

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak  
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya  
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;  
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

**( YÜKSEK LİSANS TEZİ )**

**TUNİKAMİSİN İLE UYARILAN ENDOPLAZMİK  
RETİKULUM STRESİNİN SIÇAN TESTİKÜLER SERTOLİ  
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN IŞIK VE  
ELEKTRON MİKROSKOBİK İNCELENMESİ**

**ÖZGÜR DOĞUŞ DEMİRKİRAN**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. FARUK ALKAN**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI**

**İSTANBUL-2013**

**TEZ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Histoloji Embriyoloji Programında Özgür Doğu DEMİRKİRAN tarafından hazırlanan Tunikamisin İle Uyarılan Endoplazmik Retikulum Stresinin Sıçan Testiküler Sertoli Hücreleri Üzerindeki Etkisinin Işık ve Elektron Mikroskopik İncelenmesi başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

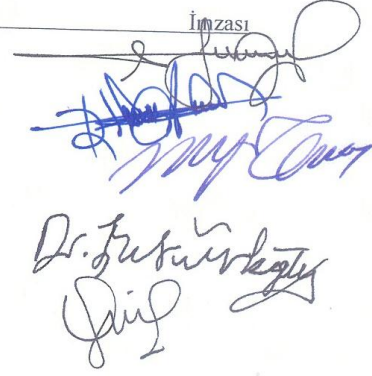
26 / 07 / 2013

**Tez Sınav Jürisi**

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)

- 1.Prof. Dr. Faruk ALKAN
- 2.Prof. Dr. Oktay ARDA
- 3.Prof. Dr. Yakup TUNA
- 4.Prof. Dr. Ahmet Şenol ERTÜRKOĞLU
- 5.Doç. Dr. Emine Elif GÜZEL

İmzası



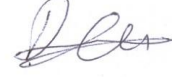
Dr. Faruk Alkan  
Dr. Oktay Arda  
Dr. Yakup Tuna  
Dr. Ahmet Şenol Ertürkoğlu  
Dr. Emine Elif Güzel

**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 çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

ÖZGÜR DOĞUŞ DEMİRKIRAN

(İmza)



## İTHAF

*Değerli anneme ve babama ithaf ediyorum...*

## TEŞEKKÜR

Tezimin kuruluş aşamasında yol gösterici yardımlarını esirgemeyen, tezim için gerekli tüm imkanları sağlayan ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Faruk ALKAN'a teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimime katkıları olan sayın hocalarım, Sayın Prof. Dr. Oktay ARDA'ya, Sayın Prof. Dr. Meral KOYUTÜRK'e, Sayın Prof. Dr. İsmail SEÇKİN'e, Sayın Prof. Dr. Şenol ERTÜRKOĞLU'na, Sayın Prof. Dr. Mustafa TAŞYÜREKLİ'ye, Sayın Prof. Dr. Hüseyin OKTAR'a, Sayın Doç. Dr. Elif GÜZEL'e tek tek teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Her türlü problemimde yanımda olan ve bana her türlü desteği veren sevgili Uzm. Dr. Pelin ERTÜRKÜNER, Araş. Gör. Dr. Murat BAŞAR, Araş. Gör. Gamze TANRIVERDİ, Uzm. Bio. Emine MAMAL, Dr. Güneş ÖZDOĞAN, Dr. Esra GÜLER, Burcu BİLTEKİN, Mediha ESER, Erençül TOKAY, Aslı GÜMÜŞEL, John Akrofi KUBİ, Birsen ÖZDEMİR, Elif YAPRAK SARAÇ, Sibel DEMİRCİ, Tuğba EKİZ, Belisa KALECİ, Selenay FURAT, Zehra SEZER, Serbay ÖZKAN, Başak İŞILDAR'a, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Selin ÜNAL'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Tezimin elektron mikroskopi parçalarının hazırlanmasında yardımcı olan Azize HARDAL GÜMÜŞYAZICI ve Ercüment BOZTAŞ'a teşekkür ederim.

Üniversite eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Bülent EDİZ'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 21595

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
BEYAN.....	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	VII
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	VIII
ÖZET .....	XI
ABSTRACT.....	XII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
4. BULGULAR.....	29
5. TARTIŞMA .....	58
KAYNAKLAR .....	64
ETİK KURUL KARARI .....	68
ÖZGEÇMİŞ .....	69

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Erkek genital sistemi .....	3
Şekil 2-2: Testisin gelişimi .....	7
Şekil 2-3: Testisin anatomik ve histolojik genel yapısı .....	9
Şekil 2-4: Testisin histolojik genel görünümü (H+E, x2).....	9
Şekil 2-5: Seminifer tübüller ve tübüller arası saha ( H+E, x10). .....	11
Şekil 2-6: Seminifer tübüller ve tübüller arası saha ( H+E, x40). .....	11
Şekil 2-7: Spermatogenezin aşamalarını gösteren şema [13]. .....	12
Şekil 2-8: Spermatogenik hücrelerin şematik görüntüsü [22]. .....	15
Şekil 2-9: Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücrelerin şematik görüntüsü [13]. .....	16
Şekil 2-10: Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücrelerin histolojik görüntüsü (H+E, x100). .....	17
Şekil 2-11: Sertoli hücresi nükleusu (a) ve sitoplazmasının (b) elektron mikroskopik görüntüsü (x 12000). .....	17
Şekil 2-12: Katlanmamış protein yanıtı sinyal yolağı [1]. .....	19
Şekil 4-1: Kontrol grubunda seminifer tübüller ve intersitisyel alanların genel görünümü (H+E, x10). .....	29
Şekil 4-2: Kontrol grubunda seminifer tübüller ve intersitisyel alan (H+E, x40). .....	30
Şekil 4-3: Kontrol grubunda sertoli hücreleri ve spermatogenik hücreler (H+E, x100). .....	30
Şekil 4-4: 7 gün grubunun genel görünümü (H+E, x10). .....	31
Şekil 4-5: 7 gün grubunda hücreler arası boşlukların oluşmaya başladığı seminifer tübül kesiti (H+E, x40). .....	32
Şekil 4-6: 7 gün grubuna ait ökromatin görünümlü hücre nükleusları ve lümende olgunlaşmamış hücrelerin görüldüğü seminifer tübül kesiti (H+E, x40). .....	32
Şekil 4-7: 7 gün grubunda kontrol grubuna çok yakın görünümdeki seminifer tübül kesiti (H+E, x40). .....	33
Şekil 4-8: 14 gün grubunun genel görünümü (H+E, x10). .....	34
Şekil 4-9: 14 gün grubunda hücreler arası boşlukların oluştuğu seminifer tübül kesiti (H+E, x40). .....	34
Şekil 4-10: 14 gün grubuna ait hücreler arası ayrılmaların görüldüğü seminifer tübül kesiti (H+E, x100). .....	35



Şekil 4-11: 14 gün grubuna ait ökromatin görünümlü hücre nükleusları ve lümende olgunlaşmamış hücrelerin görüldüğü seminifer tübül kesiti (H+E, x40). .....	35
Şekil 4-12: 14 gün grubundaki normal görünümlü seminifer tübül kesiti ( H+E, x40). 36	
Şekil 4-13: 21 gün grubunun grubunun genel görünümü (H+E, x10).....	37
Şekil 4-14: 21 gün grubundaki hücreler arası boşlukların olduğu seminifer tübül kesiti (H+E, x40). .....	37
Şekil 4-15: 21 gün grubuna ait ökromatin görünümlü hücre nükleusları ve lümende olgunlaşmamış hücrelerin görüldüğü seminifer tübül kesiti (H+E, x40). .....	38
Şekil 4-16: 21 gün grubundaki aşırı hasar gözlenen kesitin genel görünümü (H+E, x10) .....	38
Şekil 4-17: 21 gün grubundaki aşırı hasar gözlenen bir seminifer tübül ( H+E, x40)....	39
Şekil 4-18: Sertoli hücrelerinde GRP78/BiP immün reaksiyonunun HSCORE analizi. 40	
Şekil 4-19: Negatif kontrole ait seminifer tübül görünümü (x40). .....	41
Şekil 4-20: Anti-GRP78/BiP antikoru ile immünohistokimya işaretlemesi yapılan kontrol grubuna ait seminifer tübül görünümü (x40). .....	41
Şekil 4-21: Anti-GRP78/BiP antikoru ile immünohistokimya işaretlemesi yapılan 7 gün grubuna ait seminifer tübül görünümü (x40). .....	42
Şekil 4-22: Anti-GRP78/BiP antikoru ile immünohistokimya işaretlemesi yapılan 14 gün grubuna ait seminifer tübül görünümü (x40). .....	42
Şekil 4-23: Anti-GRP78/BiP antikoru ile immünohistokimya işaretlemesi yapılan 21 gün grubuna ait seminifer tübül görünümü (x40). .....	43
Şekil 4-24: Anti-GRP78/BiP antikoru ile immünohistokimya işaretlemesi yapılan 21 gün grubuna ait aşırı dejenerasyon gösteren seminifer tübül görünümü (x40). .....	43
Şekil 4-25: Sertoli hücrelerindeki apoptotik indeks analizi.....	45
Şekil 4-26: TUNEL yöntemi ile apoptotik hücrelerin işaretlemesi yapılan negatif kontrole ait seminifer tübül görünümü (x40).....	45
Şekil 4-27 TUNEL yöntemi ile apoptotik hücrelerin işaretlemesi yapılan kontrol grubuna ait seminifer tübül görünümü (x40). .....	46
Şekil 4-28: TUNEL yöntemi ile apoptotik hücrelerin işaretlemesi yapılan 7 gün grubuna ait seminifer tübül görünümü (x40). .....	46
Şekil 4-29: TUNEL yöntemi ile apoptotik hücrelerin işaretlemesi yapılan 14 gün grubuna ait seminifer tübül görünümü (x40). .....	47

Şekil 4-30: TUNEL yöntemi ile apoptotik hücrelerin işaretlemesi yapılan 21 gün grubuna ait seminifer tübül görünümü (x40).....	47
Şekil 4-31: TUNEL yöntemi ile apoptotik hücrelerin işaretlemesi yapılan 21 gün grubuna ait aşırı dejenerasyon gösteren seminifer tübül görünümü (x40). .....	48
Şekil 4-32: Sertoli hücrelerine ait düz endoplazmik retikulumların geçirimli elektron mikroskopik görüntüleri (x12.000).....	50
Şekil 4-33: Sertoli hücrelerine ait granüllü endoplazmik retikulumların geçirimli elektron mikroskopik görüntüleri (x50.000).....	51
Şekil 4-34: Sertoli hücrelerine ait lizozom gruplarının geçirimli elektron mikroskopik görüntüleri (x12.000). .....	52
Şekil 4-35: 21gün grubundaki stresli bir Sertoli hücresinde yumak şeklinde görünen granüllü ve düz endoplazmik retikulumun geçirimli elektron mikroskopik görüntüsü (x50.000).....	53
Şekil 4-36: 21 gün grubundaki aşırı hasar gözlenen seminifer tübülün geçirimli elektron mikroskopik görüntüsü (x10.000).....	54
Şekil 4-37: 21 gün grubundaki aşırı hasar gözlenen seminifer tübüldeki çok nükleuslu yapının geçirimli elektron mikroskopik görüntüsü (x7.500). .....	55
Şekil 4-38: 21 gün grubundaki aşırı hasar gözlenen seminifer tübüldeki çok nükleuslu yapının geçirimli elektron mikroskopik görüntüsü (x7.500). .....	56
Şekil 4-39: 21 gün grubundaki aşırı hasar gözlenen seminifer tübüldeki bol ve büyük lipid damlacıklarının elektron mikroskopik görüntüsü (x5.000). .....	57

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

ER: Endoplazmik retikulum

NaCl: Sodyum klorür

KPY: Katlanmamış protein yanıtı

AMH: Anti-Müllerian hormon

TBF: Testis belirleyici faktör

Ap: A pale, açık tip spermatogonyum A

Ad: A dark, koyu tip spermatogonyum A

DNA: Deoksiribonükleik asit

FSH: Folikül uyarıcı hormon

Ca<sup>+2</sup>: Kalsiyum

H+E: Hematoksilen + Eozin

PBS: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hidrojen peroksit

OsO<sub>4</sub>: Osmiyum tetroksit

## ÖZET

Demirkıran, Ö.D. Tunikamisinin, testis Sertoli hücreleri üzerindeki etkisinin ışık mikroskopik ve elektron mikroskopik olarak incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji-Embriyoloji A.D. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul 2013

Proteinlerin katlanması karmaşık işlemlerle gerçekleşir ve hata olasılığı oldukça yüksektir N-bağımlı glikozilasyon inhibisyonu, kalsiyum dengesinin bozulması, oksidatif stres gibi faktörler protein katlanmasına etki ederek endoplazmik retikulumun (ER) normal işlevinin bozulmasına ve ER lümeninde katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine neden olur böylece ER stresi meydana gelir. Sertoli hücreleri, erkek verimliliğinde önemli rol oynamaktadır. Bu hücrelerin yapısını etkileyen faktörler, hücresel fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda, ER stresinin Sertoli hücrelerinde ultrastrüktürel değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Bu değişikliklerle birlikte meydana gelen morfolojik bozuklukların, erkek kısırlığının sebeplerinden biri olduğunu öngörmekteyiz. Bu hipotezden yola çıkarak, tunikamisine uyarılan ER stresinin neden olduğu, Sertoli hücrelerindeki morfolojik değişiklikleri ve apoptozu, ışık ve elektron mikroskobu ile inceledik.

Çalışmamızda 32 adet, 2,5-3 aylık, erkek, albino Wistar sıçan kullanıldı. Hayvanlar 200-250gr ağırlığında seçilerek 8'erli 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna, tek doz 1ml subkutan 0,09'luk NaCl çözeltisi verildi, deney gruplarına tek doz subkutan 200µg/kg tunikamisin uygulanarak ER stresi uyarıldı. 7. Günde, kontrol grubu ve 7 gün grubu, daha sonra sırasıyla 14. ve 21. günlerde, 14 gün grubu ve 21 gün grubunun dokuları alınarak sakrifiye edildi. Testis örnekleri, ışık ve elektron mikroskobu incelemeleri için uygun tekniklerle hazırlanarak, ışık ve elektron mikroskobuyla incelendi. Elde edilen veriler uygun istatistiksel metotlarla değerlendirildi.

Çalışmamız tunikamisin ile uyarılan ER stresinin, Sertoli hücrelerinin yapısı üzerindeki etkisini ortaya koymuştur. Aşırı stres gözlenen grupta apoptoz gösteren hücre sayısının arttığı da görülmüştür. Bu bulgular ışığında çalışmamız erkek kısırlığında yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine ve uygulanmasına fayda sağlayacaktır. Ayrıca, ER stresinin erkek kısırlığına olan etkisi üzerine yapılan nadir in vivo çalışmalardan biridir.

**Anahtar Kelimeler:** Tunikamisin, Sertoli Hücreleri, Endoplazmik Retikulum Stresi, Apoptoz, Işık ve Elektron Mikroskobu

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 21595

## ABSTRACT

Demirkiran, Ö.D. Tezin İngilizce Adı. Light and electron microscopic examination of tunicamycin effects on testis Sertoli cell. Istanbul University, Institute of Health Science, Histology and Embryology Department. Master Thesis. İstanbul 2013.

Protein folding is the complex process and mistake in protein folding frequently seen. N-glycosylation inhibition, deterioration of calcium homeostasis, oxydative stress vs. factors causes functional damage in ER. accumulation of unfolded or misfolded proteins in the lumen of the endoplasmic reticulum causes ER stress in the cels. The Sertoli cells plays very important role in male fertility. The morphological changes in these cells disturb their functions. Previous research suggests the endoplasmic reticulum stress (ER) causes ultrastructural changes in Sertoli cells. We consider that these morphological anomalies are one of the reasons of male infertility. We concentrated on the morphological changes and the apoptosis of Sertoli cells caused by tunicamycin induced ER stress. We used immunohistochemistry, light and electron microscopy to observe the possible changes.

The control and the experiment groups covered 2,5-3 months old, 32 male mature Wistar Albino rats each weighing about 250-300 grams. The 32 animals divided in four groups each having 8 rats. These were control group, 7<sup>th</sup> day group, 14<sup>th</sup> day group and 21<sup>st</sup> day group. We gave 1ml of 9 % subcutaneous injections of saline to the animals in the control group. The other three groups received one dose of 200µl/kg tunicamycin subcutaneously to induce ER stress. The control and the 7<sup>th</sup> day group sacrificed in the 7<sup>th</sup> day, the 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> day groups sacrificed respectively in 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days. We prepared the testis specimens for immunohistochemistry, light and electron microscopy using appropriate technics. The observations carried with light and electron microscope and the findings supported by statistical technics.

In conclusion, the tunicamycin induced ER stress caused morphological changes in the Sertoli cells. The number of apoptotic cells increased in the group which displayed the maximum amount of ER stress. We believe that the outcome of these evidences may light up and aid to therapeutic treatments of male infertility. On the other hand, this is one of the rare in vivo researches on the ER stress of Sertoli cells.

Key Words: Tunicamycin, Sertoli Cells, Endoplasmic Reticulum Stress, Apoptosis, Light and Electron Microscope

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 21595

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

ER, salgılanan ve hücre dışına gönderilecek proteinlerin katlanmasından, olgunlaşmasından, hücre içinde rol alacağı bölgeye taşınmasından ve taşınacak proteinlerin kalite kontrolünden sorumlu olan organeldir [1]. ER'ye gelen yeni sentezlenmiş proteinler çeşitli değişimler (N-glikozilasyon, disülfid oluşumu, hidroksilasyon, oligomerizasyon) geçirerek katlanır [2]. Proteinlerin katlanması karmaşık işlemler ile sağlanmaktadır ve hata olasılığı oldukça yüksektir. N-bağımlı glikozilasyon inhibisyonu, kalsiyum dengesinin bozulması, hipoksi, oksidatif stres, enfeksiyonlar, sıcaklık stresi gibi birçok etken protein katlanması olayına etki edebilir [1]. Bu etkenler ER'nin normal işlevinin bozulmasına, dolayısı ile ER lümeninde katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin birikmesini sağlayarak ER stresine neden olur. Deneysel olarak ER stresi tunikamisin [3], nonilfenol [4] gibi bazı toksik ajanlar kullanılarak sağlanmaktadır. Tunikamisin, N-bağımlı glikolizasyonu inhibe ederek ER stresi oluşumuna neden olan ve birçok biyolojik çalışmada bu amaçla kullanılan bir antibiyotiktir [3, 5, 6]. ER stresi oluştuğunda, proteinlerin doğru katlanmasına yardımcı olan GRP78, GRP94 gibi moleküller tarafından bazı transmembran proteinler serbest bırakılıp, aktif hale gelirler.

Yapılan çalışmalarda ER stresinin, Alzheimer, Parkinson, diyabet, kistik fibrozis gibi hastalıklara neden olduğu görülmüştür [2]. Birçok doku, organ ve hücrelerde de hasar oluşturduğu görülmüştür [3, 5, 7, 8]. Yapılan çalışmalarda, ER stresinin Sertoli hücrelerinde morfolojik değişimlere sebep olduğu bilinmektedir. Ayrıca, elektron mikroskobu ile yapılan birçok incelemede de ER'lerde genişleme şeklinde ultrastrüktürel değişiklikler gözlenmiştir [4, 9, 10]. Hücrelerde ER stresinden kurtulabilmek için katlanmamış protein yanıtı (KPY) adı verilen bir yolak aktive olmaktadır. Eğer hatalı katlanmış yada katlanmamış protein miktarı çok fazla olursa ve stres koşulları devam ederse, KPY'nin aktivasyonu ER stresiyile baş etmek için yetersiz kalabilmektedir. Böyle bir durumda ER stresine maruz kalan hücreler apoptoza (programlı hücre ölümü) yönlenebilmektedir [1, 11].

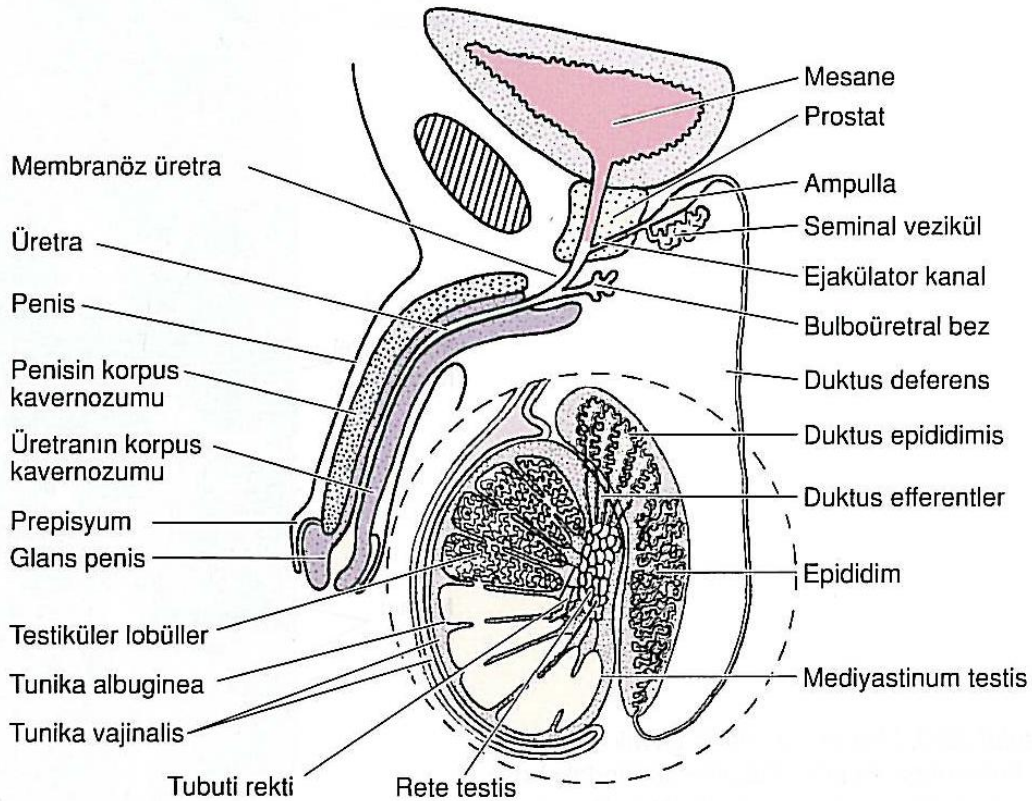
Daha önce yapılan çalışmalarda, ER stresinin Sertoli hücrelerinde ultrastrüktürel değişikliklere neden olduğu görülmüştür [4]. Bu değişiklikler bazı işlevsel bozukluklara da sebep olabilmekte ve germ hücreleri de sertoli hücrelerinin bu durumundan etkilenebilmektedir [12]. Çalışmamızda, tunikamisine uyarılan ER stresinin, Sertoli

hücrelerinin yapısına etkisi, ışık ve elektron mikroskobu kullanarak değerlendirilecektir. Böylece ER stresinin, Sertoli hücrelerinin yapısı üzerindeki etkisini ortaya koyarak, erkek kısırlığına ve bu konuda uygulanacak yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine ışık tutmayı amaçlamaktayız.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi (Şekil 2-1); ekzokrin ve endokrin salgı yapan testisler, yardımcı bezler ve içeriği zenginleşmiş meninin dişi ferde ulaşmasını sağlayan kanallar ve penisten oluşur. Testisler, spermlerin üretimi ve salgılanmasından sorumlu holokrin bezler olmakla birlikte başta testosteron olmak üzere bazı androjenler, Anti-Müllerian hormon (AMH), estradiol ve inhibin gibi hormonları da salgılayan endokrin karakterli organlardır. Üretimin yapıldığı seminifer tübüllerden sonra tubulu rektiler, rete testis, duktuli efferentesler, epididim, duktus deferens, ejakülator kanal ve erkek uretrası, meninin dışarı atılmasını sağlayan kanallardır. Glandula veziküloza, prostat bezi ve bulbo üretral guddeler ile penil uretra epitelinden gelişen, Tyson guddeleri de ekzokrin salgı yapan guddelerdir. Penis ise; ince bir deriyle kaplı, güçlü bağ dokusuyla sargılanmış olan, fonksiyonel bir çift erekteör dokunun oluşturduğu çiftleşme organıdır [13-15].



Şekil 2-1: Erkek genital sistemi [13].



Erkek üreme sistemi; sperm üretiminin devamından, beslenmesi ve geçici olarak depolanmasından, ayrıca androjenler olarak adlandırılan seks hormonlarının sentezi ve salgılanmasından sorumludur.

### **2.1.1. Genital sistem gelişimi**

Embriyonun cinsiyeti, ovumu dölleyen sperm ile belirlenir. Erkek ve dişi morfolojik karakterler ise embriyonik gelişimin 7. haftasında gelişmeye başlar. Gelişimin erken dönemlerinde her iki genital sistem de birbirine oldukça benzerdir ve bu dönem seksüel gelişimin farklılaşmamış safhası olarak bilinir [15-18].

### **2.1.2. Gonadların gelişimi**

Gonadların gelişiminin başlangıcı 5. haftada, mezonefrozun medialinde, genital çizginin ortaya çıkması ile olur. Mezotel ile kaplı olan ve proliferasyonla kalınlaşmış bu bölge, gonadların gelişim bölgesidir. Embriyonun genetik özelliğine göre dişi veya erkek gonadlar burada gelişir. Bu bölgeye vitellüs kesesi duvarından, dorsal mezenter yolunu kullanarak ameboid hareketle göç eden hücreler, gametleri oluşturur. Primordial germ hücreleri, dişi fertlerde, mezotel ile sargılanarak primordial folikülleri meydana getirir. Erkek fertlerde ise mezotelden gelişen ve bir kısmının daha sonra Sertoli hücreleri haline gelecek olan, epitelyal hücrelerin yapmış olduğu kordonlar ve aralarına karışan primordial germ hücreleri birlikte germ kordonlarını oluştururlar. Her iki fertte de bu hücrelerin etrafındaki yapısal gelişimler sonucu erkek ve dişi gonadlar ortaya çıkar [15-18].

### **2.1.3. Cinsiyetin belirlenmesi**

Genetik olarak cinsiyetin belirlenmesi, ovumu dölleyecek olan sperme bağlıdır. Erkek fenotipi, XY genotipine bağlı olarak gelişir. Burada belirleyici faktör Y kromozomudur. Bu kromozomda bulunan SRY geni (Y kromozomu cinsiyet belirleyici bölgesi) tarafından denetlenen, testis belirleyici faktör (TBF), testiküler farklılaşmanın sağlanmasında görev alır. Ayrıca bu faktör gonadal kordonların, seminifer kordonlara farklılaşmasını da etkiler. Bunun dışında testislerin gelişiminde SOX9 transkripsiyon faktörünün, AMH'nin ve testosteronun da belli oranda rolü olduğu bilinir. Y kromozomunun yokluğu ise XX genotipinin oluşmasına ve ifade olarak over gelişimine sebep olur [15-18].

#### 2.1.4. Testis Gelişimi

Genetik olarak erkek olan bir embriyoda (XY), yedinci ve sekizinci gelişim haftalarında, sölom epitelinin proliferasyonu ile primer germ kordonları oluşarak gonadın medullasına doğru uzanır. Bunlar testis kordonları olarak bilinir. İçinde buldukları mezenkim dokusundan morfolojik olarak ayırdedilebilen, kompakt hücre kordonları, erişkinde tubuli kontorti seminiferileri oluştururlar. Bu kordonlar bezin hilus bölgesine doğru, daha sonra rete testisi oluşturacak ince hücre sıralarından oluşan bir ağ şeklinde dağılırlar. Gelişimin daha ileri evrelerinde testis kordonlarının yüzey epiteli ile olan ilişkileri, tunika albuginea adlı yoğun fibröz bağ dokusunun araya girmesi ile sona erer.

Dördüncü ayda, testis kordonları at nalı şeklini alarak, uçları rete testis ile devam eder. Bu durumda testis kordonlarının büyük bölümünü oluşturan üretken bölümler (tubuli kontorti seminiferiler), artık primitif germ hücreleri ve Sertoli destek hücrelerinden oluşan bir epitel doku görünümündedirler.

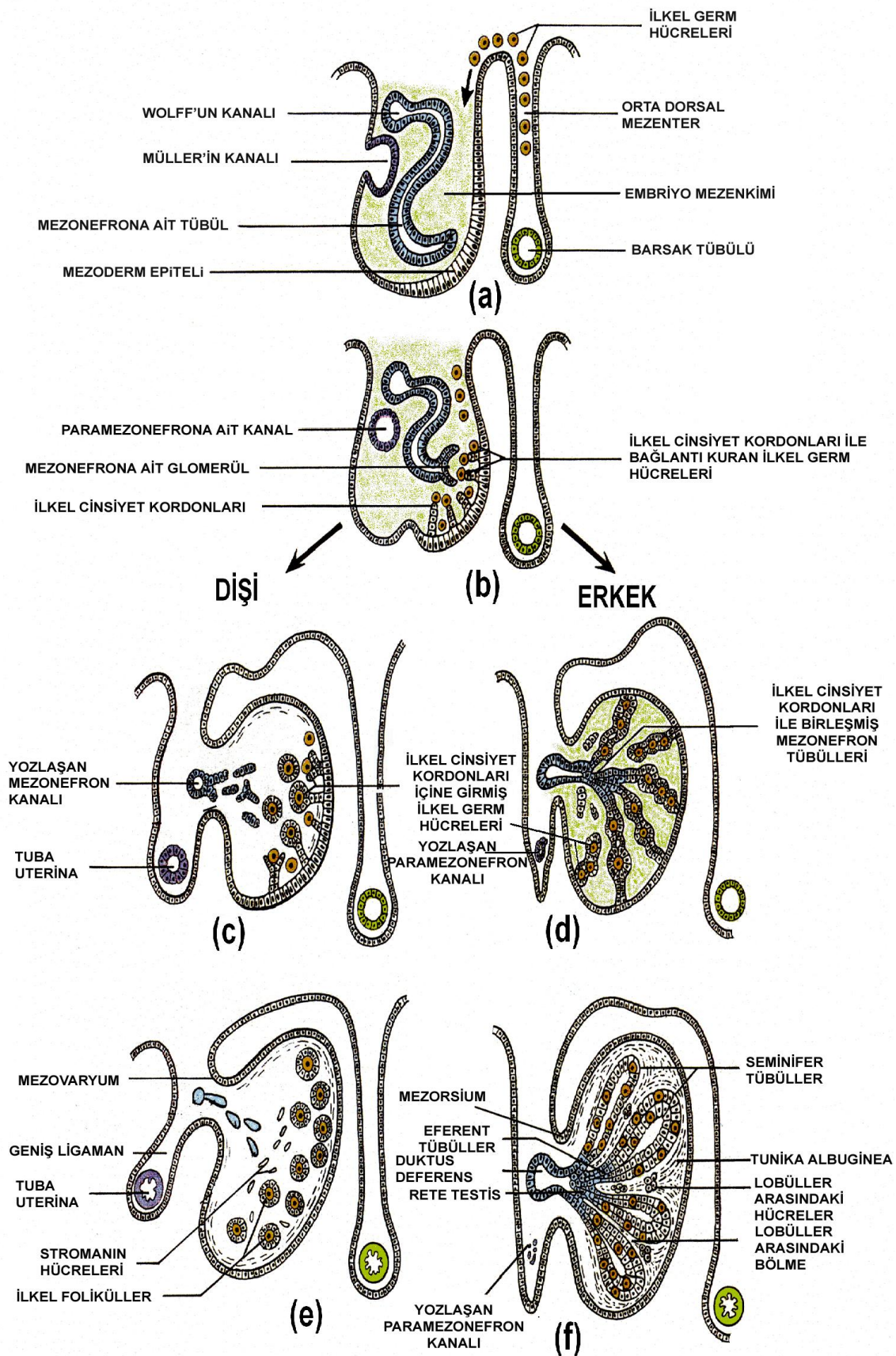
Testisin yüzey epitelini oluşturan sölomik epitel hücrelerinin elektron mikroskopik özelliklerinin Sertoli hücreleri ile olan benzerliğinden dolayı, Sertoli hücrelerinin bu hücrelerden geliştiği kabul görür. Buna rağmen Sertoli hücrelerinin mezonefroz kaynaklı olduğu görüşü de tartışılmaktadır. Bu bulgular ışığında, sölomik epitelden kaynaklanan bu hücrelerin testis içine hareket ettikleri ve buradaki hücre sütuncuklarını oluşturdukları düşünülmektedir [19].

Destek hücreleri olan Sertoli hücreleri, gelişimin ileri safhasında tubuli kontorti seminiferileri ve tubuli rektleri meydana getirecek olan hücre sütuncuklarını oluştururken, bölgedeki primordial germ hücreleri bu sütuncukların içerisine girerek sütuncukların oluşumuna katkıda bulunur. Sertoli hücresi, gelişimin ileri safhalarında sadece fiziksel destek değil, aynı zamanda sperm oluşumunda spermatogonyumların beslenmesinde anaç rol oynayan hücreler haline gelirler. Sertoli hücreleri, fetal testiste seminifer tübüllerde çoğunluğu oluşturur. Daha sonraki gelişim sırasında, testisin yüzey epiteli düzleşir ve yetişkin testisin dış yüzeyindeki mezoteli oluşturur.

Tubuli rektiden sonra ortaya çıkan rete testis, duktuli efferentesleri oluşturan 15-20 adet mezonefrik tübüller ile devam eder. Bu duktuliler, duktus epididimisi oluşturan mezonefrik kanal ile bağlanırlar.

Genital çizginin mezenkiminde bulunan bazı fibroblast karakterli bağ dokusu hücreleri, testis kordonlarının gelişmeye başlamasıyla birlikte farklılaşmaya başlarlar. Bu farklılaşma sonucunda Leydig hücreleri (intersitisyel hücreler) adı verilen, endokrin hücreler ortaya çıkar.

Gelişimin 8. haftasında, Leydig hücreleri testosteron üretmeye başlarlar. Testisler artık genital kanal ve dış genital organların cinsiyetini etkileyecek hale gelmiştir [15-17, 20].



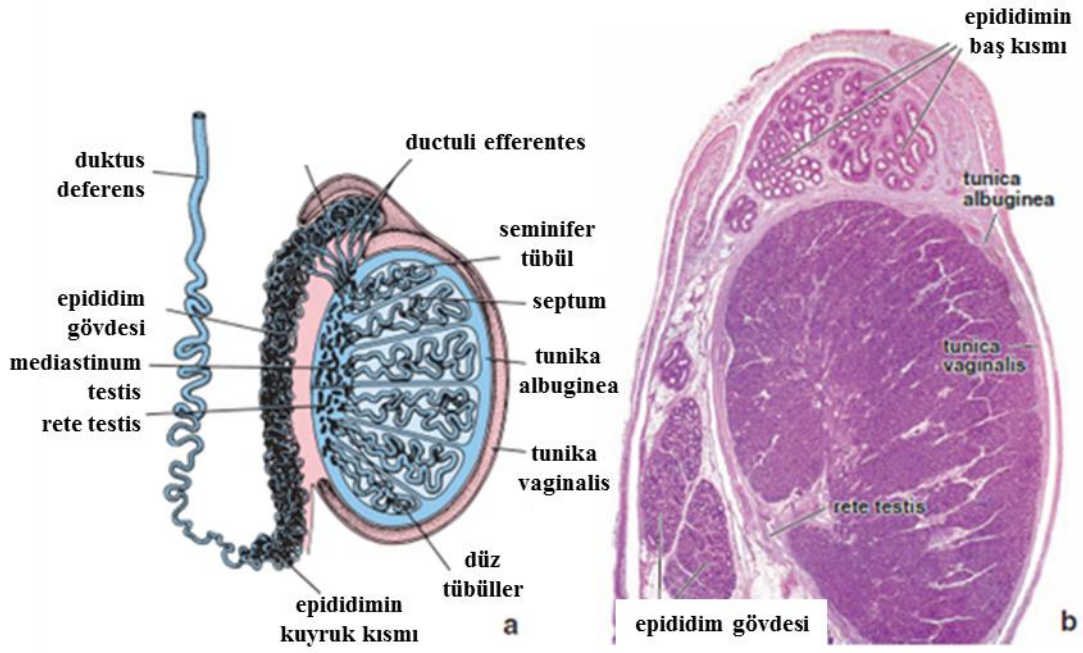
Şekil 2-2 Testisin gelişimi [21].

### 2.1.5. Testis Histolojisi

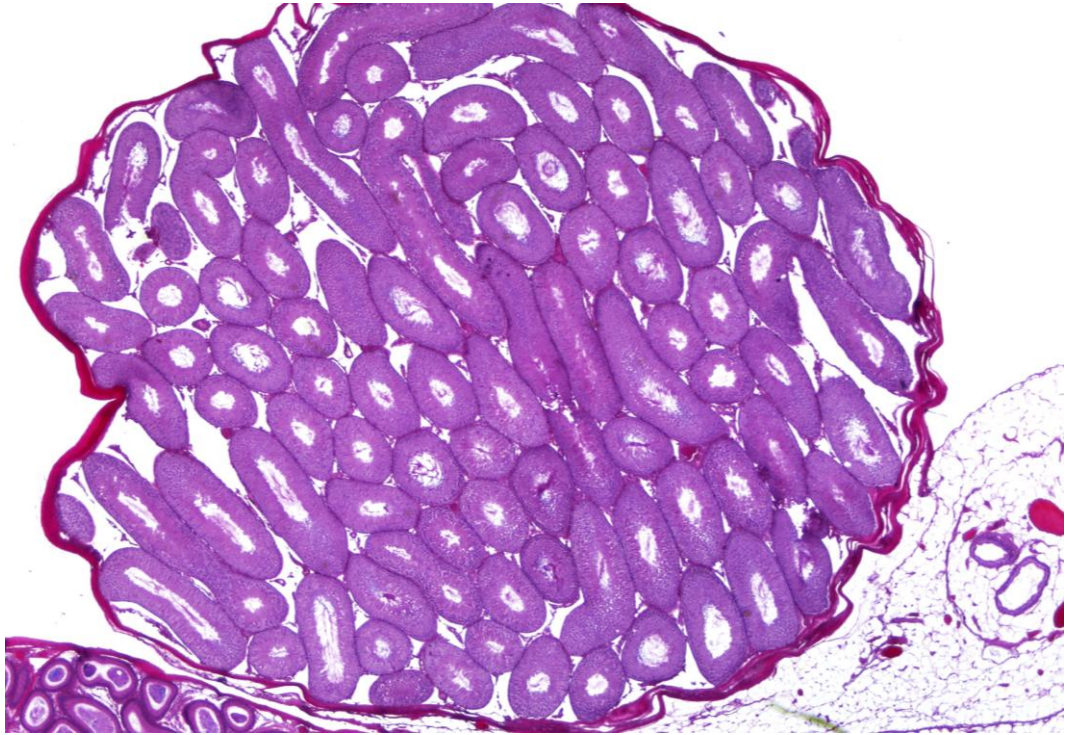
Testisler, karın boşluğunun dışında, skrotum içinde, birbirinden septum skroti ile ayrılmış bir çift organ olarak bulunur. Bu yerleşim, skrotumdaki ter guddelerinin fazlalığı ve yağ dokusunun olmaması gibi etkenler ile birlikte, testislerin vücut ısısından 2°C-3°C düşük bir sıcaklıkta (34°C-35°C) olmasını sağlar. Bu değer, sperm üretimi için en uygun sıcaklıktır [14, 15].

Testisler, tunika albuginea olarak bilinen, yoğun bağ dokusundan oluşan kalın bir kapsül ile sarılıdır. Kapsül üst kısımda kesintiye uğrayarak mediastinum testis ve epididimin yerleştiği yer olan margo mezorkiumu oluşturur. Testisler, skrotumun oluşturduğu kese içerisinde ve duktus deferens, spermatik arter, venöz pleksuslar, lenfatik pleksusları içeren spermatik kordonla asılı bir konumda bulunur [13, 14].

Kapsül testisin arka yüzünde kalın bir katlanma şeklinde içeriye doğru uzanır, bu kısım mediastinum testis adını alır. Mediastinum testisten, testiküler kitleye doğru fibröz bölmeler uzanarak burada 250-300 lopçuk oluşturur. Her bir lopçuk bir ila dört tübül içerir. Her testiste 600-1200 tübül bulunur. Bu tübüller; spermin üretildiği tubuli kontorti seminiferi isimli bir kısım ile bunun devamı olan, tek katlı silindirik epitele sahip, içerisinde spermatogonyum üretilmeyen, düzgün yapıdaki tübülü rektile dönüşür. Tübülü rektiller, mediastinum testis içerisinde birbirine bağlı geniş kanalcıklardan oluşan tek katlı ve tek bir sile sahip epitel hücreleriyle döşeli rete testislere açılır. Rete testis ise; birleşerek, silindirik, silli epitel hücreleri ve fagositotik özelliği olan kübik epitel hücrelerine sahip tek katlı bir epitel ile döşenmiş 12-18 adet duktuli efferenteslere açılır. Bu kanallar ile testis sıvısı ve spermler epididimin baş kısmına aktarılır [14, 18].



Şekil 2-3: Testisin anatomik (a) ve histolojik (b) genel yapısı [22].



Şekil 2-4: Testisin histolojik genel görünümü (H+E, x2).

### **2.1.5.1. İntersitisyel bağ dokusu**

Testislerde seminifer túbüllerin arasında kollajen ve retiküler liflerden oluşan gevşek bağ dokusu bulunmaktadır. Buradaki gevşek bağ dokusunda sinirler, kan kapillerleri, lenf damarları ile bunlara eşlik eden, yer yer gruplaşmış, testosteron yapımından sorumlu Leydig hücreleri bulunmaktadır. Ayrıca testiküler bağ dokusu çeşitli tipte bağ dokusu hücreleri içermektedir. Testis intersitisyel bağ dokusu, túbüllerin yakınında lamina propria oluşturacak şekilde sıkılaşmakta ve bazal membranın hemen altında miyoepteliyal hücreler yerleşmektedir [13, 15, 18].

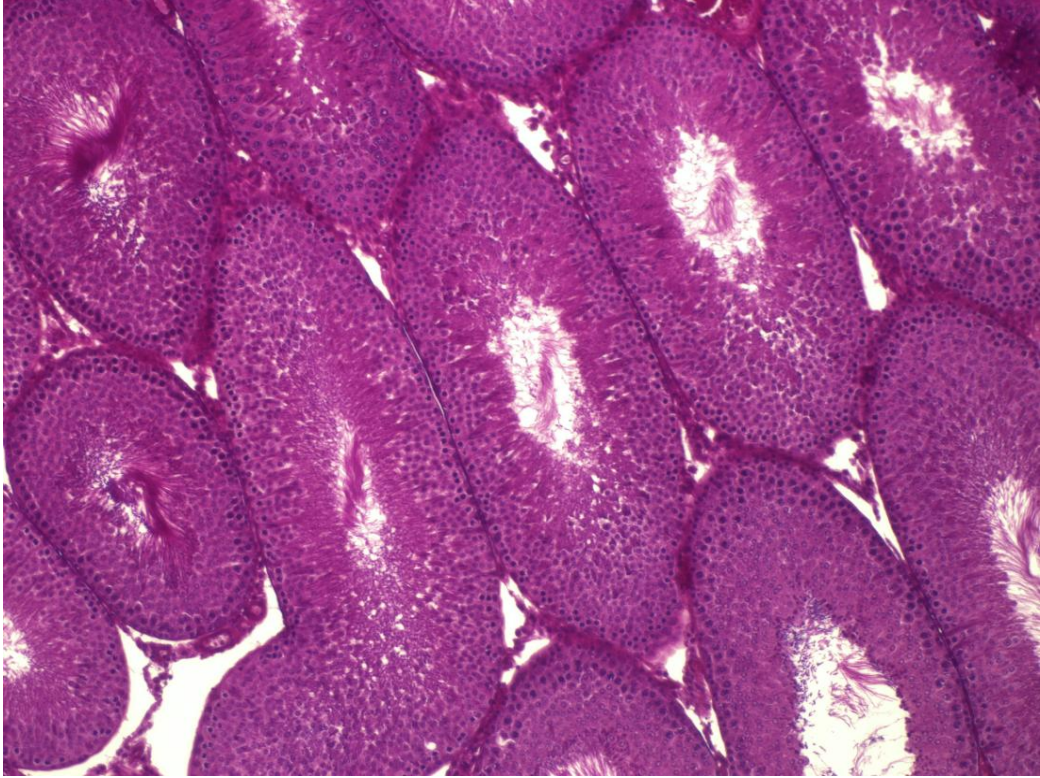
#### **2.1.5.1.1. Leydig hücreleri**

Seminifer túbüllerin arasındaki bağ dokusunda bulunan Leydig hücreleri lipid damlacıklarından zengin eozinofilik sitoplazmaya sahip hücreler olup, genellikle kan proteinleri gibi büyük moleküllerin geçişine izin verecek özellikteki pencere kapillerler ve küçük lenf damarlarına yakın olarak yerleşmişlerdir. Leydig hücreleri, yuvarlak veya poligonal şekilli, bir yada iki nükleolusa sahip merkezi bir nükleusu olan ve yüzeyinde çok sayıda mikrovillus bulunduran hücrelerdir. Bu hücreler túbüler kristal mitokondrileri, lipid damlacıkları ve düz ER'lerinin işbirliği içerisinde testosteron isimli steroid hormonu üretirler. Leydig hücreleri testosteron üretiminde çok önemli bir yer tutmaktadır, serumda bulunan testosteronun yaklaşık olarak %95'i Leydig hücreleri tarafından üretilir [13-15, 18].

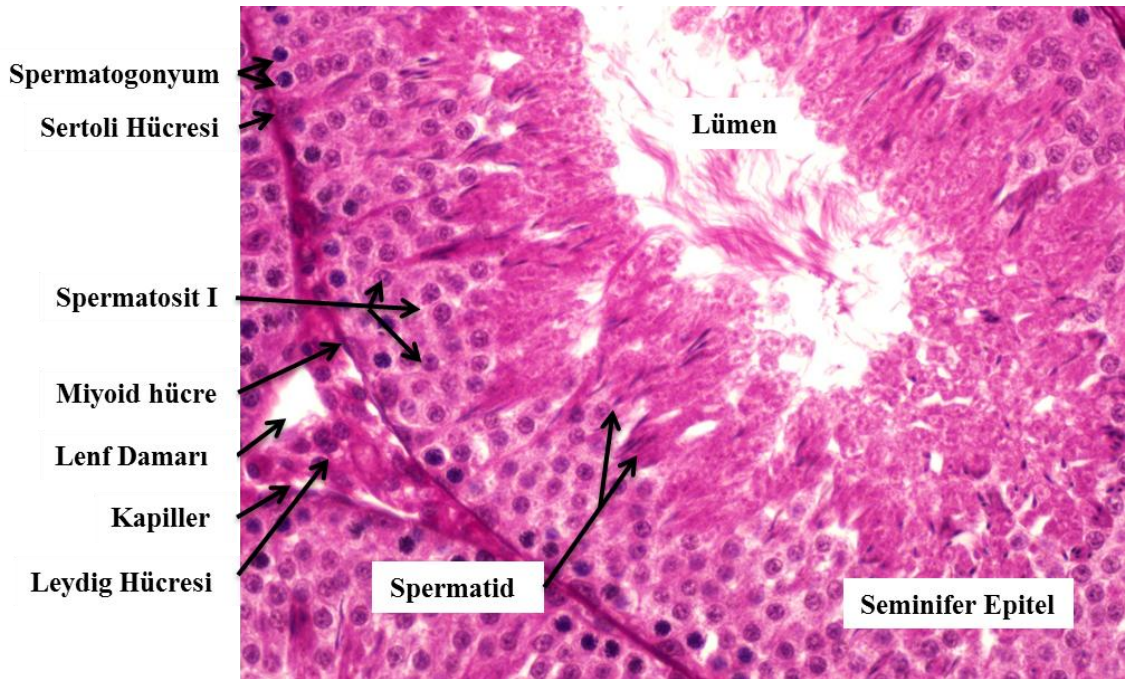
#### **2.1.5.2. Seminifer túbüller**

Seminifer túbüller, spermatogenik hücreler (spermatogonyum, spermatid, spermatozoid) ve Sertoli hücrelerinden oluşan, özelleşmiş seminifer epitel ve bu epitelin çevrelediği lümen oluşur.

Seminifer epitel, bir bazal membran, kollajen lifler, fibroblastlar ve düz kas hücre özelliği de gösteren myoid hücreler tarafından oluşturulan bir lamina propria ile çevrelenmiştir. Myoid hücrelerin yaptığı ritmik kasılmalar, hareketsiz spermaların rete testise iletimini sağlar [13-15, 18].



Şekil 2-5: Seminifer tübüller ve tübüller arası saha ( H+E, x10).



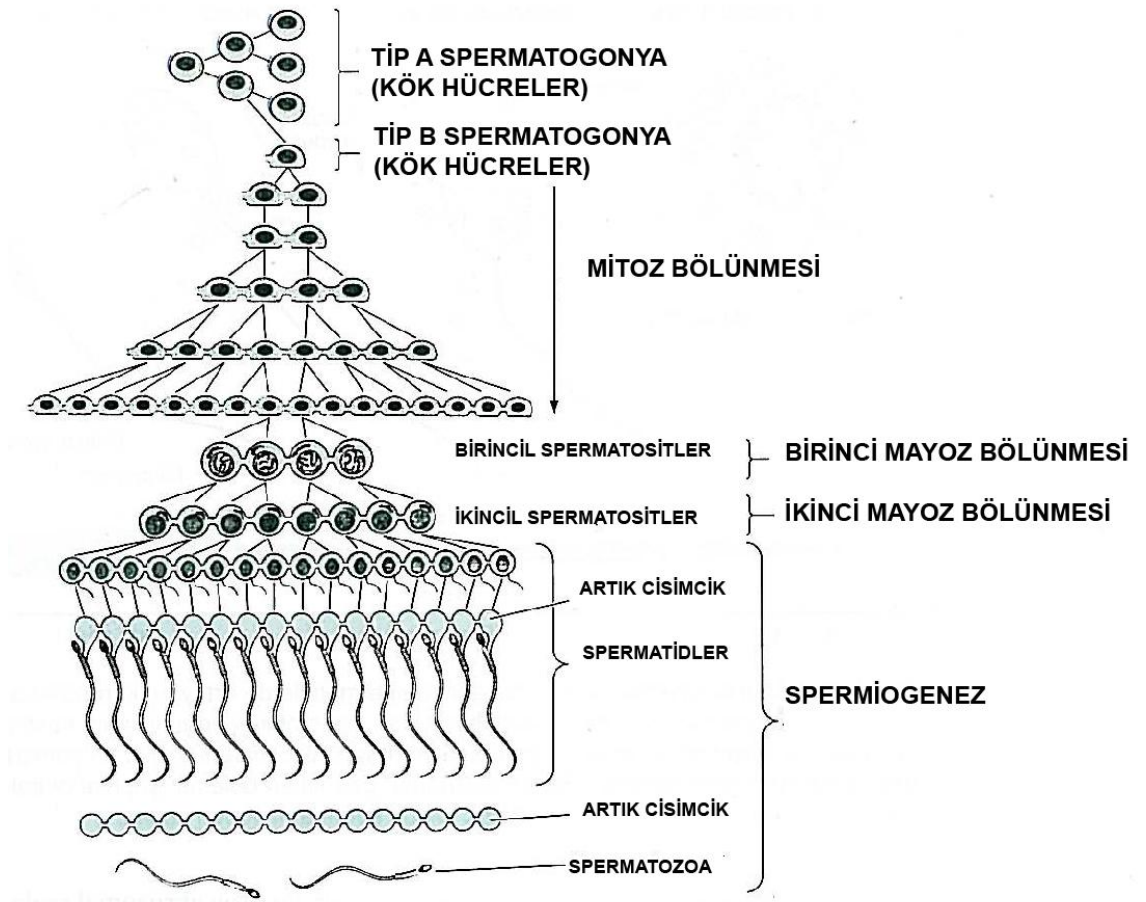
Şekil 2-6: Seminifer tübüller ve tübüller arası saha ( H+E, x40).



### 2.1.5.2.1. Spermatogenez

Seminifer tübüllerde, spermatogonyumlardan sperm oluşması, yani spermatogenez, üç aşamada gerçekleşir. Spermatogonyal aşama (mitoz aşaması), mayoz bölünme aşaması ve spermiyogenez aşaması olarak bilinen bu olayların tümü spermatogenez olarak adlandırılır.

Spermatogonyal aşamada, spermatogonyumlar sürekli olarak mitoz hücre bölünmesi geçirerek çoğalırlar. Bu hücrelerden bazıları mayoz bölünmenin ilk aşamasına (mayoz I) girdiklerinde farklılaşarak spermatosit I'leri oluşturur. Mayoz bölünmenin birinci aşamasında diploid ( $2n$ ) kromozom sayısına sahip olan spermatosit I'ler, bu özel bölünmeyi tamamladıklarında, haploid kromozom sayılı ( $n$ ) spermatosit II adı verilen iki hücre oluştururlar. Spermatosit II'ler ise mayoz bölünmenin ikinci aşamasını (Mayoz II) geçirerek haploid spermatidleri meydana getirirler. Mayoz bölünmeyi tamamlamış olan hücreler spermiyogenez aşamasında farklılaşarak sperm haline gelirler [13-16].



Şekil 2-7: Spermatogenezin aşamalarını gösteren şema [13].

### **2.1.5.2.2. Spermatojenik Hücreler**

#### **2.1.5.2.2.1. Spermatojenyumlar**

Bazal membrana oturmuş 12-15 $\mu$  çapındaki hücrelerdir. Cinsel olgunluk çağından itibaren mitoz bölünmeler geçirerek çoğalmaya ve yeni hücreler oluşturmaya başlarlar. Oluşan hücreler, kök hücre olarak bölünmeyi sürdürebilir ve küçük farklar gösteren yapısal özelliklerine göre birçok çeşitlere ayrılırlar. A pale (Ap) ile A dark (Ad) tiplerine ayrılan son aşamada, Ap'ler spermatojenyum B tipine dönüşür, birkaç mitozdan sonra bu spermatojenyum B'ler mayoz bölünme aşamasına geçerek spermatozoid I'leri meydana getirirler.

#### **2.1.5.2.2.2. Spermatozoidler**

B tipi spermatojenyumların mitoz bölünmesiyle oluşan spermatozoid I'ler 46 kromozom (diploid) (44+XY) ve 4N DNA içerirler. Mitoz bölünmeden hemen sonra bu hücreler mayoz bölünmenin profaz aşamasına girerler ve bu aşama yaklaşık 22 gün sürer. Spermatozoid I'ler yaklaşık 16 $\mu$  büyüklüğündedir ve spermatojenik hücrelerin en büyüğüdür. Birinci mayoz bölünmeden sonra 23 kromozom sayısına sahip (haploid) daha küçük hücreler oluşur, bunlar spermatozoid II olarak adlandırılır. Bu hücrelerde DNA miktarı da yarıya iner (  $4N \rightarrow 2N$  ). Spermatozoid I'lere göre bu hücrelerin bölünmesi çok kısa sürmektedir, bu yüzden testis kesitlerinde nadiren görülürler. Spermatozoid II'lerin bölünmesi sonucunda spermatidler oluşur.

#### **2.1.5.2.2.3. Spermatidler**

Spermatozoidlerin ikinci mayoz bölünmesinden sonra oluşan spermatidler haploid kromozoma sahiptir ve bu hücreler seminifer tübül lümenine yakın hücrelerdir. Spermatidler spermiyogenez adı verilen bir farklılaşma süreci geçirirler. Sperm oluşması sırasında geçirdikleri aşamalara göre çeşitli isimler alırlar. Genel yapı olarak hafif uzamış küçük hücreler olup büyük bir nükleolusa sahiptirler. Spermiyogenez, spermatogenezin son aşamasıdır ve spermatidler bu aşamada erkek DNA'sını ovuma aktarmak için özelleşmiş olan sperm halini alırlar.

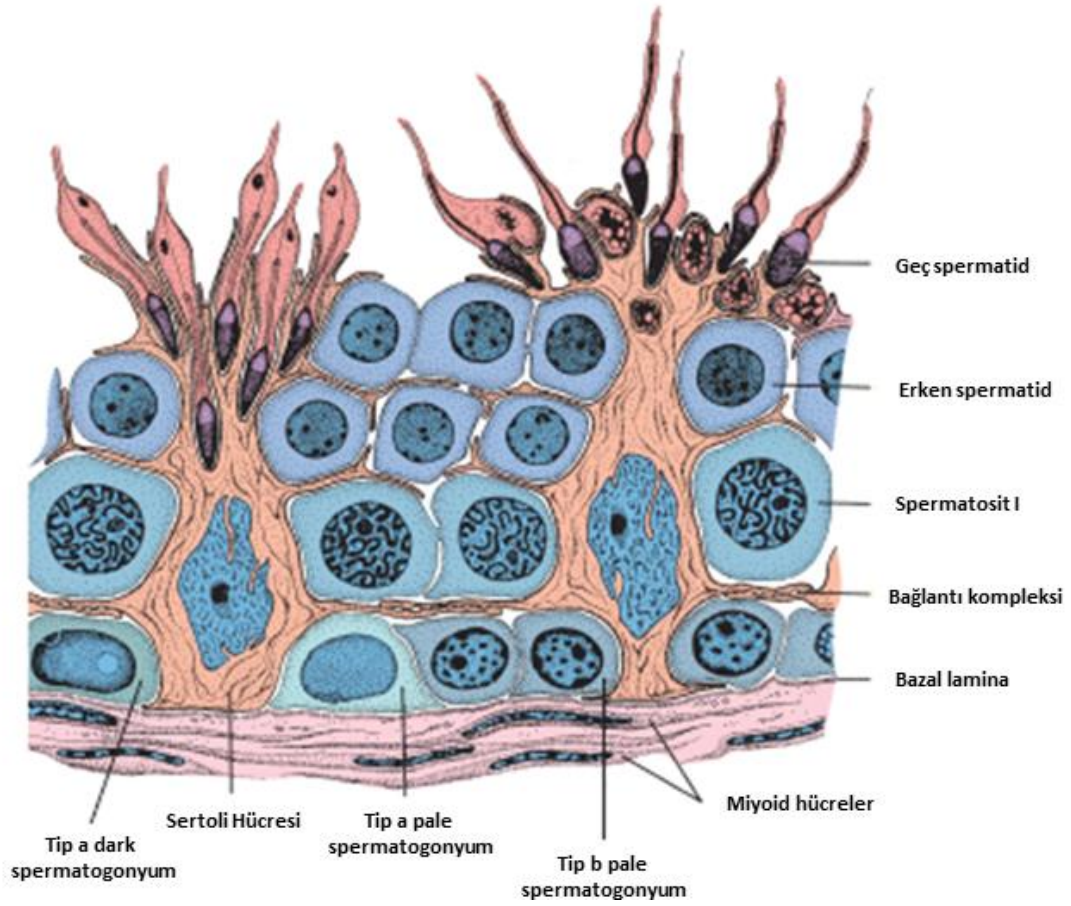
### 2.1.5.2.3. Spermiyogenez

Spermiyogenez, bir bütünü tamamlayan, baş, boyun ve kuyruk gelişimi şeklinde üç karmaşık olayın neticesinde spermin oluşmasını ifade eden bir sürectir.

Sperm başının oluşumu sırasında esas olarak spermin yumurtayı dölleyebilmesi için gerekli yapıların gelişmesi söz konusudur. Bu aşamada Golgi aygıtında, nükleusta ve sitoplazma içerisinde bir takım değişiklikler görülür. Bu değişikliklerden en önemlileri nükleus yoğunlaşması, akrozom gelişimi ve sitoplazmanın kuyruk bölümüne doğru ağmasıdır. Kromatin yoğunlaşması ile nükleusta hacimce azalma meydana gelerek baş türe özgü bir şekil alır. Kromatin yoğunlaşması DNA paketlerinin sıkılaşması ile sağlanır. Akrozom gelişmesi aşamasında, döllemenin sağlanmasında gerekli hidrolitik enzimlerin depolanması ve sentez edilmesi için akrozomal kese oluşumu görülür. Akrozomal kese; golgi evresi, kep (şapka) evresi, akrozomal evre olarak adlandırılan 3 evrede incelenebilir. Akrozom gelişip, nükleus sıkılaştırırken diğer taraftan sitoplazma, kuyruğun oluşmakta olduğu yöne doğru içerdiği materyallerle birlikte ağmaktadır. Bu olayın gerçekleştirilmesini kolaylaştırmak için bir çekirdek çevresi halka ve bu halkaya tutunmuş mikrotübüllerden oluşan, konik şekilde düzenlenmiş manşet gelişir. Bu arada mitokondriler de birbirleriyle birleşip büyüyerek manşetin yolak olarak gösterdiği yönde, yani kuyruğun oluşma yönünde hareket ederler ve sonunda kuyruğun orta parçasına yerleşirler. Sitoplazmanın aşağı ağan kısımları residual sitoplazma olarak adlandırılır ve aynı hücreden gelen sperm grupları lümene atılana kadar birbirleri ile sitoplazmik köprücükler aracılığıyla bağlıdır.

Boyun oluşumunda, akrozom gelişirken, sentriol çiftleri birbirinden uzaklaşarak biri proksimale diğeri de distale yerleşir. Distal sentriol, hücrenin uzun eksenine paralel konumdadır ve aksonemi oluşturmak üzere ilk başlangıç proteinlerini üretir. Aynı zamanda boynun bağlayıcı parçasının oluşmasına katkıda bulunur.

Kuyruk oluşumu safhasında, distal sentriol tarafından oluşturulan başlatılan aksonema, dimerlerin eklenmesi ile gittikçe uzar. 9+2 mikrotübül dizilimine sahip bir yapı gösterir. Aynı zamanda mitokondriler, kuyruğun orta parça bölgesinde annulus adı verilen son halka hizasına kadar sarmal bir yapı oluşturularak yerleşir. Bu arada aksonema etrafında, aksosomaya bağlantılı olarak dış yoğun fibriller yerleşir ve en dış kısımda da fibröz bir kılıf oluşur. Fibröz kılıfın dış kısmını da hücre zarı sarar.



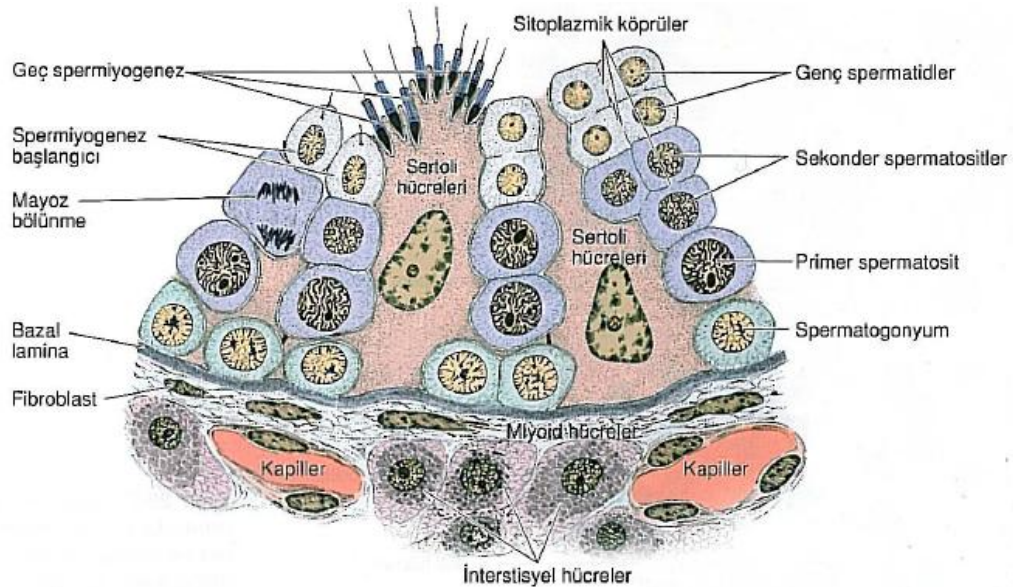
**Şekil 2-8: Spermatogenik hücrelerin şematik görüntüsü [22].**

#### 2.1.5.2.4. Sertoli hücreleri

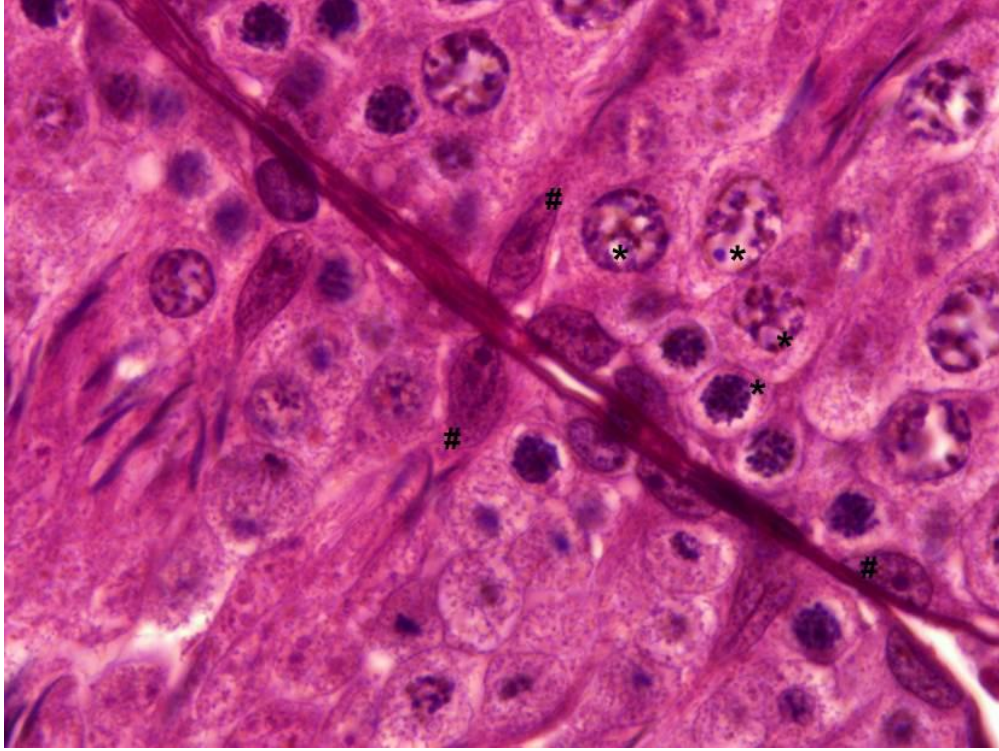
Sertoli hücreleri puberteye kadar seminifer epitelin baskın hücreleridir. Puberteden sonra seminifer tübül epitelindeki hücrelerin %10'unu oluştururlar. Bu hücreler prizmatik hücrelerdir ve bazal membrana oturup, seminifer tübül lümenine uzanırlar. Sertoli hücreleri, gelişmekte olan spermatogenik hücreleri cep şeklindeki girintileri içine alarak sararlar, bu yüzden Sertoli hücrelerinin apikal ve lateral sınırlarını ayırdetmek zordur. Her hücrede armut biçiminde nükleus, büyük bir nükleolus ve az miktarda heterokromatin bulunmaktadır. Hücre sitoplazmalarında, düz ve granüllü ER, mitokondriler, yaygın bir Golgi aygıtı, lizozomlar, lipid damlacıkları ile mikrotübüller ve ara filamanlardan zengin bir hücre iskeleti bulunur. Ayrıca sitoplazmalarında Charcot-Bottcher ve Sprango kristalleri içerirler. Bitişik hücreler bazolateral bölgelerinde bulunan sıkı bağlantı kompleksleri ile birbirlerine tutunarak seminifer epiteli, bazal ve adluminal olarak iki kompartmana ayırır. Kan-testis bariyeri oluşturan

bu kompartman, gelişmekte olan spermatozoidleri ve spermatidleri, spermatogonyumlardan ayırır. Bu kompartmanın bazal kısmında, spermatogonyumlar ile mayoz I'in leptoten ve zigoten aşamalarında bulunan spermatozoidler bulunur. Pakiten safhasında spermatozoidler, adluminal kompartmana geçerler. Kan testis bariyeri, spermatogonyumlardan farklılaşarak oluşan spermatozoid ve spermatidleri, immünolojik tanınmadan korur ve sperm spesifik antikor oluşumunu önler.

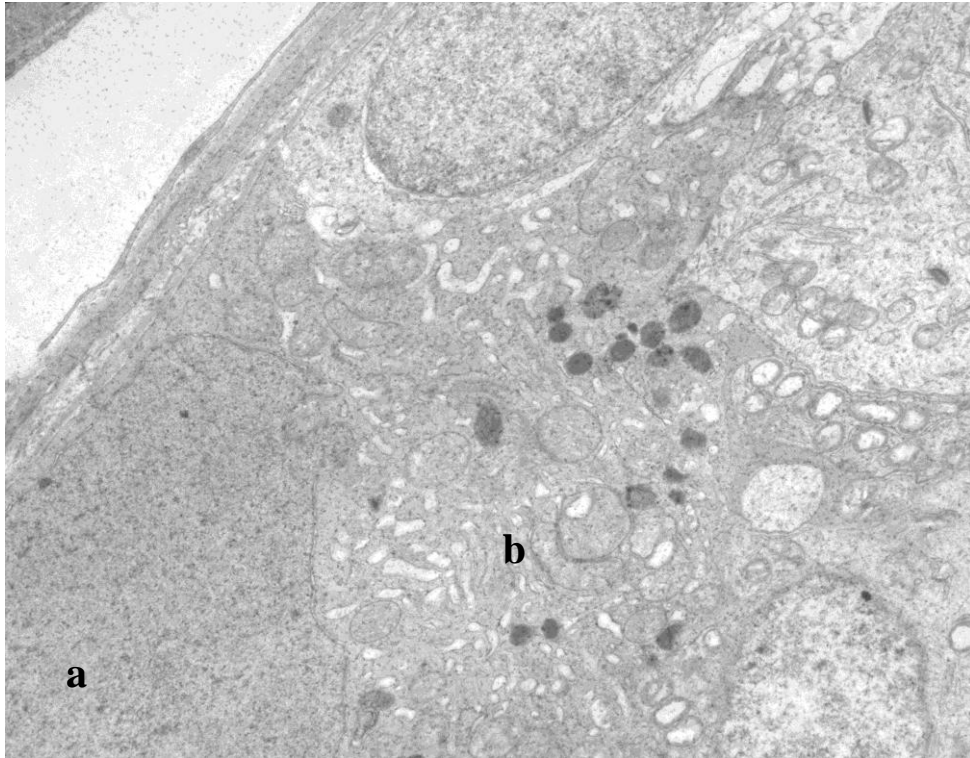
Sertoli hücrelerinin görevleri arasında, gelişmekte olan spermatogonyumların desteklenmesi, beslenmesi ve korunması, spermiyogenez sonunda ortaya çıkan artık cisimciklerin fagositoz ile ortadan kaldırılması, olgun spermatidlerin seminifer tübül lümenine salınımının kolaylaştırılması ve seminifer tübül lümenine protein ve iyonlardan zengin bir sıvı sağlanması bulunmaktadır. Ayrıca Sertoli hücreleri, yaptığı salgılar ile bazı androjen ve hormonlar üzerine etki ederek önemli bir rol üstlenirler. Bu hücrelerde androjen bağlayıcı proteinin salgılanması, folikül uyarıcı hormon (FSH) ve testosteron kontrolü altında gerçekleştirilerek, spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaştırılmasını sağlar. Hipofizinin ön lobundan salgılanan FSH'nin sentezi ve salınımının kontrolü Sertoli hücrelerinden, inhibin ve aktivin altünitelerinin salgılanması ile sağlanır. Yine Sertoli hücrelerinde üretilen AMH, embriyonik gelişim sırasında erkek fetusta Müller kanalının gerilemesini sağlar [13-15, 18].



**Şekil 2-9: Sertoli hücreleri ve spermatogonyumların şematik görüntüsü [13].**



Şekil 2-10: Sertoli hücreleri (#) ve spermatojenik hücrelerin (\*) histolojik görüntüsü (H+E, x100).



Şekil 2-11: Sertoli hücresi nükleusu (a) ve sitoplazmasının (b) elektron mikroskopik görüntüsü (x 12000).

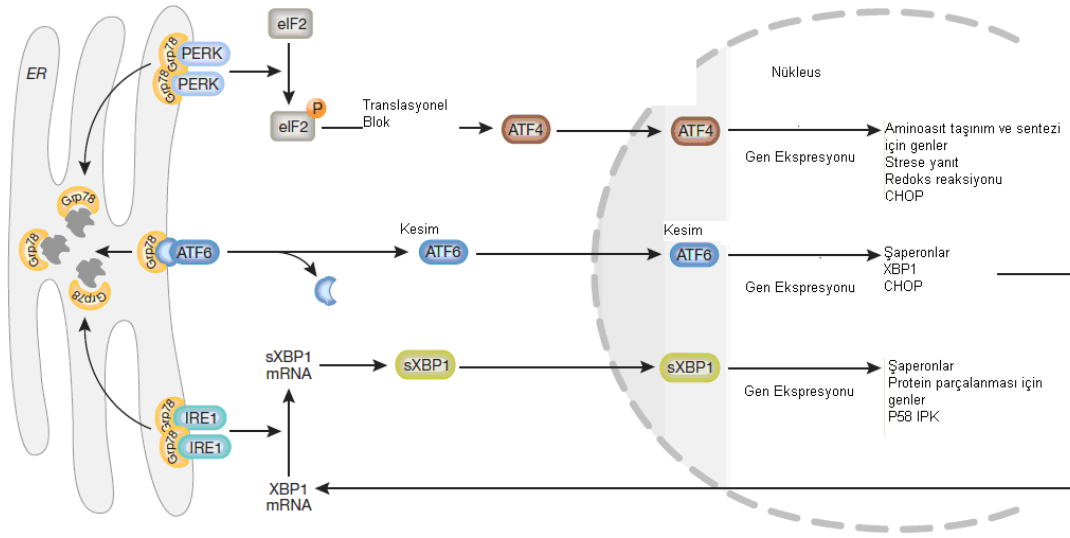
### 2.1.6. Endoplazmik retikulum, endoplazmik retikulum stresi ve katlanmamış protein yanıtı

ER, hücre sitoplazması içinde bulunan, yer yer sisterna adı verilen genişçe şişkinlikler yapan bir kanallar sistemidir. Fosfolipid yapıda bir zar ile çevrilmiştir. Bu zar sisteminin bir bölümünün üzerine protein sentezinde görevli olan ribozomlar yerleşerek granüllü ER'yi meydana getirirler. Ribozom bulunmayan bölüme düz ER adı verilir ve bu bölge proteinlerin katlanması, paketlenmesi ve kortizon gibi steroidlerin yapılmasında görev alır [13].

ER, salgılanan ve hücre dışına gönderilecek proteinlerin katlanmasından, olgunlaşmasından, hücre içinde rol alacağı bölgeye taşınmasından ve taşınacak proteinlerin kalite kontrolünden sorumlu en önemli organeldir. ER'ye gelen yeni sentezlenmiş proteinler çeşitli değişimler (N-glikozilasyon, disülfid oluşumu, hidroksilasyon, oligomerizasyon) geçirerek katlanır. Ayrıca bir  $Ca^{+2}$  deposu olan ER, proteinlerin doğru katlanmasına yardımcı şaperon adı verilen bazı  $Ca^{+2}$  bağımlı moleküller (Örn. GRP78, GRP94) içermektedir. Proteinlerin katlanması karmaşık işlemler ile sağlanmaktadır ve hata olasılığı oldukça yüksektir. N-bağımlı glikozilasyon inhibisyonu, kalsiyum dengesinin bozulması, hipoksi, oksidatif stres, enfeksiyonlar, sıcaklık stresi gibi birçok etken protein katlanması olayına etki edebilir. Bu etkenler ER'nin normal işlevinin bozulmasına, dolayısı ile ER lümeninde katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine neden olur. Bu olay ER stresi olarak adlandırılır. Böyle bir durumda hücrede stresin engellenip homeostazisin (denge) eski haline döndürülmesi için KPY adı verilen ve bir takım hücre içi sinyal yollarının katıldığı olaylar dizisi aktif hale gelmektedir. Stres altında olmayan hücrelerde, GRP78 (HSPA5), ER lümen bölgesinde yerleşim gösteren 3 transmembran proteine bağlanır:

- 1- IRE1 [ERN1 (ER den nükleusa sinyal 1) geninin kontrolündeki protein]
- 2- PERK (ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 2-alfa kinaz 3)
- 3- ATF6 (aktive edici transkripsiyon faktör 6)

Bu proteinler, ER stresi şartları oluştuğunda, GRP78 den serbest bırakılıp, aktif hale gelirler ve sinyal transdüksiyon aşamalarını uyararak KPY düzenleyicisi olarak rol alırlar [3]. Yani, KPY'nin aktif hale gelmesi GRP78 aracılığıyla IRE1, PERK ve ATF6 olmak üzere 3 farklı ER stres algılayıcısı tarafından düzenlenmektedir [1, 2, 23, 24].



**Şekil 2-12: Katlanmamış protein yanıtı sinyal yolağı [1].**

### 2.1.7. Tunikamisin

Tunikamisin, *Streptomyces clavuligerus* ve *Streptomyces lysosuperficus* gibi bazı bakteriler tarafından üretilen, homolog nükleozid antibiyotiklerin bir karışımıdır. Tunikamisin, glikoprotein sentezinin ilk adımında, UDP-N-asetilglukozamin yapısındaki, N-asetilglukozamin-1-fosfatın, dolikol fosfata transferinin katalizinde rol alan GTP enzimine (GlcNAc fosfotransferaz) etki ederek, dolikol fosfatın, N-asetilglukozamin-1-fosfata bağlanmasını engeller [5, 6, 8, 25-27]. Böylece dolikol fosfat aracılığıyla birbirine bağlanan moleküllerin kimyasal bağlanımı engellenmiş olur. Tunikamisin bu şekilde N-bağlı glikoproteinlerin sentezini bloke ederek ER lümeninde hatalı katlanmış veya katlanmamış proteinlerin yığılmasına neden olur ve bu olay sonucunda ER stresi oluşmaktadır [5]. Özellikle ER stresi çalışmalarında deneysel stres oluşturmak için tunikamisin kullanılmaktadır [3, 5, 28-31].

### 2.1.8. Kısırlık – Üreme

Üreme fonksiyonunun yerine getirilememesi kısırlık olarak tanımlanabilir. Doğurganlığı normal olan çiftlerin korunmasız düzenli cinsel ilişki ile 1 yıl içinde gebe kalma olasılığı yaklaşık %85'tir, çiftlerin yaklaşık %15'inde ise kısırlık görülmektedir. Bu süre içinde gebelik için çaba harcayan genç çiftlerde, bir menstürel siklusta gebe kalma oranının yaklaşık %25 olduğu bilinmektedir. Kısır çiftlerin %25-30'unda yalnızca erkeğe bağlı sorunlar, %35-40'ında yalnızca kadına bağlı sorunlar



bulunmaktadır. Ayrıca %20-25'inde ise hem erkek hem kadına bağlı, %10-15'inde ise nedeni bilinmeyen sorunlar bulunmaktadır. Bu yüzdelerden yola çıkarak kısırlık sebebinin erkek olduğu durumlar %50-55 civarındadır. Bu yüzden tanı yöntemleri arasında erkeğin değerlendirilmesi önemlidir [32-36].

Kadın ve erkeklerde üreme sistemlerinin temel işlevi kadın ve erkek gamet hücrelerinin üretilmesi ve üreme hormonlarının salgılanmasıdır. Bu işlevin sağlıklı olarak yerine getirilebilmesi için normal genetik yapı, bozulmamış bir anatomi ve salgı organlarının sağlıklı çalışması gerekmektedir. Kadınlarda anatomik olarak mevcut fonksiyonel overler, normal fallopi tüpleri, uterus ve vajina ile normal dış genital organlar gereklidir. Erkeklerde ise skrotum içine yerleşmiş, sperm üretimi yapan testis, üretilen spermlerin iletiminden ve meninin zenginleştirilmesinden sorumlu kanallar, yardımcı salgı bezleri ve fonksiyonel bir penis gereklidir. Üreme işlevinin başarılı şekilde gerçekleştirilmesi için hem kadın hem erkekte tüm bu anatomik, fizyolojik, hormonal ve immünolojik sistemlerin sağlıklı şekilde çalışması gerekmektedir. Aksine bir durum üreme işleminde bozulmaya ve kısırlığa yol açabilmektedir [36].

Spermatogenezin başarılı şekilde sağlanması için hassas bir mikro çevreye ihtiyaç vardır. Sertoli hücreleri ve germ hücreleri arasında yakın ve çok yönlü bir etkileşim bulunmaktadır. Bir Sertoli hücresi, farklı gelişim aşamalarındaki 50'den fazla germ hücresi ile bağlantıdadır. Sertoli hücreleri bu germ hücrelerini, çoğalması ve farklılaşması için gelişim faktörleri ve besinlerle besleyerek destekler. Sertoli hücreleri, iki Sertoli hücresi arasında bulunan sıkı bağlantı (tight junction) ile kan-testis bariyeri oluşturarak farklılaşan germ hücrelerini immünolojik tanınmadan korur. Ayrıca Sertoli hücreleri, spermatositlerin ve spermatidlerin, spermiyasyona devam ettirilmesinde görev alır. Spermiyasyonda Sertoli hücreleri, artık cisimciklerin atılmasını, spermatidlerden geriye kalan sitoplazmanın fagositozunu sağlarlar. Sertoli hücrelerinin başka bir önemli rolü ise interstisyel sıvının ve salgılanan sıvının seminifer tübül lümenine emilmesi-aktarılmasıdır. Bu sıvı, spermlerin rete testis ve epididime iletilmesini sağlar. Tüm bu fonksiyonları ile Sertoli hücreleri uygun bir spermatogenez için vazgeçilmezdir. Bu fonksiyonlardan herhangi birinde oluşacak bir arıza, spermatogenezde başarısızlıklara, bu da germ hücrelerinde hasara sebep olabilmektedir. Germ hücreleri ve Sertoli hücreleri arasında desmozomlar, gap junctionlar, tübülo bulbar kompleksler ve ektoplazmik özelleşmeler gibi değişik çeşitlerdeki hücre bağlantı aparatları ile oluşan

yakın morfolojik ilişki vardır. Spermatogenezdeki bozukluktan hangi hücre tipinin sorumlu olduğunu anlamak zordur. Bu önemli rolleri ile Sertoli hücrelerinin işlevlerindeki yada morfolojisindeki bozukluklar, sperm üretimini, dolayısı ile de üreme başarısını etkileyebilmekte ve erkek kısırlığına yol açabilmektedir [4, 32-34, 36-38].

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma için İstanbul Üniversitesi Hayvan Denepleri Etik Kurulu'ndan 29.12.2011 tarihli ve 2011/168 sayılı onay alınmıştır ve tüm çalışmalar Etik Kurul ilkelerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma, T.C. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda 10.10.2011-24.07.2013 tarihleri arasında yürütülmüştür. Çalışmada İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen 32 adet, ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen, 2,5-3 aylık, yetişkin, Wistar Albino sıçanlar kullanılmıştır. Deneş hayvanları İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deneş Hayvanları Araştırma Laboratuvarında standart şartlar altında muhafaza edilmiştir. Tüm hayvanlar, içerisinde %21 protein bulunan pellet yemler ve şebeke suyu ile serbest olarak beslenmiştir. Bir haftalık adaptasyon süreci tamamlandıktan sonra hayvanlar 8'erli 4 gruba ayrılmıştır.

#### 3.1. GEREÇLER

##### 3.1.1. Alet ve teçizat

- 5 numaralı ince uçlu pens
- 7 numaralı ince uçlu pens
- Pozitif şarjlı lam (Histobond)

##### 3.1.2. Kimyasal malzemeler

- Apoptag Plus Peroxidase Kit (Millipore)
- Antibody diluent (Invitrogen)
- GRP 78/BiP (N-20) Antibody (Santacruz)
- Tunikamisin (Sigma)
- Gluteraldehit (Merck)
- Osmium tetroksit (Merck)
- ImmunoCruz goat LSAB Staining System (Santacruz)
- Hidrojen Peroksit (Merck)

### 3.1.3. Cihazlar

Takip cihazı (Thermo Scientific Microm STP120)

pH metre (İnolab wtw)

Hassas terazi (Sartorius)

Manyetik karıştırıcı (IKA Rct Basic)

Etüv (Heraeus)

Mikrotom (Thermo Scientific Microm hm430)

Ultramikrotom (Reichert UM2 - Reichert UM3)

Işık mikroskobu (Olympus BX61)

Elektron mikroskobu (Jeol Jem-1011)

### 3.2. DENEY HAYVANLARI

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen 32 adet, 200-250 gr ağırlığında, 2,5-3 aylık ergin, erkek, albino Wistar sıçan kullanılarak gerçekleştirildi. Sıçanlar sıkıştırılmış pellet yemlerle serbest olarak beslendiler. Oda sıcaklığında 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık şartlarında bırakıldı. Her deney grubu farklı kafeslerde muhafaza edildi.

### 3.3. DENEY GRUPLARI

- 1. Kontrol grubu:** 8 hayvana, ilk gün, tek doz, subkutan olarak, 1 ml 0,09'luk bazik (pH 9) H<sub>2</sub>O çözeltisi verilip 7. günün sonunda testis dokusu alındı.
- 2. 7 gün grubu:** 8 hayvana, ilk gün, tek doz, subkutan olarak 200µg/kg tunikamisın verilip 7. günün sonunda testis dokusu alındı.
- 3. 14 gün grubu:** 8 hayvana, İlk gün, tek doz, subkutan olarak 200µg/kg tunikamisın verilip 14. günün sonunda testis dokusu alındı.
- 4. 21 gün grubu:** 8 hayvana, İlk gün, tek doz, subkutan olarak 200µg/kg tunikamisın verilip 21. günün sonunda testis dokusu alındı.

Hayvanlara deney sürelerinin sonunda 120 mg/kg tiyopental sodyum verilip, doku örnekleri alındıktan sonra sakrifiye edildi.

### **3.4. MORFOLOJİK YÖNTEMLER**

#### **3.4.1. Histokimya yöntemleri**

Dokular Davidson'un tespit çözeltisine (300ml %37lik Formaldehit, 150ml %100 Etil alkol, 50ml Glasiyal asetik asit, 500ml distile su) alınarak tespit edildi. İnsulin iğnesi ile testislerin her iki kutbunda fiksatifin tunika albugineayı kolay geçebilmesi için 5'er adet delik açıldı. 24 saatlik fiksasyondan sonra ikinci bir fiksator olarak nötral tamponlanmış formol kullanıldı. Daha sonra rutin ışık mikroskopik takip yöntemleri kullanılarak testis parçaları parafine gömüldü. Mikrotom ile 4-5µ kalınlığında alınan parafin kesitler ışık mikroskobu incelemeleri için pozitif şarjlı lamlara alındı.

##### **3.4.1.1. Hematoksilen + Eozin**

Hematoksilen Eozin (H+E) boyaması testis dokusunun genel görünümünü izlemek amacıyla yapıldı. Toluol ile parafinden arındırılan kesitler yoğunluğu azalan alkol serilerinden geçirilerek saf suya alındı. Daha sonra hücre nükleus boyanması için hematoksilende 15 dakika bekletildi. Çeşme suyunda 10 dakika morartmaya bırakıldıktan sonra %1'lik asit alkolde kısaca çalkalanıp çeşme suyunda tekrar 10 dakika morartmaya bırakıldı. Morartmadan sonra sitoplazma boyanması için 2 dakika eozin boyasında bekletildi. Son olarak yoğunluğu artan alkol serilerinden geçirilen dokular toluol ile saflaştırma işlemi yapıp entellan ile kapatıldı.

#### **3.4.2. İmmünohistokimya**

Doku örneklerinde, hücre ve doku antijenlerini göstermek amacı ile işaretlenmiş poliklonal antikor kullanılarak Streptavidin-Biotin-Peroksidaz yöntemi ile immünohistokimyasal boyama yapıldı. Apoptotik hücreleri işaretlemek için TUNEL yöntemi uygulandı.

##### **3.4.2.1. GRP78 İmmünohistokimyası**

ER stresinin belirteci olan GRP78'in immünohistokimya işlemleri, Santa Cruz GRP78 (N-20) sc-1050 primer antikor ve ImmunoCruz™ goat ABC Staining System sc-2023 sekonder kiti ile yapıldı.

1. Kesitler 3 x 5 dakika toluolde, 2 x 10 dakika %100 etanolde, 2 x 10 dakika %95 etanolde, 8 dakika %90 etanolde, 8 dakika %70 etanolde daha sonra 8 dakika saf suda bekletilerek parafinden arındırılıp suya indirildi.

2. Sıcaklık uygulaması ile antijenleri açığa çıkarmak için sitrat buffer kullanılarak mikrodalga fırını ile uygulama yapıldı. Daha sonra 20 dakika oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı.
3. Soğuma işlemi bittikten sonra kesitler su ile yıkandı.
4. 3 kere 5'er dakika fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkama yapıldı.
5. 10 dakika %1'lik Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) uygulandı.
6. Bloklama kit içerisindeki bloklama serumu ile 1 saat yapıldı.  
(15µl Serum + 985µl PBS)
7. Primer antikor 1'e 50 oranında seyreltilerek kesit başına 100µl uygulandı ve bir gece +4 °C de bırakıldı. Negatif kontrol örneğine primer antikor yerine PBS uygulandı.
8. 3 kere 5'er dakika PBS ile yıkama yapıldı.
9. Biotinli sekonder antikor (Biotinlated seconder antibody) 1 saat uygulandı  
(15µl Serum + 7,5µl Biotinlated Antibody + 980µl PBS )
10. 3 kere 5'er dakika PBS ile yıkama yapıldı.
11. Avidin biyotin karışımı 45 dakika uygulandı.  
(7,5µl Avidin+7,5µl Biotinlated HRP+250µl PBS)
12. 3 kere 5'er dakika PBS ile yıkama yapıldı.
13. 6 dakika DAB kromojen uygulandı.
14. Nükleus boyanması hematoksilin ile yapıldı.

### **3.4.2.2. Apoptoz Tayini**

Apoptoz tayini için in situ DNA uç işaretleme yöntemi (TUNEL Yöntemi) kullanıldı. Kesitler 4-5µ olarak alındı ve 37 °C'lik etüvde bir gece bekletildi ve kit ile birlikte önerilen işlemler uygulandı.

#### **3.4.2.2.1. TUNEL Yöntemi**

Kesitler 3 kere 5'er dakika toluolde, 2 kere 5'er dakika %100 alkolde, 5 dakika %96 alkolde, 5 dakika %70 alkolde, 5 dakika PBS içinde bekletilerek parafinden arındırılıp suya indirildi. Kesitler suya indirildikten sonra proteinlerin sindirilmesi işlemi, kesitlere oda ısısında 15 dakika Proteinaz K (20µg/ml) uygulanarak yapıldı ve kesitler 2 kere 2'şer dakika saf su ile çalkalandı. Bu işlemden sonra ortaya çıkan endojen peroksidaz'ın maskelenmesi için PBS'le hazırlanmış %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oda ısısında

5 dakika uygulandı ve sonrasında PBS ile 2 kere 5'er dakika çalkalandı. Daha sonra kesitlerin etrafı dikkatlice kurulanıp üzerlerine kit içerisinde bulunan dengeleyici tampondan (buffer) 75µl damlatılarak 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bu işlemden sonra kesitlerin etrafı kurulanıp üzerlerine 55µl TDT Enzimi (38,2µl Reaksiyon tamponu +16,5µl TDT enzimi) damlatıldı. TDT enzimi damlatılan kesitlerin üzeri plastik lameller ile kapatılarak nemli ortamda 37 °C etüvde 1 saat inkübe edildi. Negatif kontrol olarak kullanılan kesitin üzerine TDT Enzimi yerine saf su damlatıldı. TDT enzimi uygulandıktan sonra plastik lameller kaldırılıp kesitler durdurma-yıkama tamponu ile oda sıcaklığında 10 dakika yıkandı. Sonra 3 kere 5'er dakika PBS ile yıkama işlemi yapıp her kesit üzerine 65µl Anti-Digoksinin Peroksidaz, kit içerisinde alınıp damlatıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Sonra kesitler PBS ile 3 kere 5'er dakika yıkandı. Kesitlerin çevresi kurulanıp her kesit üzerine 75µl DAB substrat çözeltisi damlatıldı. Pozitif renk reaksiyonu, 6 dakikada mikroskop altında tespit edilerek sağlandı. Renk reaksiyonunun oluşmasından hemen ardından kesitler saf su ile 3 kere 2'şer dakika yıkandı. Kesitler 2 kere 2'şer dakika toluolde bekletilip entellan ile kapatıldı.

### 3.4.2.3. Apoptotik İndeks

Tüm gruplara ait deney hayvanlarının testis kesitlerindeki Sertoli hücreleri apoptoz tayini için TUNEL yöntemi uygulandıktan sonra, apoptotik indeks tespiti yapıldı. Her kesit Olympus BX61 model mikroskop ile x40 büyütmede birbirinden habersiz iki araştırmacı tarafından rastgele seçilen 15 seminifer tübül incelenerek apoptotik hücre tespiti yapıldı. Pozitif olarak işaretlenen apoptotik Sertoli hücreleri ve tüm Sertoli hücreleri sayılarak aşağıdaki apoptotik indeks formülüne göre tespit yapıldı [39].

$$\text{Apoptotik İndeks} = \left( \frac{\text{Apoptotik hücre sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \right) \times 100$$

### 3.4.2.4. HSCORE

GRP78/BiP immünreaksiyonunun yoğunluğu HSCORE yöntemi kullanılarak tespit edildi. Her kesit için ışık mikroskopunda x40 büyütmede, birbirinden habersiz iki araştırmacı tarafından rastgele beş alan seçildi ve bu alanlar içinde hücrelerin immün boyanma yoğunluğuna göre kategorilere ayrıldı [0 (boyanma yok), +1 (zayıf, fakat tespit edilebilir boyanma), +2 (orta şiddetli boyanma) ve +3 (yoğun boyanma)]. Her örnekten, HSCORE değeri elde edildi. HSCORE değerleri,  $\text{HSCORE} = \sum P_i(i+1)$

( i: Boyanma yoğunluğu skoru, Pi: Boyanan hücrelerin yüzdesi ) formülü kullanılarak hesaplandı [3].

### 3.5. ELEKTRON MİKROSKOBU

Deney hayvanlarından alınan testis dokusu örnekleri, geçirimli elektron mikroskobu incelemeleri için, Millonig'in fosfat tamponu (pH:7,3) ile hazırlanan %2,5'lik gluteraldehit çözeltisinde, +4°C'de 2-4 saat tespit edildi. Gluteraldehit çözeltisine koyulmadan önce, insülin iğnesi yardımıyla, testislerin her iki kutbunda fiksatifin tunika albugineayı kolay geçebilmesi için 5'er adet delik açıldı. Sertleşen dokular 1mm<sup>3</sup>'lük parçalar halinde küçültüldü. Sonra Millonig'in fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra yine aynı tampon içerisindeki %1'lik Osmiyum tetraoksit (OsO<sub>4</sub>) ile 1,5 saat ikinci tespit yapıldı. Daha sonra dokular 15 dakika Millonig'in fosfat tamponu ile yıkandı. Parçaları sudan arındırmak için %30, %50, %70, %80, %96'lık alkollerde 10'ar dakika, %100 alkolde, 2 kez 20'şer dakika tutuldu. Ardından, 2 kez 15'er dakika propilen oksitte bekletildikten sonra 60 dakika 1:1 oranında propilen oksit ile araldit, 60 dakika 1:3 oranında propilen oksit ile araldit ve son olarak da 1 gece saf aralditte bekletildikten sonra plastik kalıplarda saf araldit içerisine gömüldü. Gece boyunca 45°C'lik etüvde bırakıldı. Sonra 60°C'lik etüvde 48 saat bırakılarak sertleştirildi. Elde edilen araldit bloklarından, Reichert UM2 ve Reichert UM3 ultramikrotomları ile cam bıçaklarla önce 0,5µ yarı ince kesitler alındı. Bunlar toluidin mavisi ile boyanarak, istenen bölge tespit edildi. Daha sonra, tespit edilen bölge, 40-50nm kalınlığında ince kesitler halinde bakır gridler üzerine alındı. Bu ince kesitler önce %70 etanol ile hazırlanmış doymuş uranil asetat ve sonra Reynold'un kurşun sitrat çözeltisi ile boyandı.

### 3.6. DEĞERLENDİRME

Genel ışık mikroskobu ve immünohistokiyoloji incelemeleri için kesitler Olympus BX61 Model mikroskop ile incelendi ve Olympus BX-UCB mikroskop kamerası ile görüntülendi.

Elektron mikroskobu incelemeleri için kesitler Jeol Jem-1011 model geçirimli elektron mikroskobunda incelendi ve Olympus Veleta TEM CCD kamera ile fotoğrafları çekildi.



### **3.7. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER**

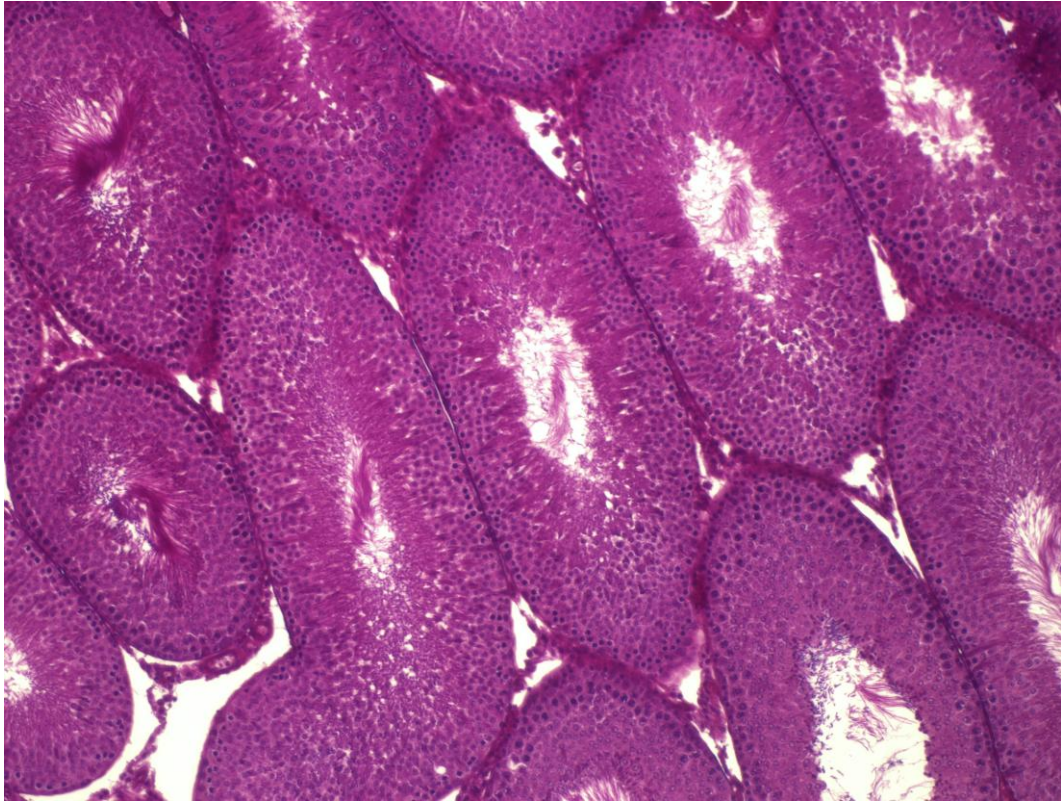
Tüm gruptaki hayvanların GRP78/BiP ve TUNEL immün reaksiyonu SigmaPlot programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Değerlerin gruplar arasında karşılaştırılmasında One Way Anova analizi kullanıldı ve  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul

## 4. BULGULAR

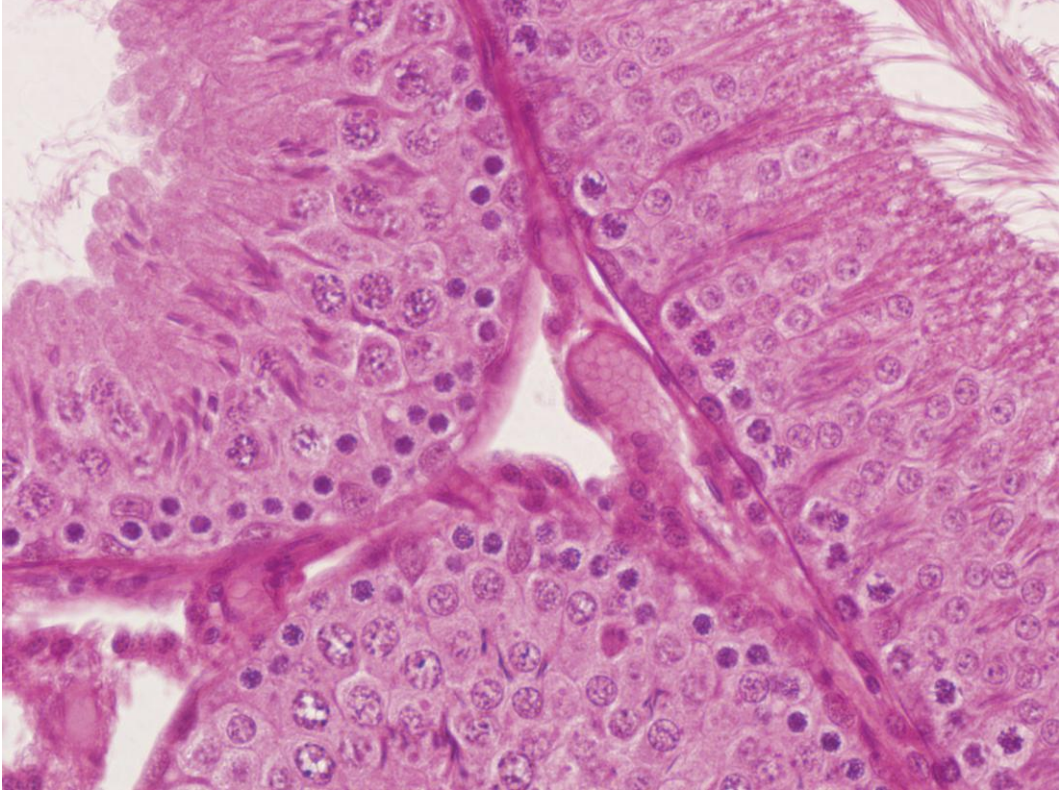
### 4.1. Histolojik Bulgular

Kontrol ve deney gruplarını oluşturan sıçanların testislerinin genel görünümünü ışık mikroskopik olarak incelemek için H+E boyası yapıldı.

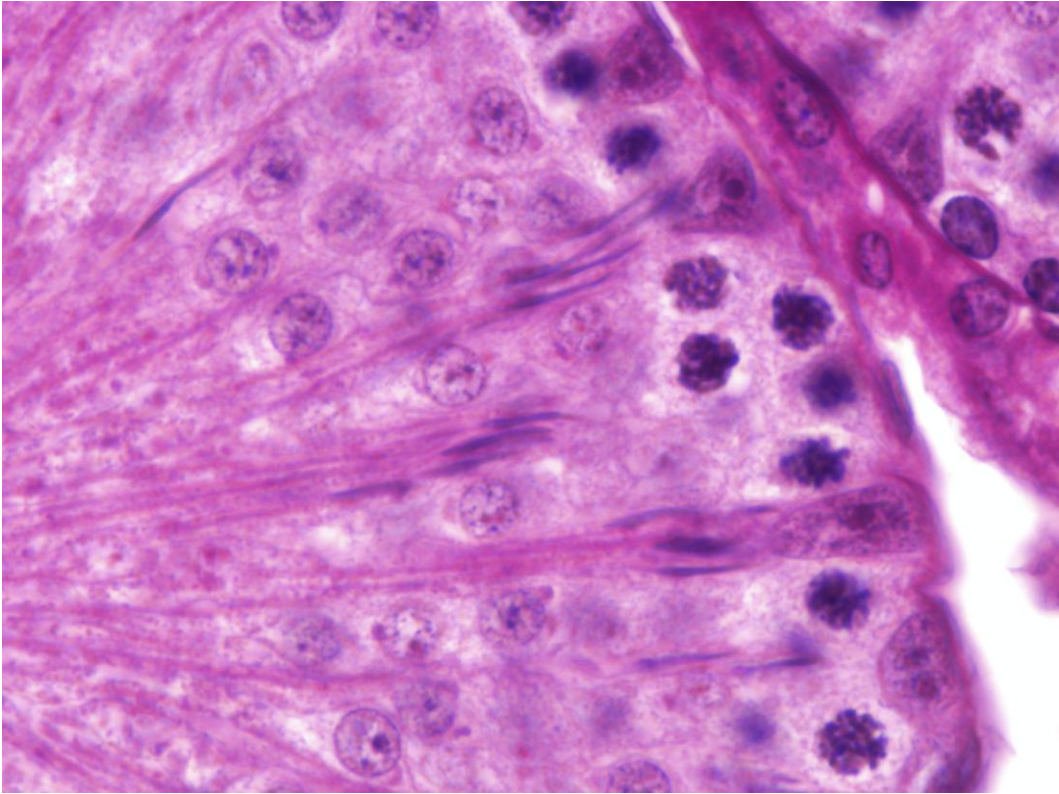
Kontrol grubu testis kesitlerinde; seminifer tübüllerin genellikle enine kesitlerini içeren preparatlar gözlemlendiğinde tübüllerin hafif basık veya yuvarlak kesitleri daha çok gözlemlenmektedir. Seminifer tübüller, dışında bir bazal membran, elastik liflerce zengin bir taban zarı, üstünde myoid hücreleri de içeren bir lamina propriya ve buna bağlı olarak intersitisyel bağ dokusu ile çevrilmiş olarak görülmektedir. Damarlar ve damar yakınlarında koyu nükleuslu Leydig hücreleri, kapillerler ve bağ dokusu elemanları arasında daha yassı görümlü fibroblast veya fibrositler ile az miktarda diğer bağ dokusu hücrelerine rastlandı. Bunlardan başka, lenfatik damarlar ile yer yer sinir kesitlerine de rastlandı. Bütün bu hücreler ve yapılar genelde normal görümlü olarak gözlemlendi.



**Şekil 4-1: Kontrol grubunda seminifer tübüller ve intersitisyel alanların genel görünümü (H+E, x10).**

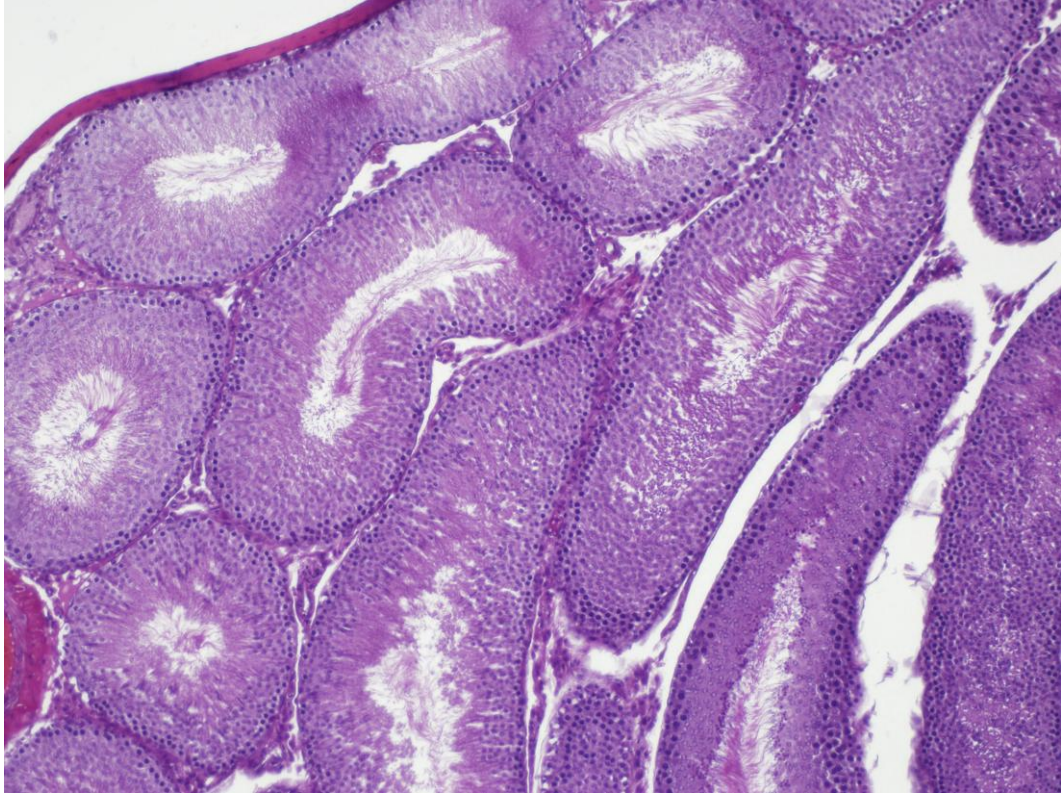


**Şekil 4-2: Kontrol grubunda seminifer tübüller ve intersitisyel alan (H+E, x40).**

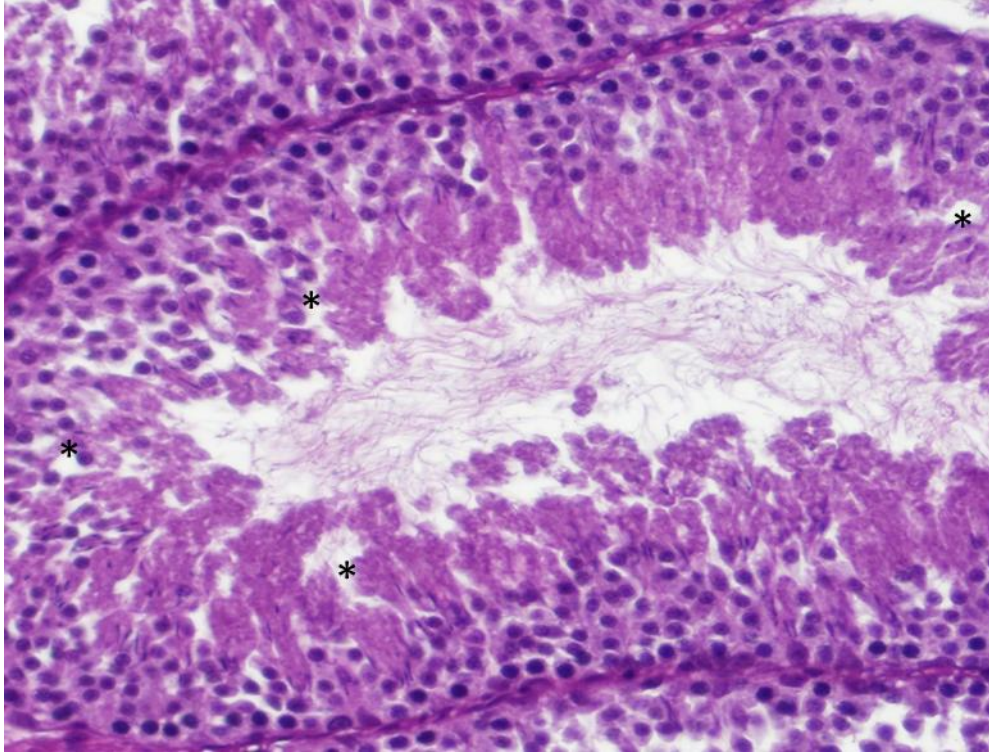


**Şekil 4-3: Kontrol grubunda sertoli hücreleri ve spermatogenik hücreler (H+E, x100).**

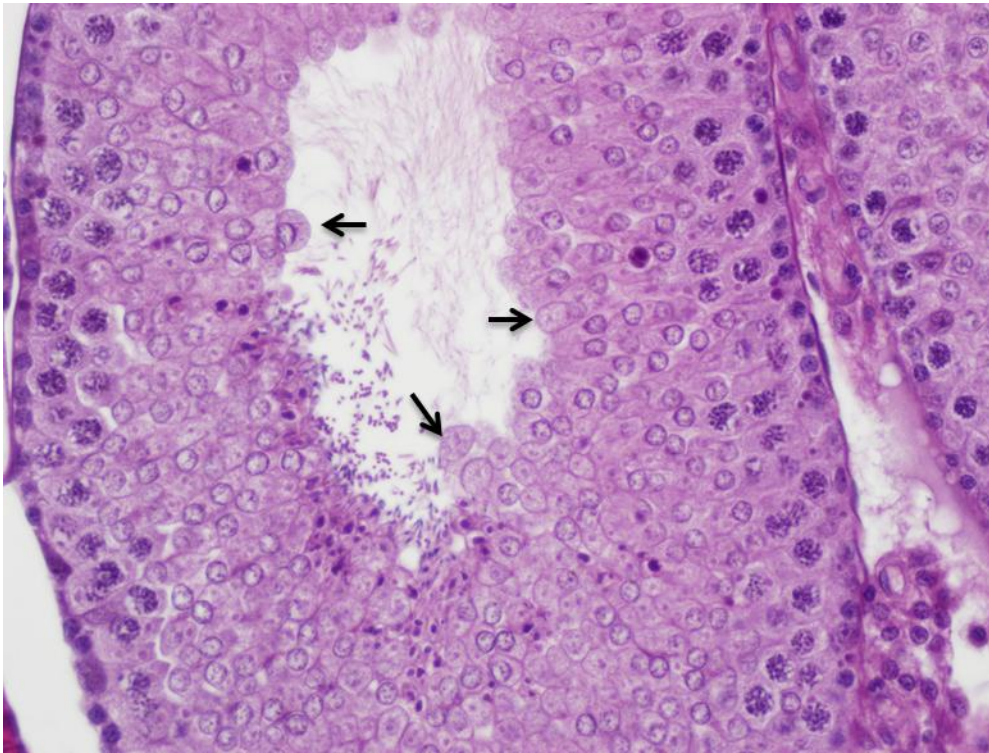
Tunikamisin verildikten 7 gün sonra incelenen grubun testis kesitlerinde (7 gün grubu); kontrol grubu ile arasında çoğu tübülde dikkat çekecek önemli farklılıklar yada hasar bulunmamasına karşın, az sayıdaki tübülde ise seminifer epitel hücrelerinin birbirleri ve Sertoli hücreleri arasında bir takım çatlak tarzında boşluklar oluştuğu gözlemlendi (Şekil 4-4, 4-5). Ayrıca, az da olsa hasarlı olan tübüllerde, lümene atılmış ve atılmakta olan olgunlaşmamış (sperm halini almamış) hücreler gözlemlendi (Şekil 4-6). Bu tip hasarlı tübüllerde spermatogonyum ve spermatozoid I fazından sonra hücre nükleuslarında heterokromatinin ökromatin lehine bozulduğu gözlemlendi. Bunların dışında çok sayıda tübül kontrol grubundan farksız şekilde gözlemlendi (Şekil 4-7).



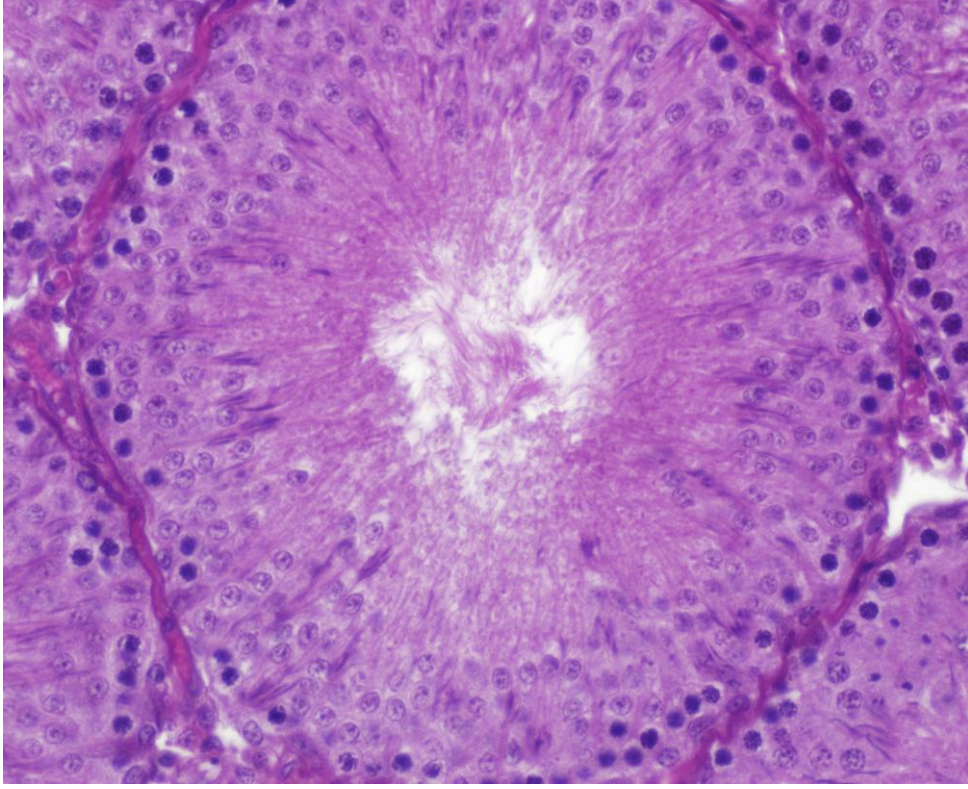
**Şekil 4-4: 7 gün grubunun genel görünümü (H+E, x10).**



**Şekil 4-5: 7 gün grubunda hücreler arası boşlukların (\*) oluşmaya başladığı seminifer tübül kesiti (H+E, x40).**

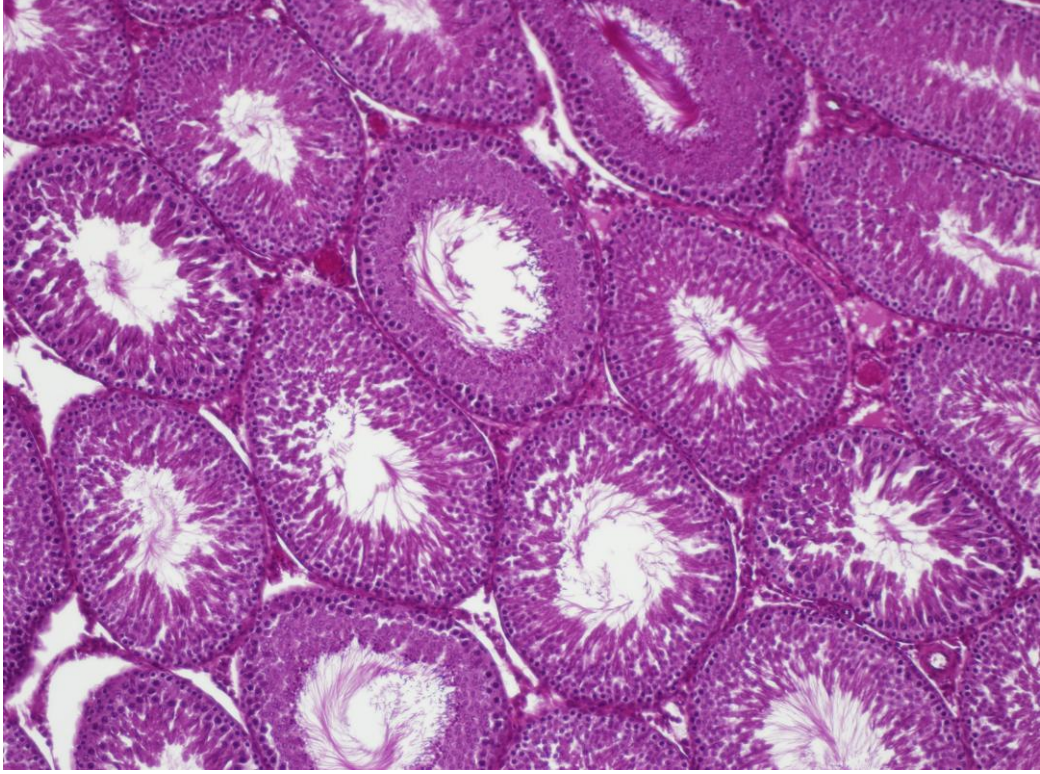


**Şekil 4-6: 7 gün grubunua ait ökromatin görünümlü hücre nükleusları (oklar) ve lümeninde olgunlaşmamış hücrelerin görüldüğü seminifer tübül kesiti (H+E, x40).**

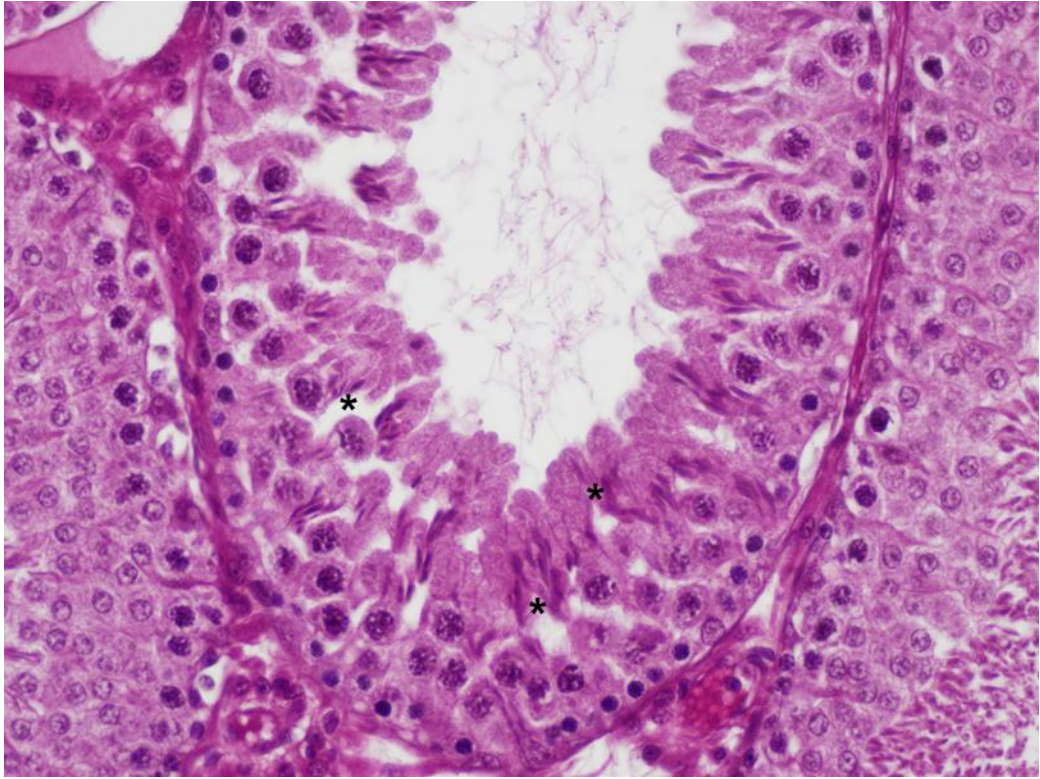


**Şekil 4-7: 7 gün grubunda kontrol grubuna çok yakın görünümdeki seminifer tübül kesiti (H+E, x40).**

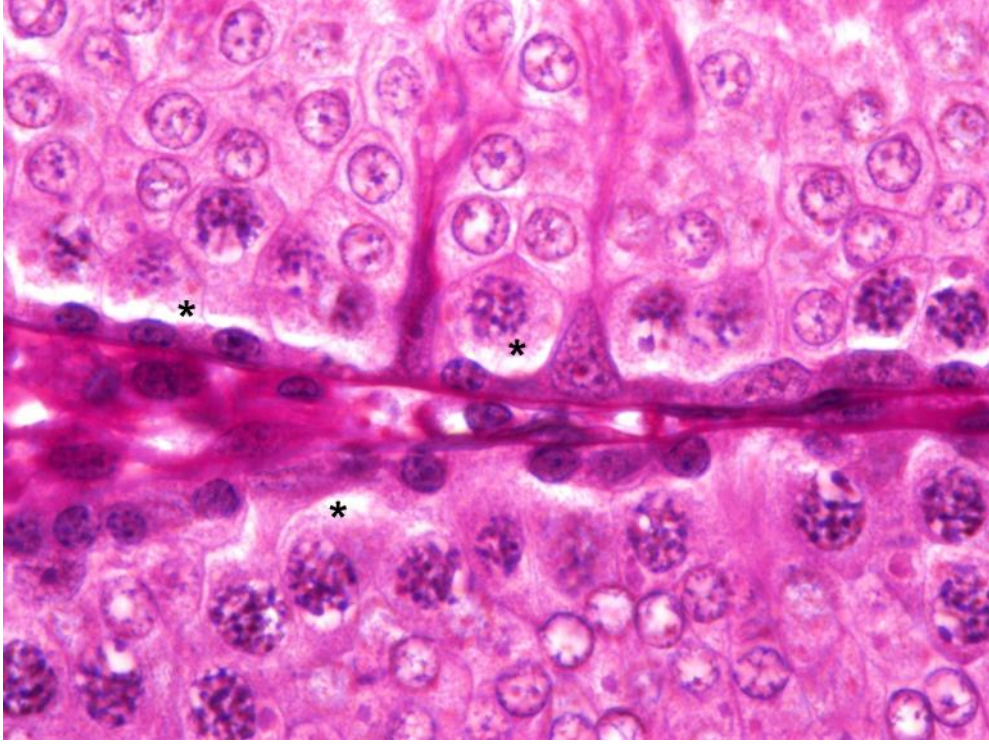
Tunikamisin verildikten 14 gün sonra incelenen grubun testis kesitlerinde (14 gün grubu), hasara uğramış seminifer tübüllerin sayısının arttığı gözlemlendi (Şekil 4-8). Bu tübüllerdeki spermatogenik hücreler arasındaki boşlukların büyüdüğü ve sayısının arttığı gözlemlendi (Şekil 4-9, 4-10). Ayrıca, hasarlı olan tübüllerde, lümene atılmış ve atılmakta olan olgunlaşmamış (sperm halini almamış) hücreler gözlemlendi. Bu tip hasarlı tübüllerde spermatogonyum ve spermatozot I fazından sonra hücre nükleuslarında heterokromatinin ökromatin lehine bozulduğu gözlemlendi (Şekil 4-11). Bunların dışında yer yer kontrol grubundan farksız tübüller de görüldü (Şekil 4-12).



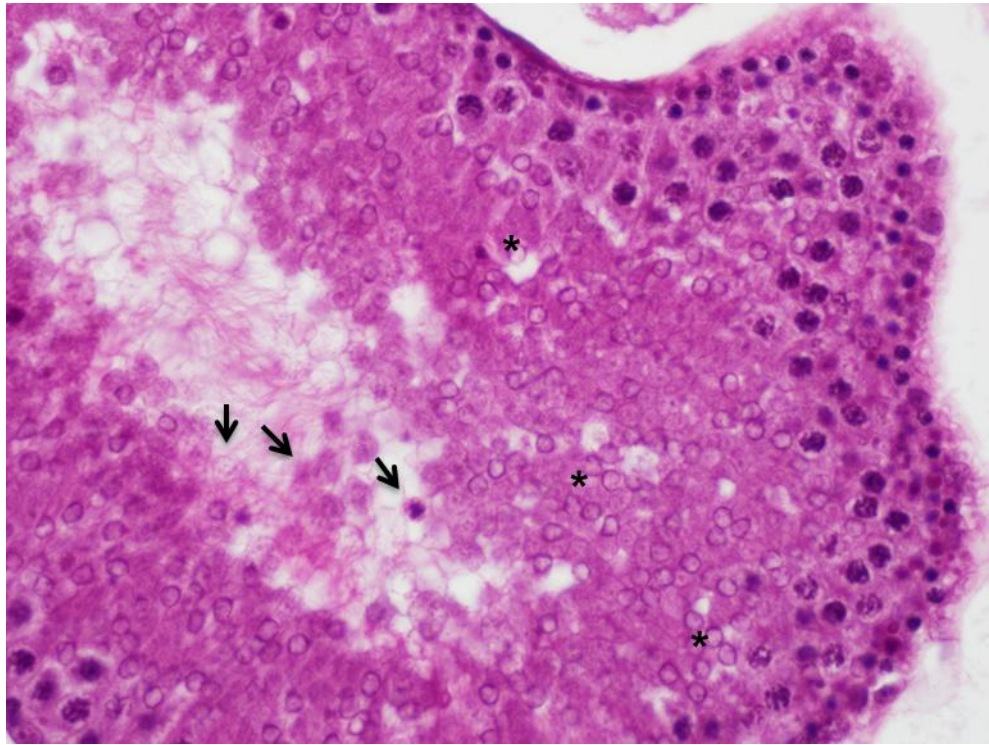
Şekil 4-8: 14 gün grubunun genel görünümü (H+E, x10).



Şekil 4-9: 14 gün grubunda hücreler arası boşlukların ( \* ) olduğu seminifer tübül kesiti (H+E, x40).

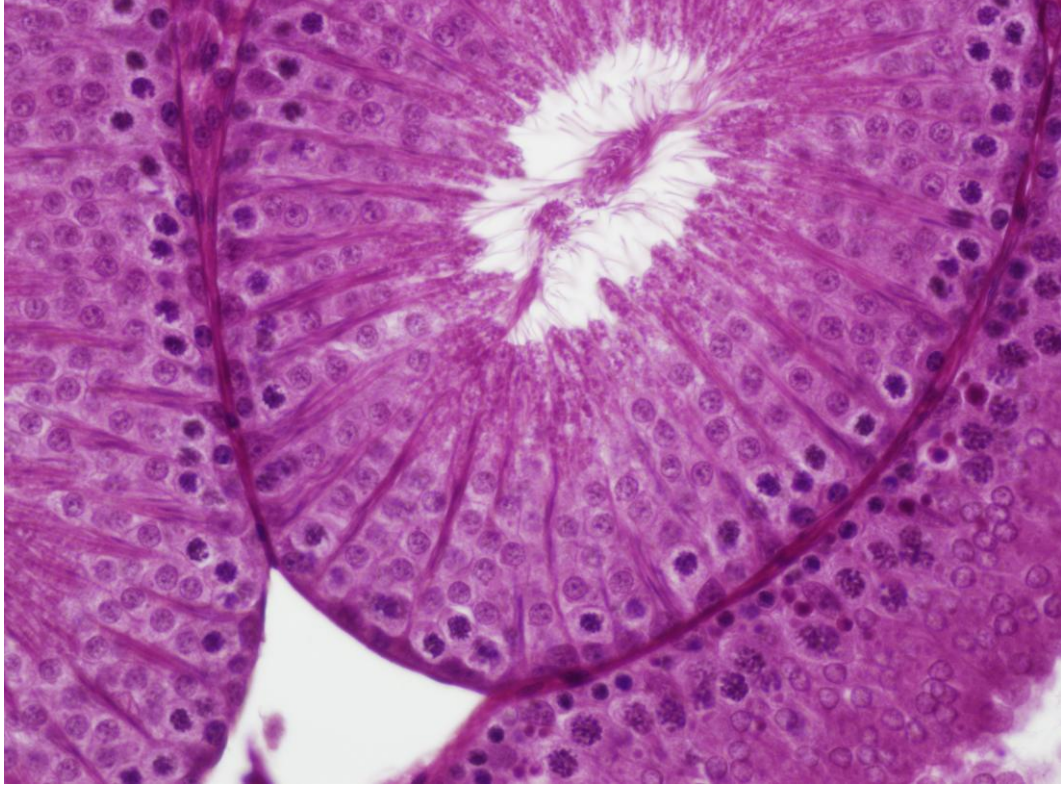


Şekil 4-10: 14 gün grubuna ait hücreler arası ayrılmaların ( \* ) görüldüğü seminifer tübül kesiti (H+E, x100).



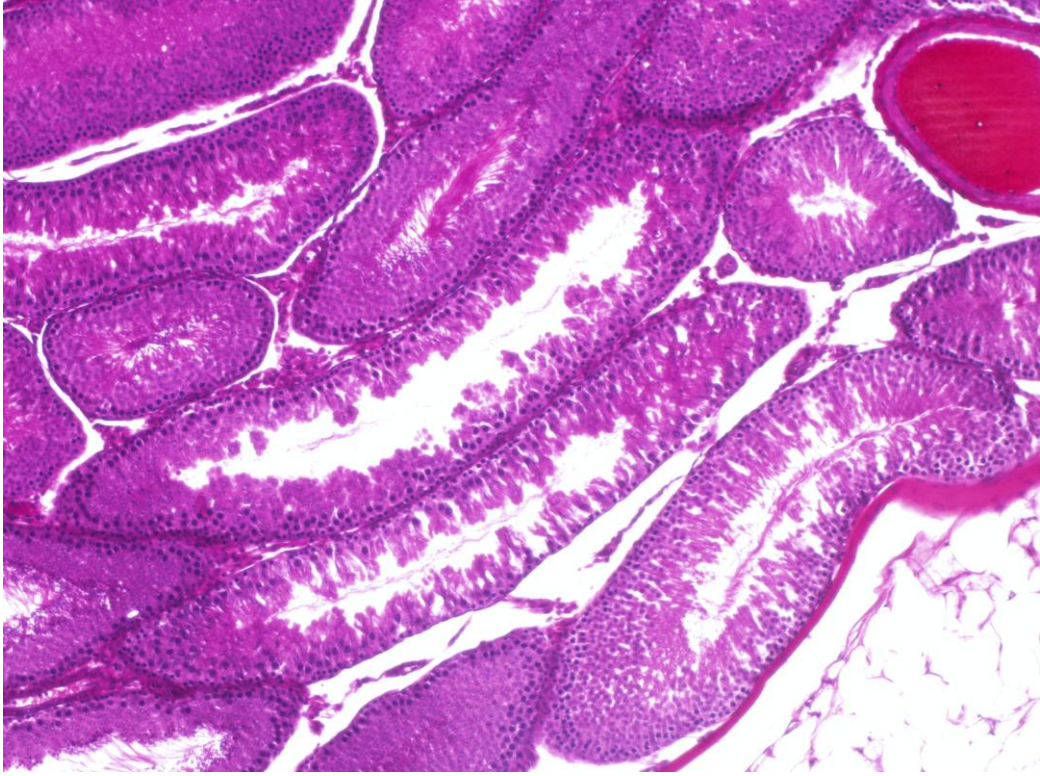
Şekil 4-11: 14 gün grubuna ait ökmromatin görünümlü hücre nükleusları ( \* ) ve lümende olgunlaşmamış hücrelerin (oklar) görüldüğü seminifer tübül kesiti (H+E, x40).



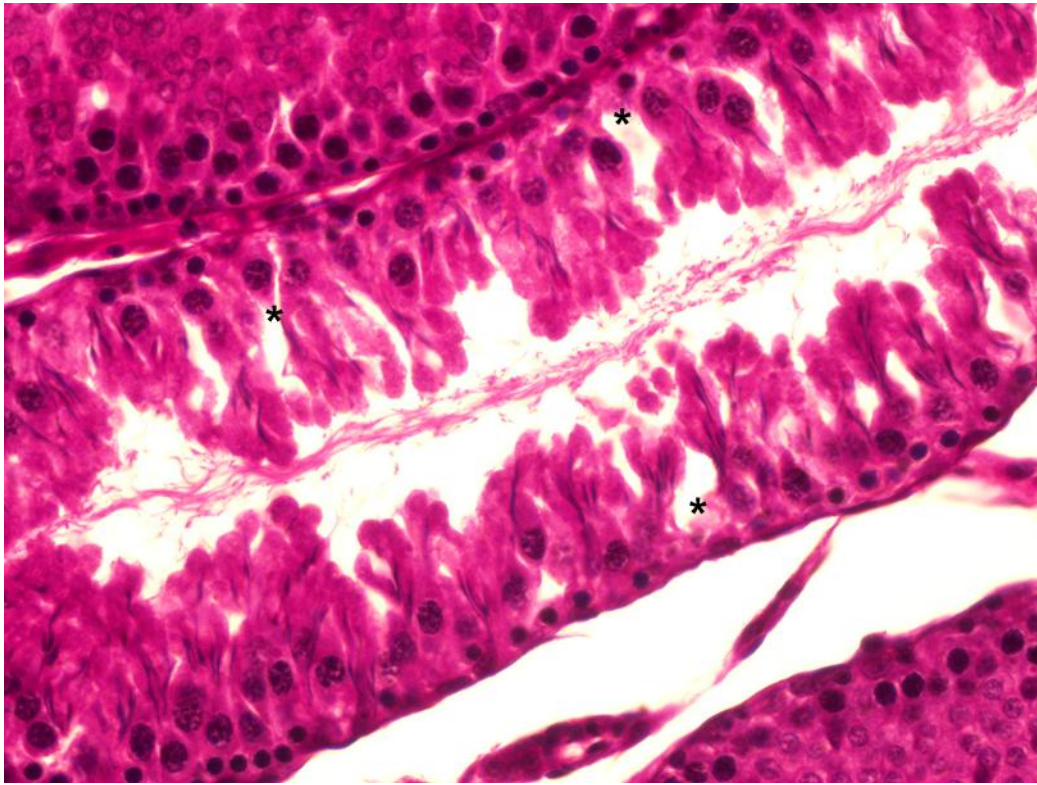


**Şekil 4-12: 14 gün grubundaki normal görünümlü seminifer tübül kesiti ( H+E, x40).**

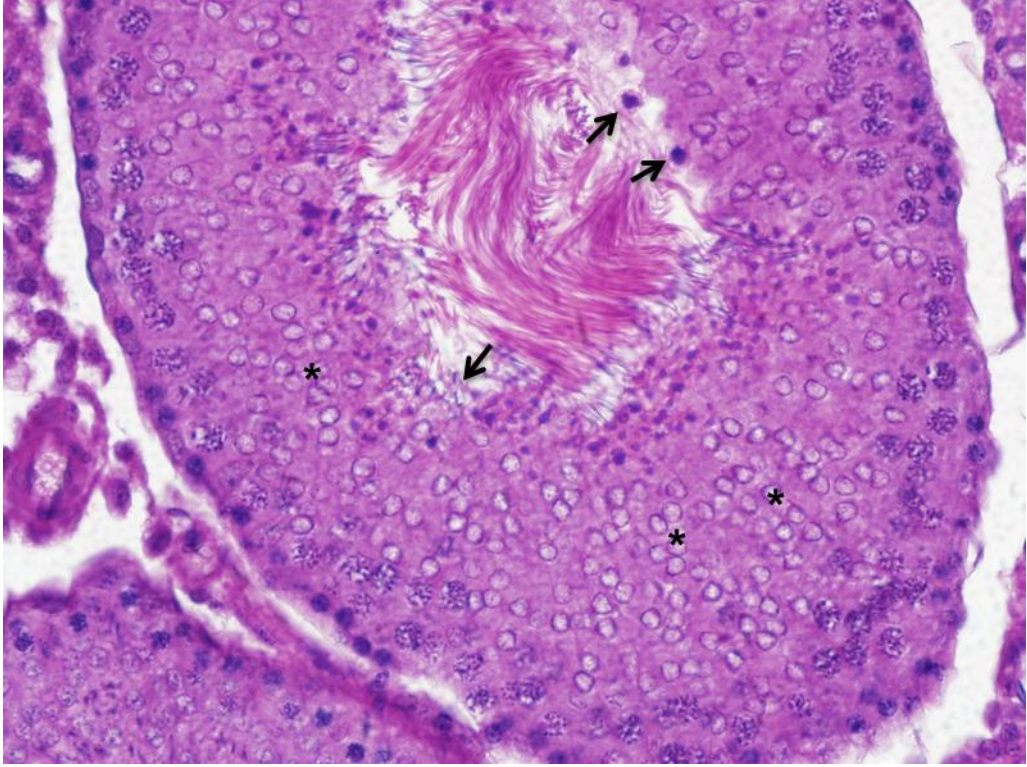
Seminifer tübüllerde spermatogenik hücreler arasında boşluklar en fazla 21 gün grubunun testis kesitlerinde görüldü. Hücrelerarası boşluklar içeren seminifer tübüller daha fazla gözlendi (Şekil 4-13, 4-14). Hasarlı olan tübüllerde, lümene atılmış ve atılmakta olan olgunlaşmamış (sperm halini almamış) hücre içerenler daha fazlaydı (Şekil 4-15). Bu deney grubundan bir hayvanda aşırı derecede tübüller dejenerasyon izlendi. Bu dejenerasyon genelde spermatogenik hücrelerin büyük kısmının ortadan kalktığı, bazı spermatogenik hücrelerin, (muhtemelen spermatidler) bir araya gelerek belirgin gruplar oluşturduğu, bu gruplarında dejeneratif bir görünüm izlenimini verdiği gözlendi (Şekil 4-16, 4-17). Benzer hücre gruplarına çok az sayıda olmakla birlikte aynı grubun diğer bir hayvanında da rastlandı. Bu dejeneratif görüntülere rağmen ışık mikroskopik olarak Sertoli hücre morfolojilerinde belirgin değişiklikler gözlenmedi.



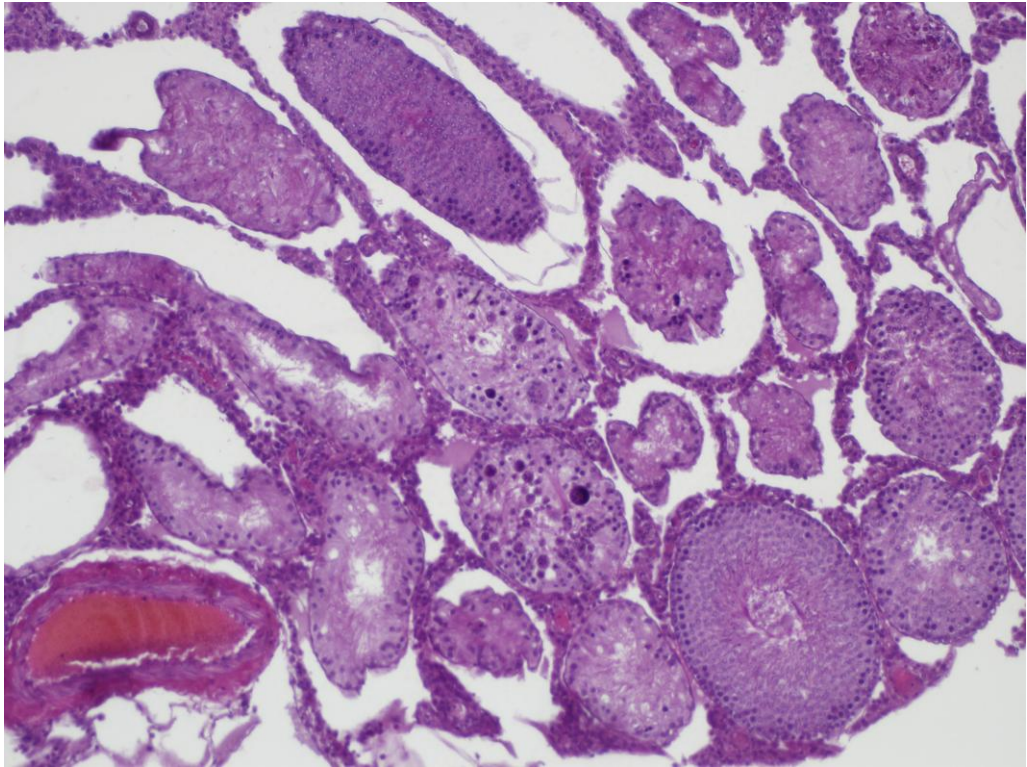
Şekil 4-13: 21 gün grubunun genel görünümü (H+E, x10).



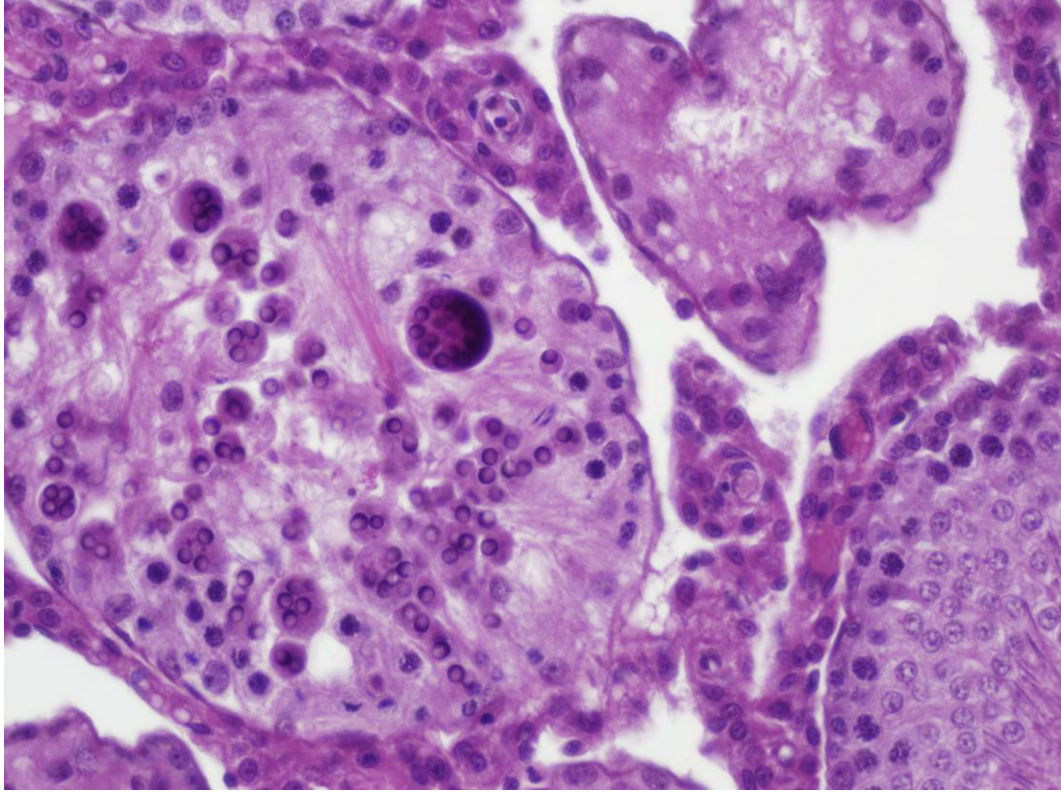
Şekil 4-14: 21 gün grubundaki hücreler arası boşlukların ( \* ) olduğu seminifer tübül kesiti (H+E, x40).



Şekil 4-15: 21 gün grubuna ait ökromatin görünümlü hücre nükleusları ( \* ) ve lümeninde olgunlaşmamış hücrelerin (oklar) görüldüğü seminifer tübül kesiti (H+E, x40).



Şekil 4-16: 21 gün grubundaki aşırı hasar gözlenen kesitin genel görünümü ( H+E, x10).



**Şekil 4-17: 21 gün grubundaki aşırı hasar gözlenen bir seminifer tübül ( H+E, x40).**

## **4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular**

### **4.2.1. Stres Belirteci Anti-GRP78/BiP İmmünohistokimyası Bulguları**

Testis seminifer tübüllerindeki hücrelerde ER stresinin varlığı GRP78/BiP immünreaktivitesi ile gösterilmiştir ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4-18).

Negatif kontrol örneklerinde herhangi bir immün reaksiyon gözlenmedi (Şekil 4-19).

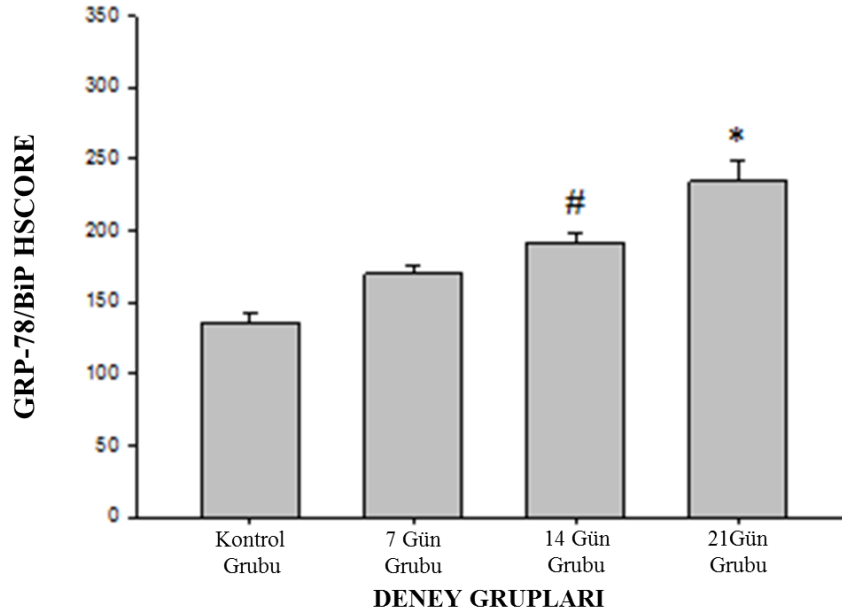
Kontrol grubu kesitlerinde Sertoli hücreleri çok zayıf immün reaksiyon gösterdi. Kontrol grubu için Sertoli hücreleri 135,4 olarak skorlandı (Şekil 4-20).

7 gün grubu testis Sertoli hücrelerinin, immün reaksiyonunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ( $P<0,05$ ). 7 gün grubu için Sertoli hücreleri immünoreaktivitesi 169,4 olarak skorlandı (Şekil 4-21).

14 gün grubu testis Sertoli hücrelerinin, immün reaksiyonunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gözlenirken, 7 gün grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı

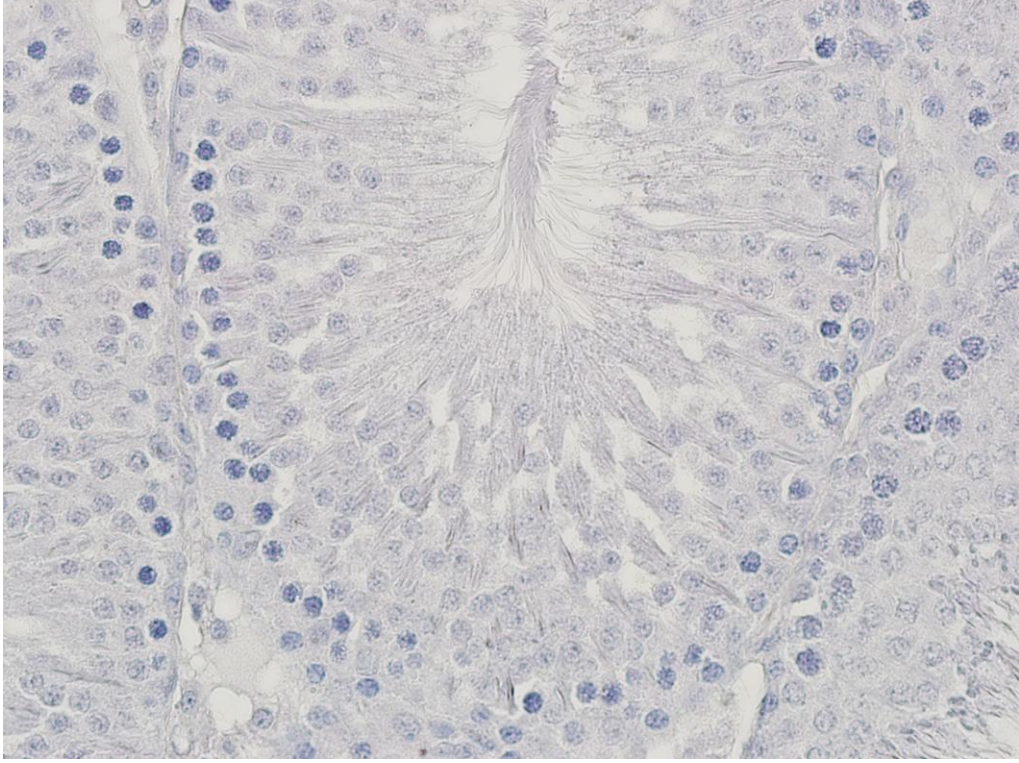
bir farklılık gözlenmedi ( $P<0,05$ ). 14 gün grubu için Sertoli hücreleri immünoreaktivitesi 189,3 olarak skorlandı (Şekil 4-18, 4-22).

21 gün grubu testis Sertoli hücrelerinin, immün reaksiyonunda kontrol grubuna ve 7 gün grubuna kıyasla anlamlı bir artış gözlenirken, 14 gün grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ( $P<0,05$ ). 21 gün grubu için Sertoli hücreleri immünoreaktivitesi 234,6 olarak skorlandı (Şekil 4-18, 4-23). Ayrıca bu grubun hayvanlarından birinde, hemen hemen tüm tübüllerde, aşırı dejenerasyon olarak değerlendirilen hücre gruplaşmaları ve bu gruplaşmaların olduğu bölgelerde immün reaksiyon yoğun olarak gözlemlendi (Şekil 4-24). Diğer hayvanların bazı tübüllerinde de yer yer hücre gruplaşmalarına rastlandı.

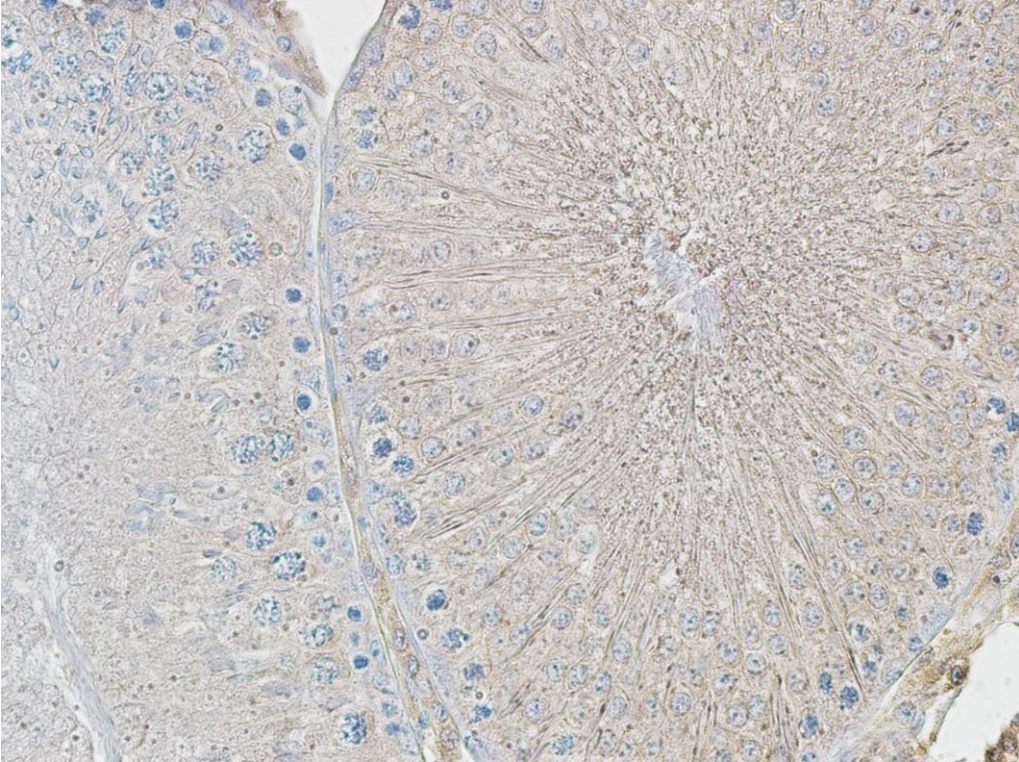


**Şekil 4-18: Sertoli hücrelerinde GRP78/BiP immün reaksiyonunun HSCORE analizi.**

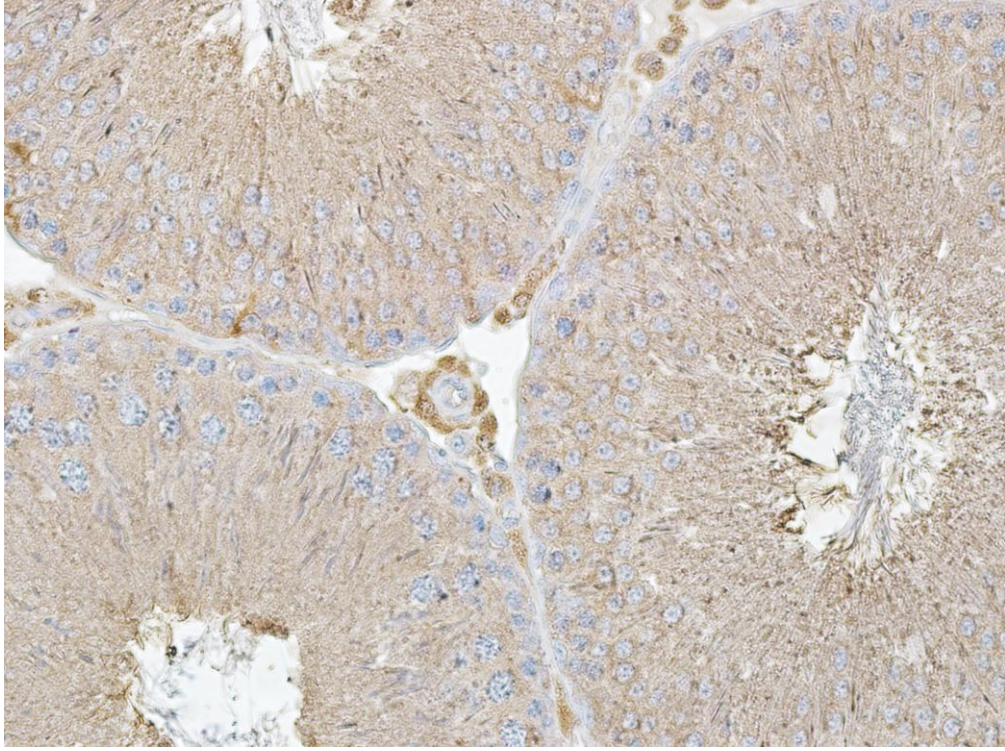
\* 21 gün grubunun kontrol ve 7 gün grubuna göre ( $p<0,05$ ), # ise 14 gün grubunun kontrol grubuna göre ( $p<0,05$ ), istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiğini ifade etmektedir.



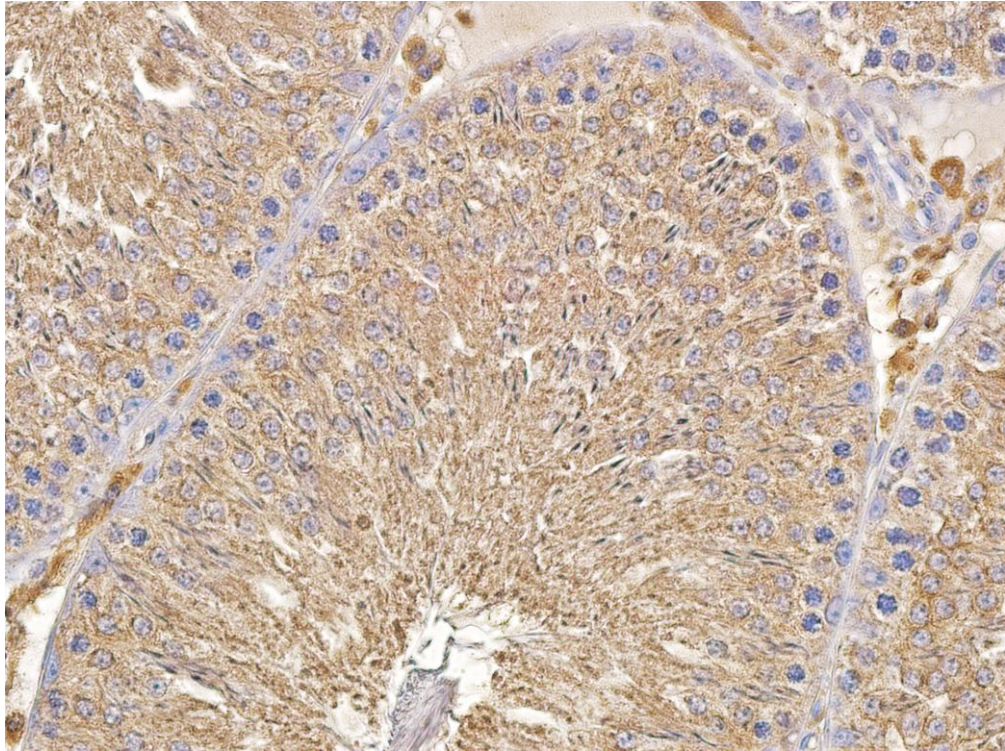
**Şekil 4-19: Negatif kontrole ait seminifer tübül görünümü (x40).**



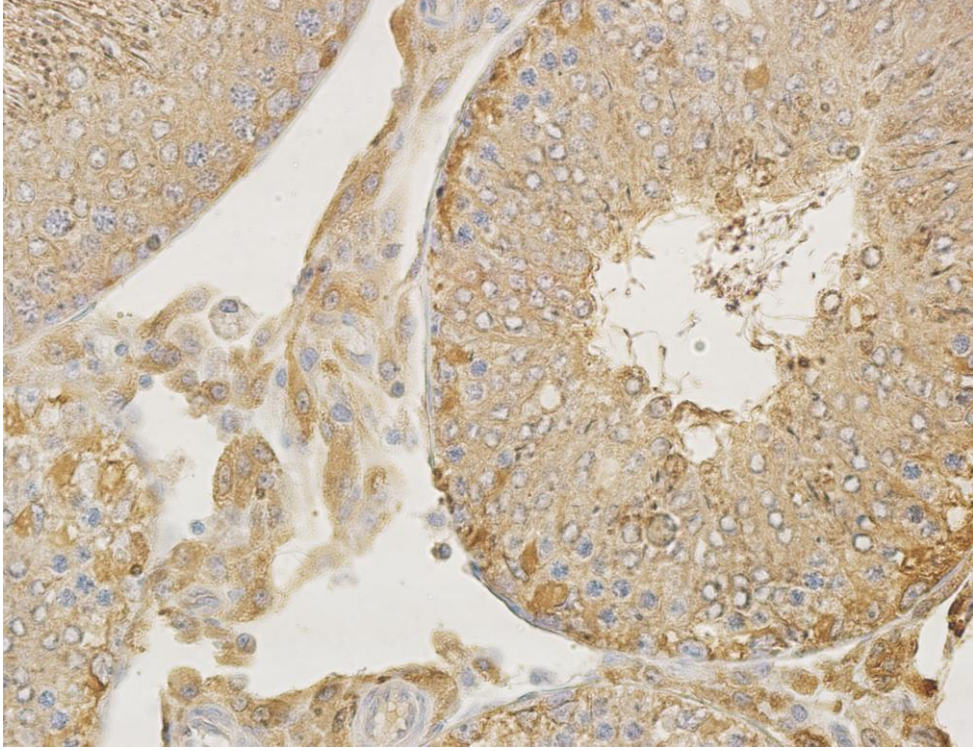
**Şekil 4-20: Anti-GRP78/BiP antikorü ile immünohistokimya işaretlemeği yapılan kontrol grubuna ait seminifer tübül görünümü (x40).**



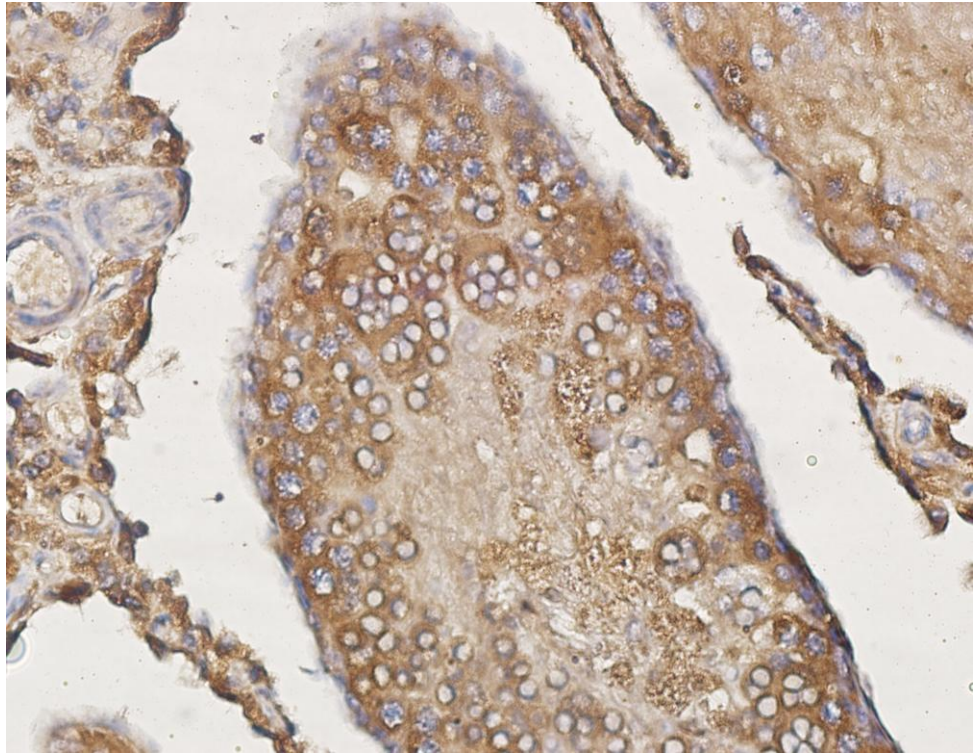
**Şekil 4-21: Anti-GRP78/BiP antikoruna ile immünohistokimya işaretleme yapılan 7 gün grubuna ait seminifer tübül görünümü (x40).**



**Şekil 4-22: Anti-GRP78/BiP antikoruna ile immünohistokimya işaretleme yapılan 14 gün grubuna ait seminifer tübül görünümü (x40).**



**Şekil 4-23: Anti-GRP78/BiP antikoruna ile immünohistokimya işaretleme yapılan 21 gün grubuna ait seminifer tübül görünümü (x40).**



**Şekil 4-24: Anti-GRP78/BiP antikoruna ile immünohistokimya işaretleme yapılan 21 gün grubuna ait aşırı dejenerasyon gösteren seminifer tübül görünümü (x40).**



#### 4.2.2. Apoptoz Belirteci TUNEL Bulguları

TUNEL yöntemi ile yapılan boyanma sonucunda, Sertoli hücrelerinin nukleuslarındaki pozitif boyanma apoptotik hücre olarak değerlendirildi ve istatistiksel analiz yapıldı (Şekil 4-25).

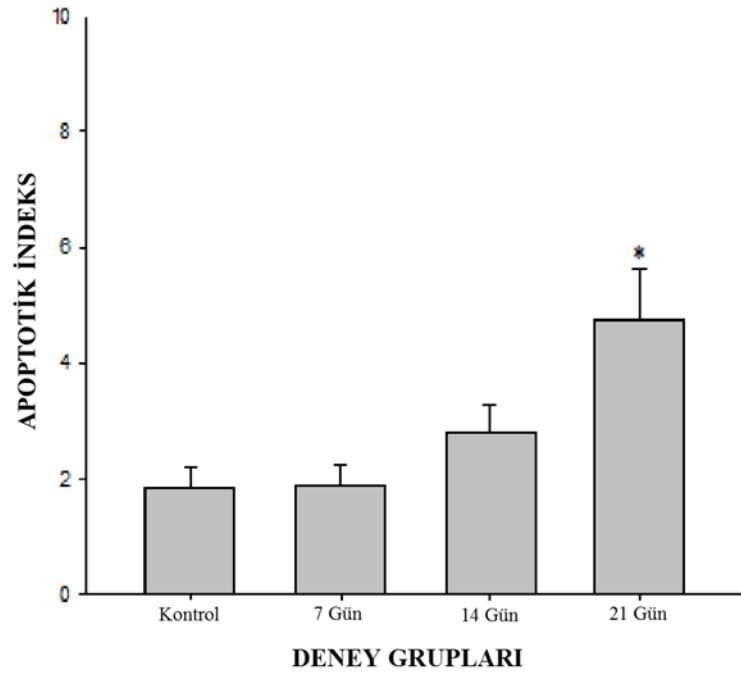
Negatif kontrol örneklerinde herhangi bir immün reaksiyon gözlenmedi (Şekil 4-26).

Kontrol grubu testis kesitlerinde apoptotik Sertoli hücresi çok nadir olarak görüldü. Sertoli hücrelerinin apoptotik hücre indeksi 1,849 bulundu (Şekil 4-27).

7 gün grubunun testis kesitlerinde apoptotik Sertoli hücrelerinde; kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmedi ( $p<0,05$ ). Sertoli hücrelerinin apoptotik hücre indeksi 1,859 bulundu (Şekil 4-28).

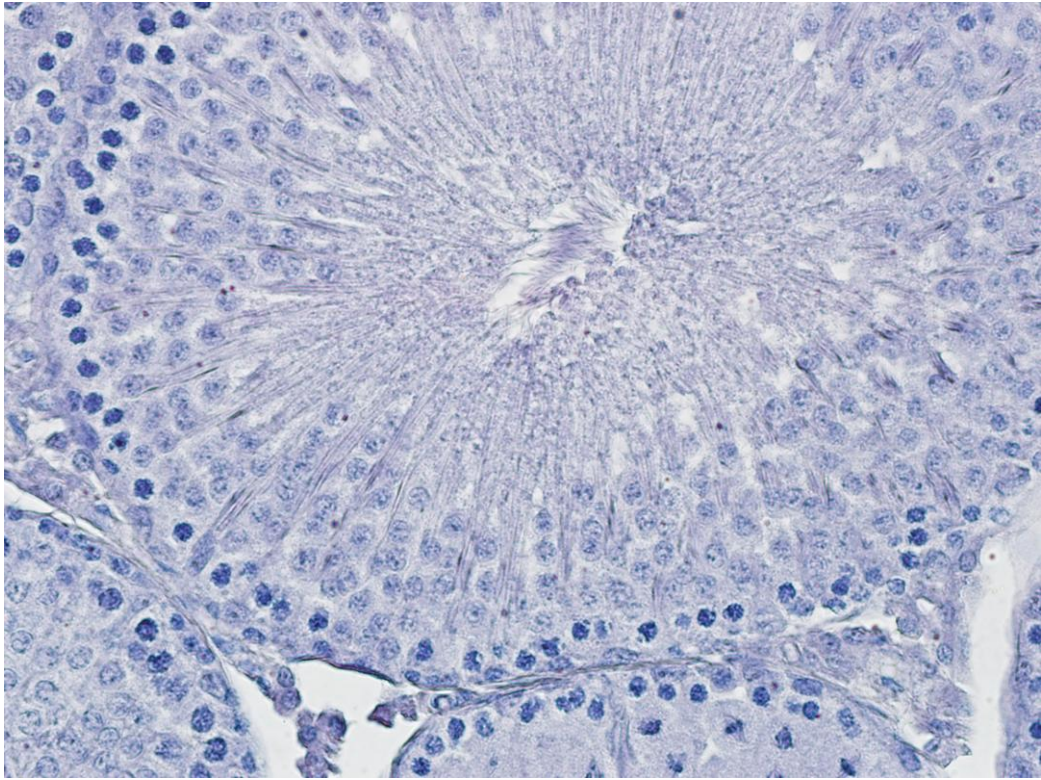
14 gün grubunun testis kesitlerinde apoptotik Sertoli hücrelerinde; kontrol grubuna ve 7 gün grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmedi ( $p<0,05$ ). Bu grubun hayvanlarından birinden alınan testis kesitinde, bir tübülde aşırı dejenerasyon olarak değerlendirilen hücre gruplaşmaları görüldü. Sertoli hücrelerinin apoptotik hücre indeksi 2,801 bulundu (Şekil 4-29).

21 gün grubunun testis kesitlerinde apoptotik Sertoli hücrelerinde; 14 gün grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, kontrol ve 7 gün grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ( $p<0,05$ ). Sertoli hücrelerinin apoptotik hücre indeksi 4,751 bulundu (Şekil 4-25, 4-30, 4-31). Ayrıca bu grubun hayvanlarından birinde, hemen hemen tüm tübüllerde, aşırı dejenerasyon olarak değerlendirilen hücre gruplaşmaları görüldü.

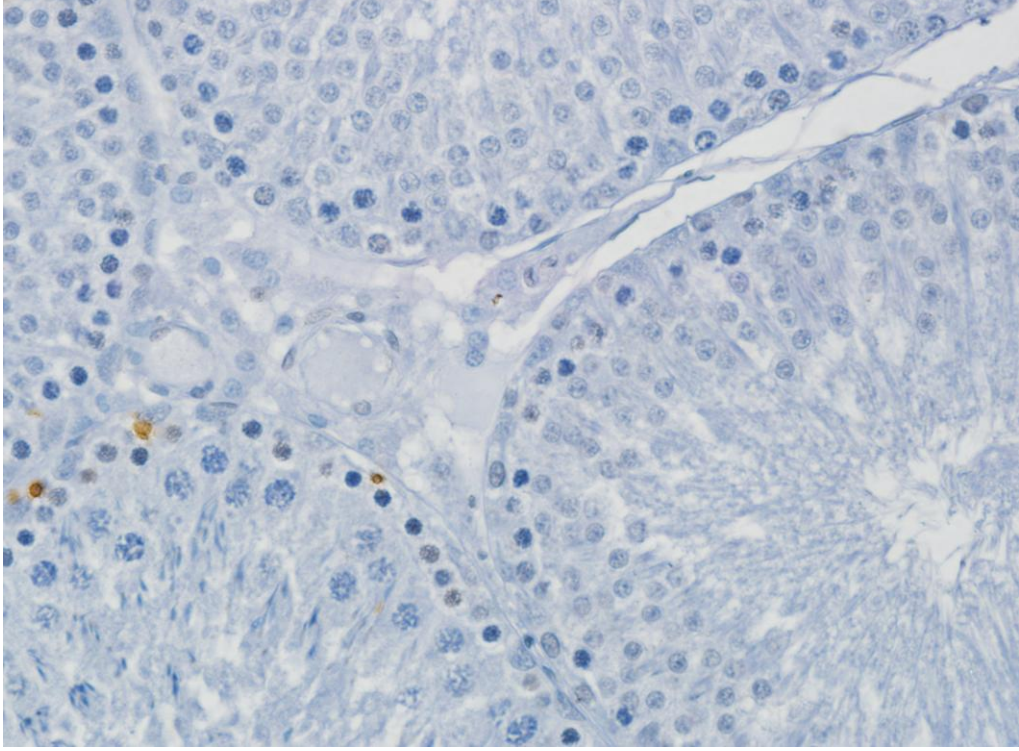


**Şekil 4-25: Sertoli hücrelerindeki apoptotik indeks analizi.**

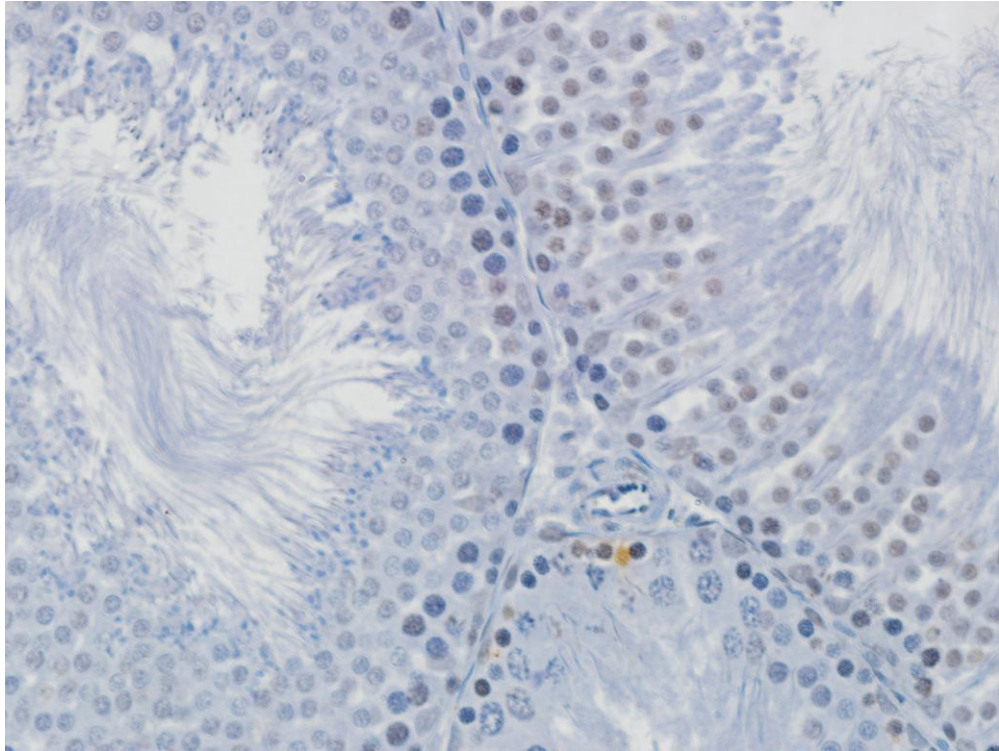
\* 21 gün grubunun kontrol ve 7 gün grubuna göre ( $p < 0,05$ ) istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiğini ifade etmektedir.



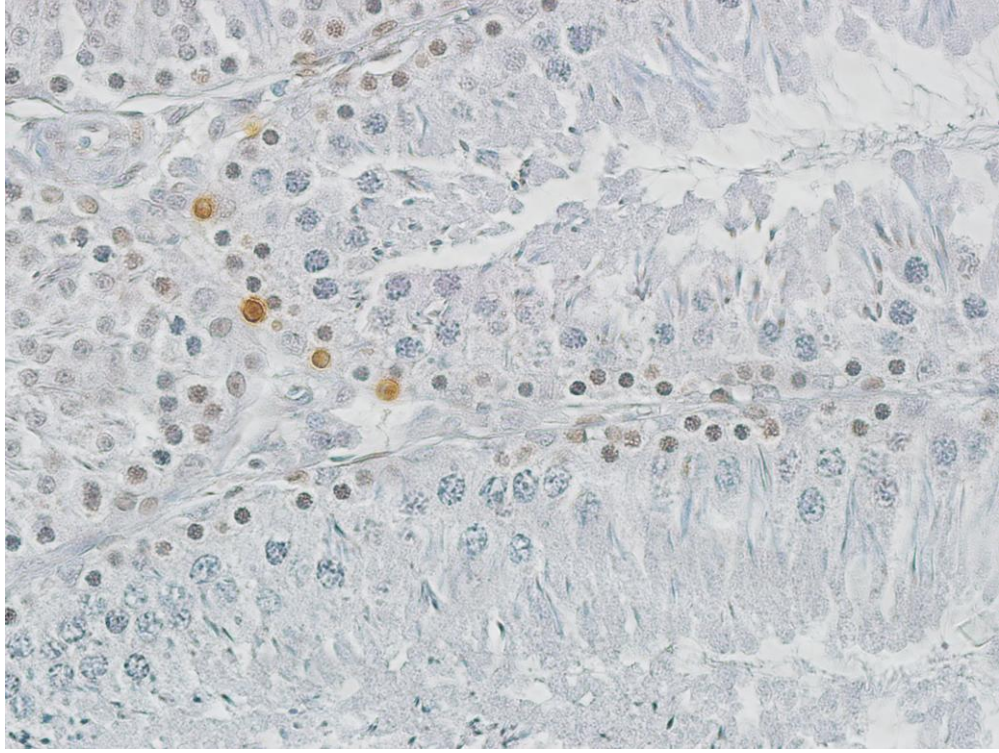
**Şekil 4-26: TUNEL yöntemi ile apoptotik hücrelerin işaretlemesi yapılan negatif kontrole ait seminifer tübül görünümü (x40).**



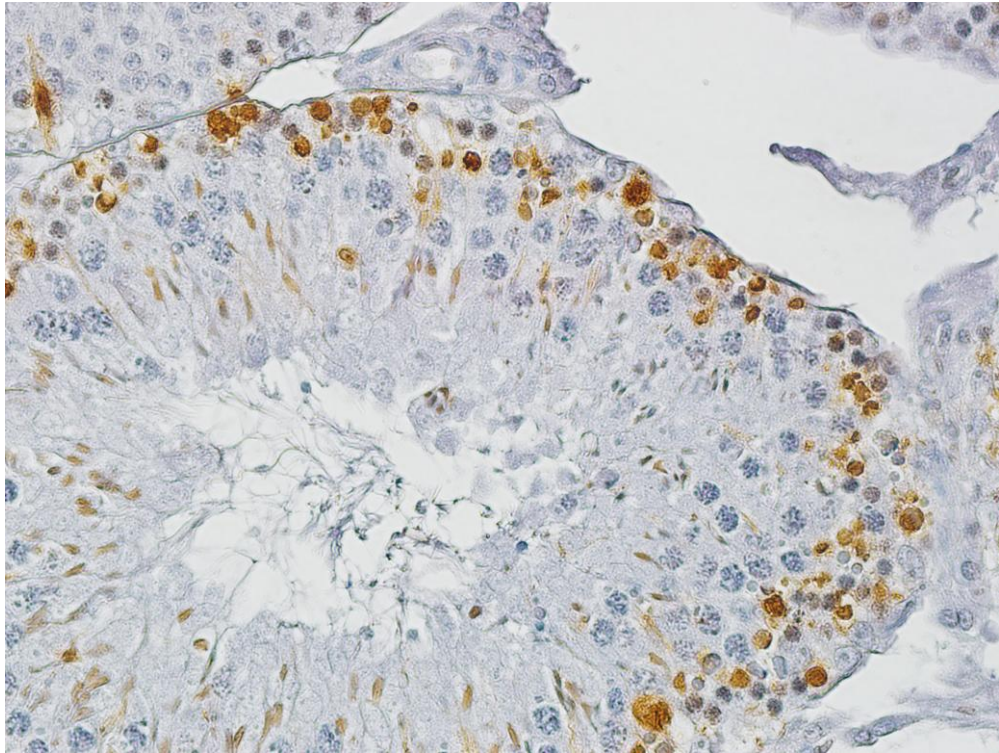
**Şekil 4-27 TUNEL yöntemi ile apoptotik hücrelerin işaretlemesi yapılan kontrol grubuna ait seminifer tübül görünümü (x40).**



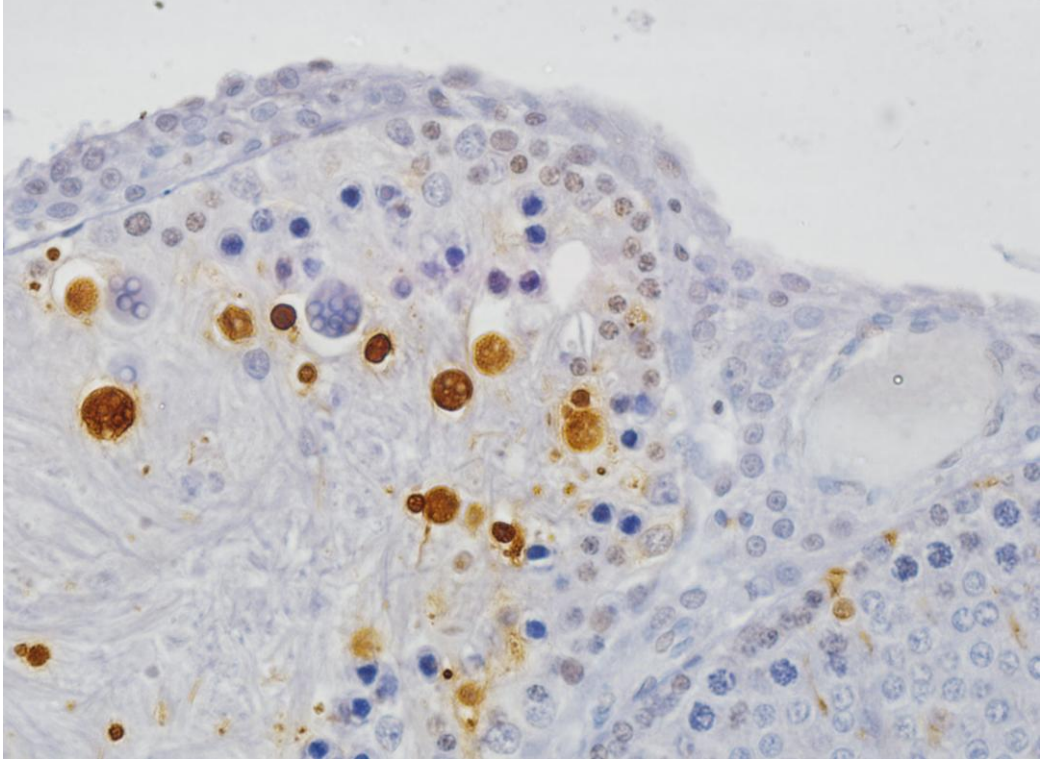
**Şekil 4-28: TUNEL yöntemi ile apoptotik hücrelerin işaretlemesi yapılan 7 gün grubuna ait seminifer tübül görünümü (x40).**



**Şekil 4-29: TUNEL yöntemi ile apoptotik hücrelerin işaretlemesi yapılan 14 gün grubuna ait seminifer tübül görünümü (x40).**



**Şekil 4-30: TUNEL yöntemi ile apoptotik hücrelerin işaretlemesi yapılan 21 gün grubuna ait seminifer tübül görünümü (x40).**



**Şekil 4-31: TUNEL yöntemi ile apoptotik hücrelerin işaretlemesi yapılan 21 gün grubuna ait aşırı dejenerasyon gösteren seminifer tübül görünümü (x40).**

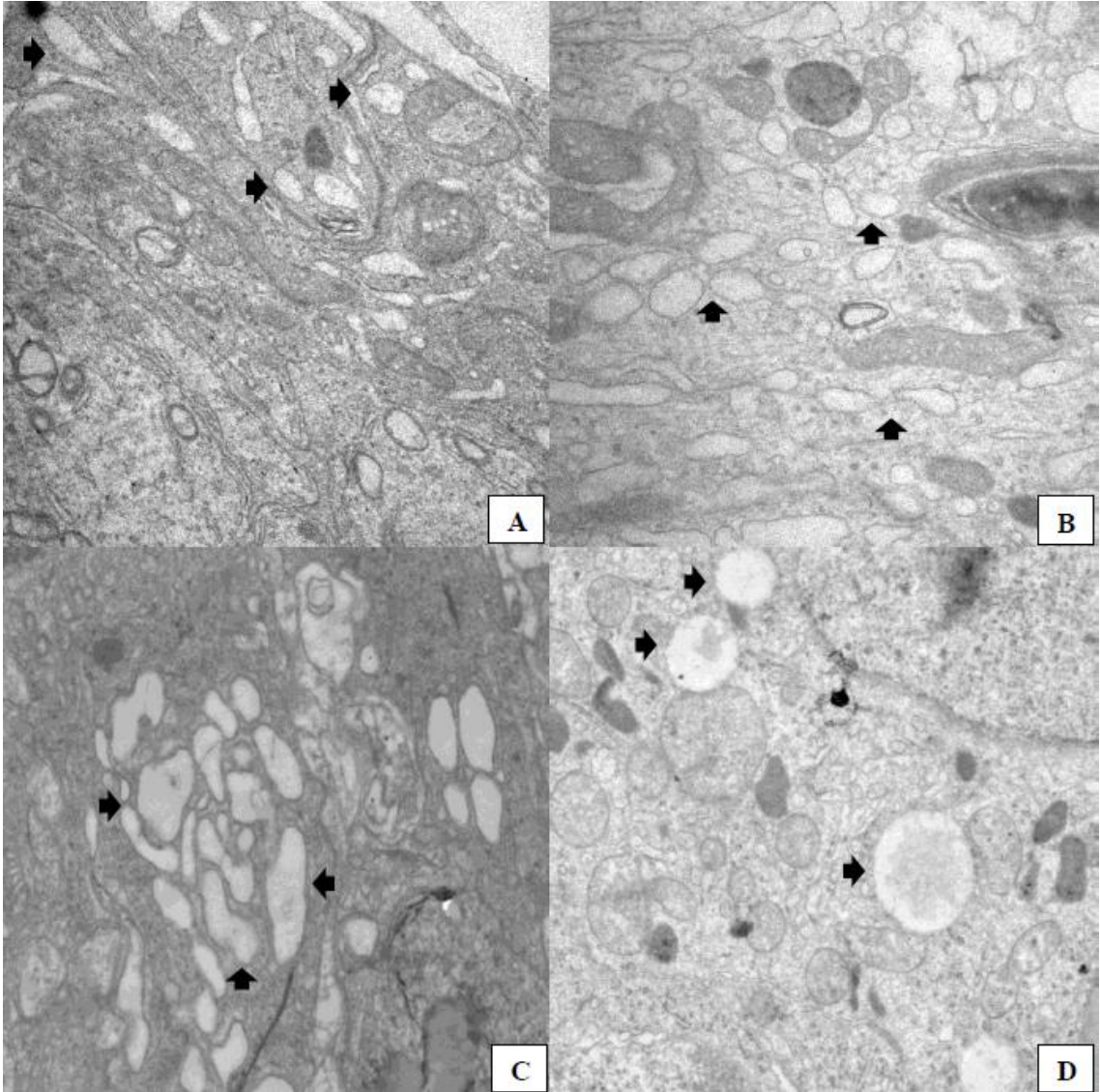
### **4.3. Elektron Mikroskopik Bulgular**

Kontrol grubunun elektron mikroskobu kesitlerinde Sertoli hücreleri incelendi. Elektron mikroskobunda, Sertoli hücresi ve myoid hücrelerin bazal membranları sırt sırta vermiş birbirine yakın iki yapı olarak gözlemlendi. Kendi bazal laminası üzerine oturan Sertoli hücrelerinin sitoplazmaları, kuşatmış oldukları diğer spermatogenik hücreler arasında devamlılık gösteren ve lümene ulaşan genellikle biraz daha koyu görünen sitoplazmaya sahip sütuncuklar halinde izlendi. Heterokromatince fakir nükleusları, armut şeklinde olağan yapısında görüldü. Sertoli hücresinin sitoplazmasında, bol miktarda düz ER'ye, bol miktarda oldukça düzenli görülen granüllü ER'ye, çok sayıda küresel, uzamış ve bazıları çatallanmış mitokondrilere, iyi gelişmiş Golgi cisimciğine ve lizozomlara rastlandı. Ayrıca yer yer az sayıda lipid damlacıkları da görüldü (Şekil 4-32, 4-33, 4-34).

7 gün grubunun elektron mikroskobu kesitlerinde kontrol grubundan farklı yapılar gözlenmedi. Sertoli hücreleri ve nükleusları normal görünümde, sitoplazmik öğeleri de kontrol grubundan farksız şekilde gözlemlendi (Şekil 4-32, 4-33, 4-34).

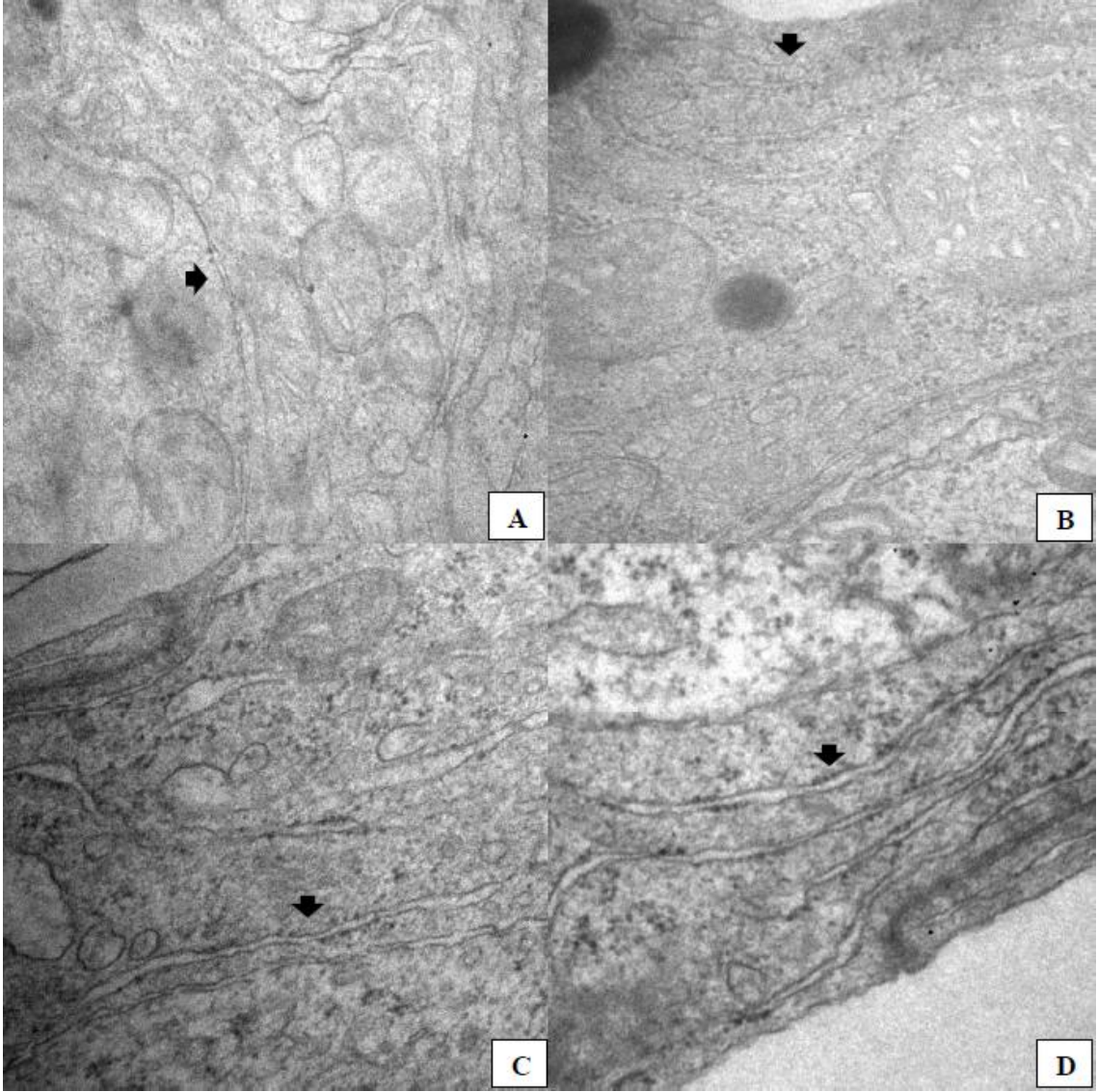
14 gün grubunun elektron mikroskobu kesitlerinde granüllü ER'ler kontrol grubuna kıyasla daha büyük ve lümenleri genişlemiş halde gözlemlendi. Aynı şekilde düz ER'lerde de genişleme gözlemlendi. Ayrıca Sertoli hücre sitoplazmasının bazı bölgelerinde lizozomlarda artış gözlemlendi. İri lipid damlacıkları daha fazla sayıda görüldü (Şekil 4-32, 4-33, 4-34).

21 gün grubunun elektron mikroskobu kesitlerinde granüllü ER lümenlerinde genişlemeler ve yer yer kese şeklinde yapılar gözlemlendi. Bazı alanlarda yumak şeklinde görünüm oluşturan granüllü ER, lümenleri iyice genişlemiş şekilde görüldü (Şekil 4-34). Düz ER'de genişleme ise en fazla bu grupta gözlemlendi. Yine 14 gün grubundaki gibi lizozomlarda kontrol grubuna kıyasla bir artış gözlemlendi. İri lipid damlacıkları daha fazla sayıda görüldü (Şekil 4-32, 4-33, 4-34). Ayrıca bu gruptaki hayvanlardan birinde ışık mikroskobu bulgularında tarif edilen gruplaşmış hücre bölgeleri şeklinde görülen yapılar, elektron mikroskobunda da incelendi. Burada Sertoli hücrelerinin dağınık yerleşim gösterdiği gözlemlendi (Şekil 4-36). Sertoli hücre nükleusları bazı bölgelerde lümeneye yakın bölgelerde görüldü (Şekil 4-36). Çoğu seminifer tübüllerde spermatogenik hücreler diğer örneklerle göre çok az sayıda idi (Şekil 4-36). Bu hayvanın bazı seminifer tübüllerinde ise, ışık mikroskobunda bir çok spermatogenik hücrenin bir araya gelerek oluşturduğu hücre grupları gibi görülen yapılar incelendiğinde, bu yapıların hücre grupları değil, bir çok nükleusu kapsayan dev bir hücre yapısında olduğu gözlemlendi. Bu şekilde değerlendirilmesinin sebebi de bu nükleusların çevrelerindeki sitoplazmik yapının birer hücreyi ifade edecek şekilde bir hücre membranına sahip olmamalarıydı (Şekil 4-37,4-38). Bu çok nükleuslu yapının sahip olduğu sitoplazma ise, diğer spermatogenik ve bilinen somatik hücrelerin hiçbirinin tarifine uymayacak şekilde, organel yapı ve zenginliğine sahipti (Şekil 4-37). Bazı seminifer tübüllerde ise bol ve büyük lipid damlacıkları göze çarpar şekilde gözlemlendi (Şekil 4-36, 4-39).



**Şekil 4-32: Sertoli hücrelerine ait düz endoplazmik retikulumların geçirimli elektron mikroskopik görüntüleri (x12.000).**

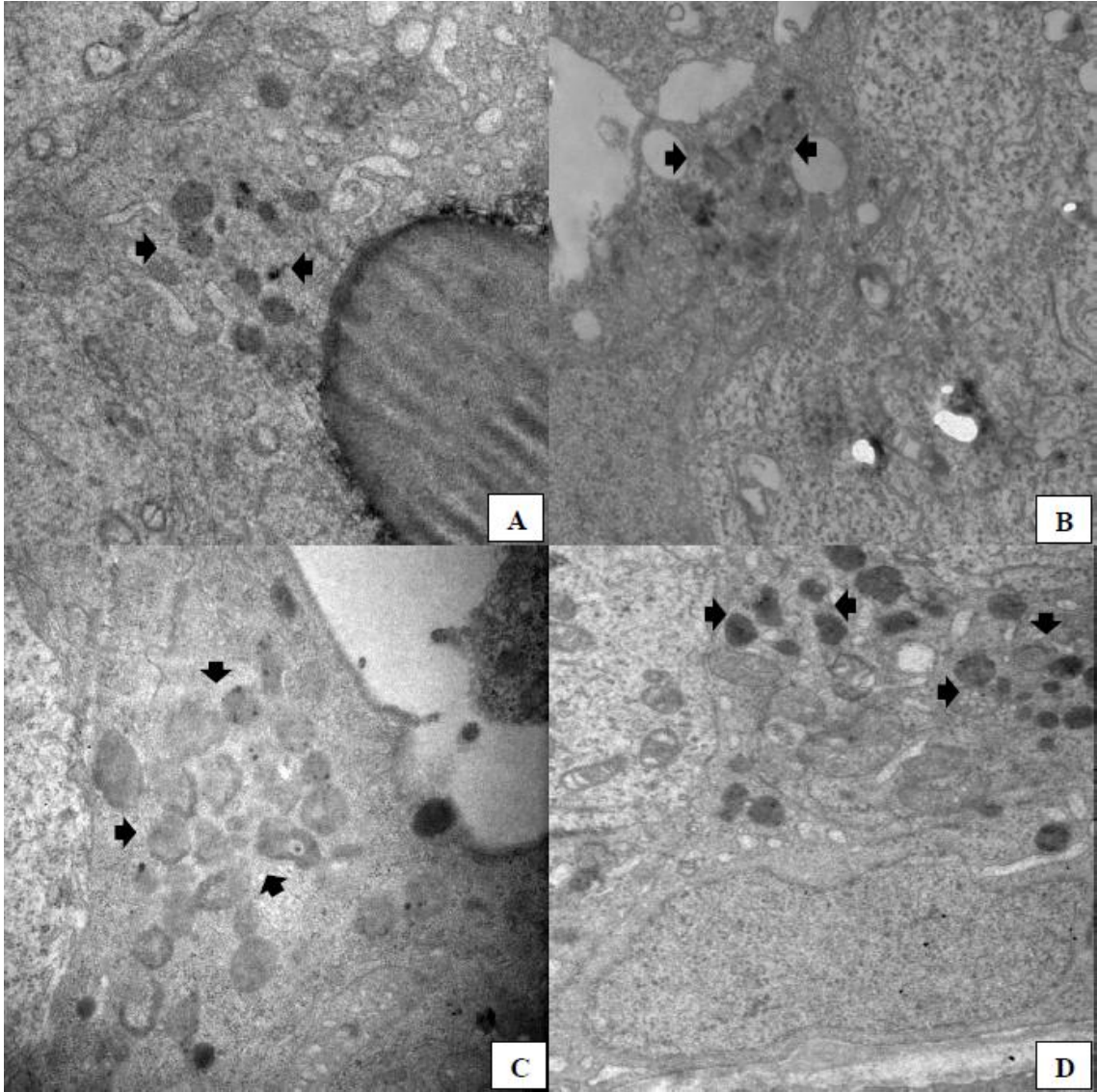
A: Kontrol grubu, B: 7 gün grubu, C: 14 gün grubu, D: 21 gün grubuna ait Sertoli hücrelerinde düz ER (oklar) görülmektedir.



**Şekil 4-33 Sertoli hücrelerine ait granüllü endoplazmik retikulumların geçirimli elektron mikroskopik görüntüleri (x50.000).**

A: Kontrol grubu, B: 7 gün grubu, C: 14 gün grubu, D: 21 gün grubuna ait Sertoli hücrelerinde granüllü ER (oklar) görülmektedir.



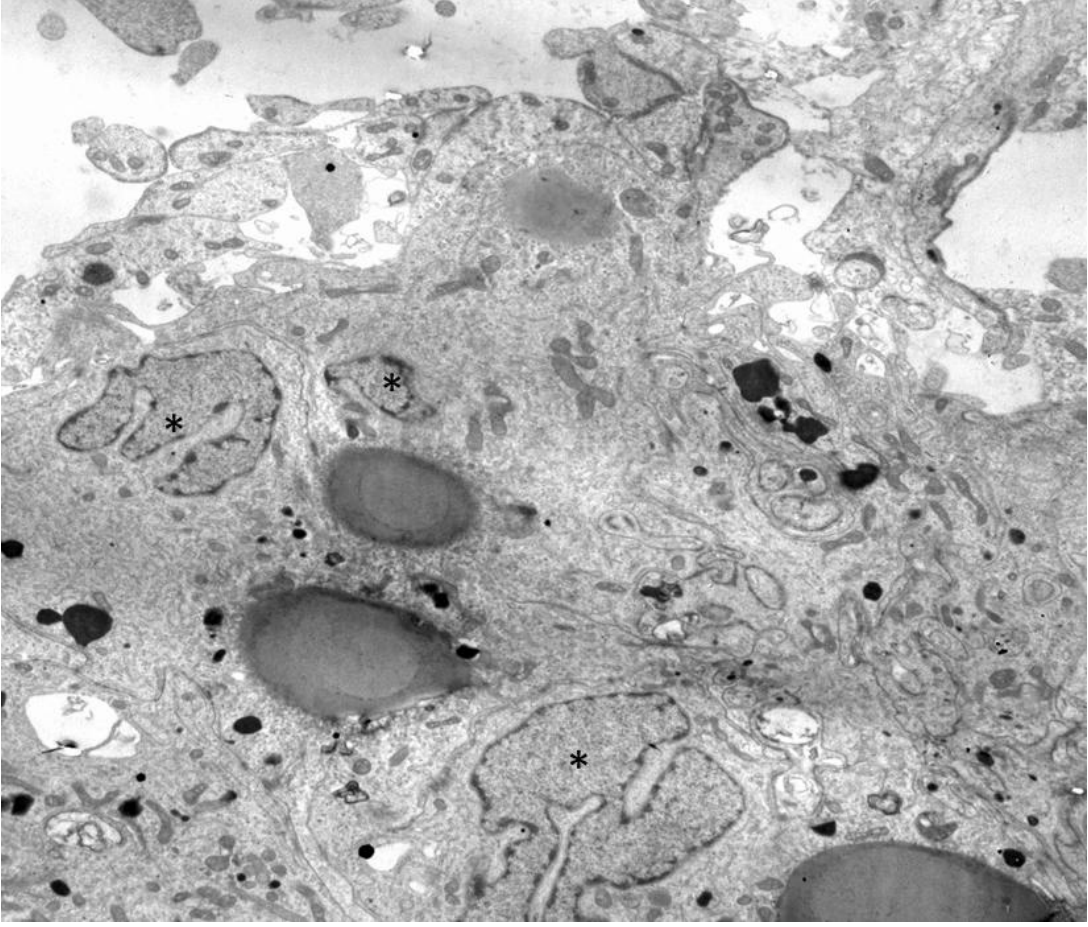


**Şekil 4-34: Sertoli hücrelerine ait lizozom gruplarının geçirimli elektron mikroskobik görüntüleri (x12.000).**

A: Kontrol grubu, B: 7 gün grubu, C: 14 gün grubu, D: 21 gün grubuna ait Sertoli hücrelerinde lizozom kümeleri (oklar) görülmektedir.

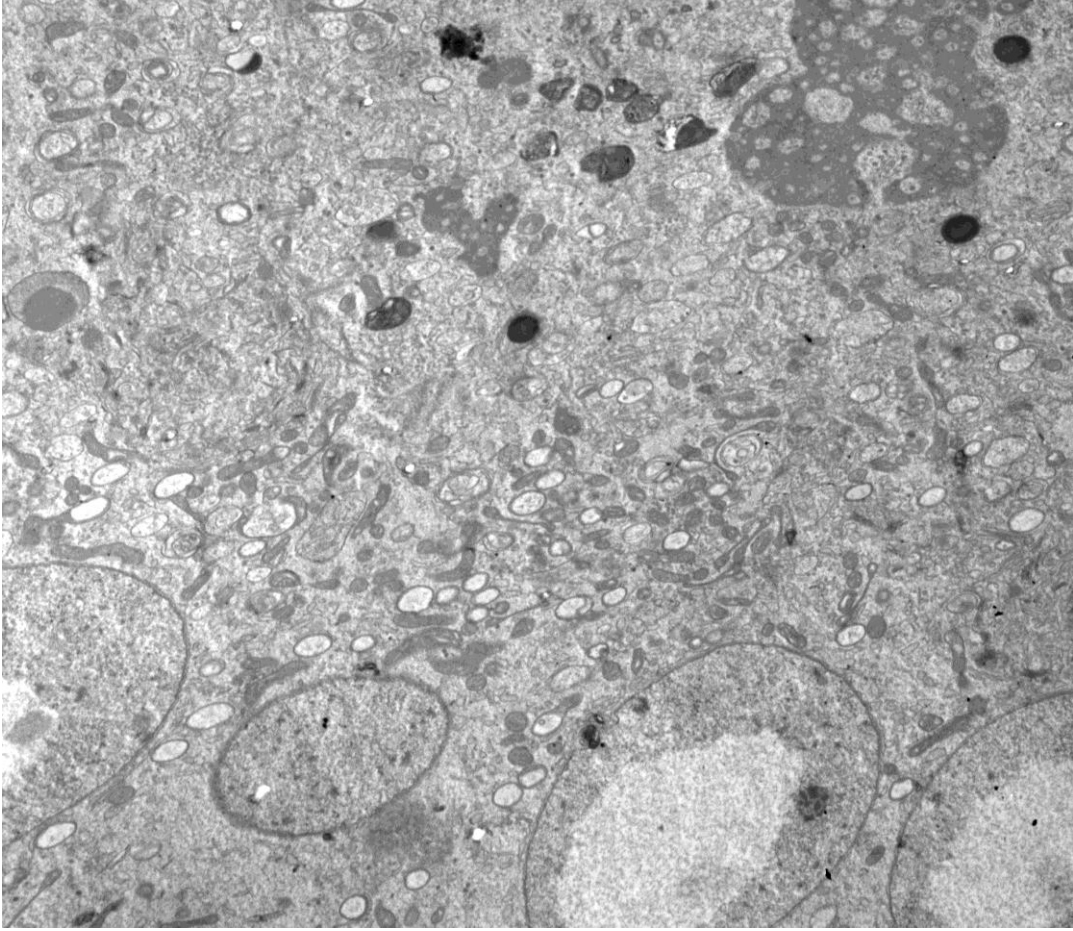


**Şekil 4-35: 21gün grubundaki stresli bir Sertoli hücresinde yumak şeklinde görünen granüllü ve düz endoplazmik retikulumun geçirimli elektron mikroskobik görüntüsü (x50.000).**

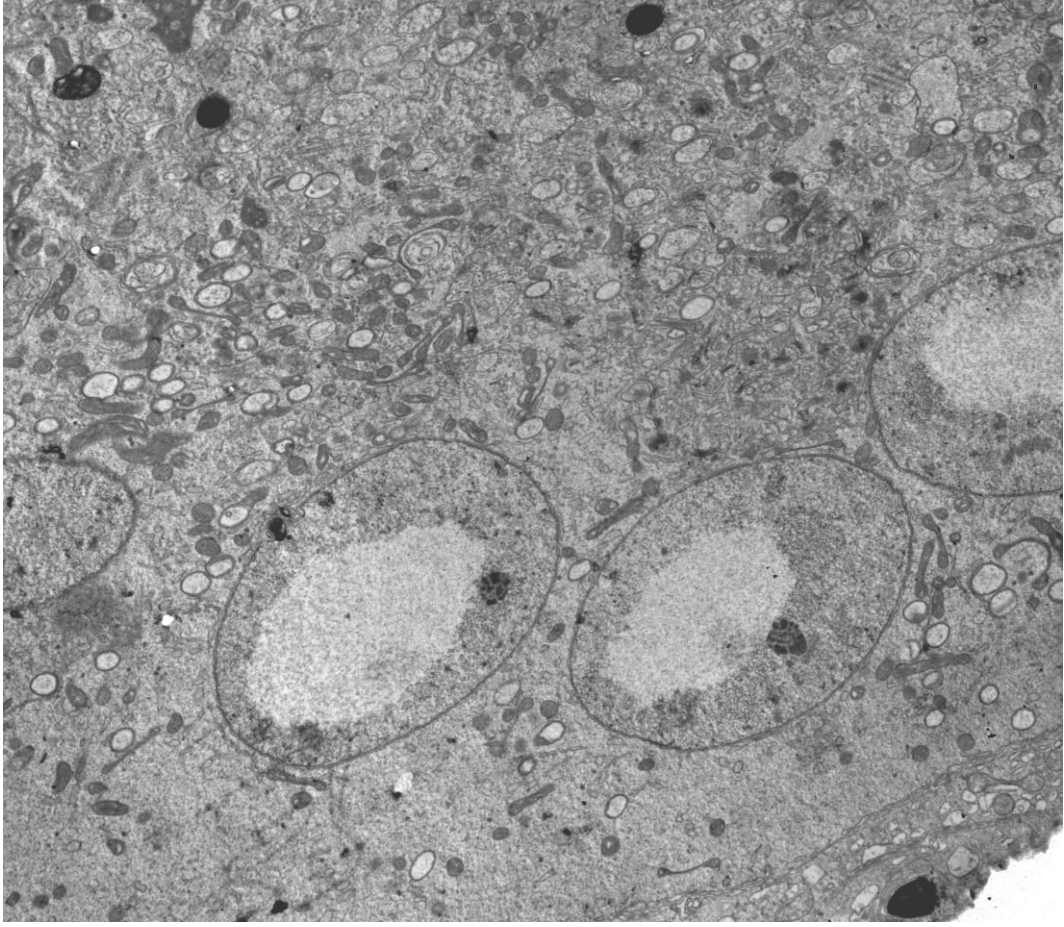


**Şekil 4-36: 21 gün grubundaki aşırı hasar gözlenen seminifer tübülün geçirimli elektron mikroskopik görüntüsü (x10.000).**

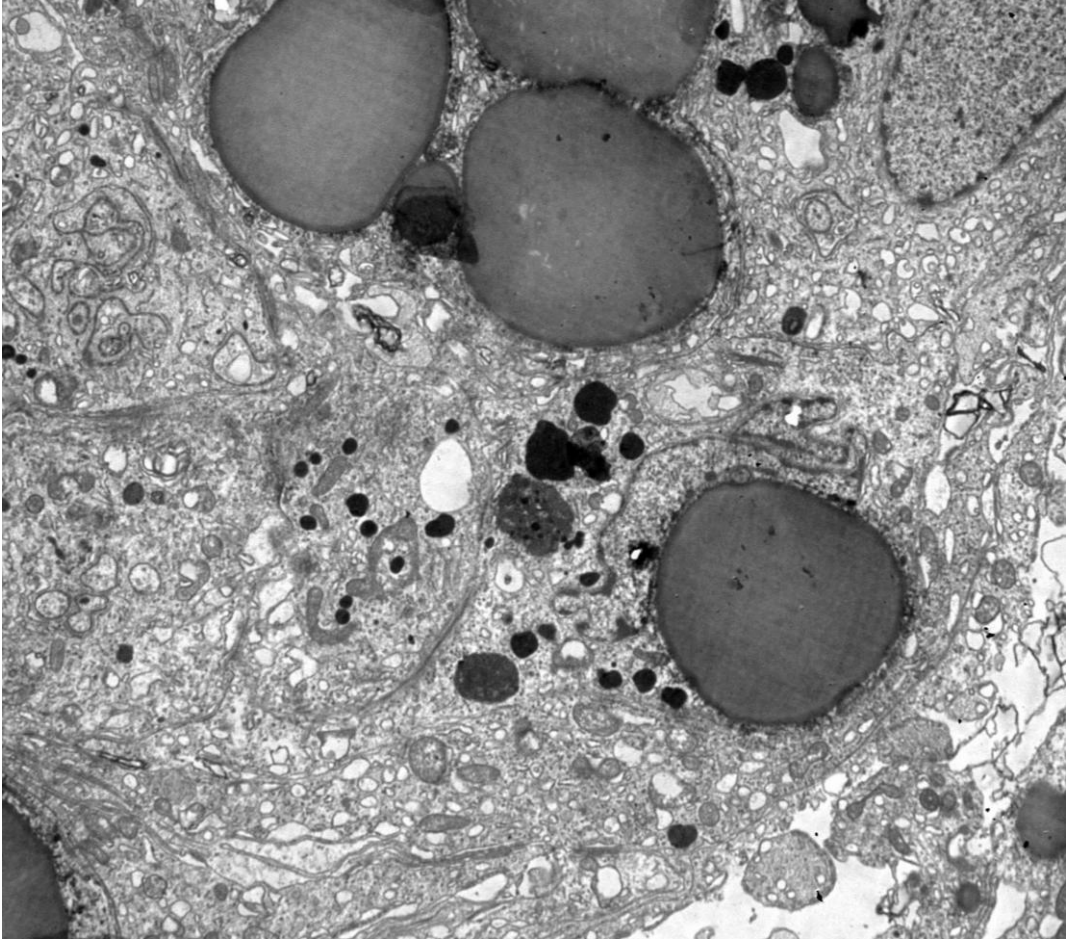
Dağınık yerleşim gösteren ve lümene yakın bölgedeki sertoli hücreleri (\*).



**Şekil 4-37: 21 gün grubundaki aşırı hasar gözlenen seminifer tübüldeki çok nükleuslu yapının geçirimli elektron mikroskobik görüntüsü (x7.500).**



**Şekil 4-38: 21 gün grubundaki aşırı hasar gözlenen seminifer tübüldeki çok nükleuslu yapının geçirimli elektron mikroskobik görüntüsü (x7.500).**



**Şekil 4-39: 21 gün grubundaki aşırı hasar gözlenen seminifer tübüldeki bol ve büyük lipid damlacıklarının elektron mikroskobik görüntüsü (x5.000).**

## 5. TARTIŞMA

Tunikamisin, glikoprotein sentezinin ilk adımında, UDP-N-asetilglukozamin yapısındaki, N-asetilglukozamin-1-fosfatın, dolikol fosfata transferinin katalizinde rol alan GTP enzimine (GlcNAc fosfotransferaz) etki ederek, dolikol fosfatın, N-asetilglukozamin-1-fosfata bağlanmasını engeller [5, 6, 8, 25-27]. Böylece N-bağlı glikoproteinlerin sentezini bloke ederek ER stresine neden olmaktadır [5]. Birçok biyolojik çalışmada deneysel araç olarak, özellikle ER stresinin uyarılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır [3, 5, 28-31]. Tunikamisin dışında ER stresi çalışmalarında değişik stres oluşturuvcu ajanlar da kullanılmaktadır. Örneğin; Gong ve ark. başka bir ER stres uyararı olan nonilfenol ile Sertoli hücre kültüründe yaptığı çalışmada, ER stresi, hücre morfolojisinde değişiklikler, apoptoz ve hücre hasar gözlemlemiştirler [4]. Tabuchi ve ark. fare Sertoli hücre kültüründe, ER stresine eşlik eden hücre hasar ve bu hasarda rol oynayan genetik ağlarının belirlenmesi üzerine yaptığı çalışmada ER stresi oluşturuvcusu olarak bisphenol A kullanmıştır [40]. Chung ve ark. sıçan kortikal nöronal hücre kültüründe yaptığı çalışmada ER stresini thapsigargin uygulayarak uyarılmışlardır [41]. Ji ve ark. ise testis germ hücrelerinde, kadmiyum ile uyarılan ER stresini ve germ hücresi apoptozunun mitokondri yolakları ile olan ilişkisini göstermişlerdir [42].

Peterson ve ark. Wistar Albino sıçanlar üzerinde yaptığı bir çalışmada sıçanlarda tek doz subkutan tunikamisin enjeksiyonunun geri dönüştürülemeyen testiküler hasara yol açtığını göstermiştir. 133µl, 200µl, 300µl ve 350µl/kg şeklinde tek doz subkutan tunikamisin enjeksiyonu yapılmış ve 200µl/kg den aşağı dozların toksik etki yaratmadığı, 350µ ve üzeri dozların ise öldürücü etkiye sebep olduğu gözlenmiştir. Ayrıca enjeksiyondan sonra seminifer tübül epitelinde, hasarın 3. ve 5. günlerde başladığını ve en fazla hasarın, 19. günden sonra görüldüğünü belirtmişlerdir [43]. Jang ve ark. yaptığı çalışmada tunikamisin ile uyarılan ER stresinin osteoblast farklılaşmasında görev alan kemik morfojenik protein 2 üzerindeki olumsuz etkisini göstermişlerdir [6]. Tanaka ve ark. nöroblast hücre kültüründe yaptığı bir çalışmada bu hücrelerde tunikamisin ile uyarılmış hücre hasar ve ER stresini gözlemiş, ayrıca genipin maddesinin koruyucu etkisini göstermişlerdir [7]. Nugent ve ark. kondrosit hücre kültürü ile yaptığı bir çalışmada ER stres oluşturuvcusu olarak tunikamisin

kullanmışlardır [44]. Seo, ve ark. yaptıkları çalışmada ER stresinin hepatik glukogenez üzerindeki etkisini incelemişlerdir ve ER stresi oluşturucusu olarak tunikamisin kullanmışlardır [45]. Güzel ve ark. insan endometrium hücre kültüründe yaptıkları çalışmada katlanmamış protein yanıtı anahtar proteini olan HSPA5 ile östrojen sinyali arasındaki çift yönlü etkileşimi araştırmışlardır ve ER stres uyararı olarak tunikamisin kullanmışlardır [3]. Inokuchi ve ark. tunikamisin ile yaptıkları çalışmada ER stresi ile uyarılan retinal hücre ölümünü araştırmışlardır [29]. Sylvester ve ark. sıçan Sertoli hücre kültüründe yaptıkları çalışmada, tunikamisin uygulamasının Sertoli hücrelerinde üretilen glikoprotein sentezine etkisini göstermişlerdir [46]. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda ER stresinin sıçanlarda testis Sertoli hücrelerine verdiği hasarı incelemek için birçok biyolojik çalışmada olduğu gibi ER stresinin uyarılmasında, tunikamisin kullanmayı tercih ettik [1-3, 13, 23, 24, 47].

ER, hücrede salgı proteinlerinin sentezinde, katlanmasında ve olgunlaşmasından sorumlu önemli bir organeldir [1]. ER dengesi (homeostazis) protein sentezi, proteinlerin katlanması ve salgılama gibi hücresel fonksiyonların yerine getirilmesinde önemlidir [23]. Örneğin; kalsiyum dengesindeki değişiklikler, salgı proteinlerinin sentezindeki artış, hatalı katlanmış proteinlerin artışı gibi hücresel stres durumları ER lümeninde katlanmamış proteinlerin birikmesine ve ER'de stres oluşumuna sebep olur. Bu stresin ortadan kaldırılarak homeostazisin sağlanması için, KPY olarak bilinen bir sinyal yolağı uyarılır [1, 2, 23, 24]. Eğer KPY hücresel stresi gideremez ve homeostazis sağlanamazsa hücreler apoptoza giderler [1, 2]. Katlanmamış proteinlerin birikimi, hücreler için toksik etkiye sahiptir ve hücreye zarar vermektedir. Ayrıca hücre içi ve dışına salgılanacak proteinlerin doğru biçimde salgılanamaması da hücreye zarar verebilmektedir [1]. Bunun sonucunda ER stresıyla alakalı olarak Parkinson, Alzheimer ve Huntington gibi nörodejeneratif hastalıklar ve tip 2 diyabet, obezite gibi metabolik hastalıklar ortaya çıkabilmektedir [1, 2, 23, 24].

Asselah ve ark. yaptığı çalışmada kronik hepatit c hastalarında, hepatik ER stresini araştırmışlar ve elektron mikroskobu incelemelerinde hepatosit ER'lerinin yapısında genişlemeler şeklinde değişiklik gözlemlemişlerdir [10]. Shi ve ark. kolorektal kanser hücre kültüründe yaptığı bir çalışmada thapsigargin ile oluşturdukları ER stresini, elektron mikroskobu incelemelerinde ER'lerde şişme şeklinde tanımlamıştır [9]. Gong ve ark. Sertoli hücrelerinde yaptığı çalışmada ise nonilfenol ile uyarılan ER



stresinin elektron mikroskopik incelemesinde, Sertoli hücrelerinin ER'lerinde şişme ve lümen genişlemesi gözlemlenmiştir [4]. Bizde çalışmamızda bu çalışmalara paralel olarak Sertoli hücrelerinde immünohistokimyasal olarak ER stresinin en şiddetli olduğunu tespit ettiğimiz 21 gün grubunda, düz ER'lerde şişme, granüllü ER lümenlerinde genişlemeler gözlemledik (Şekil 4-32, 4-33). Ayrıca bazı alanlarda yumak şeklinde görünüm oluşturan, lümenleri genişlemiş granüllü ve düz ER yapısı gözlemledik. Ancak düz ER bölgelerindeki genişlemeler daha fazlaydı (Şekil 4-32). Bunların dışında, bazı alanlarda lizozom grupları gözlemledik (Şekil 4-34).

Hatalı katlanmış proteinlerin birikimi ve ER stresinin üstesinden gelmek için KPY yolağı aktive olmaktadır. Eğer hatalı katlanmış protein miktarı çok fazla olursa ve stres devam ederse, KPY'nin aktivasyonu ER stresine baş etmek için yetersiz kalmaktadır ve böyle bir durumda ER stresi apoptoza (programlı hücre ölümü) sebep olmaktadır [1, 11]. Güzel ve ark. insan endometriyumda yaptıkları çalışmada ER stresini GRP78/BiP immünohistokimya yöntemiyle göstermişlerdir [3]. Gong ve ark. yaptıkları çalışmada Sertoli hücre kültüründe western blot yöntemi ile GRP78/BiP miktar tayini yaparak, ER stresinin, uygulanan nonilfenol dozuna bağlı olarak arttığını göstermişlerdir [4]. Bizde çalışmamızda, GRP78/BiP immünohistokimya işaretlemesi yaparak ER stresini gösterdik ve en güçlü immün reaksiyonu deney gruplarımızdan 21 gün grubunda gördük (Şekil 4-18).

Xu ve ark. yaptığı çalışmada, tunikamisin ile uyarılan ER stresinin fare akciğer endotel hücrelerinde apoptozu arttırdığını AnnexinV yöntemiyle göstermişlerdir [47]. Fu ve ark. kardiyomiyositlerde yaptıkları çalışmada, tunikamisin ile uyarılan ER stresinin bu hücrelerde apoptoza sebep olduğunu MTT analizi kullanarak göstermiştir [48]. Zhang ve ark. yaptıkları immatür sıçan Sertoli hücre kültürü çalışmasında, bu hücrelerin kimyasal olarak toksinlere maruz bırakılması sonucunda apoptoza yöneldiğini, MTT analizi ile göstermişlerdir [49]. Gong ve ark. sıçan Sertoli hücre kültürü üzerinde yaptığı çalışmada, nonilfenol uygulayarak oluşturdukları ER stresi sonucunda bu hücrelerin hayatta kalma oranında azalma gözlemlenmiş, yüksek dozda nonilfenol uygulamasında ise hücrelerin apoptoza daha fazla yöneldiğini AnnexinV metodu ile göstermişlerdir [4]. Biz çalışmamızda apoptotik Sertoli hücrelerini TUNEL yöntemi uygulayarak tespit ettik. Yapılan çalışmalara benzer şekilde, şiddetli ER stresi tespit edilen 21 gün grubunun Sertoli hücrelerinde, kontrol ve 7 gün grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı apoptoz artışı gözlemledik (Şekil 4-25).

Sertoli hücreleri spermatogenezin sağlanması ve düzenlenmesinde temel görev almaktadır. Sertoli hücrelerinin görevlerinin yerine getirilmesi sırasında salgıladıkları anti-Müllerian hormon (AMH) [13], androjen bağlayıcı protein (ABP) [12], inhibin [29], sitokeratin-18, vimentin [50], kortikosteroid bölgesel ekspresyonları 16 (CR16) [51] gibi bazı proteinler de bu görevlerin doğru şekilde yapılmasında önemli rol oynar. Sertoli hücrelerinde oluşan ER stresinin bu hücrelerde yapılan proteinlerin yapısında ve sentezlenmesinde olumsuz yönde etkisi olabilmektedir. Sylvester ve ark. rat testis sertoli hücre kültüründe yaptığı çalışmada ER stresinin bu hücrelerde dimerik asidik glikoprotein protein üretimini olumsuz etkilediğini gözlemlemiştir [46]. Benzer çalışmalarda Sertoli hücrelerinin işlevlerinin doğru şekilde yerine getirilemediği durumlarda, germ hücrelerinin gelişimlerinin de kötü yönde etkilendiği gösterilmiştir [50, 52]. Ji ve ark. yaptıkları çalışmada Sertoli hücrelerinde kadmiyum ile uyarılan ER stresine bağlı fonksiyonel bozuklukların, germ hücre apoptozunu da tetiklediğini açıklamışlardır [42].

Sertoli hücreleri, spermatogenez üzerindeki önemli rolü sebebiyle toksik hasar için hedef hücrelerdir. Bu hücrelerdeki herhangi bir fonksiyonel bozulmanın, germ hücrelerinin hayatta kalabilme yeteneğine olumsuz etkileri bulunmaktadır [53]. Çeşitli sitotoksik ajanlara maruz kalma sonucunda bu hücrelerde ölüm gözlenmektedir. Sertoli hücreleri, dış etkenler sebebiyle hücre ölümüne karşı dayanıklı hücreler olmakla birlikte, bu etkenler dolayısıyla fonksiyonel bozulmalara hassas hücrelerdir. Bu yüzden Sertoli hücrelerinde apoptoz veya nekroz çok az görülmektedir. Buna karşılık metabolik ve düzenleyici yollardaki bozulmalar sonucunda Sertoli hücreleri kolayca etkilenir ve işlevlerinde bir takım aksaklıkların görülmesi kaçınılmazdır. Bunun en iyi göstergesi de germ hücrelerindeki dejenerasyonun artışıdır [12].

Germ hücreleri aktif şekilde bölünen ve farklılaşan hücrelerdir. Bunlar çok düşük toksik etkilerde bile hasar görebilir ve ölebilirler. Bu hücrelerin aksine erişkinlerde çoğalmayan Leydig ve Sertoli hücreleri en dirençli hücrelerdir. Çoğu toksik uygulama sonrasında hayatta kalmaya devam ederler. Fakat bu hücreler fonksiyonel hasara uğrayabilmektedirler. Çalışmamızda ışık mikroskopik incelemeler sonucunda 7 ve 14 gün gruplarının Sertoli hücrelerinde görülen apoptoz kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık göstermemesine karşın, yapılan GRP78/BiP immünohistokimya işaretlemesinde, ER stresinden en fazla etkilendiği tespit edilen 21 gün grubunda apoptotik Sertoli hücrelerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir (Şekil 4-18). Bununla

birlikte, 14 gün grubunda GRP78/BiP immün reaksiyonunun kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artmasına rağmen apoptotik indeks incelendiğinde bu hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir apoptoz artışı görülmemiştir. Buradan yola çıkarak Sertoli hücrelerinin, morfolojik bir hasara karşı çok güçlü olmasına rağmen, yüksek stres koşullarında apoptoza gittiği görülmüştür.

Corrier ve ark. kobalt uygulaması ile yaptığı bir çalışmada, sıçan testisinde çok nükleuslu dev hücreler, dejenere ve nekrotik tübüller, birkaç spermatositten oluşan dev hücre toplulukları, gruplaşmış spermatid toplulukları, vakuoller içeren Sertoli hücreleri ve dağınık yerleşimli Sertoli hücreleri ile karakterize ettikleri yoğun testiküler dejenerasyon gözlemlemişlerdir [53]. Biz de geçirimli elektron mikroskobu ile yaptığımız incelemede 21 gün grubu hayvanlarından birinde Corrier ve ark. yaptıkları çalışmaya benzer şekilde dağınık yerleşim gösteren ve bazı bölgelerde lümene yakın görülen sertoli hücreleri (Şekil 4-36), çok az sayıda spermatogenik hücre içeren seminifer tübüller (Şekil 4-36), çok nükleus içeren dev hücreler (Şekil 4-37,4-38) ve bazı bölgelerde bol ve büyük lipid damlacıkları gözlemledik (Şekil 4-36, 4-39). Bu görüntülere ışık mikroskobik incelemelerde de rastladık (Şekil 4-17, 4-24, 4-31). Ayrıca birkaç hayvanda da yoğun olmasa da bu hasar belirtilerinin öncüsü olabilecek hücre gruplaşmaları gözlemledik.

Bu çalışmada sıçanlarda tunikamisin ile uyarılan ER stresinin, testis Sertoli hücreleri üzerindeki etkisinin immünohistokimyasal ve ışık ve elektron mikroskobik olarak incelenmesi amaçlandı. Araştırma sonucunda tunikamisin uygulanan gruplardan en fazla etkilenen 21 gün grubu oldu. Bu grupta testis dokularının Sertoli hücrelerinde GRP78 immün reaksiyonunun ve apoptotik indeksin anlamlı şekilde arttığı gözlemlendi. 7 ve 14 gün gruplarında Sertoli hücrelerinin apoptotik indeksinde anlamlı bir değişiklik görülmedi (Şekil 4-25). GRP78 immün reaksiyonunda ise gün sayısının artması ile birlikte artış gözlemlendi (Şekil 4-18). Ayrıca elektron mikroskobik incelemeler sonucunda, tunikamisin verilen sıçanların deney süresi arttıkça bazı morfolojik değişikliklerin de arttığı gözlemlendi.

Sonuç olarak yaptığımız çalışmada tunikamisin ile uyarılan ER stresinin, Sertoli hücrelerinin fonksiyonlarına ve hayatta kalma gücüne olumsuz etki ettiğini gözledik. Bunun yanı sıra ER stresinin artması ile birlikte germ hücrelerinde de morfolojik hasarlar tespit ettik. Bu bilgiler ışığında hasar gören Sertoli hücrelerinde ER stresine

bağlı olarak oluşan morfolojik bozuklukların erkek fertilitelerini olumsuz etkileyen sebeplerinden biri olabileceği sonucuna ulaştık.

## KAYNAKLAR

1. Seydel S ve Aksoy K(2012). Endoplazmik Retikulum Stresi ve Apoptozis Mekanizması. *Archives Medical Review Journal*: p. 221-235.
2. Duzguna A, Alacam H, ve Okuyucu A(2011). Endoplazmik retikulum stresi ve katlanmamış protein cevabı. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*: p. 95-100.
3. Guzel E, Basar M, Ocak N ve ark.(2011). Bidirectional interaction between unfolded-protein-response key protein HSPA5 and estrogen signaling in human endometrium. *Biol Reprod*, **85**(1): p. 121-7.
4. Gong Y, Wu J, Huang Y ve ark.(2009). Nonylphenol induces apoptosis in rat testicular Sertoli cells via endoplasmic reticulum stress. *Toxicol Lett*, **186**(2): p. 84-95.
5. Balcan E, Arslan O, Gumus A ve ark.(2009). Tunikamisinin Embriyonik ve Yenidoğan Fare Dalak Dokularına Etkisi. p. 651-660.
6. Jang WG, Kim EJ, ve Koh JT(2011). Tunicamycin negatively regulates BMP2-induced osteoblast differentiation through CREBH expression in MC3T3E1 cells. *BMB Rep*, **44**(11): p. 735-40.
7. Tanaka M, Yamazaki M, ve Chiba K(2009). Neuroprotective action of genipin on tunicamycin-induced cytotoxicity in neuro2a cells. *Biol Pharm Bull*, **32**(7): p. 1220-3.
8. Fujinami Y, Mutai H, Mizutari K ve ark.(2012). A novel animal model of hearing loss caused by acute endoplasmic reticulum stress in the cochlea. *J Pharmacol Sci*, **118**(3): p. 363-72.
9. Shi Y, Tang B, Yu PW ve ark.(2012). Autophagy protects against oxaliplatin-induced cell death via ER stress and ROS in Caco-2 cells. *PLoS One*, **7**(11): p. e51076.
10. Asselah T, Bieche I, Mansouri A ve ark.(2010). In vivo hepatic endoplasmic reticulum stress in patients with chronic hepatitis C. *J Pathol*, **221**(3): p. 264-74.
11. Rasheva VI ve Domingos PM(2009). Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis*, **14**(8): p. 996-1007.
12. Creasy DM(2001). Pathogenesis of male reproductive toxicity. *Toxicol Pathol*, **29**(1): p. 64-76.
13. Junqueira LC ve Carneiro J(2006). *Basic Histology 10th Edition*. Nobel Tıp Kitapevi
14. Kierszenbaum AL(2006). *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*. Palme Yayıncılık
15. Seçkin İ ve ark. (2008). *Özel Histoloji Ders Kitabı*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayın Evi
16. Seçkin İ ve ark. (2008). *Embriyoloji Ders Kitabı*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayın Evi

17. Moore KL ve Persaud TV(2003). *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. . Pennsylvania-USA: Elsevier Science
18. William KO ve Patrick CN(2009). *Netter Temel Histoloji*. Philadelphia: Güneş Tıp Kitabevi
19. Skinner MK ve Griswold MD(2005). *Sertoli Cell Biology*. California-USA: Elsevier Academic Press
20. Sadler TW(2006). *Langman's Medical Embryology*. Maryland-USA: Lippincott Williams & Wilkins
21. Gray H(1988). *Gray's Anatomy; Part-II Embryology: Development of Urogenital Organs*. London-UK: Churchill Livingstone
22. Ross MH(2003). *Histology A Text And Atlas. 6th ed*. Pennsylvania-USA: Lippincott Williams and Wilkins
23. Gundesli H ve Dincer P(2008). Endoplazmik retikulum stresinin moleküler mekanizması ve kas patolojisi arasındaki ilişki. *Hacettepe Tıp Dergisi*.
24. Schroder M ve Kaufman RJ(2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*, **74**: p. 739-89.
25. Mahoney WC ve Duksin D(1979). Biological activities of the two major components of tunicamycin. *J Biol Chem*, **254**(14): p. 6572-6.
26. Soroka CJ, Xu S, Mennone A ve ark.(2008). N-Glycosylation of the alpha subunit does not influence trafficking or functional activity of the human organic solute transporter alpha/beta. *BMC Cell Biol*, **9**: p. 57.
27. Takatsuki A, Arima K, ve Tamura G(1971). Tunicamycin, a new antibiotic. I. Isolation and characterization of tunicamycin. *J Antibiot (Tokyo)*, **24**(4): p. 215-23.
28. Oda T, Kosuge Y, Arakawa M ve ark.(2008). Distinct mechanism of cell death is responsible for tunicamycin-induced ER stress in SK-N-SH and SH-SY5Y cells. *Neurosci Res*, **60**(1): p. 29-39.
29. Inokuchi Y, Nakajima Y, Shimazawa M ve ark.(2009). Effect of an inducer of BiP, a molecular chaperone, on endoplasmic reticulum (ER) stress-induced retinal cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **50**(1): p. 334-44.
30. Yuan L, Cao Y, ve Knochel W(2007). Endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin disables germ layer formation in *Xenopus laevis* embryos. *Dev Dyn*, **236**(10): p. 2844-51.
31. Zhang Y, Lucocq JM, ve Hayes JD(2009). The Nrf1 CNC/bZIP protein is a nuclear envelope-bound transcription factor that is activated by t-butyl hydroquinone but not by endoplasmic reticulum stressors. *Biochem J*, **418**(2): p. 293-310.
32. Valenti D, La Vignera S, Condorelli RA ve ark.(2013). Follicle-stimulating hormone treatment in normogonadotropic infertile men. *Nat Rev Urol*, **10**(1): p. 55-62.
33. Vicdan KI, A. C.(1999). İn Vitro Fertilizasyon Ve Mikromanipülasyon Uygulamalarında Laboratuvar.

34. Hamada A, Esteves SC, ve Agarwal A(2013). Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 2. *Nat Rev Urol*, **10**(1): p. 26-37.
35. Brehm R ve Steger K(2005). Regulation of Sertoli cell and germ cell differentiation. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, **181**: p. 1-93.
36. Gardner DK, Weissman A, Howles MC ve ark.(2004). *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*. Nobel Tıp Kitapevi
37. Nalam RL, Andreu-Vieyra C, ve Matzuk MM(2010). Absence of inhibin alpha and retinoblastoma protein leads to early sertoli cell dysfunction. *PLoS One*, **5**(7): p. e11797.
38. Ogawa T, Ito C, Nakamura T ve ark.(2004). Abnormal sperm morphology caused by defects in Sertoli cells of Cnot7 knockout mice. *Arch Histol Cytol*, **67**(4): p. 307-14.
39. Kaya-Dagistanli F, Tanriverdi G, Altinok A ve ark.(2013). The effects of alpha lipoic acid on liver cells damages and apoptosis induced by polyunsaturated fatty acids. *Food Chem Toxicol*, **53**: p. 84-93.
40. Tabuchi Y, Takasaki I, ve Kondo T(2006). Identification of genetic networks involved in the cell injury accompanying endoplasmic reticulum stress induced by bisphenol A in testicular Sertoli cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **345**(3): p. 1044-50.
41. Chung H, Chung HY, Bae CW ve ark.(2011). Ghrelin suppresses tunicamycin- or thapsigargin-triggered endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in primary cultured rat cortical neuronal cells. *Endocr J*, **58**(5): p. 409-20.
42. Ji YL, Wang H, Zhao XF ve ark.(2011). Crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mitochondrial pathway mediates cadmium-induced germ cell apoptosis in testes. *Toxicol Sci*, **124**(2): p. 446-59.
43. Peterson JE, Jago MV, ve Stewart PL(1996). Permanent testicular damage induced in rats by a single dose of tunicamycin. *Reprod Toxicol*, **10**(1): p. 61-9.
44. Nugent AE, McBurney DL, ve Horton WE, Jr.(2011). The presence of extracellular matrix alters the chondrocyte response to endoplasmic reticulum stress. *J Cell Biochem*, **112**(4): p. 1118-29.
45. Seo HY, Kim MK, Min AK ve ark.(2010). Endoplasmic reticulum stress-induced activation of activating transcription factor 6 decreases cAMP-stimulated hepatic gluconeogenesis via inhibition of CREB. *Endocrinology*, **151**(2): p. 561-8.
46. Sylvester SR, Skinner MK, ve Griswold MD(1984). A sulfated glycoprotein synthesized by Sertoli cells and by epididymal cells is a component of the sperm membrane. *Biol Reprod*, **31**(5): p. 1087-101.
47. Xu D, Perez RE, Rezaiekhalthigh MH ve ark.(2009). Knockdown of ERp57 increases BiP/GRP78 induction and protects against hyperoxia and tunicamycin-induced apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **297**(1): p. L44-51.
48. Fu HY, Minamino T, Tsukamoto O ve ark.(2008). Overexpression of endoplasmic reticulum-resident chaperone attenuates cardiomyocyte death induced by proteasome inhibition. *Cardiovasc Res*, **79**(4): p. 600-10.

49. Zhang HZ, Zhang FQ, Li CF ve ark.(2011). A cyanobacterial toxin, microcystin-LR, induces apoptosis of sertoli cells by changing the expression levels of apoptosis-related proteins. *Tohoku J Exp Med*, **224**(3): p. 235-42.
50. Bar-Shira Maymon B, Paz G, Elliott DJ ve ark.(2000). Maturation phenotype of Sertoli cells in testicular biopsies of azoospermic men. *Hum Reprod*, **15**(7): p. 1537-42.
51. Suetsugu S, Banzai Y, Kato M ve ark.(2007). Male-specific sterility caused by the loss of CR16. *Genes Cells*, **12**(6): p. 721-33.
52. Foresta C, Bettella A, Moro E ve ark.(2001). Sertoli cell function in infertile patients with and without microdeletions of the azoospermia factors on the Y chromosome long arm. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**(6): p. 2414-9.
53. Corrier DE, Mollenhauer HH, Clark DE ve ark.(1985). Testicular degeneration and necrosis induced by dietary cobalt. *Vet Pathol*, **22**(6): p. 610-6.



## ETİK KURUL KARARI



T.C  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 2011/ 168

29 / 12/ 2011

Sn: Prof. Dr. Faruk ALKAN  
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Karar No : 2011/ 168  
Başvuru :29.11.2011

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, Biyolog Özgür DOĞUŞ DEMİRKİRAN'a ait "Tunikamisinin, testis sertoli hücreleri üzerindeki etkisinin ışık mikroskopik ve elektron mikroskopik olarak incelenmesi" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ  
İ.Ü.HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK  
Üye

Prof. Dr. Pınar YAMANTÜRK ÇELİK  
Üye

Doç.Dr.Ufuk ÇAKATAY  
Üye

Yard.Doç.Dr.Alper OKYAR  
Üye

Yard.Doç.Dr Altan ARMUTAK  
Üye

Uzm.Vet.Hek.Fatma TEKELİ  
Üye

Avukat Selma DEMİR  
Üye

Mak.Yük.Müh. Dr.Burak OLGUN  
Üye

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Özgür Doğuş	<b>Soyadı</b>	Demirkıran
<b>Doğ.Yeri</b>	İstanbul	<b>Doğ.Tar.</b>	10.05.1987
<b>Uyruğu</b>	TC	<b>TC Kim No</b>	35500987636
<b>Email</b>	<a href="mailto:dogus87@gmail.com">dogus87@gmail.com</a>	<b>Tel</b>	0505 582 5628

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>	-	-
<b>Yük.Lis.</b>	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D.	2013
<b>Lisans</b>	Balıkesir Üniversitesi - Biyoloji	2010
<b>Lise</b>	Vefa Lisesi	2005

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	Orta	48,75	70

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>LES Puanı</b>	78.338	75.480	71.690
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office	Çok iyi

### Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

**Özel İlgi Alanları (Hobileri):** Müzik, sinema, spor