bilim/Hizmet ve E itim Alanlarındaki Katkıları

Proje kapsamında bir altyapı deste i alınmamı tır.

IX. Kaynaklar

Goharbakhsh, L., et al. (2013). "Isolation and culture of human spermatogonial stem cells derived from testis biopsy." *Avicenna J Med Biotechnol* 5(1): 54-61.

Hessel, M., et al. (2013). "A novel cell-processing method 'AgarCytos' in conjunction with OCT3/4 and PLAP to detect intratubular germ cell neoplasia in non-obstructive azoospermia using remnants of testicular sperm extraction specimens." *Hum Reprod* 28(10): 2608-2620.

Hou, J., et al. (2014). "Generation of male differentiated germ cells from various types of stem cells." *Reproduction* 147(6): R179-188.

Hua, J., et al. (2009). "Derivation of male germ cell-like lineage from human fetal bone marrow stem cells." *Reprod Biomed Online* 19(1): 99-105.

Izadyar, F., et al. (2011). "Identification and characterization of repopulating spermatogonial stem cells from the adult human testis." *Hum Reprod* 26(6): 1296-1306.

Kossack, N., et al. (2013). "A combined approach facilitates the reliable detection of human spermatogonia in vitro." *Hum Reprod* 28(11): 3012-3025.

West, F. D., et al. (2013). "In vitro-derived gametes from stem cells." *Semin Reprod Med* 31(1): 33-38.

Hanna et al. (2014) "Fluorescence- and magnetic-activated cell sorting strategies to isolate and enrich human spermatogonial stem cells" *Fertility and sterility*: 2014 0015-0282

X. Ekler

a) Mali Bilanço ve Açıklamaları:

Proje kapsamında sarf malzemesi alımına ili kin olarak KDV dahil 25.000 (yirmibe bin) TL'sı kullanılarak deneylerde kullanılan sarf malzemelerinin temini yapılmı tır.

b) Makine ve Teçhizatın Konumu ve lerideki Kullanımına Dair Açıklamalar:

Proje kapsamında makine ve teçhizat alımı yapılmamı tır.

c) Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar:

d) Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar):

Projenin verilerinin de erlendirilmesi proje sonucunda yapılmı olup henüz bir bilimsel payla ımda bulunulmamı tır. Elde edilen verilerin doktora tezi yazımı sürecini takiben "üreme tıbbı" alanında bir kongrede sunulması ve ardından bilimsel makale haline getirilmesi planlanmaktadır.

e) Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler: