

**T.C.**  
**ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TUNİKAMİSİN İLE UYARILMIŞ ENDOPLAZMİK  
RETİKULUM STRESİNE BAĞLI GELİŞEN APOPTOZİS  
ÜZERİNE SHİLAJİT'İN ETKİLERİ**

**NURTEN TAŞCI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**  
**DOÇ. DR. ZEHRA SAFİ ÖZ**  
**DOÇ. DR. MERYEM AKPOLAT FERAH**

**ZONGULDAK**

**2019**

**T.C.**  
**ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TUNİKAMİSİN İLE UYARILMIŞ ENDOPLAZMİK  
RETİKULUM STRESİNE BAĞLI GELİŞEN APOPTOZİS  
ÜZERİNE SHİLAJİT'İN ETKİLERİ**

**NURTEN TAŞCI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**  
**DOÇ. DR. ZEHRA SAFİ ÖZ**  
**DOÇ. DR. MERYEM AKPOLAT FERAH**

Bu Tez Çalışması Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Tarafından Desteklenmiştir. (Proje No: 2016-83155101-02)

**ZONGULDAK**

**2019**

**KABUL VE ONAY:**

**“TUNİKAMİSİN İLE UYARILMIŞ ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNE BAĞLI GELİŞEN APOPTOZİS ÜZERİNE SHİLAJİT’İN ETKİLERİ”** başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

15.03.2019

**Başkan: Doç. Dr. Zehra SAFİ ÖZ**

**Üye: Doç. Dr. Kanat GÜLLE**

**Üye: Dr. Öğr. Üyesi Habib KHOSHVAGHTİ**

**ONAY:**

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

**TARİH:**

**Prof. Dr. Veysel Haktan ÖZAÇMAK**  
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca beni yönlendiren, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, kıymetli hocam Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Zehra SAFİ ÖZ'e, bilimsel katkıları ile desteğini esirgemeyen değerli hocam, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Meryem AKPOLAT FERAH'a ve Süleyman Demirel Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi değerli hocam Sayın Doç. Dr. Kanat GÜLLE'ye içtenlikle teşekkür ederim.

Araştırma bulgularının istatistiksel değerlendirmelerinde katkıda bulunan ve yardımlarını esirgemeyen Biyoistatistik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Dr. Öğr. Üyesi Füzünan KÖKTÜRK'e ve çalışmanın gerçekleşmesinde maddi destek sağlayan Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine ve çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında bana destek olan sevgili arkadaşlarım Araş. Gör. Büşra ÇETİNKAYA, Biyolog Çiğdem ÖZARSLAN, Moleküler Biyolog Nurten GÜLERYÜZ, Moleküler Biyolog Eren ERMİŞ ve Veteriner Hekim Serkan KARAÇETİN'e,

Tüm hayatım boyunca ve eğitimim süresince benden desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen sevgili anneme, babama ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nurten TAŞCI

Mart, 2019, ZONGULDAK

## ÖZET

**Nurten TAŞCI. Tunikamisın ile Uyarılmış Endoplazmik Retikulum Stresine Bağlı Gelişen Apoptozis Üzerine Shilajit'in Etkileri. Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak, 2019.**

Bu çalışmada, öncelikle endoplazmik retikulum stresine bağlı testis seminifer tübüllerinde meydana gelen apoptozis ile infertilite arasındaki ilişkiyi incelemek amaçlanmıştır. Ayrıca Shilajit'in endoplazmik retikulum stresini baskılayarak apoptozis ve infertiliteyi önlemedeki etkisinin değerlendirilmesi de bir diğer amacımız olmuştur.

Endoplazmik retikulum, proteinlerin katlanmasında rol oynayan önemli bir organeldir. Endoplazmik retikulumun fonksiyon kapasitesini aşan fizyolojik ya da patolojik olaylar lümeninde yanlış katlanmış ya da katlanmamış proteinlerin birikimine yol açarak endoplazmik retikulum stresine neden olmaktadır. Shilajit, Himalaya dağlarında kaya katmanlarından sızan ve değişken kıvama sahip olan doğal bir sıızıntıdır. Shilajit'in spermatojenik ve oojenik etkileri bulunmaktadır.

Çalışmamızda denekler 8 gruba (24. saat ve 4. gün) ayrıldı. Endoplazmik retikulum stresi oluşturmak amacıyla V, VI, VII ve VIII. grup deneklere; deneyin 1. günü tek doz subkutan yoldan 200 µg/kg Tunikamisın, I, II, III ve IV. grup deneklere 1 ml Dimetil sülfoksit aynı yoldan uygulandı. III, IV, VII ve VIII. grup deneklere; oral yoldan gün aşırı 100 mg/kg Shilajit, I, II, V ve VI. grup deneklere 1 ml fizyolojik serum aynı şekilde verildi.

GRP78/BİP, CHOP ve Kaspaz-3 gibi apoptotik belirteçlerin kullanıldığı immünohistokimyasal boyamalarda Shilajit verilen 4. gün gruplarında ekspresyonlarının azaldığı gözlemlendi. FSH, LH ve testosteron hormon düzeyleri ölçümünde Shilajit verilen 4. gün gruplarında FSH seviyesinde anlamlı düzeyde azalma, LH ve testosteron seviyelerinin anlamlı bir farklılığın olmadığı saptandı.

Bu çalışmada Shilajit'in, Tunikamisın indüklü endoplazmik retikulum stresine bağlı gelişen apoptozisin, sıçan testisinde ortaya çıkaracağı germ hücre kaybını ve morfolojik değişiklikleri anlamlı bir düzeyde azaltabileceği düşünülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Tunikamisın, Endoplazmik retikulum stresi, Apoptozis, İnfertilite, Shilajit.

## ABSTRACT

**Nurten TAŞCI. The Effects of Shilajit on Tunicamycin Induced Endoplasmic Reticulum Stress Caused by Apoptosis. Zonguldak Bülent Ecevit University, Institute of Health Sciences, Department of Histology and Embryology, Postgraduate Thesis, Zonguldak, 2019.**

The first purpose of this study was to investigate the relationship between infertility and apoptosis that emerges in the seminiferous tubules due to the endoplasmic reticulum stress. The second purpose was to evaluate the effect of Shilajit that suppresses the endoplasmic reticulum stress and prevents apoptosis and infertility.

The endoplasmic reticulum is an important organelle, which plays a role in the protein folding. Pathological events, which exceed the physiological and pathological functional capacity of endoplasmic reticulum, lead to protein accumulation and consequently cause endoplasmic reticulum stress. Shilajit is a natural substance found in the rock layers of Himalaya mountains. This substance leaks from the rock layers and has a changing texture. It has spermatogenic and oogenic effects.

In our study, the subjects were divided into 8 groups. (24 hours and 4 days) In order to induce endoplasmic reticulum stress, single-dose subcutaneous tunicamycin (200 µg/kg) was administered in Groups V, VI, VII, and VIII in the first day of the experiment. 1 ml dimethyl sulfoxide was administered to the subjects in Groups I, II, III and IV through the same way. Subjects in Groups III, IV, VII, and VIII received oral 100 mg/kg Shilajit every two days and subjects in Groups I, II, V and VI received oral 1 ml saline solution every two days.

Immunohistochemical staining, in which apoptotic markers like GRP78/BIP and CHOP, Caspase-3 were used, revealed a decrease in the expressions in the 4th-day groups, which received Shilajit. The measurement of the hormones FSH, LH, and testosterone, showed that FSH levels were significantly decreased and the LH and testosterone levels were not significantly different in the 4th-day groups received Shilajit.

In this study, it is concluded that Shilajit, might significantly decrease the germ cell loss and morphological changes in the rat testicles caused by apoptosis related to endoplasmic reticulum stress and induced by Tunicamycin.

**Keywords:** Tunicamycin, Endoplasmic reticulum stress, Apoptosis, Infertility, Shilajit.

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEZ KABUL VE ONAY .....	iii
ÖNSÖZ .....	iv
ÖZET .....	v
ABSTRACT .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
TABLolar DİZİNİ .....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Erkek Üreme Sistemi.....	4
2.1.1. Testis embriyolojisi.....	4
2.1.1.1. Gonadların gelişimi.....	4
2.1.1.2. Testislerin gelişimi .....	5
2.1.1.3. Erkek genital kanalların gelişimi .....	7
2.1.2. Testis histolojisi .....	7
2.1.2.1. Seminifer tübül.....	9
2.1.2.2. Sertoli (destek) hücreleri .....	9
2.2. Spermatogenez .....	11
2.2.1. Spermatositogenez (Spermatogonyal faz) .....	12
2.2.2. Mayoz (Spermatosit fazı).....	13
2.2.3. Spermiyogenez (Spermatid fazı) .....	13
2.3. Spermatogenezin Hormonal Kontrolü.....	16
2.4. Olgun (Matur) Sperm Hücresinin Yapısı .....	18
2.5. İnfertilite-Üreme.....	20
2.6. Hücrenin Yapısı ve ER.....	21
2.7. ER Stresi ve Katlanmamış Protein Cevabı (UPR) .....	25
2.7.1. PERK sinyal yolağı.....	28
2.7.2. IRE1 sinyal yolağı .....	29
2.7.3. ATF6 sinyal yolağı .....	29
2.8. ER Stresinde Apoptozisin Uyarılması.....	30
2.8.1. Transkripsiyonel uyarı yolağı .....	30

2.8.2. C-jun NH2-terminal kinaz (JNK) yolağı .....	31
2.8.3. Kaspaz-12'nin aktivasyonu.....	32
2.9. Apoptozis Morfolojisi .....	33
2.10. Tunikamisin.....	34
2.11. Shilajit .....	36
2.10.1. Shilajit'in geleneksel tıp sistemlerinde kullanımı.....	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	39
3.1. Deney Hayvanı .....	39
3.2. ER Stresi Oluşturulması ve Deney Grupları .....	39
3.3. Histopatolojik Analizler .....	40
3.4. Cosentino Skoru ile Spermatogenezin Değerlendirilmesi.....	42
3.5. İmmünohistokimyasal İncelemeler .....	43
3.5.1. Histolojik skorklama (H skor) .....	44
3.6. Hormon Testleri .....	45
3.7. İstatistiksel Analiz .....	45
4. BULGULAR.....	46
4.1. Histolojik Bulgular .....	46
4.1.1. Yirmi dördüncü saat kontrol ve deney gruplarının histolojik bulgularının karşılaştırılması.....	46
4.1.1.1 Hematoksilen+Eozin (H+E) boyama .....	46
4.1.1.2. Periodik Asit-Schiff+Hematoksilen (PAS+H) boyama .....	50
4.1.2. Dördüncü gün kontrol ve deney gruplarının histolojik bulgularının karşılaştırılması.....	52
4.1.2.1. Hematoksilen+Eozin (H+E) boyama .....	52
4.1.2.2. Periodik asit-Schiff+Hematoksilen (PAS+H) boyama .....	55
4.1.3. Yirmi dördüncü saat ve dördüncü gün kontrol ve deney gruplarının histolojik bulgularının karşılaştırılması .....	57
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular .....	57
4.2.1. Dördüncü gün kontrol ve deney gruplarında GRP78/BİP, CHOP ve Kaspaz-3 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi .....	57
4.2.2. Dördüncü gün kontrol ve deney gruplarına ait negatif kontrol görüntüleri	64
4.3. Dördüncü Gün Kontrol ve Deney Gruplarında Spermatogenezin Cosentino Skoru ile Değerlendirilmesi.....	65



4.5. Yirmi Dördüncü Saat Kontrol ve Deney Gruplarında Total Vücut Ağırlığı ve Testis Ağırlığında Meydana Gelen Değişiklikler.....	69
4.6. Dördüncü Gün Kontrol ve Deney Gruplarında Total Vücut Ağırlığı ve Testis Ağırlığında Meydana Gelen Değişiklikler .....	70
4.7. Yirmi Dördüncü Saat ve Dördüncü Gün Kontrol ve Deney Gruplarında Total Vücut Ağırlığı ve Testis Ağırlığında Meydana Gelen Değişikliklerin Karşılaştırılması.....	71
5. TARTIŞMA .....	73
6. SONUÇLAR .....	86
7. KAYNAKLAR .....	87
8. EKLER.....	99
Ek 1. Türkçe Etik Kurul Onayı.....	99
Ek 2. İngilizce Etik Kurul Onayı.....	100
9. ÖZGEÇMİŞ .....	101

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>ABP</b>	: Androjen bağlayıcı protein
<b>ALP</b>	: Alkalın fosfotaz
<b>ALS</b>	: Amyotrofik Lateral Skleroz
<b>AMH</b>	: Antimüllerian hormon
<b>ASK1</b>	: Apoptosis sinyal düzenleyici kinaz 1
<b>ATF 6</b>	: Aktive edici transkripsiyon faktörü 6
<b>BM</b>	: Bazal membran
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	: Kalsiyum
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>CHOP/GADD153</b>	: C/EBP homolog proteini
<b>CoA</b>	: Asetil koenzim A
<b>CREBH</b>	: Siklik AMP (cAMP)
<b>DAB</b>	: 3'3-diaminobenzidine
<b>DAG-protein</b>	: Dimerik asidik glikoprotein
<b>DHEA</b>	: Dehidroepiandrosteron
<b>DMSO</b>	: Dimetil sülfoksit
<b>DRG</b>	: Dorsal kök gangliyon
<b>ECM</b>	: Ekstrasellüler matriks
<b>eIF2<math>\alpha</math></b>	: Ökaryotik başlama faktörü 2 $\alpha$
<b>ER</b>	: Endoplazmik retikulum
<b>ERAD</b>	: ER aracılı yıkım
<b>ERSE</b>	: ER stres cevap elementi
<b>FSH</b>	: Folikül stimulan hormon
<b>GADD34</b>	: Büyüme durdurma ve DNA hasar geni 34
<b>GH</b>	: Büyüme hormonu
<b>GPX</b>	: Glutasyon peroksidaz
<b>gr</b>	: Gram
<b>GRP 94</b>	: Glukoz düzenleyici protein 94
<b>GRP78/BİP</b>	: Glukoz düzenleyici protein 78/Bağlayıcı protein
<b>GTP enzimi</b>	: GlcNAc fosfotransferaz
<b>Gy</b>	: Gray
<b>H</b>	: Hemoraji

<b>H+E</b>	: Hematoksilen+Eozin
<b>hCG</b>	: İnsan koryonik gonadotropin
<b>HSP70</b>	: Heat shock 70 protein
<b>IBM</b>	: İnküzyon cisimcik miyoziti
<b>IEC-6</b>	: Bağırsak epitel hücreleri
<b>IRE1</b>	: İnositol gerektiren kinaz 1
<b>i.p.</b>	: İntraperitoneal
<b>İA</b>	: İnterstitiyel alan
<b>JNK</b>	: c-Jun NH2-terminal kinaz
<b>KD</b>	: Kan damarı
<b>kg</b>	: Kilogram
<b>L</b>	: Seminifer tübül lümeni
<b>LH</b>	: Leydig hücresi
<b>LH</b>	: Luteinizan hormon
<b>mg</b>	: Miligram
<b>MH</b>	: Miyoid hücre
<b>MIS</b>	: Müllerian inhibitör madde
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>NRF2</b>	: Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2
<b>OC</b>	: Osteokalsin
<b>OGH</b>	: Olgunlaşmamış germ hücresi (immatür hücre)
<b>PAS</b>	: Periyodik asit-Schiff
<b>PAS+H</b>	: Periyodik asit-Schiff+Hematoksilen
<b>PERK</b>	: Protein kinaz RNA(PKR) benzeri ER kinaz
<b>PS</b>	: Primer spermatosit
<b>GER</b>	: Granüllü endoplazmik retikulum
<b>DER</b>	: Düz endoplazmik retikulum
<b>RP</b>	: Retinis Pigmentosa
<b>s.c.</b>	: Subkutan
<b>S1</b>	: Site1 proteaz
<b>S2</b>	: Site2 proteaz
<b>sf.</b>	: Serum fizyolojik
<b>SE</b>	: Seminifer epitel (Germinal epitel)

<b>SG</b>	: Spermatogonyum
<b>SH</b>	: Sertoli hücresi
<b>SP</b>	: Spermatozoon (Spermiyum)
<b>H skor</b>	: Histolojik skorklama
<b>ST</b>	: Seminifer tübül
<b>StAR</b>	: Steroidogenik akut regülatör protein
<b>STH</b>	: Spermatid hücresi
<b>TA</b>	: Tunika albuginea
<b>TBF</b>	: Testis belirleyici faktör
<b>TM</b>	: Tunikamisin
<b>TRAF2</b>	: TNF reseptör ilişkili faktör 2
<b>TUNEL</b>	: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
<b>UPR</b>	: Katlanmamış protein cevabı
<b>UPRE</b>	: Katlanmamış protein cevap elementi
<b>UV</b>	: Ultra viole
<b>V</b>	: Vakuol
<b>XBP-1</b>	: X-box bağlanma proteini
<b>ZBEÜ</b>	: Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi

## TABLolar DİZİNİ

### Sayfa

<b>Tablo 1.</b> Spermatojenik seri hücrelerin ve interstisyel doku hücrelerinin sınıflandırılması.....	42
<b>Tablo 2.</b> Cosentino kriterleri ve skora ..... 43	43
<b>Tablo 3.</b> 4. gün kontrol ve deney gruplarına ait GRP78/BİP, CHOP ve Kaspaz-3 immünoreaktivitesi için H skor değerleri. ....	59
<b>Tablo 4.</b> 4. gün kontrol ve deney gruplarına ait Cosentino skor analizleri. ....	66
<b>Tablo 5.</b> 4.gün kontrol ve deney gruplarında FSH, LH ve Testosteron hormon değerlerinde meydana gelen değişimler. ....	67
<b>Tablo 6.</b> 24. sa kontrol ve deney gruplarının total vücut ağırlığı ve testis ağırlıklarında meydana gelen değişiklikler .....	70
<b>Tablo 7.</b> 4. gün kontrol ve deney gruplarının total vücut ağırlığı ve testis ağırlıklarında meydana gelen değişiklikler .....	71
<b>Tablo 8.</b> 24.sa ve 4. gün kontrol ve deney gruplarının total vücut ağırlığı ve testis ağırlığında gözlenen değişikliklerin karşılaştırılması.....	71

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

<b>Şekil 1.</b>	5 haftalık embriyoda, farklanmamış gonadların overler ya da testisler olarak gelişiminin şematik çizimi .....	6
<b>Şekil 2.</b>	Testisin anatomik (a) ve H+E ile boyanmış histolojik (b) genel yapısı .....	8
<b>Şekil 3.</b>	Seminifer epitel .....	10
<b>Şekil 4.</b>	Spermatogenez aşamaları .....	14
<b>Şekil 5.</b>	Olgun spermin yapısı .....	20
<b>Şekil 6.</b>	Protein transportu sırasında şaperonların rolü .....	23
<b>Şekil 7.</b>	ER’da katlanmamış proteinlere yönelik mekanizmalar .....	25
<b>Şekil 8.</b>	Katlanmamış protein yanıtı ve ER stresi. (A) Yeni sentezlenen proteinlerin sağlıklı hücrelerde şaperonlar yardımıyla katlanması (B) Dışarıdan etki eden çeşitli streslere ve mutasyonlara karşı katlanmamış protein cevabı ve adaptasyon .....	27
<b>Şekil 9.</b>	UPR sinyal yolları .....	30
<b>Şekil 10.</b>	BCL2 protein ailesi ve JNK aracılı apoptozis mekanizması .....	32
<b>Şekil 11.</b>	ER stresiyle uyarılan apoptozis mekanizmaları .....	33
<b>Şekil 12.</b>	Santimetre ölçeği ile gösterilen işlenmiş Shilajit .....	37
<b>Şekil 13.</b>	Testis seminifer tübüllerine ait 24. saat Hematoksilen+Eozin (H+E) boyaması.....	49
<b>Şekil 14.</b>	Testis seminifer tübüllerine ait 24. saat Periodik asit-Schiff+Hematoksilen (PAS+H) boyaması.....	51
<b>Şekil 15.</b>	Testis seminifer tübüllerine ait 4. gün Hematoksilen+Eozin (H+E) boyaması.....	54
<b>Şekil 16.</b>	Testis seminifer tübüllerine ait 4. gün Periodik asit-Schiff+Hematoksilen (PAS+H) boyaması.....	56
<b>Şekil 17.</b>	4. gün kontrol ve deney gruplarının testis seminifer tübüllerinde GRP78/BİP ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. 61	
<b>Şekil 18.</b>	4. gün kontrol ve deney gruplarının testis seminifer tübüllerinde CHOP ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. ....	62
<b>Şekil 19.</b>	4. gün kontrol ve deney gruplarının testis seminifer tübüllerinde Kaspaz-3 ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. ....	63
<b>Şekil 20.</b>	4. gün kontrol ve deney gruplarının negatif kontrol görüntüleri. ....	64

## GRAFİKLER DİZİNİ

### Sayfa

<b>Grafik 1.</b> 4. gün kontrol ve deney gruplarına ait GRP78/BİP immünreaktivitesi için H skor analizi.....	49
<b>Grafik 2.</b> 4. gün kontrol ve deney gruplarına ait CHOP immünreaktivitesi için H skor analizi.....	49
<b>Grafik 3.</b> 4. gün kontrol ve deney gruplarına ait Kaspaz-3 immünreaktivitesi için H skor analizi.....	50
<b>Grafik 4.</b> 4. gün kontrol ve deney gruplarında FSH hormon değerinde meydana gelen değişimler.....	57
<b>Grafik 5.</b> 4. gün kontrol ve deney gruplarında LH hormon değerinde meydana gelen değişimler.....	57
<b>Grafik 6.</b> 4. gün kontrol ve deney gruplarında LH hormon değerinde meydana gelen değişimler.....	58

## 1. GİRİŞ

Ökaryotik hücrelerde bulunan endoplazmik retikulum (ER), hücre sağkalımı ve gelişimi için önemli bir organeldir (1). ER, protein sentezinde, katlanmasında, olgunlaşmasında, hücre içi kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) homeostasisinde ve lipit sentezinde merkezi bir rol oynamaktadır (2, 3). Ayrıca ER, salgılanan ve hücre dışına iletilecek proteinlerin katlanmasından, olgunlaşmasından gerekli hücre içi bölgeye taşınmasından ve taşınacak proteinlerin kontrolünden de sorumlu bir organeldir (4).

ER'ye gelen yeni sentezlenmiş proteinler, N-glikozilasyon, disülfid oluşumu, hidroksilasyon, oligomerizasyon gibi çeşitli posttranslasyonel modifikasyonlara uğrayarak katlanırlar. Bu nedenle posttranslasyonel modifikasyonların çoğu ER'de gerçekleşir (5).

Proteinlerin katlanma aşaması, hata olasılığının çok yüksek olduğu karmaşık işlemler ile meydana gelir. N-bağımlı glikozilasyon inhibisyonu, hipoksi,  $Ca^{+2}$  homeostazının bozulması, enfeksiyonlar, oksidatif stres, sıcaklık faktörü gibi pek çok etken proteinlerin doğru bir şekilde katlanmasına etki edebilir (4). Bu gibi etkenler ER işlevinin bozulmasına ve ER lümeninde katlanmamış ya da hatalı katlanmış proteinlerin birikimine neden olarak ER stresine yol açmaktadır. Deneysel araştırmalarda ER stresi oluşturmak için Tunikamisin (TM), Nonilfenol, Kadmiyum gibi bir takım toksik ajanlar kullanılmıştır (6, 7, 8). TM, N- bağımlı glikozilasyon inhibitörü olup ER stresine neden olan bu amaçla pek çok deneysel araştırmada da kullanılan yaygın bir antibiyotiktir (6, 9, 10).

ER stresi meydana geldiğinde, proteinlerin katlanma aşamasının başarılı bir şekilde gerçekleşmesini sağlayanglukoz düzenleyici protein 78/bağlayıcı protein (GRP78/BİP) ve glukoz düzenleyici protein 94 (GRP 94) gibi moleküler şaperonlar, proteinlerin doğru katlanmasına yardımcı olmaktadır. Bu şaperonlar tarafından bazı transmembran proteinler serbest bırakılarak aktif hale geçer.

ER stresi oluştuktan sonra, hücrede homeostazı sağlamak için katlanmamış protein cevabı (UPR) olarak adlandırılan UPR sinyal yolağı aktive olur. UPR sinyal yolağının aktivasyonu; protein kinaz RNA(PKR) benzeri ER kinaz (PERK), aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF 6) ve inositol gerektiren kinaz 1 (IRE1) olarak adlandırılan üç farklı ER stresi sensörü tarafından düzenlenmektedir. Tüm bu düzenlemeye rağmen homeostaz sağlanamayıp protein birikimi devam ederse ER stresine maruz kalan hücreler apoptozise (programlı hücre ölümü) yönlendirilir.



ATF4 sinyal yolağı aktive olduğunda ATF4 nükleusa geerekC/EBP homolog proteini (CHOP/GADD153) transkripsiyonunu aktive eder. Aktive olan CHOP, bir hücre ölüm sinyalidir ve hücreyi apoptozise teşvik eder (4, 5).

Günümüzde yapılan çalışmalarda, GRP78/B P ve CHOP ekspresyon düzeyleri, ER stresinin akut ya da kronik fazını ayırt etmek için sıklıkla kullanılan markerlardır. Ayrıca testis dokusu ile ilgili yapılan pek çok çalışmalarda, testis seminifer tübül hücrelerinde ER stresinin varlığı GRP78/B P immün reaktivitesi ile belirlenmiŐtir (11, 12).

Apoptozis için kaspazların aktivasyonu gereklidir ve ER stresi ile ilgili pek çok çalışmada kaspaz-12, 3, 6, 7, 8 ve 9'un iŐlevi gösterilmiştir (2, 4).

Yapılan araştırmalarda ER stresinin Alzheimer, Parkinson, kistik fibrozis ve diyabet gibi hastalıklara yol açtığı g r lm Őtir (5). Pek çok hücre, doku ve organlarda da hasar oluşturduğu g r lm Őtir (13, 14, 15, 16).

ER stresinin ışık ve elektron mikroskopik değerlendirmelerdemorfolojik değişimlere neden olduğu bilinmektedir. Ji ve ark. 2.0 mg/kg Kadmiyum klörür indüklü ER stresinin, testislerde germ hücre apoptozisini oluşturduğunu ve doza bağlı apoptotik hücre sayısının artırdığını vurgulamıŐlardır (8). Özellikle ER stresinin Sertoli hücrelerinde de morfolojik değişimlere neden olduğu bildirilmiştir (7). Ayrıca elektron mikroskobu ile yapılan pek çok çalışmalarda ER'lerde ultrastrüktürel değişiklikler olarak geniŐleme ve ŐiŐmelerinolduđu rapor edilmiştir(12, 17, 18).

Spermatogenez süreci, seminifer tübül duvarında yer alan spermatogonyum hücrelerinin çoğalarak olgunlaşması ve spermatozoalara farklılaşması gibi karmaşık bir organizasyondur. Testosteron, luteinizan hormon (LH), folikül stimülan hormon (FSH), östrojenler, büyüme hormonu (GH), inhibin ve aktivin gibi pek çok hormonal aktiviteler ile spermatogenez süreci kontrol edilir. Spermatogenezin baŐlamasında testosteron gereklidir ve spermatidlerden olgun spermin oluşması (spermiyogenez) aşaması FSH olmadan gerçekleşmez. Dolayısı ile spermatogenezde meydana gelen bir aksaklık infertilite ile sonuçlanabilmektedir (19, 20, 21).

Antik ağlardan beri doğal kaynaklardan ve kimyasal bileŐiklerden antifertilite ajanları geliŐtirme çabaları devam etmektedir. Diğer yandan üreme yeteneğini artıran maddeler geliŐtirmek için daha az çaba sarf edilmiştir. Modern toplumda ise evre kirliliği ve stres gibi çeŐiti faktörler nedeniyle spermatogenez ve ovulasyon azalmış, infertilite vakalarının arttığı rapor edilmiştir. Bu nedenle infertiliteyi önlemede antioksidan çalışmalarına odaklanılmıŐtir.

Antioksidan özellik gösteren maddelerden biri de Shilajit'tir. Shilajit; geleneksel Hint tıbbı başta olmak üzere pek çok farklı kültürde geleneksel tedavi yöntemi olarak asırlardır kullanılmaktadır. Genellikle yaz aylarında Himalayalar, Hindikuş, Pamir ve Urallar gibi dağlık alanlarda, 1000 ila 5000 metre yükseklikte kaya köklerinden sızan ve pek çok organik ve inorganik bileşimden meydana gelen doğal bir üründür. Aynı zamanda içeriğinde humik maddeler ile bitkisel ve mikrobiyal metabolitlerin karışımı da bulunmaktadır. Bilimsel araştırmalar sonucu pek çok tedavi edici özelliği rapor edilmiştir. Shilajit'in antioksidan etkisinin yanı sıra antiülserojenik, antiinflamatuvar, immünomodülatör, antidiabetik, antialerjik, antihiperlipidemik, spermatojenik ve oojenik, öğrenme, hafıza ve anksiyete üzerine de etkileri bulunduğu rapor edilmiştir (22, 23).

ER stresinin zararlı etkileri ve oluşabilecek infertilite üzerine karşı korunma üzerine son zamanlarda antioksidan içerikli alternatif tedavi yöntemlerine odaklanılmış çalışmalar bulunmaktadır. Ji ve ark. (8), intraperitoneal (i.p.) olarak 2.0 mg/kg olarak uyguladıkları Kadmiyum klorür indüklü ER stresinde antioksidan olarak kullandıkları Askorbik asit'in, ER stresini ve UPR'yi inhibe ederek testis germ hücre apoptozisinden koruduğunu göstermişlerdir.

Bu noktadan yola çıkarak çalışmamızda sıçan testis dokusunda Tunikamisin ile uyarılan ER stresine karşı Shilajit'in 24. saat ve 4. gündeki koruyucu etkisinin histopatolojik incelenmesi ve 4. gündeki immünohistokimyasal ve hormon değerlendirmelerinin yapılması planlanmıştır. Böylece ER stresinin testis seminifer tübül hücreleri üzerindeki etkisini ortaya koyarak erkek infertilitesine ve bu konuda uygulanacak olan yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlamayı amaçlamaktayız.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Erkek Üreme Sistemi**

Erkek üreme sistemi, spermatozoa (tekil: spermatozoon) veya spermin sürekli üretimi, beslenmesi, depolanması, androjenlerin üretimi ve salgılanmasından sorumludur.

Erkek üreme sistemi, skrotum içinde bulunan bir çift testis, iç ve dış kanallar sistemi, aksesuar bezler ve penisten oluşur.

Epididimis, vaz deferens, ejakülatuvar kanal ve erkek uretrasının bir parçası olan dış kanallar sistemi dışarıya spermatozoa taşınmasını sağlar. Aksesuar cinsiyet bezleri olan seminal vezikül, prostat bezi ve bulbo üretral bezlerin salgıları semeni oluşturmasının yanı sıra sperm beslenmesinden de sorumludur (24).

#### **2.1.1. Testis embriyolojisi**

##### **2.1.1.1. Gonadların gelişimi**

Embriyonun cinsiyeti, ovumu döleyen sperm çeşidi (X ya da Y) ile fertilizasyon esnasında belirli olmasına rağmen gonadlar erkek ya da dişi morfolojik özelliklerini gelişimin 7. haftasına kadar kazanamazlar. 7. haftadan önce her iki cinstegonadların görünümü birbirine benzer ve farklanmamış gonadlar olarak tanımlanır.

Gonadlar, seks hücrelerini üretir ve posterior abdominal duvarı döşeyen mezotel, altındaki mezenkimal doku ve primordiyal germ hücreleri olarak üç kaynaktan köken alır. Gonadlar, yaklaşık olarak 5. haftada genital ya da gonadal katlantı (kabarıntı) olarak belirir. Gelişimin 6. haftasına kadar bu genital katlantılar, germ hücrelerini içermez.

Primordiyal germ hücreleri, ilk olarak yolk kesesinin allontoise yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında belirirler. Buradan yola çıkarakson bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ameboid hareketler ile göç edip 5. haftanın başında primitif gonad bölgesine ulaşırlar. Ardından bu hücreler, 6. haftada genital katlantıları işgal eder. Primordiyal germ hücreleri, genital katlantılara ulaşamadığı takdirde gonadlar gelişemez. Primordiyal germ hücrelerinin gonadlara girişini

takiben gonad gelişimi uyarılır. Gonadların over ya da testiste farklanmasında primordiyal germ hücrelerinin indükleyici rolü olduğu bilinmektedir.

Primordiyal germ hücrelerinin primitif gonadlara ulaşmasından kısa bir süre önce ve ulaşması sırasında genital katlantıların epiteli proliferate olup mezenşime doğru ilerleyen irregüler hücre kordonları oluşturur. Primitif seks kordonları denilen bu kordonlar, başlangıçta heriki cinste yüzey epiteline bağlıdır ve bu evrede erkek ve dişi gonadlar birbirinden ayırt edilemez. Bu dönemdeki gonad, farklanmamış gonad olarak ifade edilir (25, 26, 27).

### **2.1.1.2. Testislerin gelişimi**

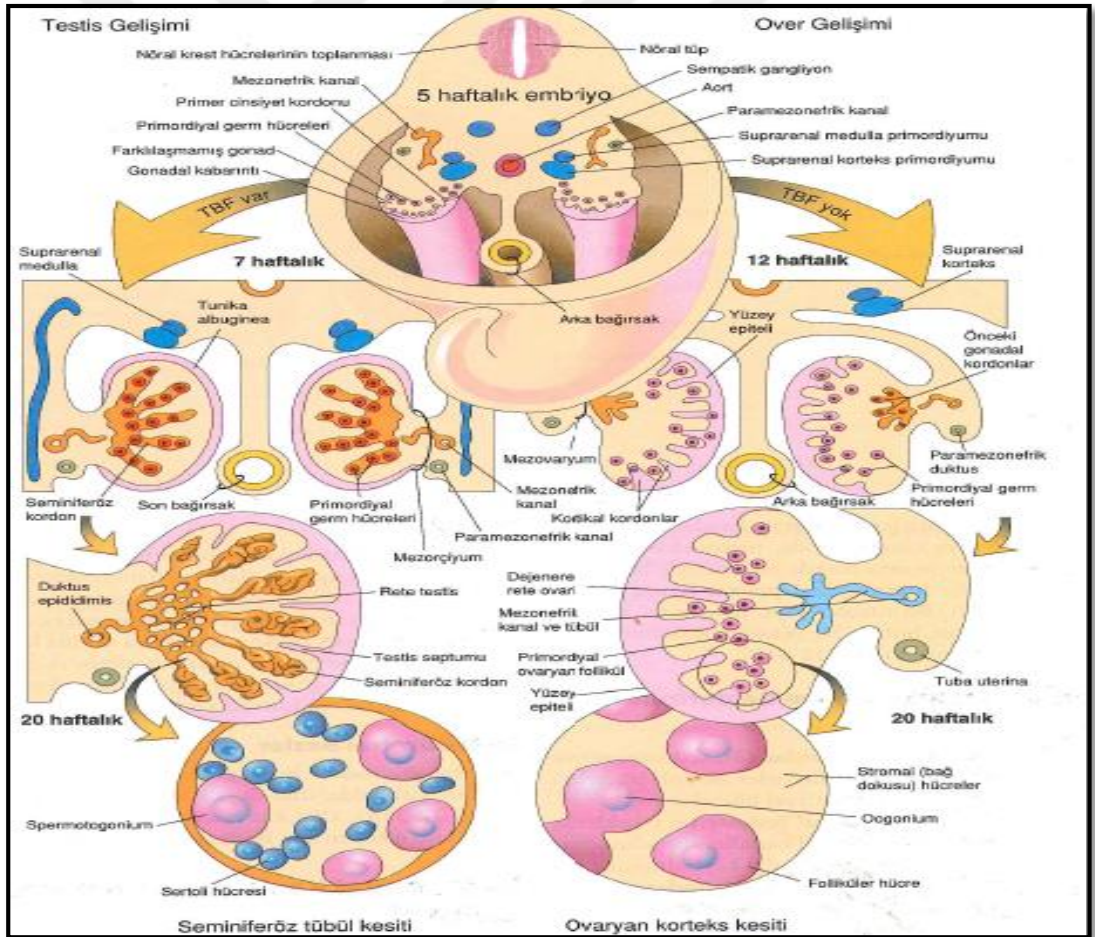
Erkek fenotipinin oluşumu için bir Y kromozomuna ihtiyaç vardır. Testis belirleyici faktör (TBF) için gerekli olan SRY geni, Y kromozomunun kısa kolu üzerinde bulunur ve farklanmamış gonadın testis olarak gelişiminde rol oynar. Bununla birlikte SOX-9 geni de gonadları testise farklılaşma yönünde indükler. Bu faktörler, testisin FGF-9 sentezlenmesine neden olur ve mezonefrik tübüllerin gonadal katlantıya ulaşmasını sağlar. Ayrıca SOX-9 geni, Sertoli hücrelerinden salgılanan Müllerian inhibe edici faktörün seviyesini artırarak dişi genital sistemin gelişiminde etkin rol alan paramezonefrik kanalın gelişimini baskılar. Y kromozomunun olmaması durumunda 12. haftada over gelişimi meydana gelir (26, 27).

TDF etkisiyle gonadal kordonlar, seminiferöz kordonlara farklılaşırlar. Seminiferöz kordonların meydana gelmesi, SOX-9 ve FGF-9 genlerinin ekspresyonları ile olur. TDF, seminiferöz kordonlarını indükleyerek, onların farklanmamış gonadın medulla derinlerine doğru uzamasına neden olur, kordonlar burada dallanarak birbirleriyle anastomoz yaparlar ve böylece rete testis meydana gelir. Tunika albuginea'nın oluşmasından sonra gonadal kordonların yüzey epiteli ile olan bağlantıları ortadan kalkar. Genişleyen testis, aşama aşamakörelen mezonefrozdaki ayrılır ve mezorşiyum ile asılı hale geçer. Ardından seminifer kordonlar, seminifer tübüllere, tubuli rekti ve rete testise dönüşürler.

Seminiferöz tübüller, interstisyel hücreleri (Leydig hücreleri) meydana getiren mezenkim ile ayrılmışlardır. Leydig hücreleri, 8. haftadan sonra androjenik hormonları (testosteron ve androstenedione) salgılamaya başlarlar. Bu hormonlar mezonefrik kanalların ve dış genitaların farklanmasını indüklerler. Testosteron üretimini, insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu stimüle eder ve hormonun

seviyesi özellikle 8-12 haftalık dönemde en yüksek değere ulaşır. Testosterona ek olarak fetal testisler, glikoprotein bir hormon olan antimüllerian hormon (AMH) veya müllerian inhibitör madde (MIS) adı verilen hormonu da salgılamaktadır. AMH; destek hücreleri olarak tanımlanan Sertoli hücreleri tarafından salgılanır ve salınması puberteye kadar devam eder ve sonrasında seviyesi azalır. Ayrıca AMH, uterus ve tuba uterinalara farklı paramezonefrik (müllerian) kanalların gelişimini baskılar.

Seminiferöz tübüllerin puberteye kadar lümenleri yoktur fakat puberteden itibaren lümen gelişmeye başlar. Seminiferöz tübül duvarında Sertoli hücreleri ve spermatogonia olarak adlandırılan iki tip hücre çeşidi bulunur. Sertoli hücreleri, testisin yüzey epitelinden gelişirken spermatogonia hücreleri, primordiyal germ hücrelerinden gelişmektedir (26).



**Şekil 1.** 5 haftalık embriyoda, farklılaşmamış gonadların overler ya da testisler olarak gelişiminin şematik çizimi (26).

### 2.1.1.3. Erkek genital kanalların gelişimi

Fetal testiste, Sertoli hücreleri MIS üretimine 6-7. haftada başlarken interstisyel hücreler ise maskülinizan hormonlardan testosteronu 8. haftada salgılamaya başlar. Testosteron erkeklerde mezonefrik kanallardan (Wolffian duktusu), erkek genital kanalların gelişimini uyarırken, MIS paramezonefrik kanalların (Müllerian duktus) kaybolmasına neden olur. Paramezonefrik kanallar, dişi üreme sisteminin gelişiminde rol almaktadır.

Fetal testisler tarafından 8. haftada üretilen testosteronun etkisiyle, her bir mezonefrik kanalın proksimal kısımları kıvrıntılı hal alır ve epididimis meydana gelir. Mezonefroz dejenereoldüğünde, mezonefrik kanallardan bazıları kalıcı olup efferent duktulileri meydana getirir. Bu duktuliler, duktus epididimise açılırlar. Epididimis distalinde mezonefrik kanal, kalın bir düz kas tabakası kazanır ve duktus deferens meydana gelir (26).

### 2.1.2. Testis histolojisi

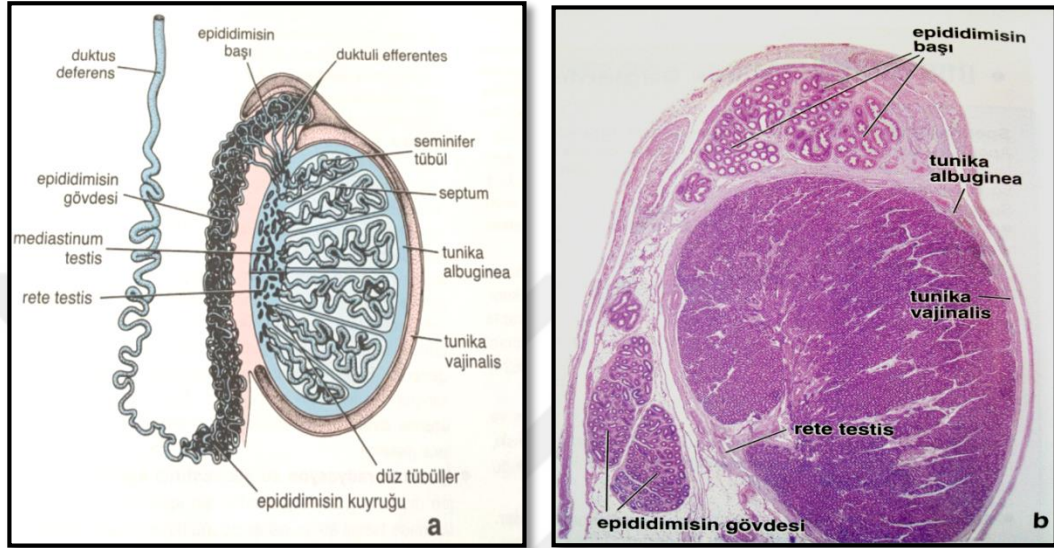
Yetişkinde testisler karın boşluğunun dışında bulunan skrotum adı verilen bir kese içerisinde yerleşmiş bir çift oval şekilli organdır (28). Skrotum içerisinde bulunmaları testislerin vücut ısısından 2°C-3°C düşük bir ısıda olmalarını sağlar. Normal bir spermatogenez süreci için sıcaklığın 34°C ya da 35°C olması gerekir (24).

Testislerin sperm üretimi ve atılımıyla ekzokrin bir fonksiyonu vardır ayrıca testosteron üretimi ile de endokrin bir fonksiyon gösterirler (29).

Skrotum içerisinde bulunan testisler, dıştan içe doğru tunika vajinalis, tunika albugenia, tunika vasküloza olmak üzere kalın bir kapsül ile çevrelenmiştir. Tunika vajinalis testislerin karın boşluğundan skrotuma inerken beraberinde sürükledikleri iki katlı periton tabakasıdır. Testislerin çevresi tunika albugenia adı verilen fibromüsküler yapıda bir bağ dokusu ile sarılıdır. Kapsülün iç kısmı olan tunika vasküloza kan damarlarından zengin bir gevşek bağ dokusu özelliğindedir. Tunika albugenia, testisin arka yüzünde kalınlaşır ve mediyastinum testisi meydana getirir. Mediyastinum testis kısmından çıkan septumlar testisi insanda sayıları 250'ye kadar ulaşan lobüllere ayırır. Her lobülde 1-4 adet, kıvrımlı yapıda seminifer tübül yer alır. Seminifer tübüller sperm üretiminden sorumludur. Seminifer tübüller tubuli rekti

olarak isimlendirilen düz tübüllere açılır. Düz tübüller mediastinumda bulunan anastomozlaşan kanallar sistemi olan rete testis ile devam eder (28, 29, 30).

Seminifertübüller tubuli rekti olarak adlandırılan düz tübüller ile rete testise bağlıdır. Rete testis; testiküler sperm, salgısal proteinler ve iyonlar gibi seminifer epitelyumun ürünlerini toplayan kanallar ağıdır (24, 30).



**Şekil 2.** Testisin anatomik (a) ve H+E ile boyanmış histolojik (b) genel yapısı (28).

Spermiler, rete testisten epididimisin ilk parçası olan ve duktus epididimise açılan sayıları 15-20 arasında değişen duktuli efferentese daha sonra duktus epididimisin proksimal kısmına geçer. Spermiler epididimis içerisinde olgunlaşarak hareket yeteneği kazanır ve buradan duktus deferense geçiş yaparlar. Epididimisin baş kısmını duktuli efferentes, gövde ve kuyruk kısmını duktus epididimis oluşturmaktadır (28, 30).

Epididimiste yüzey epiteli; yalancı çok katlı sterosilyumlu prizmatik epitelidir. Epitelde prizmatik şekilde esas hücreler (uzun sterosilyumlara sahip) ve bazal hücreler yer almaktadır. Esas hücreler, sperm olgunlaşmasından sorumlu glikoproteinleri, siyalik asiti, gliserofoskolini salgırlarlar. Bu maddeler kapasitasyon reaksiyonu ile kaldırılır ve spermiyum tam fertilizasyon yeteneğini kazanır (29).

### **2.1.2.1. Seminifer tübül**

Her bir seminifer tübül 30-50 cm uzunluğunda, 150-250 µm çapındadır. Seminifer tübüller, tunika propriya ile çevrili çok katlı bir seminifer epitelden (germinal epitel) ve merkezi bir lümenden oluşur. Seminifer epitel, bir bazal membran ile kollajen lifler, fibroblastlar ve kasılma yeteneğine sahip miyoid hücrelerden oluşun duvar ile sarılmıştır. Miyoid hücreler hareketsiz özellikteki spermleri ritmik kasılma ile rete testise doğru iletir. Epididimal kanaldan geçtikten sonra spermler ileri motilite yeteneği kazanır.

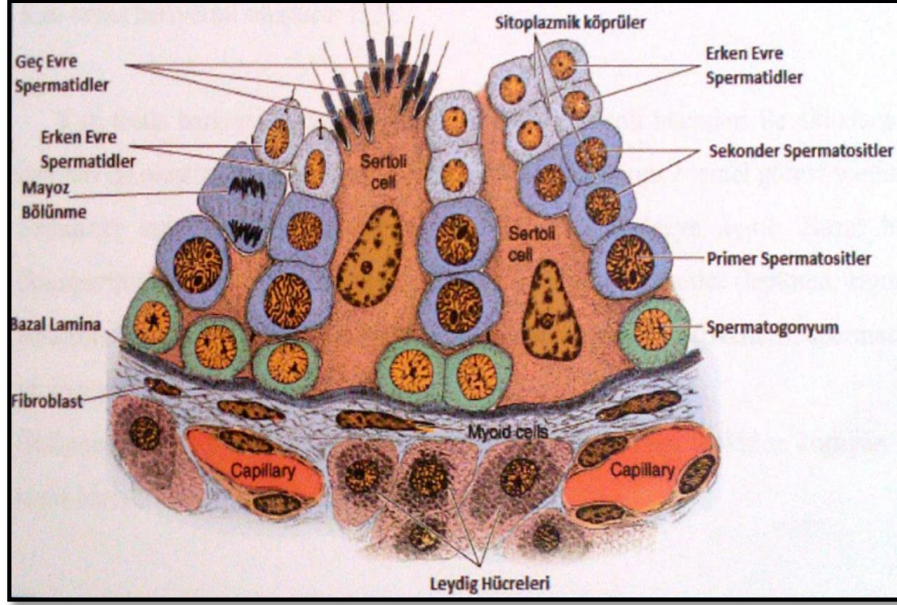
Seminifer tübüller arasındaki interstisyel alanda kan damarları, lenfatik kanallar, makrofajlar ve androjen üretiminden sorumlu Leydig (interstisyel) hücre grupları yer alır. Leydig hücreleri tübüler kristalı mitokondri, lipid damlacıkları ve düz endoplazmik retikulum bulundurur. Erken fetal yaşımda farklılaşun ve steroid salgılayan Leydig hücreleri, testosteronu üretir. Testosteronun yetişkinde salgılanması spermatogenezin ve sekonder seks karakterlerinin devamlılığı için gereklidir.

Seminifer epitel Sertoli (destek) hücreleri ve spermatogenik seri hcrelerolarak iki tip hücre populasyonu içerir (24, 28).

### **2.1.2.2.Sertoli (destek) hücreleri**

Sertoli hcreleriseminifer tübülün bazal laminası üzerine oturmuş, seminifer epitelin tüm kalınlığı boyunca seminifer tübül lümenine doğru uzanan prizmatik hücrelerdir. Seminifer tübüller içerisinde bulunan spermatogenik hücreler arasında bulunmaktadırlar. Komşu spermatogenik hücreleri çevreleyen ve onların arasındaki boşlukları dolduran apikal ve lateral uzantıları vardır. Böylece gelişmekte olan spermatogenik hücelere ev sahipliği yaparlar. Ayrıca tübüllere yapısal bir düzen verirler (24, 28).





Şekil 3. Seminifer epitel (31).

Komşu Sertoli hücreleri birbirlerine zonula okludens olarak bilinen oldukça sıkı bağlantılar ile tutunur ve kaynaşır. Böylece Sertoli hücrelerinin lateral uzantılarının oluşturduğu bölmelerde yerleşmiş olan spermatogenik hücreler otoimmün reaksiyonlardan korunur. Ayrıca Sertoli hücreleri arasında oluklu bağlantılar, Sertoli hücreleri ile erken dönem spermatogenik hücreler arasında desmozom benzeri bağlantı yapıları ve Sertoli hücreleri-bazal lamina arasında hemidesmozomlar yer alır.

Sertoli hücreleri ekzokrin ve endokrin salgılama fonksiyonuna sahiptirler. Örneğin; olgunlaşmakta olan spermilerin seminifer tübül boyunca ilerlemesini ve oradan da intratestiküler kanallara geçmesini sağlayan sıvıyı salgılayan bir yandan da spermatogonyumların spermatozooya dönüşümü için gerekli olan faktörleri üretirler (28, 29).

Sertoli hücreleri;

- 1) Gelişme sürecinde olan spermatogenik hücreleri besler, destekler ve korur.
- 2) Spermiyogenezin son aşamasında spermatisidlerce atılan rezidual (artık) cisimcikler olarak bilinen fazla hücre kısımlarını ve farklılaşmasını tamamlayamayan spermatogenik hücreleri fagosite eder.
- 3) Sperm transportu için gerekli olan sıvıyı salgılar.
- 4) Androjen bağlayıcı protein (ABP), transferin, seruloplazmin, plazminojen aktivatör sentezler. ABP seminifer tübüllerde testosteronu konsantre ederek gelişmekte olan spermilerin olgunlaşmasına yardımcı olur ayrıca testosteron ve dihidrotestosteron

androjenlerine yüksek bağlanma afinitesi gösteren salgısal bir proteindir. Sertoli hücreleri folikül stimulan hormon (FSH) uyarımına yanıt verirler. FSH, ABP sentezi ve salınımını düzenler.

- 5) İnhibin ve aktivin alt ünitelerinin salınımından sorumludur. İnhibin hipotalamus ve ön hipofizden salınan gonadotropin salgılatıcı faktör ve FSH üzerine negatif feedback bir etki yaparken, aktivin FSH salınımı üzerine pozitif bir etki yapar.
- 6) Olgun spermatidlerin spermiyasyon sürecinde seminifer tübül lümenine salınımını kolaylaştırır.
- 7) Fruktoz bakımından zengin testiküler sıvıyı salgılayarak spermlerin boşaltım kanallarına taşınımını ve beslenmesini sağlar.
- 8) Embriyonik gelişim sırasında erkek fetusta Müller kanalının (paramezonefrik kanalın) gerilemesini sağlayan glikoprotein yapısındaki AMH üretimini yapar. Müller kanalının gerilemesi erkek karakterlerinin ortaya çıkmasında önemlidir (24, 28, 29, 32, 33).
- 9) Komşu Sertoli hücreleri arasında bulunan sıkı bağlantılar, kan-testis bariyerini oluşturur. Su, çözülmüş maddeler ve immün hücrelerin dolaşımından seminifer tübüllere geçişi kısıtlanır. Böylece spermatogenez için kişinin kendi immün sisteminden izole eşsiz bir mikro çevre oluşturularak farklılaşmış germ hücrelerinin immünolojik reaksiyonlardan korunumu sağlanır. Ayrıca kan-testis bariyerindeki değişiklikler, erkeklerde çeşitli fertilité durumları ile ilişki gösterir (28, 33, 34).

## 2.2.Spermatogenez

Bazalden lümeneye doğru spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatidler spermatogenik seri hücrelerini oluşturur. Bazal lamina ile lümen arasında bulunan spermatogenik seri hücreleri 4-8 tabakadan meydana gelir ve görevleri farklılaşarak spermatozonları üretmektir. Bu nedenle seminifer tübül epitelinde, farklı gelişim aşamalarındaki spermatogenik seri hücreleri bulunmaktadır. Spermatogenez; öncü hücreler olan spermatogonyumlardan spermatidlerin oluşma sürecidir. Bu süreç mitoz ve mayoz hücre bölünmelerini kapsar (20, 29).

Puberte ile başlayan spermatogenez, aktif seksüel yaşam süresince önhipofiz gonadotropik hormonlarının uyarımı sonucunda seminifer tübüllerde meydana gelir ve bu süreçte spermatogonyumdan sperm üretimi sağlanır (28, 35,36).

İnsanda spermatogonyumdan spermatozoon oluşumu süreci yaklaşık olarak 64-74 gün sürmektedir. Spermatogenez, bütün seminifer tübüllerde ve her seminifer tübülün içerisinde aynı anda ve eş zamanlı gerçekleşmez. Bu durum seminifer epitel siklusu olarak tanımlanır (28, 32). Sıçanlarda ise spermatogenez yaklaşık olarak 49-51 günlük bir süreci kapsamaktadır. Spermlerin matürasyonu ise 14 gün sürer. Bu zaman sürecinde germ hücreleri farklılaşma geçirerek matür hale gelirler (37).

Spermatogenez süreci üç bölümden oluşur.

- 1) Spermatositogenez
- 2) Mayoz
- 3) Spermiyogenez (20).

### **2.2.1. Spermatositogenez (Spermatogonyal faz)**

Bazal lamina ile doğrudan ilişkide olan spermatogonyumlar, küçük ve en genç diploid hücrelerdir. Lümene yaklaştıkça gelişim aşamaları gösterirler. Sertoli hücreleri arasındaki tkayıcı bağlantıların altında bulunurlar. Spermatogonyal kök hücrelerden köken alan spermatogonyumlar pubertede başlayan mitotik hücre bölünmeleri geçirirler (24).

İnsan spermatogonyumları rutin histolojik preparat görünümüleri baz alındığında üç tip olarak sınıflandırılır.

- 1) Koyu Tip A spermatogonyumlar: Seminifer epitelin kök hücreleridir. Düzensiz aralıklarla bölünmeler geçirerek hem kök hücre olarak kalan koyu Tip A spermatogonyumları hem de açık Tip A spermatogonyumları meydana getirirler.
- 2) Açık Tip A spermatogonyumlar: Spermi üreten farklılaşma sürecine yönlendirilmiş, testosteronun etkisiyle ard arda mitotik bölünmeler ile sayılarını arttırabilen hücrelerdir. Çoğalarak yeni açık Tip A hücreleri ve Tip B hücreleri oluştururlar. Koyu Tip A hücrelere benzerler.
- 3) Tip B spermatogonyumlar: Mitoz bölünme geçirerek diploid yapıda primer spermatositleri oluştururlar ve açık Tip A spermatogonyumlara benzer özelliklere sahiptirler. Bütün spermatogonyum hücreleri seminifer tübüllerin bazalinde bulunurken, primer spermatositler lümenin komşu kısmına doğru göç ederler (28, 30, 31, 38).

### **2.2.2. Mayoz (Spermatosit fazı)**

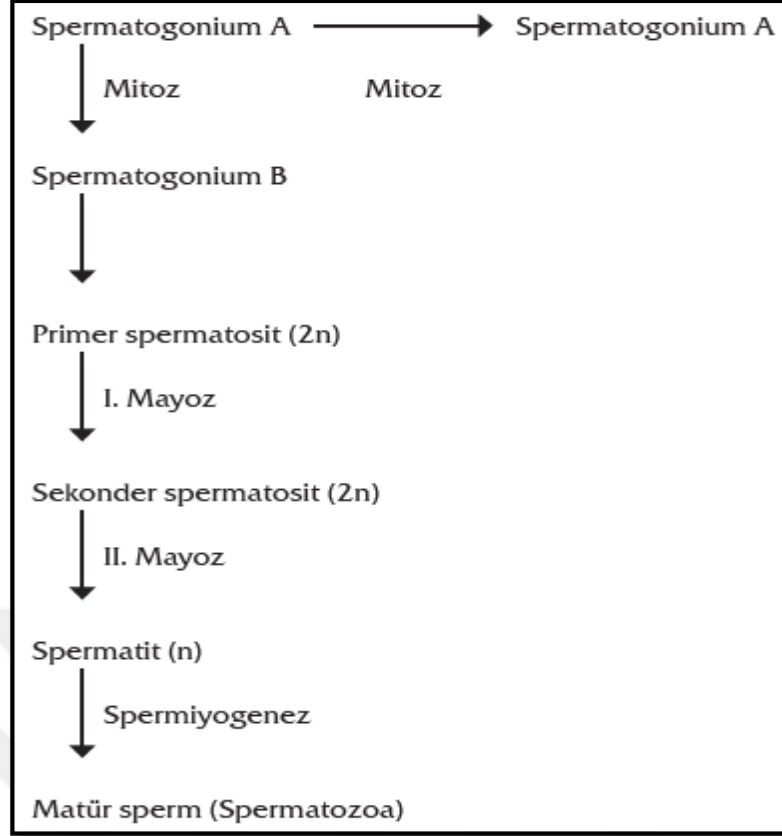
Mitoz bölünmeler geçirdikten sonra tip B spermatogonyumlar, son S fazını bitirdikten sonra mayoz bölünmenin profaz aşamasına geçerler ve sekonder spermatositleri oluşturacak olan primer spermatositleri meydana getirirler. Sekonder spermatositler, ikinci mayotik bölünmelerini tamamladıktan sonra yuvarlak görünümlü spermatidleri oluştururlar.

Primer spermatositler spermatogonyuma göre iki kat DNA (4C DNA) miktarına sahiptir. Birinci mayoz sonrası, primer spermatositin 4C DNA miktarı sekonder spermatositte 2C'ye iner. İkinci mayozun sonunda 2C DNA miktarı 1C'ye iner ve oluşan spermatidler haploid yapıda özelliğe sahiptir.

Birinci mayoz uzun, ikinci mayoz kısa bir süreç olduğundan seminifer tübüllerde en çok primer spermatositler gözlenir. Sekonder spermatositler ise çok geçmeden ikinci mayoz bölünmeye girdiklerinden dolayı kesitlerde az rastlanılır (24, 29, 38).

### **2.2.3. Spermiyogenez (Spermatid fazı)**

Haploid ve yuvarlak yapıdaki spermatidlerin uzamış sperm hücrelerine dönüştüğü hücre farklılaşmasının olduğu bir yapısal süreçtir. Bu süreçte hücre bölünmesi gerçekleşmez, spermatidlerin boyut ve şekillerinde değişiklik, çekirdek kromatininde yoğunlaşma meydana gelir (30, 38). Bu aşama insanlarda yaklaşık olarak 16-22 gün süreçle karakterizedir (31).



**Şekil 4.** Spermatogenez aşamaları (39).

Spermatid, Sertoli hücrelerinin fagositik aktiviteleri ile sitoplazmasının çoğunu kaybederek bir akrozom granülü, dış yoğun lifler, uzun bir silyum yapısı ve kaba fibröz bir kılıf yapısına sahip olur. Oluşan ve seminifer tübül lümenine salınan sperm hareketli olmadığından dolayı ovumu dölleme kapasitesine sahip değildir (30). Spermatidlerin olgun sperme farklılaşması sırasında oluşan yeniden şekillenme dört fazı içerir. Bunlar; Golgi evresi, Kep evresi, Akrozom evresi ve Olgunlaşma evresi olarak tanımlanır. Bu fazlar gerçekleşirken spermatidler Sertoli hücresinin plazma membranına özelleşmiş bağlantılar ile tutunmuş durumdadır (31).

**a) Golgi Evresi:** Spermatidlerde Golgi kompleksi nükleusa yakın bir alanda bulunmaktadır. Bu evre, spermatidin Golgi kompleksinde kümelenen PAS (Periyodik asit-Schiff) boyası ile pozitif boyanan granüllerin varlığıyla karakterizedir. Spermatidin Granüllü endoplazmik retikulumunda oluşan hidrolitik enzimler modifikasyon için Golgi kompleksine taşınır ve burada modifiye edilmelerinin ardından küçük proakrozomal granüller olarak paketlenir. Glikoproteinden zengin olan bu proakrozomal granüller, akrozomal vezikül olarak tanımlanan ve nüklear zarfa yakın, membranla sınırlandırılmış bir

vezikülü meydana getirmek için bir araya gelirler. İçeriği artan ve genişleyen akrozomal vezikülün yerleşimi, gelişen spermin ön yüzünü belirler. Ayrıca bu aşamada, sentrioller jukstanükleer bölgeden akrozom vezikülün zıt kutbuna nükleustan uzağa doğru göç ederler. Sentriollerden biri, sperm kuyruğunun aksonemini meydana getiren 9 periferik mikrotübül çiftini ve 2 merkezde bulunan mikrotübülün oluşumunu başlatırken diğer sentriol nükleus ile kuyruğu birleştiren bağlantı parçasını oluşturur.

- b) **Kep Evresi:** Akrozomal vezikül, nükleusun ön yarısı üzerine doğru yayılım göstererek akrozomal kep adını alır. Bu sırada akrozomal kepin altındaki nüklear zarf porlarını kaybederek kalınlaşır.
- c) **Akrozom Evresi:** Spermatid morfolojisinde birçok değişikliğin meydana geldiği bu evrede spermatid kendisini yeniden hizalar ve baş kısmı Sertoli hücrelerinin içerisine gömülerek bazal laminaya doğru yönelim gösterir. Gelişen flagellum, seminifer tübül lümenine doğru uzanım gösterirken spermatidin nükleusu yassılaşır ve uzar. Nükleus ve çevresinde bulunan akrozom, plazma membranının ön kısmına komşu bir pozisyona taşınırken, sitoplazma posteriyora doğru yer değiştirir. Sitoplazmadaki mikrotübüller, manşet olarak tanımlanan, sperm nükleusundan distale doğru uzanan silindirik bir yapıyı meydana getirirler. Manşet uzadıkça sitoplazmada bulunan mitokondrilerde uzayan spermatid içinde kuyruk yönünde taşınırlar. Kuyruğun gelişimini öncesinde başlatmış olan sentrioller, nükleusun arka yüzeyine, geriye taşınırlar ve gelişmekte olan spermin boyun ya da bağlantı parçasını meydana getirmek üzere modifiye olurlar. Plazma membranı gelişmekte olan flagellumu çevrelemek için posteriyora hareket ederken manşet yapısı kaybolur. Mitokondriler, boyun kısmındaki kaba fibrillerin çevresini ve boyun bölgesinin posteriyor uzantısını heliks şeklinde saran bir kılıf oluşturmak için göç ederler. Mitokondriler spermiyum hareketi için gerekli olan enerjinin sağlanmasında önemli rol oynarlar. Bu bölüm, spermiyum kuyruğunun orta parçası olarak bilinir. Orta parçanın distalinde longitudinal iki sütundan ve çok sayıda bağlantı biriminden oluşan bir fibröz kılıf, esas parçanın dokuz longitudinal fiberini sararve kuyruğun sonuna kadar uzanarak esas parçayı meydana getirir. Fibröz kılıfın distalinde kalan kısa kuyruk segmenti ise son parça olarak tanımlanır.

**d) Olgunlaşma (Maturasyon) Evresi:** Spermatidin yeniden şekillenmesinin gerçekleştiği bu son aşamada, rezidüel cisimcik olarak tanımlanan fazla sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilerek azaltılır ve olgun spermatozoon oluşur. İnterselüler köprüler, fagosite edilen rezidüel cisimlerde kalırlar. Dolayısıyla artık birbirine bağlı olmayan spermatidler Sertoli hücrelerinden salıverilirler. Spermiumun seminifer tübül lümenine salınması sürecine spermiasyon adı verilir. Spermiasyonaşamasında Sertoli-spermatid bağlantı kompleksleri yıkılır ve spermatidler Sertoli hücrelerinden ayrılarak tübül lümenine geçerler. Yeni oluşmuş olan bu spermium hareketsiz ve oositi fertilize etme özelliğine sahip değildir. Hareketsiz ve dölleme kapasiteleri düşük olan spermler epididimiste ilerledikçe gelişimlerini tamamlar ve dölleme yeteneği kazanırlar. Spermiasyondan sonraspermatozoa 2-4 haftalık bir süreçten geçerek epididimise ulaşır. Ancak epididimin ilk bölümünde hareket özelliği olmayan spermatozoa, epididimise ulaştıktan 18-24 saat sonrası hareket yeteneğini kazanmaktadır ve genelde spermler ortalama 3-12 gün epididimiste kalmaktadır (28, 31, 40).

### 2.3. Spermatogenezin Hormonal Kontrolü

Spermatogenezde uyarıcı etki hormonlar tarafından yapılır. Bunlar; testosteron, LH, FSH, östrojenler, büyüme hormonu (GH), inhibin ve aktivindir.

**1) Testosteron:** İnterstisyel alanda yer alan Leydig hücrelerince salgılanır. Spermatogenez uyararak androjenik etki göstermekte böylece spermatogonyumdan olgun sperm hücrelerinin oluşumuna katkı sağlamaktadır. Ayrıca sekonder seks karakterlerinin ortaya çıkması, genital kanal ve yardımcı bezlerin devamlılığının sağlanması gibi birçok görevi vardır. Erişkin erkeklerde kanda tespit edilen testosteronun yaklaşık %95'i testislerden salınırken geriye kalan %5'i ise böbrek üstü bezinden kana verilen dehidroepiandrosteron (DHEA) ve androstenedionun (Leydig hücreleri tarafından üretilir.) testosterona dönüştürülmesinden sağlanır. Genellikle yetişkin erkek testislerinde günlük olarak sabit seviyelerde testosteron sentezi yapılmakta ve bu miktarın yaklaşık olarak 5-10 mg'ı kana verilmektedir. Testosteronun sentezi aşamasında plazma kolesterolü hücreye girerek asetil koenzim A (CoA) tarafından esterleştirilir ve sitoplazmada lipid damlacıkları olarak depolanır. Düz endoplazmik retikulumda

yağ asitleri kolestrole dönüştürülür. Kolesterol, mitokondriyonlara steroidogenik akut regülatör protein (StAR) vasıtasıyla taşınır ve pregnenolon üretimi sağlanır. Düz endoplazmik retikulumdaki enzimler, pregnenolon'u progesteron'a çevirir. Progesteron'uda testosterona dönüştürür.

2) **Luteinizan hormon (LH):** Ön hipofizden salgılanarak Leydig hücrelerini uyarır testosteron salgılanmasına neden olur. Testosteron seviyesindeki artış, LH'nin salgılanmasını inhibe eder ve dolayısıyla testosteron seviyesi belirli bir düzeyde tutulur ve tersine testosteron düşük seviyede ise LH salınımı artar.

3) **Folikül stimulan hormon (FSH):** Ön hipofizden salgılanarak Sertoli hücrelerine etki eder. Androjen bağlayıcı proteinin (ABP) Sertoli hücrelerince sentezi ve salınımı FSH tarafından uyarılır. ABP, androjenleri (testosteron ya da dihidrotestosteron) bağlar ve oluşan ABP-androjen kompleksi gelişen spermatogenik hücrelerin etrafında yüksek androjen seviyelerini meydana getirir. Dolayısıyla ABP testosterona bağlanır ve bu hormonu seminifer tübül lümenine aktarır. Böylece spermatogenez uyarılır. Fakat bu uyarı yapılmazsa spermatidlerin sperme dönüşmesi süreci başlatılamaz.

Sonuç olarak; LH öncelikle Leydig hücrelerini testosteron salgılaması için uyarır. Testosteron ve FSH ise spermatogenez teşvik etmek için doğrudan Sertoli hücrelerine etki eder.

4) **Östrojenler:** Sertoli hücreleri tarafından az miktarda üretilir. Leydig hücrelerinden salgılanan testosteronun, Sertoli hücrelerinde östrojene dönüştürülmesiyle elde edilir.

5) **Büyüme hormonu (GH):** Testisin metabolik işlevlerinin kontrolü için gerekli olan bu hormon spermatogonyumun erken bölünmesini destekler. Eksikliğinde ise spermatogenez sekteye uğrar veya durur.

6) **İnhibin ve Aktivin:** Sertoli hücrelerinden inhibin ve aktivinin üretimini FSH sağlar. İnhibin Adenohipofizden FSH'nin salınımını engeller, aktivinler ise uyarır (20, 24, 39, 41).

FSH spermatogenezin başlatılmasında, LH ve testosteron hormonları ise spermatogenezin devamlılığının sağlanmasında önemlidir (42).



## 2.4. Olgun (Matur) Sperm Hücresinin Yapısı

İnsanda seminifer tübüller içerisindeki germinal epitelden, günde sayıları 200 milyonu aşan sperm üretimi gerçekleşir. Fakat bu sayı türler arasında farklılık göstermektedir. Yaklaşık olarak 60 µm uzunluğuna sahip olgun insan spermi, baş ve kuyruk olmak üzere iki bölümden oluşur.

Yassı ve sivri olan baş bölümü; 4,5x3 µm boyutundadır. İmmünolojik yöntemlerle incelendiğinde spermin baş bölümü akrozomal ve postakrozomal olarak iki kısma ayrılır. Akrozomal kısım ise anterior akrozom ve posterior akrozom olarak iki kompartmandan oluşur. Haploid kromozom içeren spermlerde başın büyük bir kısmını nükleus işgal eder. Nükleusun anterior üçte ikilik kısmını saran akrozomal kep; akrozin, nöraminidaz, hyaluronidaz ve asit fosfataz olarak adlandırılan akrozomal enzimleri içermektedir. Spermin oositle birleşmesi için gerekli olan litik olayları düzenleyen ve enzimatik fonksiyona sahip birçok proteini içeren akrozom yapısı, plazma membranı ile nükleus zarı arasında bulunan dar bir kesecik şeklindedir. Burada yer alan akrozomal enzimler, ovumun zona pellusidasının geçilmesinde gereklidir. Sperm yumurtaya temas ettiğinde akrozomal enzimler salınır (akrozom reaksiyonu). Bu süreç sperm penetrasyonunu ve fertilizasyonu kolaylaştırarak ovuma başka spermlerin girişini önler. Hücre zarı ile akrozom arasında kalan periakrozomal alandaki birçok düzenleyici proteinlerin akrozom reaksiyonunda rolü olduğu bilinmektedir. Hücre zarı, nükleus zarı ve akrozomal zarlar arasında bulunan sitoplazmik tabakalarda (periakrozomal, subakrozomal ve postakrozomal bölge) yapısal ve fonksiyonel birçok özelliği olan moleküller yer almaktadır. Nükleus zarı ile akrozom arasında kalan subakrozomal alanın apikal kısmında bulunan ve yapısal desteklik sağlayan dış yüzü perforatorium olarak da isimlendirilir.

Postakrozomal bölge ise spermin daha distalinde yer alan ve akrozomun olmadığı hücre zarı ile nükleus zarı arasında kalan tabakadır.

Sperm hareketinden sorumlu olan kuyruk içerisinde ise aksonem bulunur ve kuyruk boyunca uzanım gösterir. Merkezde yer alan bir çift tübül ve onun etrafında bulunan 9 çift mikrotübülden meydana gelir. Periferdeki tübül çiftlerinin lateralinde 9 adet yoğun dış fibril bulunur ve bunlar kuyruğa sağlamlık ve elastikiyet sağlar.

Sperm kuyruğu 4 kısımdan oluşur.

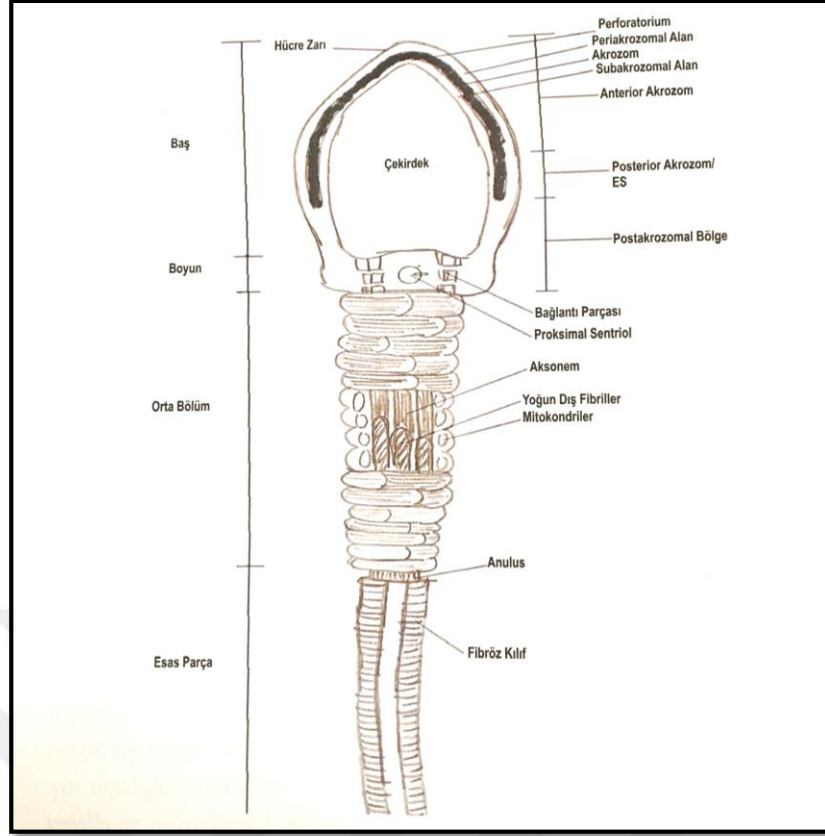
- 1) Boyun kısmı (Sperm bağlantı parçası)
- 2) Orta bölüm
- 3) Esas parça
- 4) Son parça

**1) Boyun kısmı:** Spermin baş bölümünü kuyruk bölümüne bağlayan 0,3  $\mu\text{m}$  uzunluğunda olan kısımdır. Yapısında nükleer zar fazlalığı, birkaç mitokondri, segmentli kolonlardan oluşan bağlantı parçası ve proksimal sentriol bulunur. Bağlantı parçası, proksimal sentriolu saran fragmente 9 adet fiberden meydana gelir. Bu fiberler distal kısımda yoğun dış fibriller ile devamlılık gösterir.

**2) Orta bölüm:** Boyun kısmından sonra devam eden kuyruk segmenti, orta bölüm olarak tanımlanır. Uzunluğu yaklaşık 7  $\mu\text{m}$ , çapı 1  $\mu\text{m}$ 'dir. Yapısında aksonem, aksonemin etrafında kalın dış fibriller ve mitokondrial kılıf içerisine yerleşmiş 100 civarında mitokondri yer alır.

**3) Esas parça:** Orta bölüm, esas parçadan anulus denen yapı ile ayrılır. Uzunluğu yaklaşık 40  $\mu\text{m}$  ve çapı 0,5  $\mu\text{m}$ 'dir. Sperm kuyruğunun en uzun bölümü olan esas parçanın yapısında aksonem, aksonemin etrafında kalın dış fibriller, fibröz tabaka ve plazma membranı yer alır.

**4) Son parça:** Kuyruğun son bölümüne 5-7  $\mu\text{m}$  kala kalın fibriller ve fibröz tabaka kaybolur. Fibröz kılıf ve dış yoğun liflerin sonlanması nedeniyle sadece aksonemin yer aldığı kuyruğun kısa bir parçasıdır (24, 28, 31, 40).



Şekil 5. Olgun spermin yapısı (40).

## 2.5. İnfertilite-Üreme

İnfertilite, reproduktif çağıdaki bir çiftin korunmasız ve düzenli ilişkiye rağmen bir yıl süresince gebe olmaması durumu olarak ifade edilir. Genellikle toplumdaki reproduktif çiftlerin %15-20'sini etkilemektedir. Çoğu infertil çiftlerin %30-40'ında sadece erkeğe bağlı sorunlar, %40-50'sinde ise sadece kadına bağlı sorunlar tespit edilir. Ayrıca %20-25 çiftte hem erkeğe hem de kadına bağlı sorunlar birlikte bulunurken, %15 çiftte ise açıklanamayan infertilite söz konusudur. İnfertil çiftler ile yapılan değerlendirmede, infertilitenin %50-55 oranında erkeğe bağlı sorunlardan kaynaklandığı görülmektedir. Bu yüzden tanıya yönelik infertilite testlerinde erkeğin değerlendirilmesi oldukça önemlidir (12, 40, 43).

Dişi ve erkek üreme sisteminin temel görevi; dişi ve erkek gamet hücrelerinin üretilmesi ve üreme hormonlarının salgılanmasıdır. Bu sistemin düzenli bir şekilde çalışması normal genetik yapıya, bozulmamış bir anatomiye ve salgı organlarının sağlıklı olarak çalışmasına bağlıdır. Üremenin başarılı bir şekilde gerçekleşmesi için dişi ve erkekte tüm anatomik, fizyolojik, immünolojik ve hormonal sistemlerin

sağlıklı olarak çalışması gerekmektedir. Aksi takdirde üreme işlevinde bozulma ve kısırlık meydana gelebilmektedir.

Spermatogenezin başarılı şekilde gerçekleşebilmesi için hassas bir mikro çevre gereklidir. Bu mikro çevreyi sağlayan Sertoli hücreleri ile germ hücreleri arasında bir etkileşim söz konusudur. Sertoli hücreleri, bu germ hücrelerini destekler, besler ve korur. Dolayısı ile Sertoli hücreleri uygun bir spermatogenez için vazgeçilmezdir. Sertoli hücrelerinin gerçekleştirdiği fonksiyonlardan herhangi birinde oluşan bir aksaklık spermatogenezde başarısızlıklara ve germ hücrelerinde hasara yol açabilmektedir. Ayrıca Sertoli hücrelerinin işlevsel ya da morfolojik bozukluğu, sperm üretimini etkileyerek üreme başarısını etkileyebilmekte ve erkekte infertiliteye neden olabilmektedir (12).

## **2.6. Hücrenin Yapısı ve ER**

Hücre; fizyolojik ve biyokimyasal olayların birbirinden bağımsız olarak gerçekleştiği canlının en küçük yapı taşıdır. Ökaryotlarda hücre; hücre zarı, sitoplazma ve çekirdek olarak üç kısımdan oluşur. Hücre zarı; hücrenin sınırlarının belirlenmesi, çeşitli maddelerin hücre içine giriş ve çıkışının kontrolü, sinyallerin alınması ve sinyallere spesifik cevapların verilmesinde görevlidir. Lipidler, proteinler ve karbonhidratlar hücre zarının yapısını oluşturur (44). Hücre zarında lipidler; fosfolipid, kolesterol ve glikolipid, proteinler; integral ve periferik proteinler şeklinde bulunurlar. Hücre hücre içi trafiğin düzenlenmesinde, hücre-hücre, hücre-matriks bağlantılarının yapısında ve membran farklılaşmaların da yer alan hücre iskeleti bulunur. Hücre iskeleti, aktin, mikrotübül ve ara filamentlerden oluşmaktadır (45).

Hücre zarı ile nükleus arasında bulunan sitoplazma; solunum, beslenme, sindirim gibi hayatsal faaliyetlerin gerçekleştiği yerdir. Sitoplazma, sitozol adı verilen sıvı bölge ile sitozol içerisinde bulunan belirli fonksiyonlara sahip organellerden oluşur (44). Örneğin; sitoplazmada serbest ya da endoplazmik retikuluma (ER) bağlı olarak bulunan ribozomlar, protein sentezinden sorumludur. İçerisinde hidrolitik enzimler bulunan lizozomlar, makromoleküllerin hücre içi sindirimini sağlar. Mitokondriler, enerji üretiminden sorumludur (46). Peroksizomlar, lizozomlara benzemekle birlikte özellikle hidrojen peroksitin yıkımından sorumludur. İçerisinde hidrojen peroksitin yanı sıra yağ asitleri ve pürinler yıkılır (45). Golgi kompleksi, sitoplazmada biyosentez ve depolama

olaylarına katılır ayrıca primer lizozomların oluşumunu sağlar. Çekirdek ile komşu membran yapısı oluşturan ER, birbirine paralel olarak yerleşmiş kanalcıklardan oluşur ve bu kanalcıkları çevreleyen zarların sitoplazmik yüzlerinde granüllü yapılar (ribozomlar) bulunur. Bu nedenle ER, granüllü ve granülsüz (düz) olarak ikiye ayrılır. Granüllü endoplazmik retikulumda (GER) genellikle protein sentezi, düz endoplazmik retikulumda (DER) lipidler sentezlenir. Nükleus, olgun eritrositler hariç tüm hücrelerde bulunur. Tüm ökaryotik hücreler, içinde hücreye ait olan DNA'nın bulunduğu bir çekirdek içerir. İnterfaz aşamasındaki hücre nükleusunda nükleus zarı (karyolemma), nükleus plazması (nucleoplasma), kromatin ağı ve nükleolus olarak dört kısım ayırt edilir. Nükleus dış ve iç zarı, nüklear zarfı oluşturur ve nüklear zarf, nükleusun dış sınırını belirleyerek nükleus ve sitozol arasında madde giriş çıkışını sağlayan porları içerir. Nükleolus, ribozom üretiminin olduğu bölgedir (44, 45).

Hücrede en geniş zar miktarına sahip olan ER, sisterna adı verilen birbirine paralel, kapalı ve yassılaştırmış keseciklerden oluşur. Ribozom bulundurmayan DER, yağ asitleri ve fosfolipidlerin sentezinden sorumludur. Bu yapı hepatosit (karaciğer hücreleri) ve gonad hücrelerinde fazla miktarda bulunur. Hepatositlerde çeşitli kimyasalların detoksifiye edilerek vücuttan uzaklaştırılması DER içerisinde gerçekleşir. Çizgili kas hücrelerinde DER, sarkoplazmik retikulum olarak adlandırılarak  $Ca^{+2}$  iyonlarının hücre içi seviyesini kontrol eder ve kas kasılmasında etkindir.

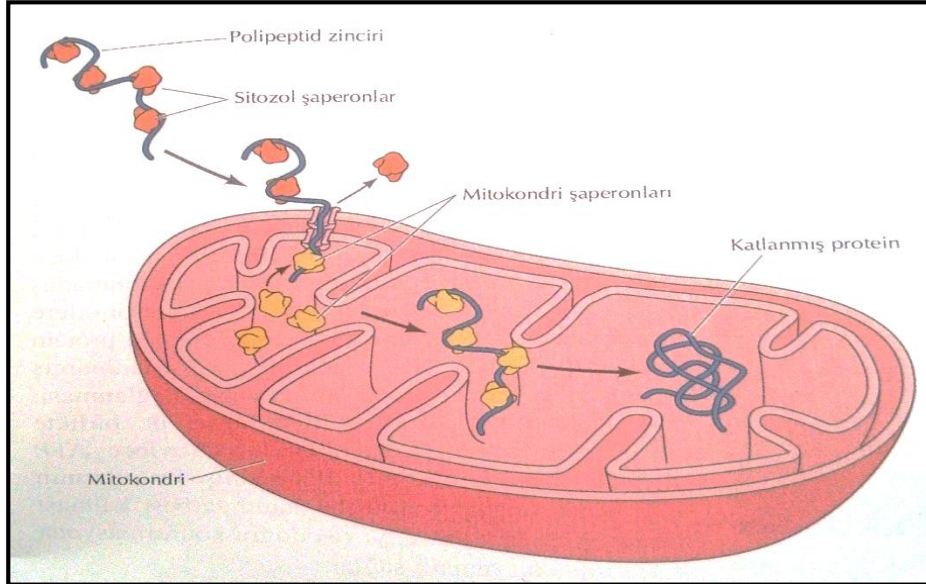
ER'un sitozole bakan kısmı ribozom içerdiğinden GER olarak adlandırılır. GER'a bağlı sitoplazmik ribozomlar, salgı proteinlerinin sentezinden sorumludur. Pankreatik hücreler ve B lenfositleri gibi protein salgılayan hücrelerde GER oranı çok daha yüksektir (44, 47).

ER, ökaryotik hücrelerde proteinlerin doğru katlanmasının sağlandığı önemli bir organeldir ve protein sentezinin kalite kontrol merkezidir (48, 49).

GER yüzeyinde sentezlenen salgı ve zar proteinleri, dört modifikasyon geçirir. Bunlar; ER'de ve Golgi'de karbonhidratların kovalent eklenmesi ve işlenmesi (glikozilasyon), disülfid bağların oluşması, polipeptid zincirlerinin uygun katlanması ve çok alt birimli proteinlerin oluşturulması, Golgi ve salgı veziküllerinde spesifik proteolitik kesilmelerin meydana gelmesi şeklindedir (47). ER'ye gelen yeni sentezlenmiş proteinler posttranslasyonel modifikasyonlara (N-glikozilasyon, disülfid oluşumu, hidroksilasyon, oligomerizasyon) uğramadan katlanamamaktadır (50). ER'da etkin protein katlanması, ER lümenine yeni proteinlerin gelişi ile ER

katlanma kapasitesi arasında sıkı bir bağlantının olmasını gerektirir. ER'ye lokalize şaperonlar ve foldazlar gibi  $Ca^{+2}$  bağlayıcı/tamponlayıcı proteinler etkili katlanma için gereklidir (51, 52).

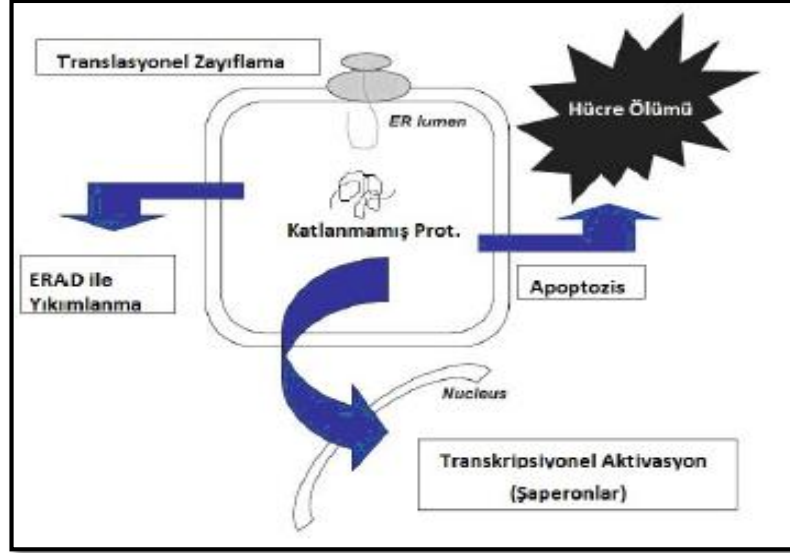
Şaperonlar, proteinlerin katlanmasını kolaylaştıran ve aracılık eden katlayıcı katalizörlerdir ve şaperonlar yardımıyla proteinler lümeninde katlanır. Şaperonlar, polipeptidlerin doğru konformasyonda katlanması için gerekli olan bilgileri taşımaz, daha çok kendiliğinden bir araya gelme sürecinde protein katlanmasını katalizleyerek katlanmaya yardımcı olurlar. Ayrıca katlanmaya doğru giden en son yolda ara ürün olarak katlanmamış ya da kısmen katlanmış proteinlere bağlanarak ve kararlılıklarını sağlayarak faaliyet gösterirler. Şaperonların yokluğunda polipeptid zincirleri çoğunlukla hatalı katlanır veya çözünmeyen birikimler oluşturarak kararsız hal alır ve yıkılırlar. Şaperonlar, hatalı katlanmayı ve kümelenmeyi önleyerek proteinlerin doğru konformasyonda katlanmasına yardımcı olur. Aynı zamanda katlanmamış polipeptid zincirlerinin organelere taşınımı sırasında onları stabil halde tutarlar. Örneğin; kısmen katlanmış polipeptid zinciri, sitozolden mitokondriye taşınırken sitozol şaperonları katlanmamış yapının korunmasını sağlar ve mitokondri şaperonları polipeptid zincirinin mitokondri içerisinde doğru katlanmasında rol alır (47, 53).



**Şekil 6.** Protein transportu sırasında şaperonların rolü (53).

ER'de proteinlerin doğru katlanmasını sağlayan glukoz düzenleyici protein 78/Bağlayıcı protein (GRP78/BİP), glukoz düzenleyici protein 94 (GRP 94), lektin benzeri proteinler ve foldazlar yer alır. GRP78, monomerik ya da dimerik formdadır ve ağırlığı 78 kDa'dur. Oligomerik formu daha çok depo şekliyken monomerik formu şaperon görevi yapmaktadır. Ayrıca ER dışında nükleus ve mitokondride de bulunmaktadır. Protein katlanmasının yapılması, apoptozisin düzenlenmesi, protein kalite kontrolünün sağlanması,  $Ca^{+2}$  bağlanması, proteinin ER'a translokasyonunun düzenlenmesi ve protein yıkımlarının yapılması gibi pek çok görevi vardır. ER'de oluşan stres durumlarında hücre yaşamının devamlılığında GRP78 önemli rol oynamaktadır. Protein katlanmasından sorumlu diğer bir protein olan GRP94 ise dimerik bir proteindir ve ağırlığı 94 kDa'dur. ER'de en fazla bulunan protein olan GRP94, proteinlerin katlanmasında ve katlanmayan proteinlerin yıkıma gönderilmesinde rol oynamaktadır. Ayrıca  $Ca^{+2}$  bağlanması, apoptozisin düzenlenmesi ve immünite gibi hücrel görevleri bulunmaktadır (5).

Proteinlerin katlanamaması ya da yanlış katlanması durumunda ER içerisinde bulunan ER aracılı yıkım (ERAD) kontrol mekanizması, yanlış ve hasarlı katlanmış proteinlerin yıkımını sağlayarak proteinlerin ER'de birikmesini önler (54). Öncelikle hatalı katlanan proteinler, ER kalite kontrol sisteminde tespit edilir ve ardından ER'dan sitozole taşınarak yıkılır. Bu işlemin birinci basamağında hatalı katlanmış proteinler tanınır. İkinci basamakta ise hatalı katlanmış proteinlerin yakalanması ve katlanması işlemi gerçekleştirilir. Kalneksin ve kalretikülün gibi lektin benzeri şaperonlar, hatalı katlanmış proteinlere bağlanırlar. Son aşama olarakta sitozole taşınma işlemi meydana gelir. Yanlış katlanmış proteinler sitozolde ubikutin-konjuge enzimler ile 26S proteozom ile yıkılırlar (55).



Şekil 7. ER’da katlanmamış proteinlere yönelik mekanizmalar (55).

## 2.7. ER Stresi ve Katlanmamış Protein Cevabı (UPR)

ER, ökaryotik hücrelerde sekretuar yolağa giren proteinlerin trafiği ve katlanması için temel bir organeldir. Proteinlerin yüksek kalitede katlanması; hücre canlılığı, fonksiyonu ve deorganizmanın normal fizyolojisinde önemlidir. ER’de pek çok süreç hücredeki protein katlanma homeostazını korumaya yardımcı olmaktadır.

Hücre tipleri arasında değişkenlik gösteren protein sentezi ve sekresyonu oranı, besin ve enerjinin farklı seviyeleri protein katlanması talebini karşılamalıdır. Özellikle, pankreasın asinar ve  $\beta$  adacık hücreleri gibi özelleşmiş salgılayıcı hücreler, plazma hücreleri, yüksek oranda proliferen olan ve protein sentezi yapan malignant hücreler etkili katlanma ve kalite kontrol özelliğinde olan ER’ye sahip olmaları gerekmektedir (56). ER, lümeni içerisinde meydana gelen sentez yükü, iyon dengesi gibi bir takım fizyolojik ve biyokimyasal değişikliklere karşı hassastır (57). Çevresel travma veya artan protein sentezi organelde çoğunlukla proteinlerin yanlış katlanmasına sebep olmaktadır (56, 58).

ER lümeninde  $Ca^{+2}$  depolarındaki değişiklikler, redoks bozulmaları, yüksek protein sentezi, glikoz açlığı, enerjinin tükenmesi, lipid birikimi, virusler, etanol zehirlenmesi, ksenobiyotikler, bozulmuş glikozilasyon ve aşırı kolesterol yüklenmesi gibi ER homeostazını etkileyen pek çok fizyolojik ya da patolojik durumlar proteinlerin katlanmasına yönelik engeller oluşturabilir ve ardından ER lümeninde katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine yol açabilir (57,59).



Tüm ökaryotik hücreler, ER’da salgı proteinlerini uygun şekilde katlamalıdır ve hücreler salgı proteinleri için ihtiyaç artışı, yanlış katlanmış protein artışı ya da azalan katlanma kapasitesi gibi ER fonksiyonundaki bozukluklara karşı gelişmiş yanıt verme yeteneğine sahiptirler (60).

ER fonksiyon kapasitesini aşan fizyolojik ya da patolojik olaylarla lümende yanlış katlanmış ya da katlanmamış proteinlerin birikimi “ER stresi” olarak adlandırılır (56, 58).

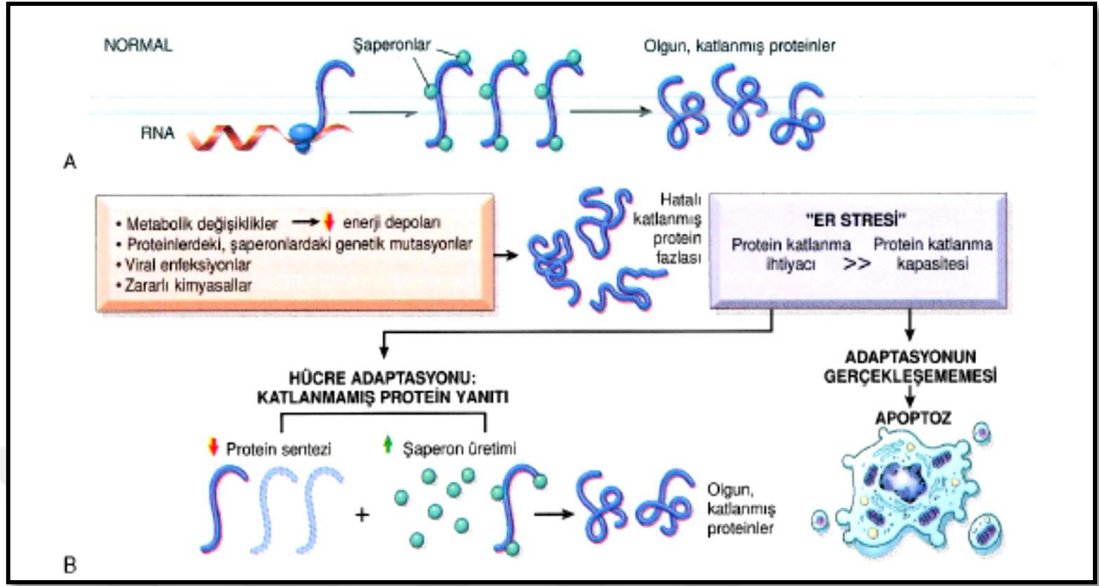
Protein katlanma ihtiyacı arttığında (örneğin; artan protein sentezi, mutasyona uğramış ya da anormal proteinlerin birikmesi) ve protein katlanma kapasitesi aşıldığında ER lümeninde hatalı katlanmış ya da katlanmamış proteinler birikir ve ER stresi başlar (59). Buna karşılık hücreler homeostazı tekrar sağlamak bu strese uyum sağlamaya yardımcı olmak için “katlanmamış protein cevabı” (Unfolded Protein Response-UPR) adı verilen sinyal yolağını saatler içinde aktive eder (54, 61). UPR’nin hedef genleri, promoter bölgelerinde ortak bir alanı paylaşırlar ve bu alan ER stres cevap elementi (ERSE) ya da katlanmamış protein cevap elementi (UPRE) olarak tanımlanır.

Son yıllarda maya hücrelerinde yapılan çalışmalar, yanlış katlanmış proteinlerin ER’da etkin olarak yıkılması için UPR’nin gerekli olduğunu ayrıca ERAD sisteminde rol alan birçok genin UPR ile uyarıldığını göstermiştir. Bu sonuçlar, ERAD sistemi kapasitesinin ER stresi durumunda yeterli olmadığını ve sınırlı kaldığını ifade etmektedir (55).

UPR aktivasyonu hücre canlılığını arttırabilir. Eğer ER stresi kronik veya şiddetli ise hücre ölümüne yol açar (56).

ER stresi indüklühücre ölümü genellikle dejeneratif hastalıkların başlangıcıyla ilişkilidir. Örneğin;  $\beta$  adacık hücrelerinin ölümünden kaynaklanan Tip I Diyabet, Tip II Diyabet, rhodopsin mutasyonunun neden olduğu Retinis Pigmentosa (RP), Schwann hücreleri’nin ölümünün neden olduğu Charcot- Marie-Tooth hastalığının bazı formları, iskemi/reperfüzyon hasarı olan hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklar (Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS), Multipl Skleroz, Alzheimer, Parkinson, Huntington, prion hastalıkları), obezite, kanser ER stresi indüklü hücre ölümlerinin meydana getirdiği hastalıklar içerisinde yer alır. Ayrıca Alzheimer hastalığında beyinde ortaya çıkan patolojinin kas dokusunda homoloğu olan ve bir dejeneratif kas hastalığı olarak

bilinen inklüzyon cisimcik miyoziti (IBM) de ER stresinin tetiklediği hastalıklar içerisinde yer almaktadır (4,6, 54, 61, 62, 64).



**Şekil 8.** Katlanmamış protein yanıtı ve ER stresi. (A) Yeni sentezlenen proteinlerin sağlıklı hücrelerde şaperonlar yardımıyla katlanması (B) Dışarıdan etki eden çeşitli streslere ve mutasyonlara karşı katlanmamış protein cevabı ve adaptasyon (65).

Karşılaştığı ER stresıyla baş etmeye çalışan hücre, UPR yolağını aktive ederek homeostazı sağlamaya çalışır. Bunun için ER, kapasitesini artırarak lümeninde biriken katlanmamış proteinlerin katlanmasını sağlar. Katlanmaya yardımcı moleküllerin sentezinde artış meydana gelir. Düzeltilemeyen yanlış katlanmış proteinler nedeniyle ER yükünü azaltmak için yıkıma gönderilir. Eğer hücre homeostazı sağlayamaz ise diğer çevre dokuların zarar görmemesi için hücre apoptozise yönlendirilir (5).

Katlanmamış proteinler ER’de biriktiğinde UPR sinyal yolağı, üç ER stres sensörü aracılığıyla aktive olur. Bunlar; ER zarı üzerinde bulunanve transmembran proteini olan protein kinaz RNA(PKR) benzeri ER kinaz (PERK), aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF 6) ve inositol gerektiren kinaz 1 (IRE1)’dir (6, 60, 66). PERK, ATF6, IRE1 içeren UPR indükleyici transmembran proteinleri, stressiz koşullarda GRP78 ile kenetli haldedir. ER stresi oluştuğunda BİP, ER lümeninde katlanmamış proteinlerin birikimi ile başa çıkmak için etkinleşir. BİP’in hücre içine alımı üzerine PERK, ATF6 ve IRE1 serbest kalarak UPR’yi başlatır (6).

ER'de bulunan şaperon proteini olan GRP78, UPR sinyal yolağında düzenleyici olarak görev yapmaktadır ve PERK, IRE1, ATF6'nın aktivasyonunu sağlayarak ER stresine karşı cevabın oluşturulmasında önemlidir. Bununla birlikte heat shock 70 protein (HSP70) ailesi ile % 60 benzerlik gösteren bir ATPaz'dır. Genellikle ER'e geçecek yeni sentezlene proteine geçici olarak bağlanmaktadır. Fakat glikozillenme sürecinde olan ve yanlış katlanmış ya da katlanmamış proteinlere kalıcı olarak bağlanmaktadır. Stresin olmadığı durumlarda GRP78, PERK, IRE1, ATF6'nın luminal domainlerine bağlanarak ER'de kalmalarını sağlamaktadır. Ancak katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin birikimi halinde GRP78, PERK, IRE1, ATF6'dan ayrılarak bu proteinlerin spontan olarak oligomerize/dimerize olmasına ve kendi kendilerini fosforlayarak devamında aktivasyonlarına neden olmaktadır. Böylece ER stresine yanıt olarak, ilgili stres düzenleyici yolların ortaya çıkması sağlanır (54, 67, 68).

### **2.7.1. PERK sinyal yolağı**

ER membranında bulunan PERK, tip I transmembran serin treonin kinazdır. Normal şartlarda GRP78 proteini ile birlikte bulunması molekülün inaktif olarak monomerik durumda kalmasını sağlar. Katlanmamış ya da hatalı katlanmış proteinlerin lümene birikmesi sonucunda oluşan stres durumunda GRP78, PERK'ten ayrılır. GRP78 lümene katlanmaya yardımcı olması için gönderilirken PERK homodimerize olur ve fosforillenir. Aktive olan PERK, ökaryotik başlama faktörü 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ )'nın 51. pozisyonundaki serini fosforiller. Fosforillenen eIF2 $\alpha$ , genel translasyonu hücre içerisinde durdurarak ER'un iş yükünü azaltır. Fakat transkripsiyon faktörü ATF4 gibi belirli mRNA'ların translasyonu devam eder ve miktarları artar. Translasyonun durması sonucunda kısa ömürlü proteinler hücreden uzaklaştırılır. Buna en iyi örnek siklin D'dir. ER stresi durumunda siklin D'nin yokluğu memeli hücrelerinin G1 fazında kalmasını sağlamaktadır.

ATF4 nükleusa girdikten sonra, antioksidant cevabı, aminoasit biyosentezi ve cevabı için gerekli olan proteinlerin kodlanmasını sağlayan UPR genlerini aktive eder. Ayrıca C/EBP homolog proteini (CHOP/GADD153) transkripsiyonunu da aktive etmektedir. CHOP, bir transkripsiyon faktörüdür ve Kaspaz-3 aktivasyonu ile ER stresi altındaki hücreyi apoptozise yönlendirmektedir. CHOP, dinlenme durumunda düşük düzeylerde ekspresyone edilirken ER stresi durumunda ekspresyonu

artış göstermektedir. Genellikle ER stresinde en yüksek oranda indüklenebilen genler içerisinde yer alır. Ayrıca oksidatif strese direnç göstermekte olan proteinlerin anlatımında da rol almaktadır. Sonuç olarak; PERK aktivasyonu sayesinde ER stresine karşı hücrelerin protein yükü azaltılarak katlanmamış ya da hatalı katlanmış proteinlerin düzeltilmesi amaçlanmaktadır (4, 5, 55, 56, 61, 68).

GADD34 (Büyüme durdurma ve DNA hasar geni 34) ise ER stresi sonrasında ortaya çıkan translasyonel baskılanmadan geri dönüşü sağlayan negatif feed back döngüsü olarak görev yapmaktadır (55).

PERK, aynı zamanda antioksidanları, enzimlerin detoksifikasyonunu, immün sinyali, hücre büyümesini içeren genleri uyaran bir transkripsiyon faktörü olan NRF2 (Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2'yi de fosforillemektedir (4).

### **2.7.2. IRE1 sinyal yolağı**

Serin treonin kinaz domaini ve endonükleaz domainine sahip iki fonksiyonlu bir enzimdir ve tip I transmembran proteinidir. Lümeneye bakan kısmı PERK ile benzerdir ve dimerizasyon gösterir. Memeli hücrelerinde IRE1 $\alpha$  ve IRE1 $\beta$  olmak üzere iki formu bulunmaktadır. IRE1 $\alpha$  her yerden eksprese olur ve genellikle pankreasta baskındır. IRE1 $\beta$  ekspresyonu ise barsak epitel hücreleriyle sınırlıdır (4, 5, 55).

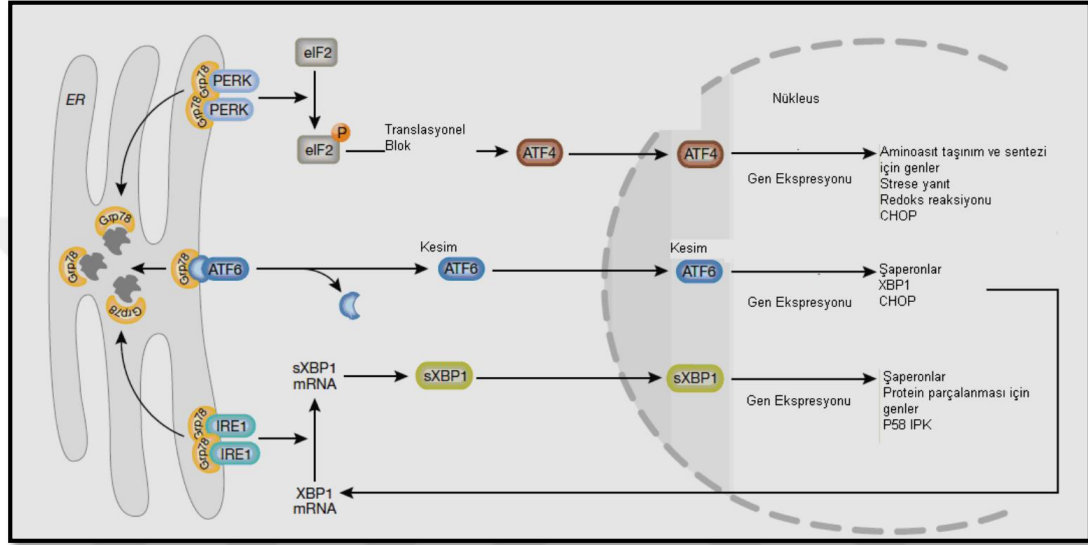
IRE1, GRP78 ile birlikte inaktiftir ve ER stresi oluştuğunda GRP78'in ayrılmasıyla dimerize olur ve otofosforillenir (5).

Aktif haldeki IRE1 sitoplazmadaki endoribonükleaz domaini ile bir transkripsiyon faktörü olarak bilinen X-box bağlanma proteini 1 (XBP-1) mRNA'sını kırarak 26 nükleoid uzaklaştırır. XBP-1 mRNA sitoplazmada normalde kırılmamış şekilde bulunmaktadır. Kırılma sonucu oluşan XBP-1 mRNA, katlanma sırasında görev alan ER şaperonlarının ve ERAD ile ilgili genlerin anlatımını sağlayarak ER stresini engellemektedir (5, 68).

### **2.7.3. ATF6 sinyal yolağı**

ATF6, tip II transmembran proteinidir. ATF6, hücrede ER stresi oluşmadığında ER membranında GRP78 ile birlikte inaktif olarak bulunmaktadır. ER stresi meydana geldiğinde GRP78, lümeneye katlanmaya yardımcı olmak üzere ayrılırken, ATF6 da posttranskripsiyonel modifikasyon geçirir. GRP78'in

ayrılmasından sonra, ATF6 veziküller vasıtasıyla ER'dan Golgi'ye taşınır ve burada site1 proteazla (S1) etkileşerek kırılır. Ardından da site2 proteazla (S2) kırılır ve aktif forma dönüştürülür. ATF6 aktif olduktan sonra nükleusa gönderilir ve burada hedef genlerin aktivasyonunu sağlar. GRP78, GRP94 olarak bilinen ER şaperonlarının ekspresyonunu artırır. Dolayısı ile bu proteinlerin sentezi artar ve ER katlama kapasitesi yükselerek oluşan strese karşı korunma sağlanılır (4, 5, 68).



Şekil 9. UPR sinyal yolları (4).

## 2.8. ER Stresinde Apoptozisin Uyarılması

Apoptozis; yaşlanmış, fonksiyonunu kaybetmiş, düzensiz gelişmiş ya da hasarlı, farklı nedenlerle organizmada artık ihtiyaç duyulmayan hücrelerin özel mekanizmaların kontrolünde programlı şekilde ölümüdür (44).

PERK, ATF6 ve IRE1 sinyal yolları, hücrenin yalnız yaşama fonksiyonlarını sağlayan yolları başlatmazlar aynı zamanda apoptozis yollarını da indüklerler. ER stresi ile uyarılan apoptozisin oluşumunda 3 farklı yolak bulunmaktadır.

### 2.8.1. Transkripsiyonel uyarı yolağı

Transkripsiyon faktör ailesinin bir üyesi olan CHOP geninin transkripsiyonel seviyede uyarılmasıyla gerçekleşir. CHOP, fizyolojik durumlarda ya sentezlenmez

ya da düşük düzeyde sentezlenir. Ancak ER stresine yanıt olarak hassas olan CHOP, transkripsiyon düzeyinde oldukça güçlü bir şekilde indüklenir.

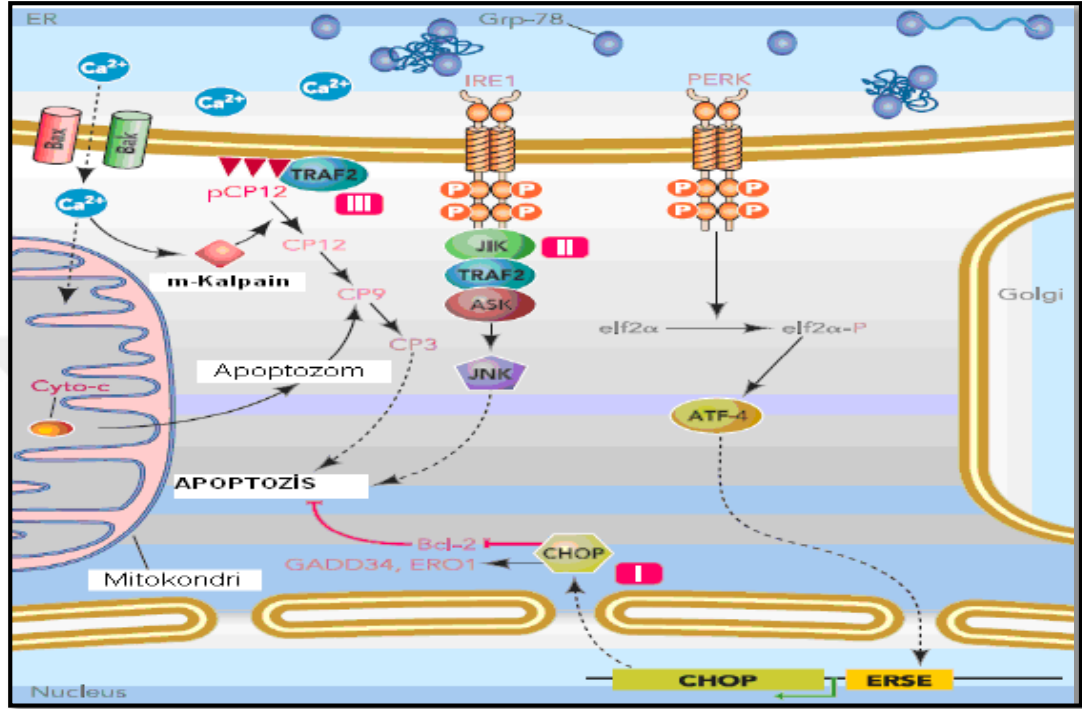
CHOP'un aşırı ekspresyonunun apoptozisle sonuçlandığı ve proapoptotik olduğu bilinmektedir. Dolayısı ile CHOP, ER stres aracılı apoptozisin indüklenmesinde önemli bir rol oynar.

CHOP geninin transkripsiyonu ATF6 ve IRE1 yolu ile uyarılır. Buna ek olarak CHOP, PERK yolağında transkripsiyon faktörü ATF4'ün translasyonel indüksiyonu yolu ile de uyarılmaktadır. Ayrıca CHOP posttranslasyonel düzeyde de regüle edilir. CHOP'un serin üzerindeki 78. ve 81. (Ser78 ve Ser81.) pozisyonlarda p38 MAP kinaz tarafından fosforilasyonu, transkripsiyonel aktivitesini yükseltir. CHOP'un ekspresyonu, proapoptotik proteinlerin (GADD34, ERO1, DR5, karbonik anhidraz VI, TRB3) indüksiyonuna da neden olmaktadır. ERO1, ER luminal protein grubundayken, diğerleri sitozoliktir. Bunların yanı sıra CHOP, BCL-2 proteinini baskılar ve reaktif oksijen türlerinin üretimini artırır. BCL-2 protein ailesinin üyeleri (BCL-2, BAX, BAK, BIK), apoptotik hücre ölümünün düzenlenmesinde büyük bir öneme sahiptir. BCL-2 ailesinin üyeleri olan BAX ve BAK, ER stresıyla uyarılan apoptozis için gereklidir. Ayrıca mitokondriden proapoptotik faktörlerin salınımını ve de ER'den  $Ca^{+2}$  salınımını düzenleyici rolleri bulunmaktadır. BAX ve BAK, apoptotik hücre ölümüne iki şekilde etki etmektedir. Birinci yol; ER stresi meydana geldiğinde BAX ve BAK, ER membranında konformasyonel değişimlere ve oligomerizasyona uğrar. Bu durum ER'dan sitoplazmaya  $Ca^{+2}$ 'un geçişine neden olur. Sitozolda  $Ca^{+2}$  seviyesinin artışı m-kalpaini aktif hale getirir ve m-kalpaine prokaspaz 12'yi keserek aktive eder. m-kalpain sitozolik  $Ca^{+2}$  tarafından aktive olan nötral sistein endopeptidazdır. Aktif olan Kaspaz-12'de prokaspaz 9'u keser ve aktif hale getirir. Böylelikle kaspaz kaskadı aktifleşir. İkinci yol ise; sitozolik  $Ca^{+2}$ 'un mitokondri tarafından alınmasıyla gerçekleşir. Bu durum mitokondriyal iç membran depolarizasyonuna ve sitokrom c salınımına neden olarak Kaspaz-9'un aktifleşmesini sağlar (4, 55).

### **2.8.2. C-jun NH2-terminal kinaz (JNK) yolağı**

Sinyal ileti proteinlerinin bir ailesi olan c-Jun NH2-terminal kinaz (JNK), ER stresinde diğer bir apoptotik yoldur. Gen ekspresyonunu düzenler ve stres oluşumunda hücre ölümü ile yaşamı arasındaki kararı sağlar (55).

IRE1 $\alpha$ 'nın aktivasyonu sayesinde oluşan IRE1 $\alpha$ -TRAF2 (TNF reseptör ilişkili faktör 2)-ASK1 (Apoptosis sinyal düzenleyici kinaz 1) kompleksi, JNK'nın aktivasyonunu indükler (69). Sonuç olarak IRE1, JNK sinyal yolunu aktifleştirerek apoptozisi tetiklemektedir (4).



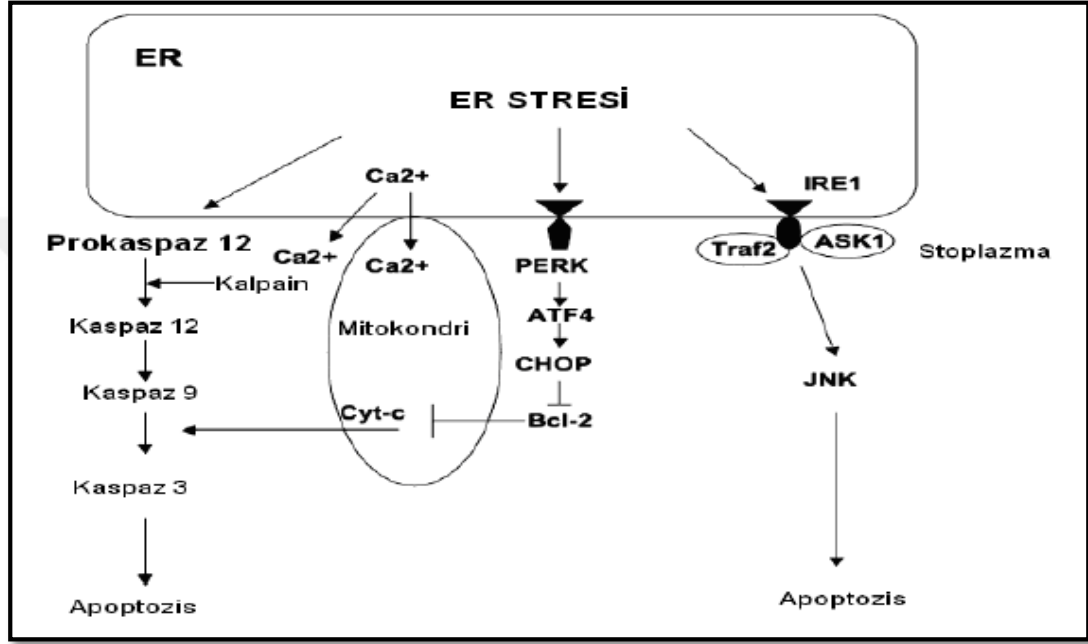
Şekil 10. BCL2 protein ailesi ve JNK aracılı apoptozis mekanizması (4).

### 2.8.3. Kaspaz-12'nin aktivasyonu

Apoptozis için kaspazların aktivasyonu gereklidir. Kaspazlar hasarlı ya da fazla hücrelerin çevrelerine zarar vermeden ortadan kaldırılmalarını sağlayan ve apoptozisi uyaran proteazlardır. Apoptotik hücrede oluşan biyokimyasal ve morfolojik değişimler sistin proteazlar olan kaspazlar ile gerçekleştirilir. Kaspazların aktivasyonuna ve dolayısı ile apoptozisin meydana gelmesine neden olan radyasyon, Ultraviyole (UV) ışını, gama ışını, toksinler ve ilaçlar dış etkenler arasında yer almaktadır (70).

Kaspazlardan 12, 3, 6, 7, 8 ve 9'un işlevleri ER stresi çalışmalarında gösterilmiştir. Bunlardan Kaspaz-12, ER membranının sitozolik kısmında yer alır ve ER stresiyle aktive edilir. Dolayısı ile Kaspaz-12, ER stresi ile uyarılan apoptoziste önemli anahtar rol oynar.

Kaspaz 12'nin m-kalpain, IRE1 $\alpha$ /TRAF2 ve Kaspaz-7 ile aktive edildiği tespit edilmiştir. Sitozolik Ca<sup>+2</sup> artışı, Kaspaz-12'yi m-kalpain yoluyla aktive edebilmesine rağmen, Kaspaz-12'nin neden sadece ER stresi sırasında aktif hale geçtiği tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca ER stresi oluştuğunda, sitozolik Kaspaz-7'nin ER'ye geçtiği belirtilmiştir. Kaspaz-7 ise Kaspaz-12 ile etkileşime girmekte ve onun aktive olmasını sağlamaktadır (4, 55, 59).



Şekil 11. ER stresiyle uyarılan apoptozis mekanizmaları (4).

## 2.9. Apoptozis Morfolojisi

Apoptoziste, hücrede çok belirgin olarak morfolojik değişiklikler meydana gelir (44). Hücre apoptoz için sinyal aldıktan sonra büzölmeye ve küçölmeye başlayarak kondanse olur ve düzgün halini kaybeder. Organeller bir araya gelerek kümelenmeye başlar. Nükleus yoğunlaşır. Hücre iskeleti dağılmaya başlar ve nükleus zarı dalgalı bir görünüm alır ve erir. Zardaki porlar kaybolur. Endonükleazların aktive olması sonucu çekirdek DNA'sı kesilerek parçalanır. Hücre, makrofajların tanıyabileceği ve sağlıklı hücrelerden ayırt edebileceği membranla çevrili küçük parçalara ayrılır. İçerisinde yoğunlaşmış sitoplazma ve sıkıca paketlenmiş organeller bulunur. Bazılarında nükleus parçaları da olan apoptotik cisimler oluşur. Apoptotik cisimler, apoptotik hücre zarından küçük veziküller şeklinde kopan tomurcuklardır.



Komşu hücreler bu apoptotik cisimleri ortamdan uzaklaştırmak için fagosite eder (44, 71). Apoptotik cisimlerin oluşumu; hem nükleus hem de sitoplazmanın belirgin yoğunlaşmasını, nükleer parçalanmayı ve hücre yüzeyi üzerinde oluşan kabartıların ayrılmasını gerektirir (72).

Erken dönemde apoptotik hücreler üzerinde cepecikler (blebs) meydana gelir. Ayrıca hücrelerin sitoplazmasında oluşan vakuoller ve bazı hücre tiplerinde hücrenin sitoplazmasından dışarıya taşar gibi görünen bir ya da birkaç vakuol (blister) oluşabilir (71).

H+E ile boyalı preparatlar incelendiğinde apoptotik hücre; yuvarlak ya da oval şekle, koyu eozinofilik sitoplazmaya ve koyu mor nükleer kromatin parçalarına sahiptir (73).

## 2.10. Tunikamisin

*Streptomyces lysosuperificus* tarafından üretilen glukozamin içeren bir antibiyotik türü olan Tunikamisin (TM), gram pozitif bakteriler de dahil olmak üzere mantar ve mayaları kapsayan mikroorganizma türlerine karşı etkindir. Yapılan ilk çalışmalar, bu antibiyotiğin maya, bakteri gibi hayvan ve bitkilerde N-glikoprotein sentezini engellediğini göstermiştir (59).

TM, amino grubuna bağlı bir yağ asidi, N-asetilglukozamin, tunicamine olarak isimlendirilen 11-carbon aminodialdose ve uracil barındırın homolog antibiyotiklerin bir karışımıdır. 10 homologu vardır ve TM homologları, yağ asidi karbon zincirlerinin değişik uzunluklarda olması nedeniyle farklılık içermektedir (74).

TM, glikoprotein sentezinin ilk aşamasında, UDP-N-asetilglukozamin yapısından dolikol fosfata N-asetilglukozamin-1-fosfatın geçişini inhibe ederek karbonhidrat ve protein arasındaki N-glikozidik bağlanmayı engellemektedir (12). Ayrıca TM, N-glikoproteinlerin öncüsü olarak kullanılan lipid bağlı oligosakkaritlerin sentezinin ilk basamağında N-glukozaminin, poliizoprenoit lipid dolikol fosfata geçişini azaltır. Özellikle N-asetilglukozamin-1-fosfatın, dolikol fosfata geçişinin katalizinde rol oynayan GTP enzimine (GlcNAc fosfotransferaz) etki ederek, dolikol fosfatın N-asetilglukozamin-1-fosfata bağlanmasını bloke eder. Sonuç olarak TM, yeni sentezlenen proteinlerin glikozilasyonunda N-bağlı proteinlerin sentezini durdurarak ER lümeninde yanlış katlanmış ya da katlanamamış proteinlerin birikimine, yeni sentezlenen proteinlerin glikozilasyonunun bozulmasına

neden olur ve ER stresini meydana getirir. Bu nedenle ER stresinin prototipik uyarıcısıdır (9, 12, 13, 59, 75).

Son yapılan çalışmalar, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve oksidatif stres gibi mekanizmalara ek olarak ER stresinin ilaç yatkınlığı ile ilişkili olabileceğini göstermiştir. İlaç kaynaklı ER stresi, hücre ve doku içerisinde lipidlerin birikimi, hücre ölümü, sitoliz ve inflamasyonu da içeren bir takım zararlı etkilere neden olabilir (59).

TM, bir N-glikozilasyon inhibitörüdür ve memeli hücrelerinde UPR'ın aktivasyonuna neden olur. Protein sentezine genel bir etkisi bulunmaksızın protein glikozilasyonunu tamamen inhibe etme özelliğine sahiptir. Bu nedenle ER stresinin farmakolojik indükleyicisi olarak in vivo da ve biyolojik çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır (6, 10, 74).

Bazı ilaçların yan etkilerinin ciddi ve hayati tehlike oluşturması nedeni ile ilaç kaynaklı toksisite oldukça önemlidir. Özellikle akut TM uygulaması kemirgen, sığır ve koyunlarda kasılmaya, felçe, şiddetli nörotoksositeye, karaciğer ve böbreklerde lezyonlara ve bazen ölüme yol açabilmektedir (59).

TM'in tek doz 200 µg/kg subkutan (s.c.) olarak uygulanması yetişkin erkek ratların seminifer tübüllerinde kalıcı hasara neden olmaktadır (76). Ek olarak TM'in bitki ve memeli hücrelerinde ER stresini uyararak hücre apoptozisini indüklediği bildirilmiştir (77).

TM, küçük kan damalarının endotelial hücrelerine zarar vermekte ve kan damarı lümeninin stenozuna neden olmaktadır. Ayrıca kapiller endoteliumda GER'in belirgin dilatasyonuna yol açmaktadır. Beyindeki lezyonlar vasküler olduğundan dolayı kan damarlarındaki hasarlar ikincil olarak beyin iskemisine ve hipoksik nöron hasarına neden olabilmektedir (78). Bunun yanı sıra hücre siklusu üzerinde de etkili olan bir antibiyotiktir. Hücre siklusunun G1 fazını durdurarak rat hepatoma hücrelerinin bölünmesini inhibe ettiği in vitro çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca glikokaliksi oluşturan hücre yüzey glikoproteinlerinin yapısını da değiştirmektedir (75).

TM toksisitesi olan hayvanların karaciğerinde, steatoz, safra kanalı hiperplazisi, şişmiş hepatositler ve apoptotik cisimlerin bulunmasını içeren lezyonlar meydana gelmektedir. Şişmiş hepatositler belirgin GER dilatasyonu ile karakterizedir (59). Ayrıca gelişim üzerine de etkileri bulunmaktadır. Örneğin; tavuk embriyosu fibroblastlarının yüzey morfolojilerinin değişimine sebep olurken, kornal epitelyal

tabakaların göçünün engellenmesinde, amfibi embriyolarında gastrula evresinin inhibisyonunda ve deniz kestanelerinin gelişiminin bloke edilmesinde rol oynamaktadır (74). Deniz kestanesi embriyolarının gastrulasyondan sonra TM ile muamele edilmesi, spikül oluşumu ve kol büyümesinin durmasına ya da gecikmesine neden olmaktadır (79).

## 2.11. Shilajit

Ayurveda, Siddha ve Unani gibi geleneksel tıp sistemlerinde uzun yıllar kullanılan ve salajit, shilajatu, mumie, asphaltum, vegetable asphalt, mineral pitchmumijo ya da mummiyo olarak da adlandırılan Shilajit, soluk kahverenginden koyu kahverengiye-siyaha değişen renklerde ve çeşitli yoğunlukta bir eksüdyondur. Shilajit, Hindistan yarımadasındaki Himalaya sıradağları ve Afganistan (Hindikuş, Badakh-Shan), Avustralya (Northern Pollock Ranges), Tibet, Çin, Bhutan, Nepal ve eski Sovyet Sosyalist Cumhuriyetler Birliği (Tien-Shan, Pamir, Kafkaslar, Ural, Baykal, Tacikistan, Özbekistan, Kazakistan)'ndeki diğer dağ sıralarının kayalık bölümlerinden, özellikle yazın ve kışın hava durumlarına ilişkin yağışın miktarı ve de güneş ışığının süresince kaya sızıntısı olarak bulunur ve bu dağ sıralarının 1000-5000 metre yükseklikteki dik yamaçlarının kaya yüzeylerinden az miktarlarda toplanır. Shilajit kaya köklerinde (Rhizosphere) meydana gelir. Organik humik maddeler, bitkisel ve mikrobiyal metabolitlerin ortak bir karışımından oluşur (80, 81, 82, 83, 84).

Mayıs ve Haziran aylarında, bitki özütü ya da bitkilerin kauçuk (lateks) sıvısı, şiddetli güneş sıcaklığı etkisiyle dağların kayalarından yapışkan sızıntı olarak ortaya çıkar. *Euphorbia royleana* Boiss ve *Trifolium repens* gibi kauçuk içeren bitkiler, Shilajit bulunduran kayaların çevresinde bulunur ve Shilajit'in kaynağını oluşturur. Aynı zamanda *Barbula*, *Fissidenc*, *Minium*, *Thuidium* gibi yosun türleri ve *Asteralla*, *Dumortiera*, *Marchantia*, *Pellia*, *Plagiochasma* gibi koyun otunun türleri ve *Stephenrencella-Anthoceros*'te Shilajit sızan kayaların çevresinde yetişir ve bu bryofitlerin Shilajit'in oluşumundan sorumlu olduğu düşünülmektedir (80).



**Şekil 12.** Santimetre ölçeği ile gösterilen işlenmiş Shilajit (80).

Başlangıçta Shilajit'in bitki fosili, karışık bitkisel ve hayvansal bir madde olduğu düşünülmüştür (80). Shilajit esas olarak %60-80 oranında humus içermekle birlikte benzoik asit, hipürik asit, yağ asitleri, elajik asit, adipik asit, süksinik asit, sitrik asit, oksalik asit, tartarik asit, reçine ve mumlu maddeler, albuminoidler, triterpenler, sterol, aromatik karboksilik asit, 3,4 benzokumarinler, aminoasitler, fenolik lipidler, dibenzo- $\alpha$ -pironlar, alkaloidler, esansiyel yağlar, kolesterol, fosfolipidler, B1 ve B12 vitaminler ile diğer organik bileşenlerden meydana gelir (81, 82, 85, 86).

Shilajit'in kompozisyonu, yerleşik bitki türleri, kayanın jeolojik doğası, bölgesel ısı profili, nem ve rakım gibi birçok faktörlerden etkilenir. Örneğin; Hindistan'ın Kumoan bölgesinden elde edilen Shilajit'in Nepal (Dolpa), Pakistan (Peshawar) ve Rusya (Tien-Shan)'dan elde edilen Shilajit ile kıyaslandığında daha yüksek oranda fulvik asit içerdiği bulunmuştur. (sırasıyla %21.4, %15.4, %15.5, %19.0). Ayrıca farklı ülkelerden elde edilen Shilajit'in %1'lik sulu çözeltilerinin pH değerleri de birbirinden farklıdır. Şöyle ki, Hindistan (Kumoan) için 6.2, Nepal (Dolpa) için 7.5, Pakistan (Peshawar) için 6.8 ve Rusya (Tien-Shan) için 8.2'dir. Yine bu ülkelerden elde edilen Shilajit'in yüzdelik humik bileşenleri de farklılık göstermektedir (85).

### 2.10.1. Shilajit'in geleneksel tıpta kullanımı

Geleneksel tıbbın bir parçası olan Shilajit'in, modern bilimsel değerlendirmeler sonucunda doğrulanmış pek çoktedavi edici ve iyileştirme özelliği bulunmaktadır (83, 84).

Shilajit'in antioksidan, antiülserojenik, antiinflamatuvar, immünomodülatör, antidiabetik, antialerjik, öğrenme, hafıza, anksiyete, spermatojenik ve oojenik etkileri bulunmaktadır (73).

Ayurveda, Siddha ve Unani gibi geleneksel Hint tıbbına göre Shilajit, dahilen alındığında kuvvet verici, laksatif, ekspektoran, diüretik, immüno-modülatör, litotriptik ve antihipertansif, haricen alındığında ise antiseptik, analjezik ve germisid etki oluşturmaktadır. Ayrıca splenomegali, epilepsi, sinirsel bozukluklar, kronik bronşit ve anemide de etkindir ve afrodisyak özelliği vardır. Ödem, hemoroid, obezite, anoreksi durumlarında iyileştirici etkisi bulunmaktadır. Süt ile birlikte kullanıldığında diabetes mellitusu iyileştirici özellik gösterir. Ayurveda'ya göreyaşlanmaya sebep olan ürünleri bloke eden Shilajit'in gençleştirici etkisi bulunmaktadır. *Commiphora wightii* (guggul) ile birlikte kullanıldığında isekırıkları tedavi edici etki gösterir. Bu durumda kallus oluşumunu teşvik ettiği düşünölmektedir. Aynı zamanda Shilajit, osteoartrit ve servikal spondiloz tedavilerinde de kullanılmaktadır (80, 83, 85, 87).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Deney Hayvanı

Bu çalışma Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi (ZBEÜ) Histoloji ve Embriyoloji, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalının ortak çalışması olup ve ZBEÜ Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nin katılımları ile gerçekleşmiştir. Çalışma için ZBEÜ Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'ndan 05.05.2016 tarihinde 2016-32-05/05 protokol numaralı "Etik Kurulu Onayı" (Ek 1-2) alınmıştır.

Çalışmamızda, ZBEÜ Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nde üretilen 2,5-3 aylık ağırlıkları (200-300 gr) arasında değişen 64 adet genç erişkin *Wistar albino* erkek sıçan kullanıldı. Aynı biyolojik ve fizyolojik özelliklere sahip deneklerden, vücut ağırlıkları birbirine yakın değerlerde olanlar aynı grupta olacak şekilde; 2'si kontrol, 6'sı deney grubu olmak üzere toplam 8 grup, olarak belirlendi. Tüm denekler, deney süresi boyunca uygun laboratuvar koşulları ( $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 12 saat aydınlık/karanlık siklusuda) altında, günlük içme suyu ve % 21 ham protein içeren pelet yemlerle beslendi.

#### 3.2. ER Stresi Oluşturulması ve Deney Grupları

ER stresi oluşturmak amacıyla; deneyin 1. günü, tek doz ve s.c. yoldan, 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Tunikamisin (Sigma, T7765) verildi.

Deney grupları aşağıdaki gibi oluşturuldu;

**I. Grup:(n=8):** Deneyin 1. günü, tek doz s.c. yoldan 1ml Dimetil sülfoksit (DMSO) ve oral yoldan 1ml serum fizyolojik (sf) uygulanacak olan **24. sa kontrol grubu.**

**II. Grup:(n=8):** Deneyin 1. günü, tek doz s.c. yoldan 1ml DMSO verilecek olan ve oral yoldan gün aşırı 1 ml sf uygulanacak olan **4. gün kontrol grubu.**

**III. Grup:(n=8):** Deneyin 1. günü, tek doz s.c. yoldan 1ml DMSO verilecek olan ve oral yoldan gün aşırı 100 mg/kg Shilajit uygulanacak olan **24. sa Shilajit grubu.**

**IV. Grup:(n=8):** Deneyin 1. günü, tek doz s.c yoldan 1ml DMSO ve oral yoldan gün aşırı 100 mg/kg Shilajit uygulanacak olan **4. gün Shilajit grubu.**

**V. Grup:(n=8):** Deneyin 1. günü, tek doz ve s.c. yoldan 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Tunikamisin ve oral yoldan 1ml sf uygulanacak olan **24. sa Tunikamisin grubu.**

**VI. Grup:(n=8):** Deneyin 1. günü, tek doz ve s.c. yoldan 200 µg/kg Tunikamisın ve oral yoldan gün aşırı 1 ml sf uygulanacak olan **4. gün Tunikamisın grubu.**

**VII. Grup: (n=8):** Deneyin 1. günü, tek doz ve s.c. yoldan 200 µg/kg Tunikamisın ve oral yoldan 100 mg/kg Shilajit uygulanacak olan **24. sa Tunikamisın+Shilajit grubu.**

**VIII. Grup: (n=8):** Deneyin 1. günü, tek doz ve s.c. yoldan 200 µg/kg Tunikamisın ve oral yoldan gün aşırı 100 mg/kg Shilajit uygulanacak olan **4. gün Tunikamisın+Shilajit grubu.**

Deney süresi boyunca deneklerin ağırlık takibi yapılmış olup, deney sonunda toplam vücut ağırlıkları ve testis ağırlıkları ölçülmüş ve her bir grup için ortalama vücut ağırlığı ve testis ağırlığı (g)/100 g vücut ağırlığı olarak hesaplanmıştır.

ZBEÜ Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nde 8 gruptaki her bir denek (i.p.) yoldan 10 mg/kg xylazine (Rompun-Bayer/Türkiye), 90 mg/kg ketamin (Ketalar-Eczacıbaşı/Türkiye) ile anestezi yapıldıktan sonra testis doku örnekleri ve kan örnekleri alındı.

### **3.3. Histopatolojik Analizler**

Dokuların ışık mikroskopunda incelenmesi için gerekli olan mikroteknik aşamaları ZBEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı histoloji laboratuvarında yapıldı. Anestezi altında sakrifiye edilen deneklerden elde edilen testis dokuları %10 formol ile tespit edilerek makroskopisi yapıldı. %10 formol ile 2 gün tespit edildikten sonra dokular 1 gün akar çeşme suyunda yıkama işlemine alındı. Su ile yıkama işleminin ardından dokular dehidratasyon için artan alkol serilerinde (%70, 90, 96, 100) sırasıyla 2'şer saat tutuldu. Dehidratasyon aşamasından sonra saydamlaştırma işlemi için dokular 10 dk ksilol ile muamele edildi. Gömme işlemi öncesi dokular yumuşak parafinde, 58°C' lik etüvde 1 gece boyu bekletildi. Bir sonraki gün testis dokuları, Bio Optica marka parafin dispenser ile bloklandı. Deneklere ait doku bloklarından Shandon Finesse 325 marka silindirik mikrotom kullanılarak 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Testis dokusunun genel özelliklerini ve bulguları ortaya koyabilmek için kesitlere Hematoksilen+Eozin (H+E) ve Periodik asit-Schiff+Hematoksilen (PAS+H) boyamaları yapıldı. Boyama için alınan kesitler 58°C' lik etüvde 1 gece boyunca bekletildi. Ardından testis kesitleri parafinden arındırılmak için Ksilol solusyonunda 2 kez 15'er dk bekletildi.

Daha sonra kesitler yoğunluğu azalan alkol serilerinden geçirilerek eşme suyunda 5 dk bekletildi. Hücre nükleusunun boyanması için dokular 15 dk Hematoksilen ile muamele edildikten sonra eşme suyunda kısa bir süre yıkandı. Ardından kesitler %1'lik asit alkole batırılıp çıkarılarak 25 dk eşme suyu altında morartmaya bırakıldı. Morartma işleminden sonra hücre sitoplazmasının boyanması için 3 dk Eozin ile muamele edilen dokular son olarak yoğunluğu artan alkol serilerinden geçirildi. Ardından Ksilen ile 2 kez 15 dk'lık saflaştırma işlemi yapılıp dokular entellan ile kapatıldı.

PAS+H boyaması için alınan kesitler ise 58°C' lik etüvde 1 gece boyunca bekletildikten sonra dokulara deparafinizasyon işlemleri uygulandı. Ardından Periodik asit solusyonunda 13 dk bekletildi. Daha sonra eşme suyunda 10 dk, distile suda ise 3 kez kısa bir süre yıkandı. Karanlık ortama alınan dokular, Schiff solusyonu içerisinde 15 dk bekletildikten sonra 3 kez 5'er dk yıkama solusyonlarından geçirildi. Ardından eşme suyunda 5 dk bekletilerek 10 dk Hematoksilen ile muamele edildi. 20 dk morartmaya bırakılan dokular, yoğunluğu artan alkol serilerinden geçirildi. Son olarak Ksilen ile 2 kez 15 dk bekletilerek entellan ile kapatıldı. Bulgular ışık mikroskobu (Axiovision LE Rel 4.8; Carl Zeiss, AxioCam ERc5s) ile fotoğraflandırıldı.

Tüm deney gruplarına ait testis kesitlerinin seminifer tübülündeki spermatogenik seri hücrelerin ve intersitisyel doku hücrelerinin sınıflandırılması, Tablo 1'de belirtilen kriterlere göre yapıldı.



**Tablo 1.** Spermatogenik seri hücrelerin ve interstisyel doku hücrelerinin sınıflandırılması (24, 29).

<b>SPERMATOGENİK SERİ HÜCRELER</b>	<b>MORFOLOJİK ÖZELLİKLER</b>
<b>Sertoli Hücreleri</b>	Bazal lamina üzerine oturmuş seminifer tübül lümenine doğru uzanan prizmatik şekilli hücrelerdir.
<b>Spermatogonyumlar</b>	Bazal lamina ile direkt ilişkide olan diploid hücrelerdir. Sertoli hücreleri arasında bulunan tıkaçıcı bağlantıların altında bulunurlar.
<b>a) Tip A Koyu Spermatogonyum</b>	İnce granüler kromatin ve yoğun bazofilik nükleuslu hücrelerdir.
<b>b) Tip A Açık Spermatogonyum</b>	İnce granüler yapılı ve açık boyanan nükleuslara sahiptir.
<b>c) Tip B Spermatogonyum</b>	Kromatini, nüklear kılıf boyunca ve nükleolus çevresinde kümeler oluşturan ve yuvarlak nükleus içeren hücrelerdir.
<b>Primer Spermatisitler</b>	Spermatogonyumla kıyaslandığında iki kat kromozom sayısına (4n) ve iki kat DNA miktarına sahip hücrelerdir.
<b>Sekonder Spermatisitler</b>	İkinci mayoz bölünmeye hemen girdiklerinden dolayı kesitlerde az rastlanılır. Primer spermatisitler ile kıyaslandığında daha küçük hücrelerdir.
<b>Spermatidler</b>	Seminifer tübül lümenine yakın alanda lokalize haploid hücrelerdir. Yuvarlak ya da poligonal görünümü, yoğun nükleus içerirler.
<b>Spermatozoon</b>	Kuyruk yapısının geliştiği lümendeki hücrelerdir. Küçük ve yoğunlaşmış nükleusa sahiptir.
<b>İNERSTİSYEL DOKU HÜCRESİ</b>	
<b>Leydig Hücreleri</b>	Bağ dokusu içerisinde intertübüler alanda yerleşik, tek tek ya da gruplar halinde yerleşim gösteren, yuvarlak veya poligonal şekilli, yuvarlak nükleusa sahip hücrelerdir.

### **3.4. Cosentino Skoru ile Spermatogenezin Değerlendirilmesi**

II., IV., VI. ve VIII. gruplara ait testis kesitlerinin ışık mikroskopik olarak incelenmesinde seminifer tübül duvarında spermatogenezin değerlendirilmesi, Tablo 2’de belirtilen kriterlere göre yapıp 0-4 arasında skorlandı.

**Tablo 2.** Cosentino kriterleri ve skorum (88).

<b>Cosentino kriterleri</b>	
<b>Seminifer Tübül</b>	Spermatozoa ve spermatid kaybı Germ hücre tabakasının yokluğu Germ hücre tabakalarının dejenerasyonu Germ hücre tabakalarının düzensizleşmesi
<b>İnterstisyum</b>	Ödem Hemoraji
<b>Cosentino skorum</b>	0: Hasar yok 1: Hafif hasar 2: Orta hasar 3: Şiddetli hasar 4: Çok şiddetli hasar

Bu değerlendirmeler, II., IV., VI. ve VIII. gruplarda her hayvan için 3 testis kesiti üzerinde ve her kesitten yuvarlak veya yuvarlağa yakın 10 tübülün enine kesiti olmak üzere toplam 30 tübül değerlendirilerek yapıldı (89).

### **3.5. İmmünohistokimyasal İncelemeler**

Tunikamisin indüklü ortaya çıkan ER stresinin göstergesi olan GRP-78/BİP, bir transkripsiyon faktörü olan CHOP (Anti DDIT3), ve Kaspaz-3 gibi apoptoz belirteçlerin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler immünohistokimyasal yöntemler ile gösterildi.

İmmünohistokimyasal inceleme için hazırlanan 4. gün deneklere ait testis doku bloklarından, Shandon Finesse 325 marka silindirik mikrotom kullanılarak 5 µm kalınlığında polilizin kaplı lamlara GRP-78/BİP, CHOP ve aktif Kaspaz-3 aktivitesini araştırmak amacıyla kesitler alındı. Bunun için immünohistokimyasal ABC (Avidin-Biotin Kompleks) yöntemi uygulandı. Kesitler 55 °C'de inkübe edildikten sonra deparafinizasyon işlemini takiben suya alındı. Dokuda formaldehit fiksasyonundan kaynaklanan reseptör maskelenmesini önlemek için kesitler %0.2 Triton-X solusyonuna (Chem Cruz, SC-29112A) alındı ve 10 dk bekletildi. Ardından kesitler 5 dk süreler ile fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) içerisinde 3 defa çalkalandıktan sonra, endojen peroksidaz aktivitesini önlemek amacıyla 10 dk süreyle metanolde hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit ile muamele edildi. Daha

sonra kesitler 3 defa 5'er dk PBS ile yıkandıktan sonra her bir dokunun çevresi hidrofobik kalemle çizildi. Kesitler PBS ile yıkandıktan sonra nonspesifik antikor bağlanmalarını önlemek amacıyla kesitlere 7 dk %1 preimmün rabbit serum (Ultra V Block, LabVision, TA-015-UB) uygulaması yapıldı. Nemli kap içerisinde muhafaza edilen her birkesit farklı antikor uygulanacak şekilde belirlendi ve ardından farklı dilüsyonlarda hazırlanan 1/5000 GRP-78/BİP (Abcam, ab108613), 1/250 CHOP (DDIT3) (Abcam, ab179823), 1/200 Kaspaz-3 (Thermo Scientific, PA5-16335), primer antikorları kesitlere nemli bir ortamda 1 saat oda ısısında uygulandı. Primer antikor uygulamasını takiben PBS ile kesitler 3 kere 5'er dk yıkandı. Yıkama sonrası kesitler, uygun sekonder antikorda (Biotinylated Link, Dako, K0609) 30 dk bekletildi. PBS ile 3 kez yıkanan kesitlere 15 dk streptavidin peroksidaz solüsyonu (Streptavidin HRP, Dako, K0609) uygulandı. Süre bitiminde PBS ile 3 kez yıkanan kesitlere mikroskop altında GRP-78 /BİP için 10dk, CHOP için 45 sn, Kaspaz-3 için 2 dk 3'3-diaminobenzidine (DAB) kromojen solüsyonu (Vector, SK-4100) işlemi yapıldı. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra 1 dk Mayer's hematoksilen ile muamele edilerek zıt boyama yapıldı. Son olarak, kesitler alkol serilerinden geçirilip, ksilen ile muamale edildikten sonra entellan (Merck, 107961.0500) ile kapatıldı ve ışık mikroskopik (Axiovision LE Rel 4.8; Carl Zeiss) olarak incelendi. Elde edilen preparatlara histolojikskorlama uygulanarak (H skor) semikantitatif bir değerlendirilme yapıldı.

### 3.5.1. Histolojik skorlama (H skor)

4. gün gruplarında GRP-78/BİP, CHOP (DDIT3) ve Kaspaz-3 immünreaksiyonun yoğunluğu H skor yöntemiyle belirlendi (Axiovision LE Rel 4.8; Carl Zeiss, x40). Hazırlanan preparatlar; birbirinden ve denek grubunun hangisi olduğundan habersiz iki araştırmacı tarafından rastgele 20 alan seçilerek hücrelerin immün boyanma yoğunluğuna göre sınıflandırıldı. (0: boyanma yok, 1+: zayıf fakat tespit edilebilir boyanma, 2+: orta ya da belirgin boyanma, 3+: yoğun boyanma). Her bir kesit için H skor değeri, her bir yoğunluk kategorisine ait boyanmış hücre yüzdesinin yoğunluk ile çarpımından elde edildi. H skor değerleri,  $H \text{ skor} = \sum P_i(i+1)$ ,  $i$ ; boyanma yoğunluk skoru,  $P_i$ ; boyananhücre yüzdesi formülü ile hesaplandı (14).

### **3.6. Hormon Testleri**

Deneyin 24. saat ve 4. günü sakrifiye edilen deneklerin kardiyak kan örnekleri alınarak, ayrılan serum ölçümlerin yapılacağı güne kadar -80° C'de saklandı. Dördüncü gün deneklerin kan serumunda fertilizasyonda büyük öneme sahip total FSH, LH ve testosteron hormon düzeyleri, ELISA kitleri ile çalışıldı.

### **3.7. İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel değerlendirme SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılarak yapıldı. Sayısal değişkenler için tanımlayıcı istatistikler ortanca (minimum-maksimum) olarak ifade edildi. 24. saat ve 4. gün ölçümleri arasındaki farklılıklar Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi ile değerlendirildi. Sayısal değişkenler bakımından gruplar arasındaki farklılıklar Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi. Kruskal-Wallis analizi sonucu anlamlı bulunduğunda, alt grupların ikişerli karşılaştırılması ise Dunn's testi ile yapıldı ve tüm değerlendirmeler için  $p < 0.05$  değeri anlamlı kabul edildi.

## **4. BULGULAR**

24. sa ve 4. gün kontrol ve deney gruplarından alınan sağ testis dokularının genel görünümüleri ışık mikroskobunda morfolojik ve histopatolojik olarak incelendi. 4. gün deney gruplarının immünohistokimyasal analizleri ve hormon değerlendirmeleri yapıldı.

### **4.1. Histolojik Bulgular**

#### **4.1.1. Yirmi dördüncü saat kontrol ve deney gruplarının histolojik bulgularının karşılaştırılması**

Çalışmada oluşturulan tüm deney gruplarına ait sıçan testis dokularının genel morfolojilerini ışık mikroskobu ile değerlendirmek için Hematoksilen+Eozin (H+E) boyaması yapılmıştır. Tüm gruplara ait (H+E) görüntüleri Şekil 13'de gösterilmiştir. Ayrıca tüm gruplara ait sıçan testis dokularının ışık mikroskobu ile incelemek ve bazal membran ile spermatidlerin görünürlüğünü artırmak amacıyla Periodik asit-Schiff+Hematoksilen (PAS+H) boyamaları yapılmıştır. Tüm gruplara ait(PAS+H) görüntüleri Şekil 14'de gösterilmiştir.

##### **4.1.1.1. Hematoksilen+Eozin (H+E) boyama**

###### Kontrol ve Shilajit Grubu

Kontrol ve Shilajit grubundaki sıçan testis seminifer tübüllerinin çok sıralı bir epiteltabakası ile döşeli olduğu gözlemlendi. Seminifer tübül epiteli incelendiğinde, spermatogenik hücre serileri ve Sertoli hücrelerinin varlığı saptandı. Bazal lamina üzerine oturan Sertoli hücreleri genellikle soluk boyanan sitoplazma ve karakteristik nükleus şekilleri (armut, piramit, üçgen ya da oval) ile diğer spermatogenik hücrelerden ayırd edildi. Sertoli hücrelerinin lateral katlantılarıarasına lokalize çok sayıda normal morfolojiye sahip spermatogenik seri hücreleri gözlemlendi. Bazal laminaya yakın komşuluklu spermatogonyumlar oval şekildedeki nükleusları ile izlendi. Spermatogonyumların hemen üzerinde yer alan ve 4n DNA miktarına sahip olmaları nedeniyle daha büyük hacimli nükleus içeren primer spermatositler ayırd edildi. Gelişme evrelerine göre sekonder spermatosit ve spermatidlerin daha üst

sıralarda yerleşimli olduğu izlendi. Lümene yakın lokalize erken spermatidler ve geç spermatidlerin ayrımı yapılabildi. Seminifer tübül lümenlerinin çoğunda spermatozoalara rastlanıldı (Şekil 13. A, B, C).

Seminifer tübül epitelinin en dıştan bir tunika propriya ile çevrili olduğu gözlemlendi. Düz kas hücrelerine benzeyen miyoid hücreler, tunika propriyanın ortasında ve bu dokuya paralel şekilde uzanan koyu boyanmış iç görünümlü uzun nükleusları ile gözlemlendi (Şekil 13. D, E, F).

Seminifer tübüller arasında bulunan interstisyel bağ dokuda; kan damarları yakınlarında yerleşik yuvarlak ya da poligonal şekilli, yuvarlak nükleusa sahip, testosteron üretiminden sorumlu Leydig hücreleri saptandı. Leydig hücreleri tek tek ya da gruplar şeklinde görüldü. Aynı zamanda bu alanda lenfatik damarlar, kapillerler ve bağ dokusu hücreleri gözlemlendi (Şekil 13. A, B, C).

#### TM Grubu

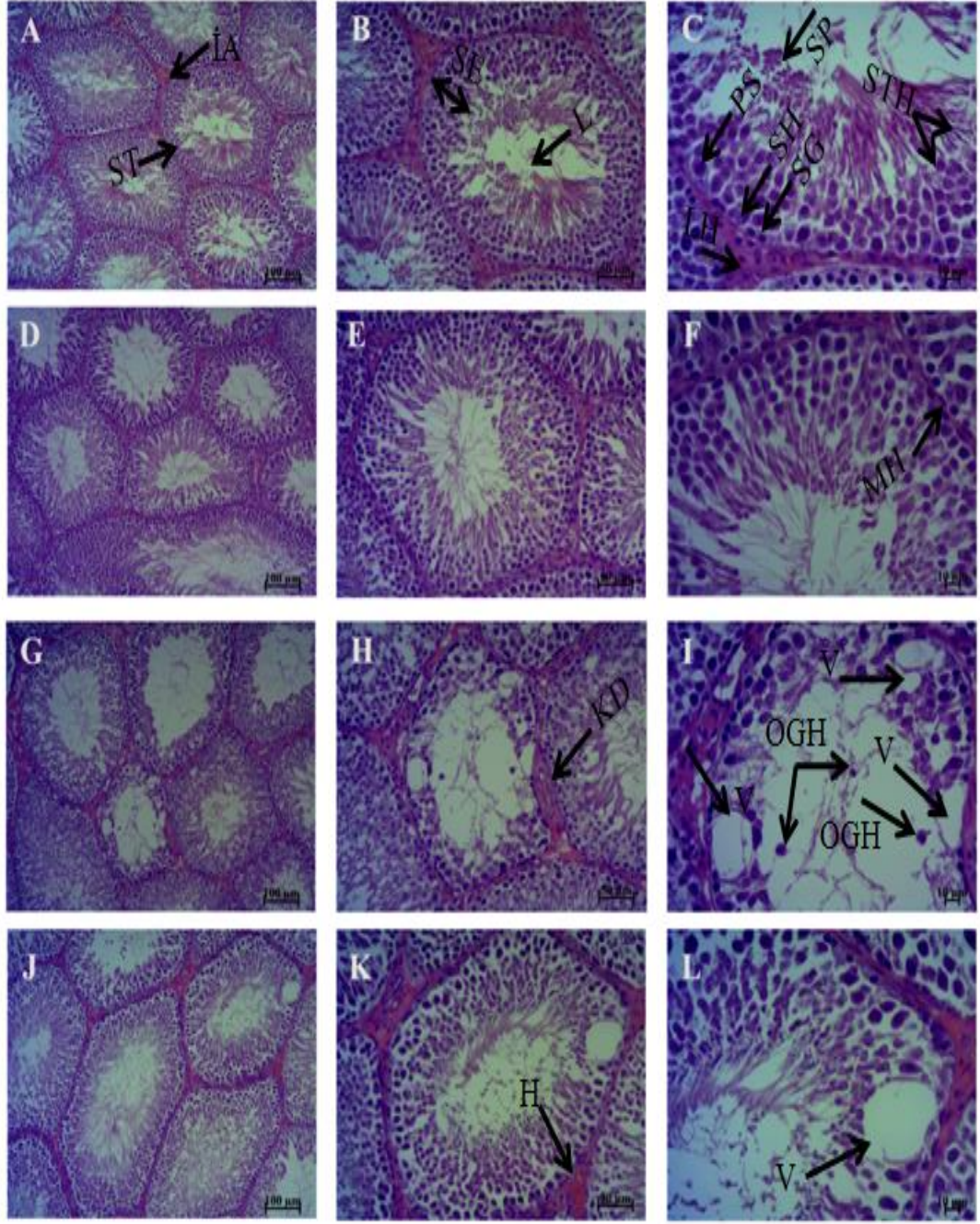
TM verilen sıçanların testis dokusu incelendiğinde, kontrol ve Shilajit grubu ile kıyaslanması sonucu bazı seminifer tübüllerde belirgin farklılıklar ve hasar gözlemlendi. Hasarlı olan seminifer tübüller incelendiğinde seminifer epiteldeki hücrelerde dökülme, incelmış tübül duvarı ve bazı tübüllerde lümene atılmış olan olgunlaşmamış germ hücreleri (sperm halini almamış) gözlemlendi. Hasarlı tübüllerdeki seminifer epitelde spermatogonyum ve primer spermatositler gözlemlendi. Hasarlı seminifer tübüllerin olmasına rağmen Sertoli hücre morfolojilerinde belirgin bir değişiklik gözlenmedi. Seminifer tübül epitelinde kontrol ve Shilajit grubunda olmayan vakuolizasyon dikkat çekti. İnterstisyel alanda ödeme, normale yakın görünümlü Leydig hücrelerine ve kan damarlarına rastlanıldı. Bazı interstisyel alanlarda hafif düzeyde hemorajiye rastlanıldı. Birkaç tübülde hasar gözlenirse de korunmuş olan spermatogenik seri hücreler nedeniyle spermatogenezin devam ettiği gözlemlendi (Şekil 13. G, H, I).

#### TM+Shilajit Grubu

TM verilen ve Shilajit ile tedavi edilen sıçanların testis dokusu incelendiğinde, hasarlı tübül sayısında bir azalma olsada, TM grubuna benzer hasarlı tübüller de gözlemlendi. Bazı hasarlı tübüllerde lümene atılmış olgunlaşmamış germ hücrelerine bu grupta da rastlanıldı. Hasarlı tübüllerde spermatogonyum ve primer spermatositler gözlemlendi. Lümene yakın lokalize olan erken spermatidler ve geç

spermatidlerin ayrımı yapılabildi. Hasarlı túbüller değerlendirildiğinde, TM grubuna kıyasla seminifer epiteldeki hücre dökülmesinin hafif düzeyde azaldığı ve seminifer epitel hücre yoğunluğunda azda olsa bir artışın olduğu gözlemlendi. Sertoli hücre morfolojisinde herhangi bir farklılığın olmadığı saptandı. Hasarlı seminifer túbül epitelinde yine yer yer vakuolizasyon görüldü. TM grubuna kıyasla interstisyel alanda hafif düzeyde ödeme ve normale yakın Leydig hücrelerine rastlandı. Bazı interstisyel alanlarda hafif düzeyde hemorajiye rastlandı. Birkaç túbülde hasar gözlemlense de korunmuş olan spermatogenik seri hücreler nedeniyle spermatogenezin devam ettiği gözlemlendi (Şekil 13. J, K, L).





**Şekil 13.** Testis seminifer tübüllerine ait 24. saat Hematoksilen+Eozin (H+E) boyaması. (A) Kontrol x10, (B) Kontrol x20, (C) Kontrolx40, (D) Shilajit x10, (E) Shilajit x20, (F) Shilajit x40, (G) TM x10, (H) TM x20, (I) TM x40, (J) TM+Shilajit x10, (K) TM+Shilajit x20, (L) TM+Shilajit x40. (IA) interstisyel alan, (LH) leydig hücresi, (ST) seminifer tübül, (SE) seminifer epitel (germinal epitel), (L) seminifer tübül lümeni, (SH) sertoli hücresi, (SG) spermatogonyum (PS) primer spermatosit, (STH) spermatid hücresi, (SP) spermatozoon (spermiyum), (MH) miyoid hücre, (KD) kan damarı, (V) vakuol, (OGH) olgunlaşmamış germ hücresi (immatür hücre), (H) hemoraji.



#### **4.1.1.2. Perodik Asit-Schiff+Hematoksilen (PAS+H) boyama**

##### Kontrol ve Shilajit Grubu

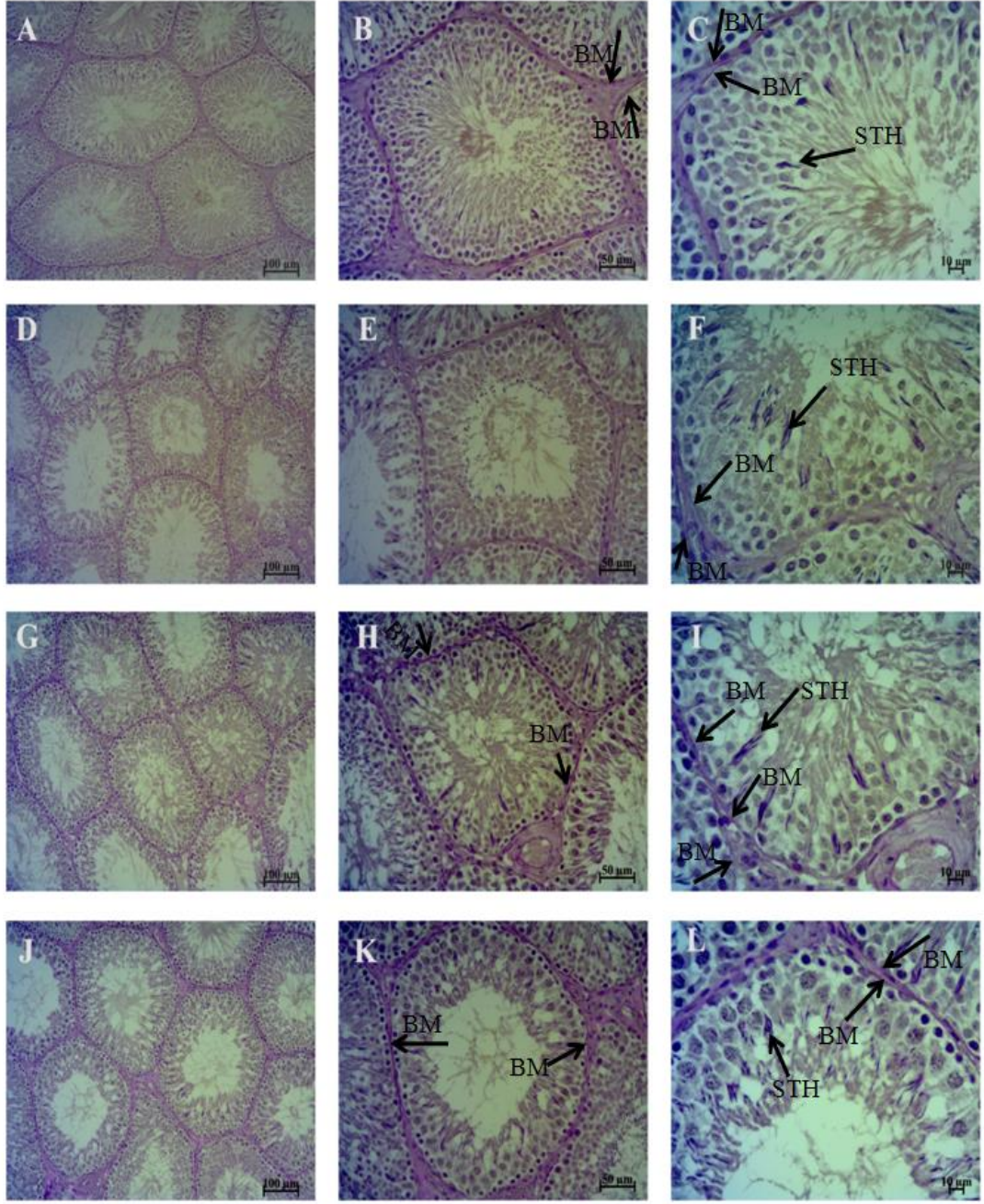
Kontrol ve Shilajit grubuna ait sıçan testis dokusu incelendiğinde her bir seminifer túbülün etrafını saran bazal membran yapısı ve spermatid başları, glikoprotein yapıdan meydana geldiği için PAS pozitif reaksiyon vererek mor-menekşe renge boyandı. Bazal membran yapısı incelendiğinde düzenli ve normal morfolojide gözlemlendi. Yan yana yerleşimli iki seminifer túbülün bazal membranlarının ayrımı yapılabildi. Nükleusun üzerine oturmuş kep şeklinde PAS pozitif reaksiyon veren akrozom yapısıyla erken spermatidler ile lümene uzanan ipliksi tarzda kuyrukları ve koyu uzun başlarıyla spermatozoalara dönüşecek olan geç spermatidler ayırd edildi (Şekil 14. A, B, C), (Şekil 14. D, E, F).

##### TM Grubu

TM verilen gruba ait sıçantestis dokusu incelendiğinde yan yana yerleşimli olan iki seminifer túbülün bazal membran yapısının ayrımı belirli bölgelerde yapılabildi. Bazal membranda belirli bölgelerde düzensizlikler ve incelmelerin olduğu gözlemlendi. Lümene yakın yerleşimde erken ve geç spermatidler gözlemlendi (Şekil 14. G, H, I).

##### TM+Shilajit Grubu

TM verilen ve Shilajit ile tedavi edilen sıçanların testis dokusu incelendiğinde, yan yana yerleşimli olan iki seminifer túbülün bazal membran yapısının ayrımı belirli bölgelerde yapılabildi. Bazal membran yapısında belirli bölgelerde hafif düzeyde düzensizlikler gözlemlendi. TM grubuna göre bazal membranda incelmelerin azaldığı dikkat çekti. Lümene yakın yerleşimde erken ve geç spermatidler gözlemlendi. TM grubuna göre daha yoğun spermatid başları dikkat çekti (Şekil 14. J, K, L).



**Şekil 14.** Testis seminifer tübüllerine ait 24. saat Periodik asit-Schiff+Hematoksilen (PAS+H) boyaması. (A) Kontrol x10, (B) Kontrol x20, (C) Kontrolx40, (D) Shilajit x10, (E) Shilajit x20, (F) Shilajit x40, (G) TM x10, (H) TM x20, (I) TM x40, (J) TM+Shilajit x10, (K) TM+Shilajit x20, (L) TM+Shilajit x40. (BM) bazal membran, (STH) spermatid hücresi.

#### **4.1.2. Dördüncü gün kontrol ve deney gruplarının histolojik bulgularının karşılaştırılması**

Çalışmada oluşturulan tüm deney gruplarına ait sıçan testis dokularının genel morfolojilerini ışık mikroskobu ile değerlendirmek için Hematoksilen+Eozin (H+E) boyaması yapılmıştır. Tüm gruplara ait (H+E) görüntüleri Şekil 15’de gösterilmiştir. Ayrıca tüm gruplara ait sıçan testis dokularının ışık mikroskobu ile incelemek ve bazal membran ile spermatidlerin görünürlüğünü artırmak amacıyla Periodik asit-Schiff+Hematoksilen (PAS+H) boyamaları yapılmıştır. Tüm gruplara ait (PAS+H) görüntüleri Şekil 16’de gösterilmiştir.

##### **4.1.2.1. Hematoksilen+Eozin (H+E) boyama**

###### Kontrol ve Shilajit Grubu

24. saat kontrol ve Shilajit grubuna ait sıçanların testis dokusuna benzer morfoloji, 4. gün kontrol ve Shilajit grubuna ait sıçanların testis dokusunda da gözlemlendi (Şekil 15. A, B, C), (Şekil 15. D, E, F).

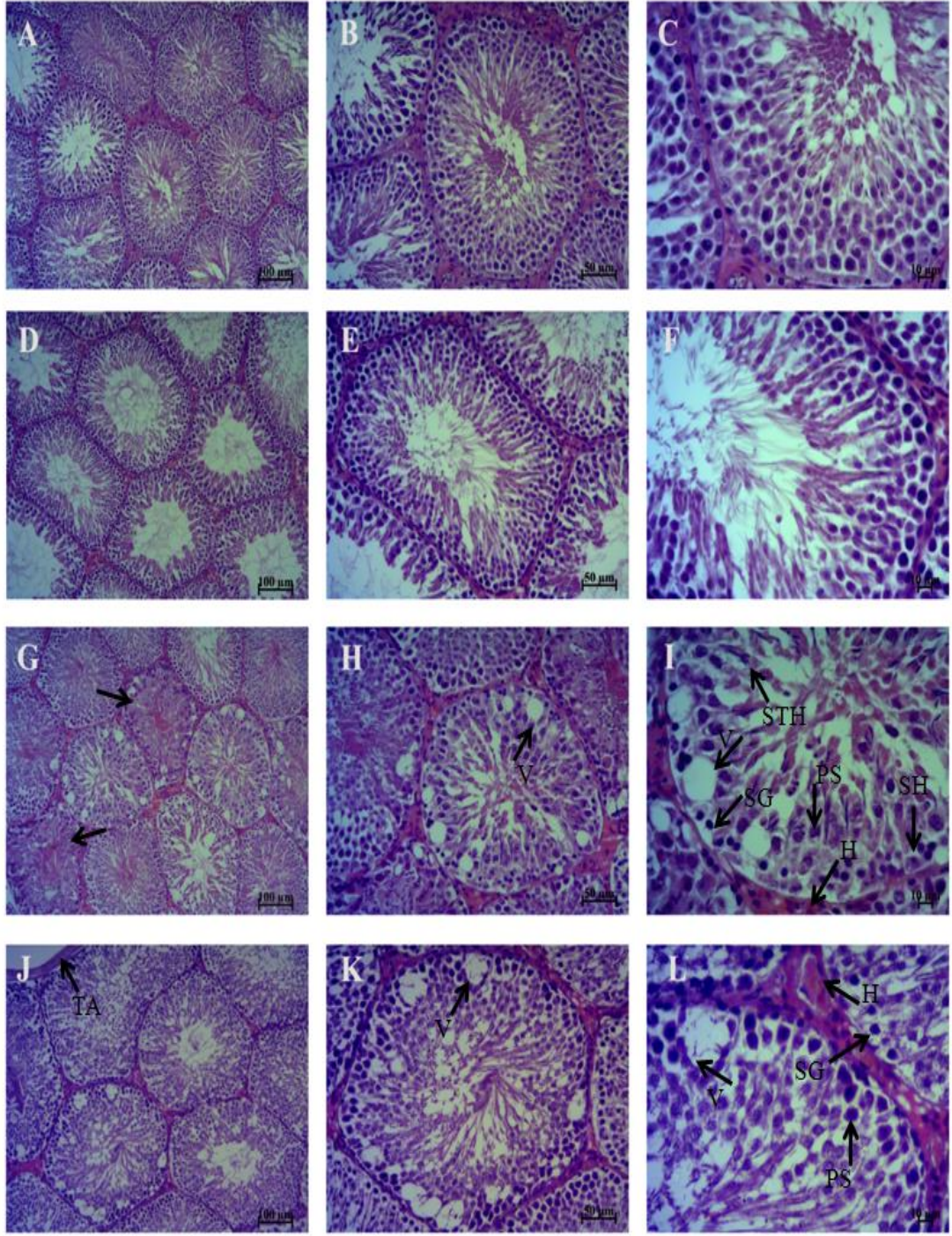
###### TM Grubu

TM verilen sıçanların testis dokusu incelendiğinde, hasara uğramış seminifer tübüllerin sayısının arttığı gözlemlendi. Bu tübüllerin seminifer epitelinde vakuolizasyon arttığı gözlemlendi. Ayrıca hasarlı olan tübüllerde lümene atılmış olgunlaşmamış germ hücrelerine rastlanıldı. Hasarlı olan tübüllerde spermatogonyum ve primer spermatositlerin varlığı saptandı. Bazı tübüllerde ise aşırı derecede tübüler dejenerasyon izlendi. Bu dejenerasyon spermatogonik hücrelerin büyük bir kısmının ortadan kalktığı, bazı spermatogonik hücrelerin özellikle spermatidlerin bir araya gelerek gruplar oluşturduğu ve bu gruplarında dejeneratif bir görünüm meydana getirdiği gözlemlendi. Bu dejeneratif görünüme rağmen Sertoli hücre morfolojisinde belirgin bir değişiklik gözlemlenmedi. İnstersitisyel alanda ve seminifer tübül lümenlerinde hafif düzeyde hemoraji görüldü. İnsterstisyel alanda hafif düzeyde ödem saptandı. Ayrıca normale yakın görünümlü Leydig hücreleri gözlemlendi (Şekil 15. G, H, I).

### TM+Shilajit Grubu

TM verilen ve Shilajit ile tedavi edilen sıçanların testis dokusu incelendiğinde, hasara uğramış tübül sayısında azda olsa azalmanın olduğu gözlemlendi. Bu tübüllerin yine deseminifer epitelinde vakuolizasyonun olduğu gözlemlendi. Seminifer tübüllerde ki seminifer epitel hücre yoğunluğunda azda olsa bir artış olduğu ve Sertoli hücre morfolojisinde belirgin bir farklılığın olmadığı saptandı. Sadece bazı tübüllerde hafif düzeyde bir yenilenme belirtilerinin olduğu gözlemlendi. Bu tübüller genellikle içerdikleri spermatogonyum ve spermatozoid kolonileri şeklinde gözlemlendi. Aşırı derecede dejenerasyonun olduğu tübül sayısında azalmanın olduğu dikkat çekti. İnstersitisyel alanda hafif düzeyde hemoraji ve ödem görüldü. Ayrıca normale yakın görünümlü Leydig hücreleri gözlemlendi. Birkaç tübülde hasar gözlemlense de korunmuş olan spermatogenik seri hücreler nedeniyle spermatogenezin devam ettiği gözlemlendi (Şekil 15. J, K, L).





**Şekil 15.** Testis seminifer tübüllerine ait 4. gün Hematoksilen+Eozin (H+E) boyaması. (A) Kontrol x10, (B) Kontrol x20, (C) Kontrolx40, (D) Shilajit x10, (E) Shilajit x20, (F) Shilajit x40, (G) TM x10, (H) TM x20, (I) TM x40, (J) TM+Shilajit x10, (K) TM+Shilajit x20, (L) TM+Shilajit x40. (TA) tunika albuginea,(V) vakuol, (SH) sertoli hüresi, (SG) spermatogonyum, (PS) primer spermatisit, (STH) spermatisit huresi, (H) hemoraji, (oklar) tübüler dejenerasyon.

#### **4.1.2.2. Periyodik Asit-Schiff+Hematoksilen (PAS+H) boyama**

##### Kontrol ve Shilajit Grubu

24. saat kontrol ve Shilajit grubuna ait sıçanların testis dokusuna benzer morfoloji, 4. gün kontrol ve Shilajit grubuna ait sıçanların testis dokusunda da gözlemlendi (Şekil 16. A, B, C), (Şekil 16. D, E, F).

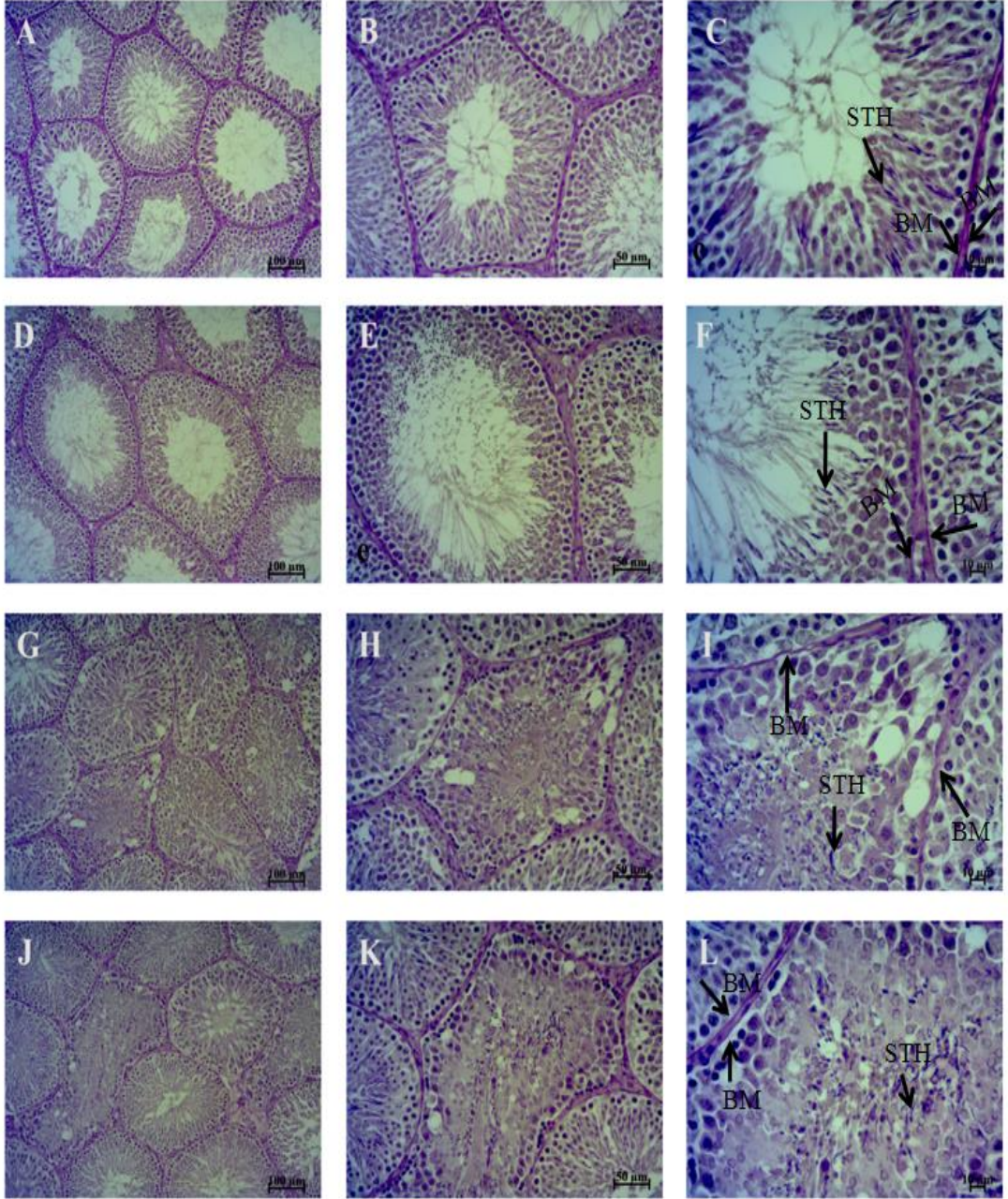
##### TM Grubu

TM verilen gruba ait sıçantestis dokusu incelendiğinde yan yana yerleşimli olan iki seminifer tübülün bazal membran yapıları çok fazla ayırd edilemedi. Ayrıca bazal membranda belirli bölgelerde düzensizlikler ve incelmeler gözlemlendi. Lümeneye yakın yerleşimli erken ve geç spermatidlerin ayrımı yapılabildi (Şekil 16.G, H, I).

##### TM+Shilajit Grubu

TM verilen ve Shilajit ile tedavi edilen sıçanların testis dokusu incelendiğinde, yan yana yerleşimli olan iki seminifer tübülün bazal membran yapısının ayrımı yapılabildi. Bazal membran yapısında belirli bölgelerde hafif düzeyde düzensizliklere rastlanıldı. Ayrıca TM grubuna göre bazal membranda incelmelerin azaldığı dikkat çekti. Lümeneye yakın yerleşimde erken ve geç spermatidler gözlemlendi. TM grubuna göre daha yoğun spermatid başları dikkat çekti (Şekil 16. J, K, L).





**Şekil 16.** Testis seminifer tübüllerine ait 4. gün Periodik asit-Schiff+Hematoksilen (PAS+H) boyaması. **(A)** Kontrol x10, **(B)** Kontrol x20, **(C)** Kontrolx40, **(D)** Shilajit x10, **(E)** Shilajit x20, **(F)** Shilajit x40, **(G)** TM x10, **(H)** TM x20, **(I)** TM x40, **(J)** TM+Shilajit x10, **(K)** TM+Shilajit x20, **(L)** TM+Shilajit x40. **(BM)** bazal membran, **(STH)** spermatid hücresi.

### **4.1.3. Yirmi dördüncü saat ve dördüncü gün kontrol ve deney gruplarının histolojik bulgularının karşılaştırılması**

24. saat ve 4. gün kontrol ve Shilajit grubuna ait sıçanların testis dokusu H+E ve PAS boyamaları ile incelendiğinde gruplar arasında belirgin bir farklılık gözlenmedi (Şekil 13. A-F),(Şekil 15. A-F), (Şekil 14. A-F), (Şekil 16. A-F).

24. saat ve 4. gün TM grubuna ait sıçanların testis dokusu incelendiğinde, seminifer epiteldeki vakuolizasyonun 24. saat grubunda daha az olduğu gözlemlendi. 4. gün grubunda hasarlı seminifer tübül sayısı daha fazla idi. Aynı zamanda 4. gün grubunda dejenerasyona uğramış tübüller de dikkat çekmekteydi. Her iki grupta da hafif düzeyde ödem ve hemoraji gözlemlendi. 4. gün grubunda seminifer tübül hasarının daha fazla olduğu dikkat çekti (Şekil 13. G, H, I), (Şekil 15. G, H, I). PAS+H boyama sonuçları değerlendirildiğinde; 24. saat grubuna ait testis dokusunda yan yana yerleşimli olan iki seminifer tübülün bazal membran yapıları ayırd edilebilirken 4. gün grubunda ayırd edilemedi (Şekil 14. G, H, I), (Şekil 16. G, H, I).

24. saat ve 4. gün TM +Shilajit grubuna ait sıçanların testis dokusu incelendiğinde, seminifer epitelde vakuolizasyonun devam ettiği saptandı. 4. gün grubunda ise dejenerasyona uğramış tübüllerde azda olsa azalmanın olduğu fark edildi. Her iki grupta da hafif düzeyde ödem ve hemoraji gözlemlendi (Şekil 13. J, K, L), (Şekil 15. J, K, L). PAS+H boyama sonuçları değerlendirildiğinde her iki deney grubunda da iki seminifer tübül bazal membran yapısı ayrımı yapılabildi (Şekil 14. J, K, L), (Şekil 16. J, K, L).

## **4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular**

### **4.2.1. Dördüncü gün kontrol ve deney gruplarında GRP78/BİP, CHOP ve Kaspaz-3 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi**

4. gün grubuna ait deneklerin testis dokusunda, immünohistokimyasal yöntem ile GRP78/BİP, CHOP ve Kaspaz-3 ekspresyonu değerlendirildiğinde; özellikle seminifer tübüllerde bulunan spermatogenik seri hücrelerinde ve interstisyumda farklı boyama şiddetlerinde (boyama yok-zayıf-orta-yoğun) GRP78/BİP, CHOP ve Kaspaz-3'ün ifade edildiğini gözlemledik (Şekil 15), (Şekil 16), (Şekil 17). Normal



tavşan Immünoglobulin-G serumu ile muamele edilmiş negatif kontrol örneklerinde ise herhangi bir immün reaksiyon gözlemedik (Şekil 18).

Morfolojik olarak elde ettiğimiz bulgularımızı, histolojik skorlama (H skor) yöntemi ile semikantitatif verilere dönüştürerek gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olup olmadığını GRP78/BİP, CHOP ve Kaspaz-3 immünreaktivitesi için değerlendirdik (Tablo 3). Histolojik skorlama, rastgele 20 alan seçilip bu alanlarda belirlenen tübüllerde ki rastgele 100 spermatogenik seri hücrelerin GRP78/BİP, CHOP ve Kaspaz-3 immünoreaktivite şiddetinin değerlendirilmesi ile gerçekleştirildi (0:boyanma yok, 1:zayıf, 2:orta, 3:yoğun boyanma).

Gruplar arasında GRP78/BİP, CHOP ve Kaspaz-3 immünore aktivitesi için H skor değerleri Grafik 1, Grafik 2 ve Grafik 3'te verilmiştir.

GRP78/BİP immünoreaktivitesi için gruplar arasındaki ikili kıyaslamalarda, kontrol ve Shilajit grubu arasında, kontrol ve TM+Shilajit grubu arasında, TM+Shilajit ve TM grubu arasında H skorun anlamlı bir farklılık göstermediğini saptadık. Shilajit ve TM+Shilajit grubu arasında, Shilajit ve TM grubu arasında, kontrol ve TM grubu arasında H skorun anlamlı farklılık gösterdiğini saptadık ( $p<0.001$ ). Shilajit grubu, TM+Shilajit ve TM grubu ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde bir azalmanın olduğunu tespit ettik. Kontrol grubu, TM grubu ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde bir azalmanın olduğunu saptadık.

CHOP immünoreaktivitesi için gruplar arasındaki ikili kıyaslamalarda, kontrol ve Shilajit grubu arasında, kontrol ve TM+Shilajit grubu arasında, Shilajit ve TM+Shilajit grubu arasında, TM+Shilajit ve TM grubu arasında H skorun anlamlı farklılık göstermediğini saptadık. Kontrol ve TM grubu arasında, Shilajit ve TM grubu arasında H skorun anlamlı farklılık gösterdiğini saptadık ( $p=0.001$ ). TM grubu, kontrol ve Shilajit grubu ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde artmanın olduğunu saptadık.

Kaspaz-3 immünoreaktivitesi için gruplar arasındaki ikili kıyaslamalarda, kontrol ve Shilajit grubu arasında, kontrol ve TM+Shilajit grubu arasında, Shilajit ve TM+Shilajit grubu arasında, TM+Shilajit ve TM grubu arasında H skorun anlamlı farklılık göstermediğini saptadık. Kontrol ve TM grubu arasında, Shilajit ve TM grubu arasında H skorun anlamlı farklılık gösterdiğini saptadık ( $p<0.001$ ). TM grubu, kontrol ve Shilajit grubu ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde bir artmanın olduğunu saptadık.

**Tablo 3.** 4. gün kontrol ve deney gruplarına ait GRP78/BİP, CHOP ve Kaspaz-3 immünoreaktivitesi için H skor değerleri.

	Gruplar	n=8	Shilajit n=8	Tunikamisin n=8	Tunikamisin+ Shilajit n=8	p
H skor	GRP78/BİP	114 (114-119) <sup>b</sup>	102 (96-112) <sup>a</sup>	162 (151-176)	133 (128-145)	<0.001
	CHOP	109 (107-130) <sup>b</sup>	119 (108-135) <sup>*</sup>	207 (191-213)	141 (127-147)	0.001
	Kaspaz-3	121 (110-125) <sup>b</sup>	129 (109-132) <sup>*</sup>	200 (182-202)	168 (132-172)	<0.001

Veriler ortanca (minimum-maksimum) olarak verilmiştir.

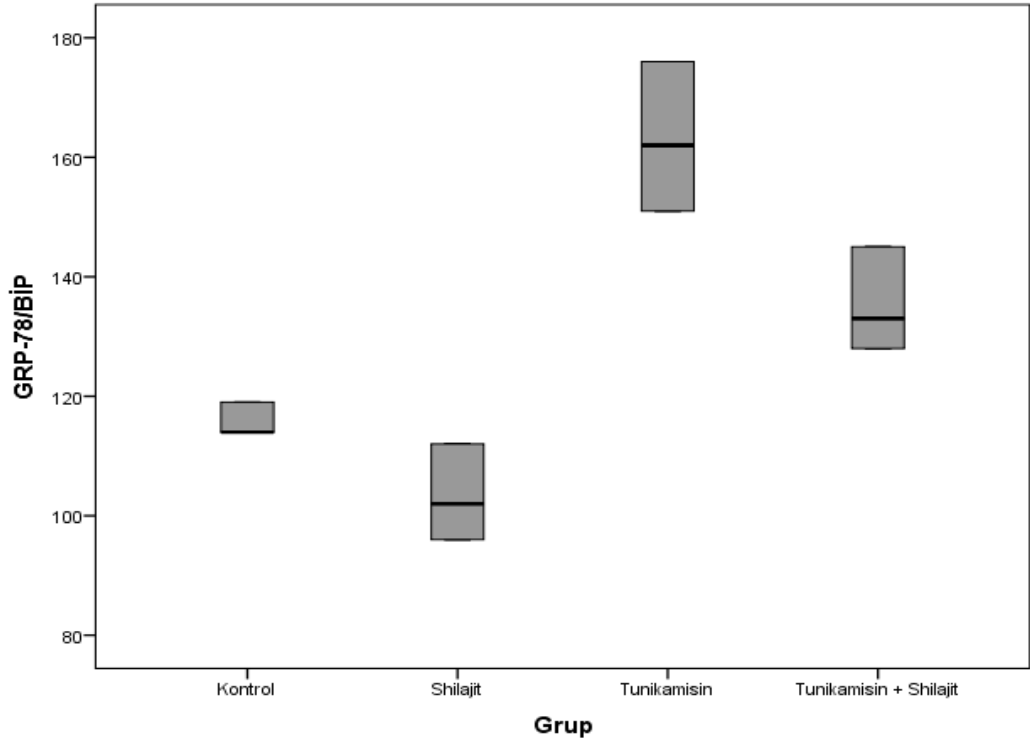
$p < 0.05$  olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

<sup>a</sup> $p < 0.05$  TM ve TM+Shilajit grubu ile kıyaslandığında.

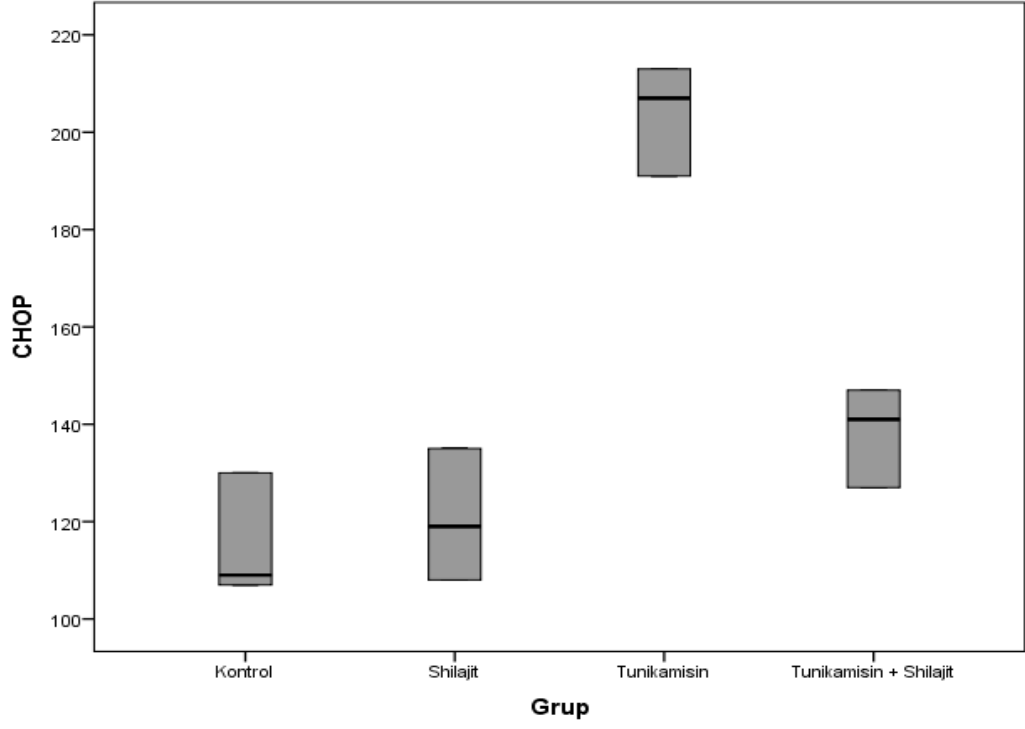
<sup>b</sup> $p < 0.05$  TM grubu ile kıyaslandığında.

<sup>\*</sup> $p < 0.05$  TM grubu ile kıyaslandığında.

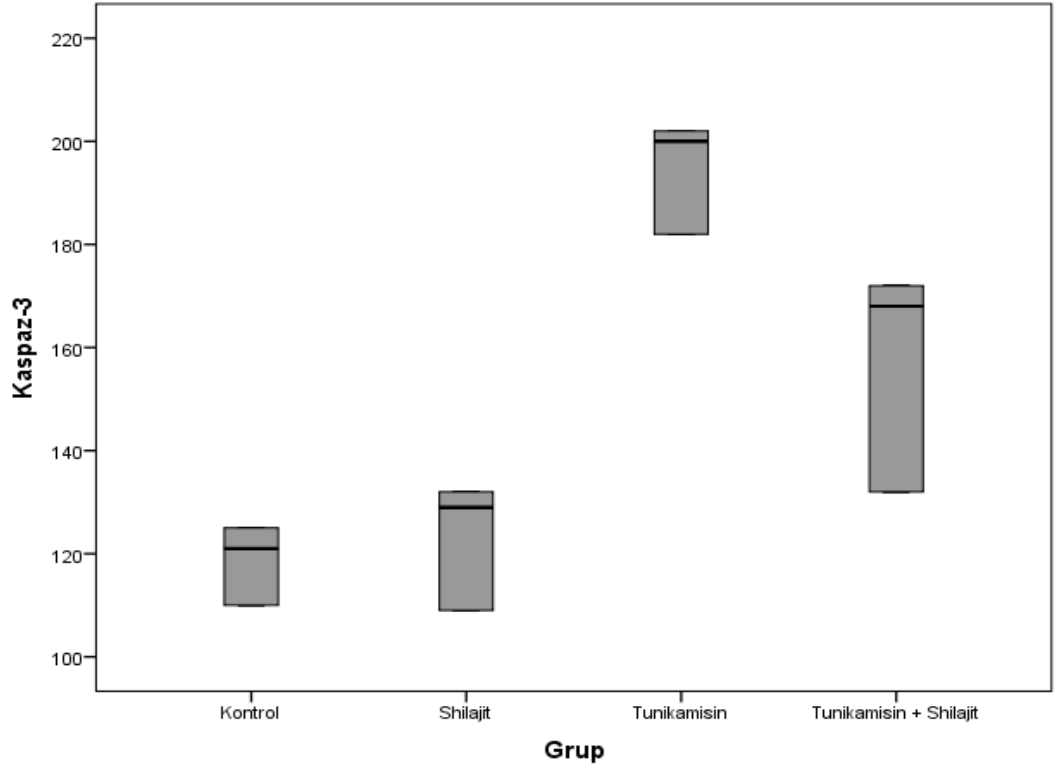
**Grafik 1.** 4. gün kontrol ve deney gruplarına ait GRP78/BİP immünoreaktivitesi için H skor analizi.

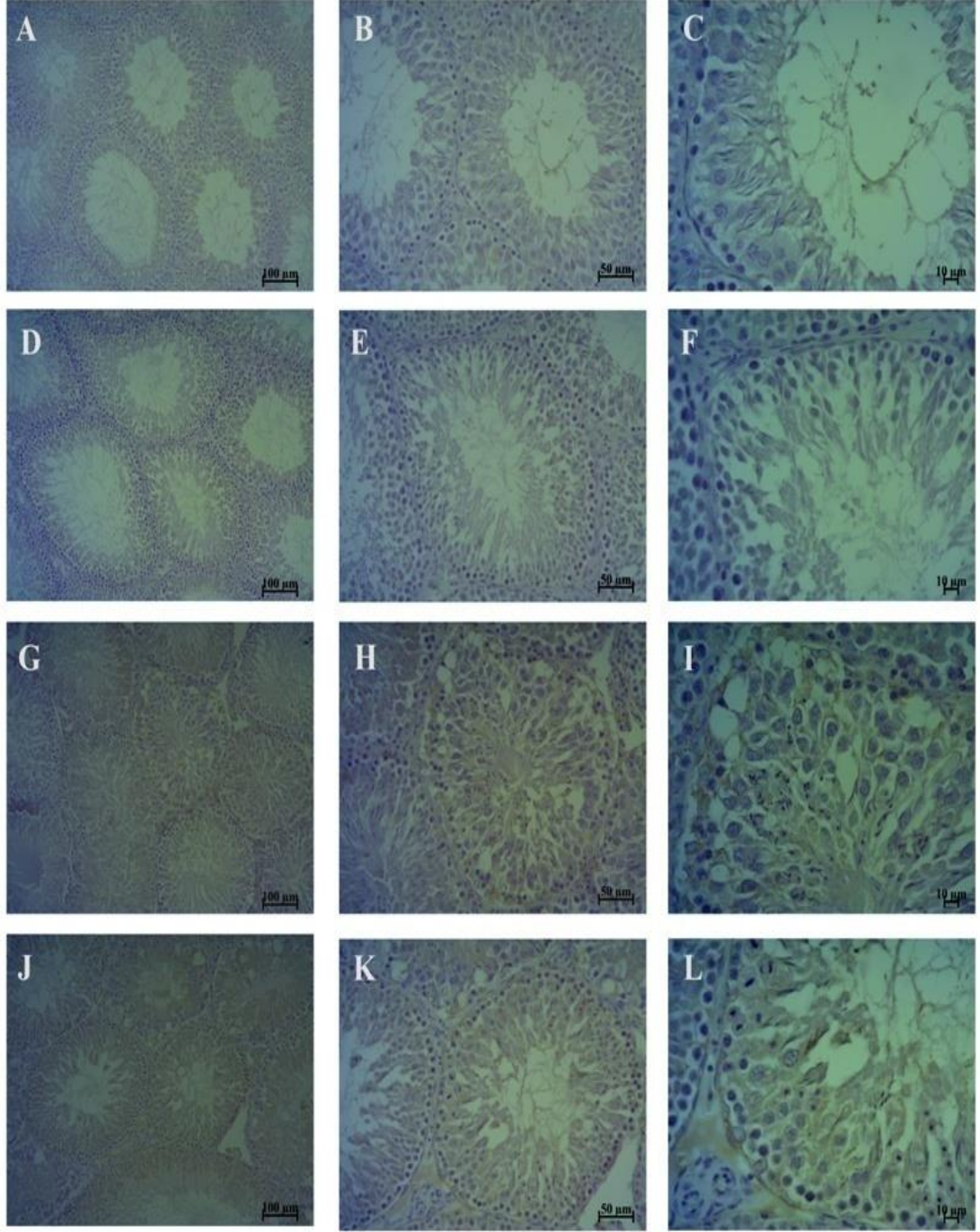


**Grafik 2.** 4. gün kontrol ve deney gruplarına ait CHOP immünreaktivitesi için H skor analizi.



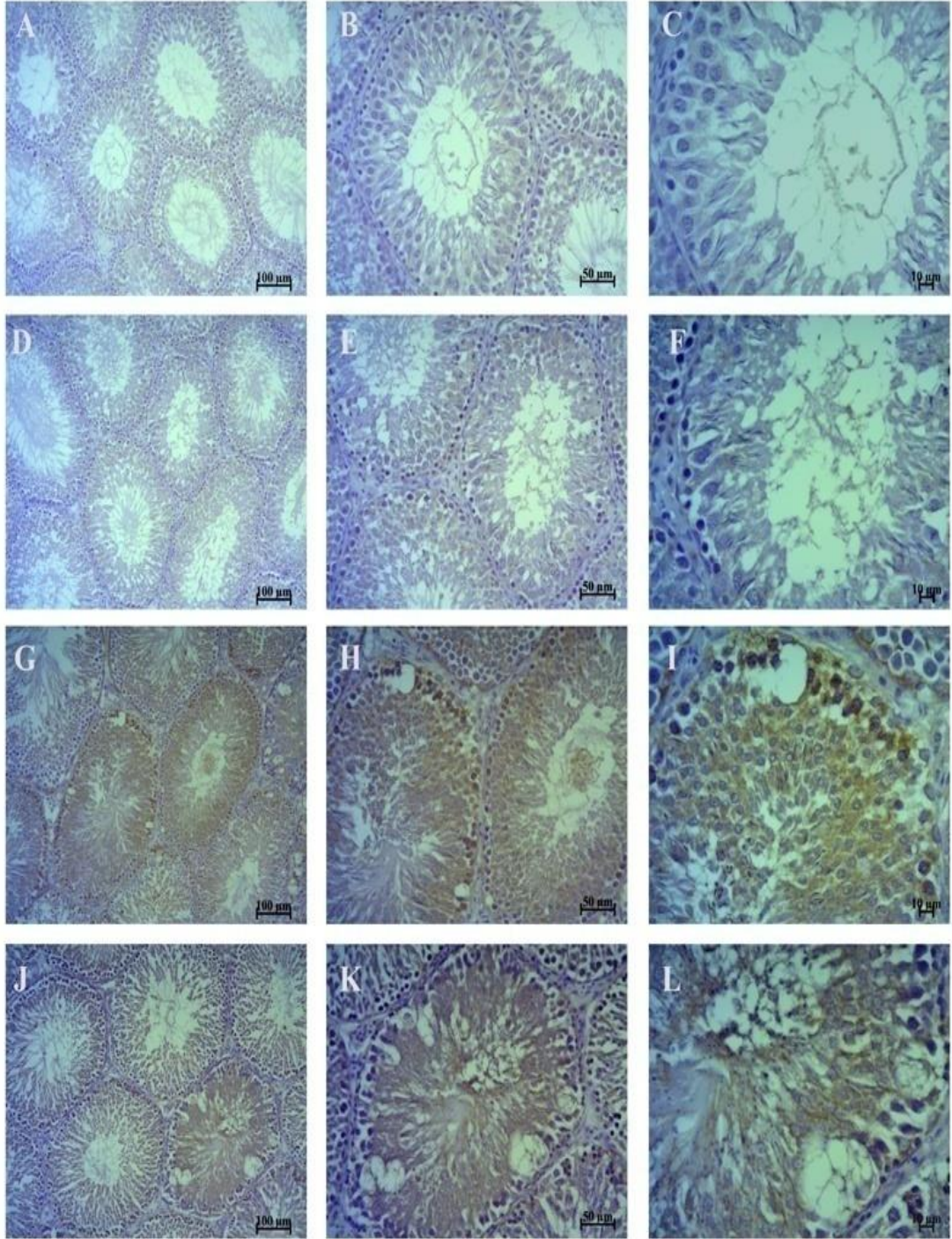
**Grafik 3.** 4. gün kontrol ve deney gruplarına ait Kaspaz-3 immünreaktivitesi için H skor analizi.





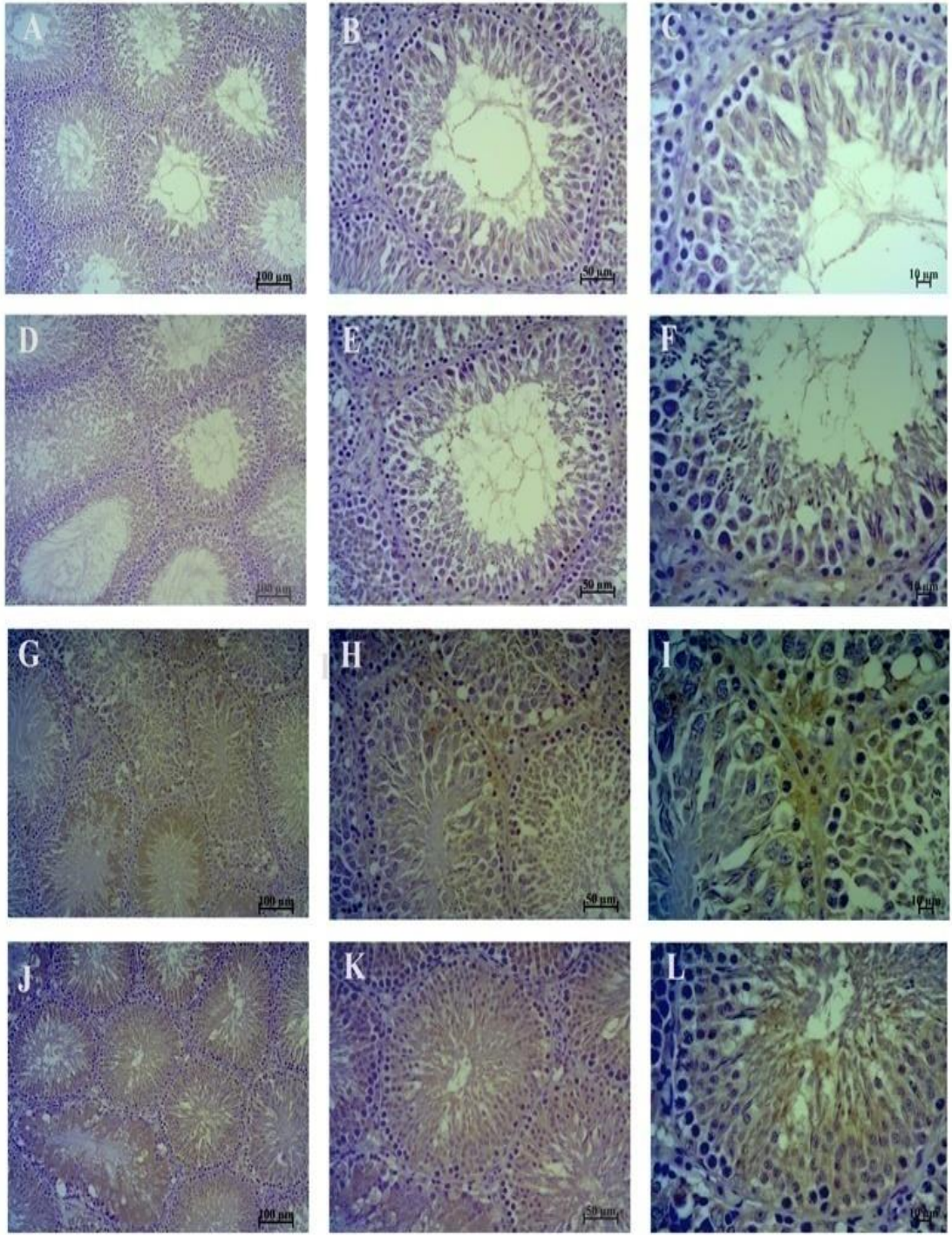
**Şekil 17.** 4. gün kontrol ve deney gruplarının testis seminifer tübüllerinde GRP78/BİP ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. (A) Kontrol x10, (B) Kontrol x20, (C) Kontrol x40, (D) Shilajit x10, (E) Shilajit x20, (F) Shilajit x40, (G) TM x10, (H) TM x20, (I) TM x40, (J) TM+Shilajit x10, (K) TM+Shilajit x20, (L) TM+Shilajit x40.





**Şekil 18.** 4. gün kontrol ve deney gruplarının testis seminifer tübüllerinde CHOP ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. (A) Kontrol x10, (B) Kontrol x20, (C) Kontrolx40, (D) Shilajit x10, (E) Shilajit x20, (F) Shilajit x40, (G) TM x10, (H) TM x20, (I) TM x40, (J) TM+Shilajit x10, (K) TM+Shilajit x20, (L) TM+Shilajit x40.

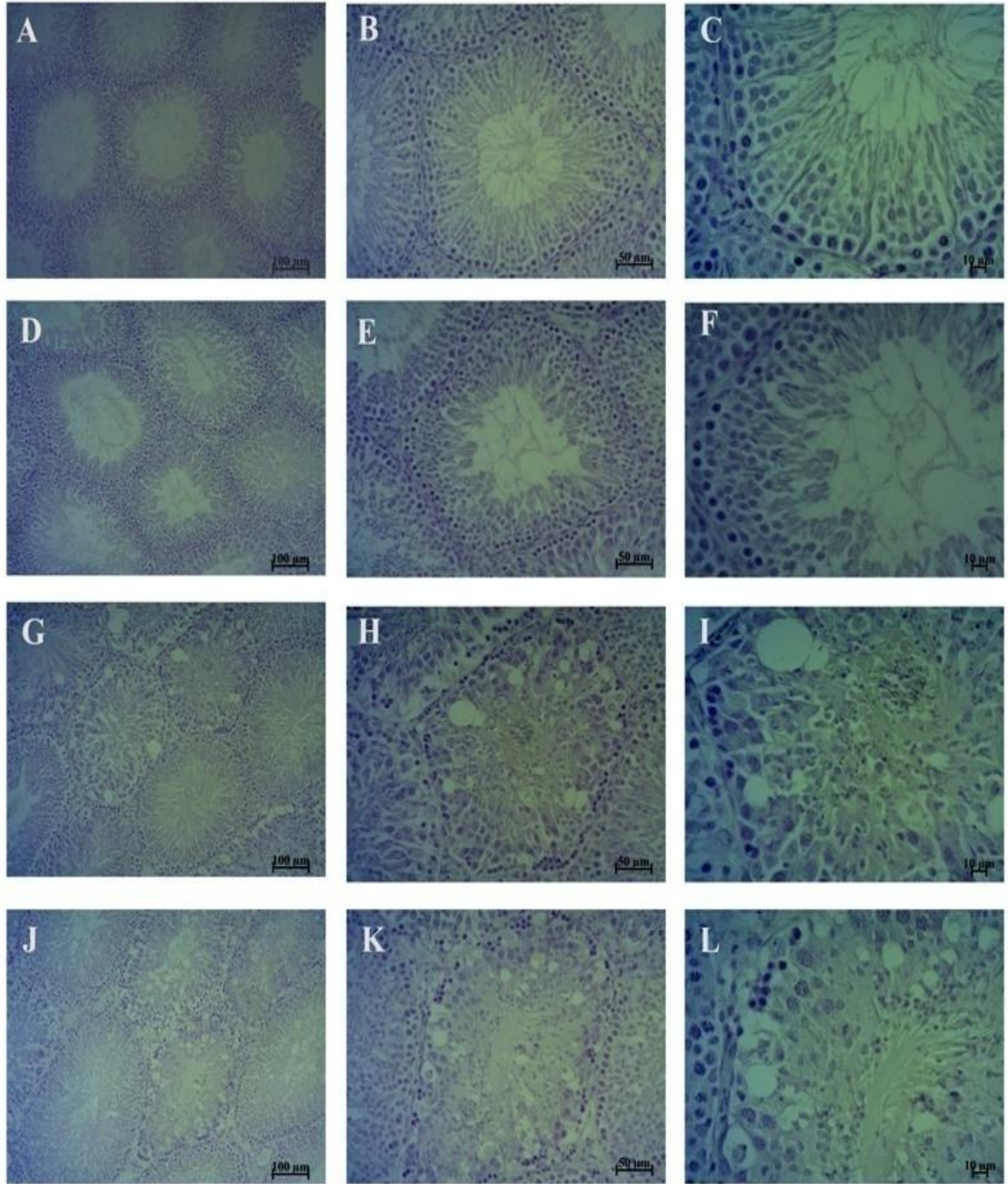




**Şekil 19.** 4. gün kontrol ve deney gruplarının testis seminifer tübülllerinde Kaspaz-3 ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. (A) Kontrol x10, (B) Kontrol x20, (C) Kontrolx40, (D) Shilajit x10, (E) Shilajit x20, (F) Shilajit x40, (G) TM x10, (H) TM x20, (I) TM x40, (J) TM+Shilajit x10, (K) TM+Shilajit x20, (L) TM+Shilajit x40.



#### 4.2.2. Dördüncü gün kontrol ve deney gruplarına ait negatif kontrol görüntüleri



**Şekil 20.** 4. gün kontrol ve deney gruplarının negatif kontrol görüntüleri. (A) Kontrol x10, (B) Kontrol x20, (C) Kontrolx40, (D) Shilajit x10, (E) Shilajit x20, (F) Shilajit x40, (G) TM x10, (H) TM x20, (I) TM x40, (J) TM+Shilajit x10, (K) TM+Shilajit x20, (L) TM+Shilajit x40.

### 4.3. Dördüncü Gün Kontrol ve Deney Gruplarında Spermatogenezin Cosentino Skoru ile Değerlendirilmesi

Testiste TM'e bağılı olarak gerçekleşen ER stresinin, seminifer tübül duvarında spermatogenezde meydana gelen morfolojik değişimleri ve Shilajit'in koruyucu kullanımına bağılı olarak ortaya çıkabilecek muhtemel iyileşmeyi değerlendirmek amacıyla boyanmış H+E testis preparatları üzerinde, Cosentino kriterlerine göre semikantitatif bir skorlama yaptık (0: hasar yok, 1: hafif hasar, 2:orta hasar, 3: şiddetli hasar, 4: çok şiddetli hasar). (Tablo 4).

İstatistiksel analiz sonucunda, ikili kıyaslamalarda, kontrol ve Shilajit grubu arasında, Shilajit ve TM+Shilajit grubu arasında, TM+Shilajit ve TM grubu arasında Cosentino skorunun anlamlı farklılık göstermediğini tespit ettik. Kontrol ve TM+Shilajit grubu arasında, kontrol ve TM grubu arasında, Shilajit ve TM grubu arasında anlamlı farklılığın olduğunu tespit ettik ( $p<0.001$ ). Kontrol grubu, TM grubu ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde azalmanın olduğunu tespit ettik. Kontrol grubu TM+Shilajit grubu ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde azalmanın olduğunu saptadık. Shilajit grubu, TM grubu ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde azalmanın olduğunu saptadık.

Ek olarak ödem ve hemoraji bakımından gruplar istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığını saptadık ( $p>0.05$ ).



**Tablo 4.** 4. gün kontrol ve deney gruplarına ait Cosentino skor analizleri.

Gruplar		Kontrol (n=8)	Shilajit (n=8)	Tunikamisın (n=8)	Tunikamisın+ Shilajit (n=8)	p	
Cosentino Kriterleri	Semifer Tübül	Spermatozoa ve spermatid kaybı	0.00 (0-0) <sup>a</sup>	0.00 (0-3) <sup>b</sup>	3.00 (0-3)	1.50 (1-2)	<0.001
		Germ hücre tabakasının yokluğu	0.00 (0-0) <sup>a</sup>	0.00 (0-2) <sup>b</sup>	2.00 (0-2)	1.00 (1-1)	<0.001
		Germ hücre tabakalarının dejenerasyonu	0.00 (0-0) <sup>a</sup>	0.00 (0-4) <sup>b</sup>	4.00 (0-4)	1.00 (1-2)	<0.001
		Germ hücre tabakalarının düzensizleşmesi	0.00 (0-0) <sup>a</sup>	0.00 (0-4) <sup>b</sup>	4.00 (0-4)	1.00 (1-2)	<0.001
	İntersfisyum	Ödem	1.00 (0-1)	1.00 (0-1)	1.00 (1-1)	1.00 (0-1)	0.264
		Hemoraji	0.00 (0-0)	0.00 (0-0)	0.00 (0-1)	0.00 (0-1)	0.559

Veriler ortanca (minimum-maksimum) olarak verilmiştir.

p<0.05 olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

<sup>a</sup>p<0.05 TM ve TM+Shilajit grubu ile kıyaslandığında.

<sup>b</sup>p<0.05 TM grubu ile kıyaslandığında.

#### 4.4. Dördüncü Gün Kontrol ve Deney Gruplarında FSH, LH ve Testosteron Değerlerinde Meydana Gelen Değişiklikler

Spermatogenezde ve fertilizasyonda büyük öneme sahip FSH, LH ve testosteron değerlerinde meydana gelen değişiklikler ELISA kitleri ile çalışıldı ve elde edilen değerler istatistiksel olarak Tablo 5’te ifade edildi. Gruplara göre FSH, LH, testosteron düzeyleri Grafik 4, Grafik 5 ve Grafik 6’da sunuldu.

FSH düzeyleri Shilajit verilen grupta azalma göstermesine rağmen istatistiksel analiz sonucunda, FSH için ikili kıyaslamalarda kontrol ve TM+Shilajit grubu arasında, kontrol ve TM grubu arasında, Shilajit ve TM+Shilajit grubu arasında, TM+Shilajit ve TM arasında anlamlı farklılığın olmadığını saptadık. Shilajit ve TM grubu arasında, Shilajit ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılığın olduğunu gözlemledik (p=0.001). Shilajit grubu, TM ve kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde bir azalmanın olduğunu saptadık.

LH ve testosteron düzeyleri Shilajit verilen grupta artma göstermesine rağmen istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı farklılığın olmadığını saptadık ( $p>0.05$ ).

**Tablo 5.** 4. gün kontrol ve deney gruplarında FSH, LH ve Testosteron hormon değerlerinde meydana gelen değişimler.

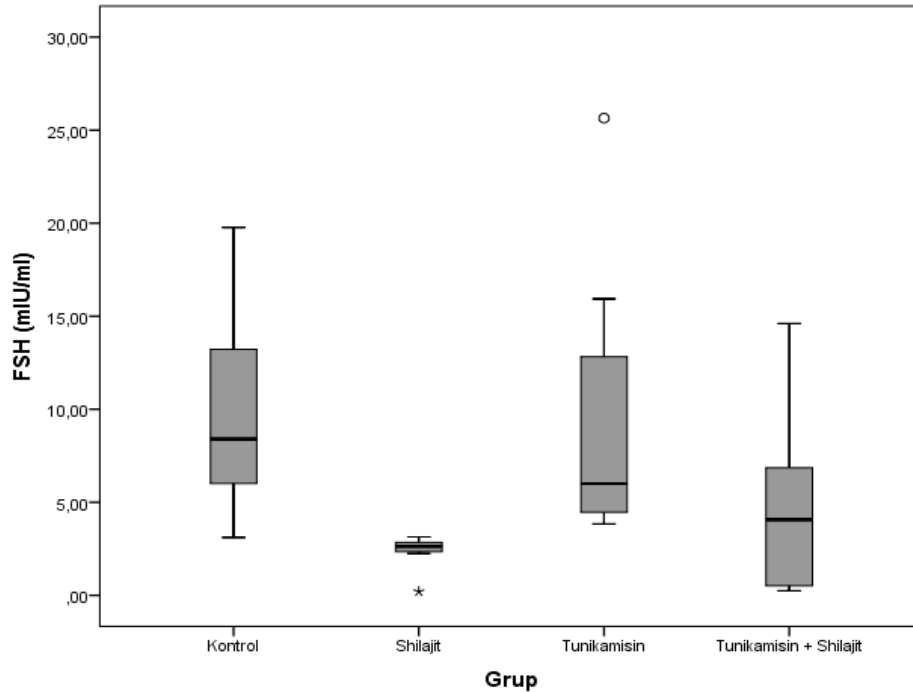
Gruplar	Kontrol n=8	Shilajit n=8	Tunikamisin n=8	Tunikamisin+ Shilajit n=8	p	
Hormon	FSH(mIU/ml)	8.39 (3.10-19.77)	2.62 (0.205-3.14) <sup>a</sup>	6.00 (3.83-25.64)	4.06 (0.249-14.61)	0.001
	LH (mIU/ml)	209.53 (21.14-395.91)	340.48 (210.48-476.80)	188.05 (42.82-426.75)	334.77 (40.35-353.38)	0.264
	Testosteron(nmol/L)	140.97 (47.65-332.52)	240.11 (111.74-378.09)	105.09 (28.88-206.86)	215.96 (28.06- 265.41)	0.068

Veriler ortanca (minimum-maksimum) olarak verilmiştir.

$p<0.05$  olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

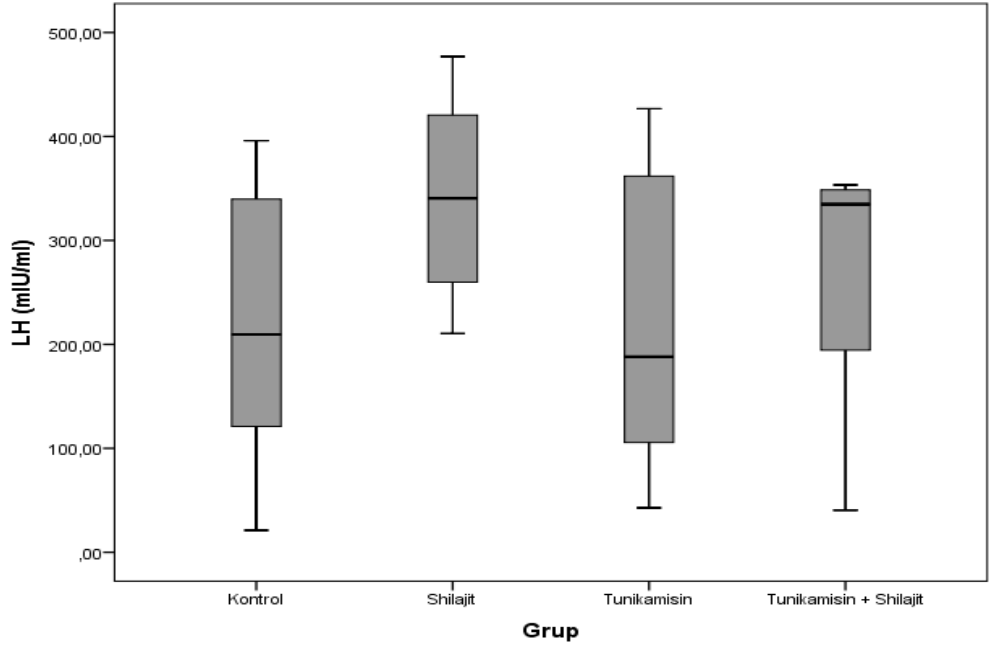
<sup>a</sup> $p<0.05$  TM ve Kontrol grubu ile kıyaslandığına.

**Grafik 4.** 4. gün kontrol ve deney gruplarında FSH hormon değerinde meydana gelen değişimler

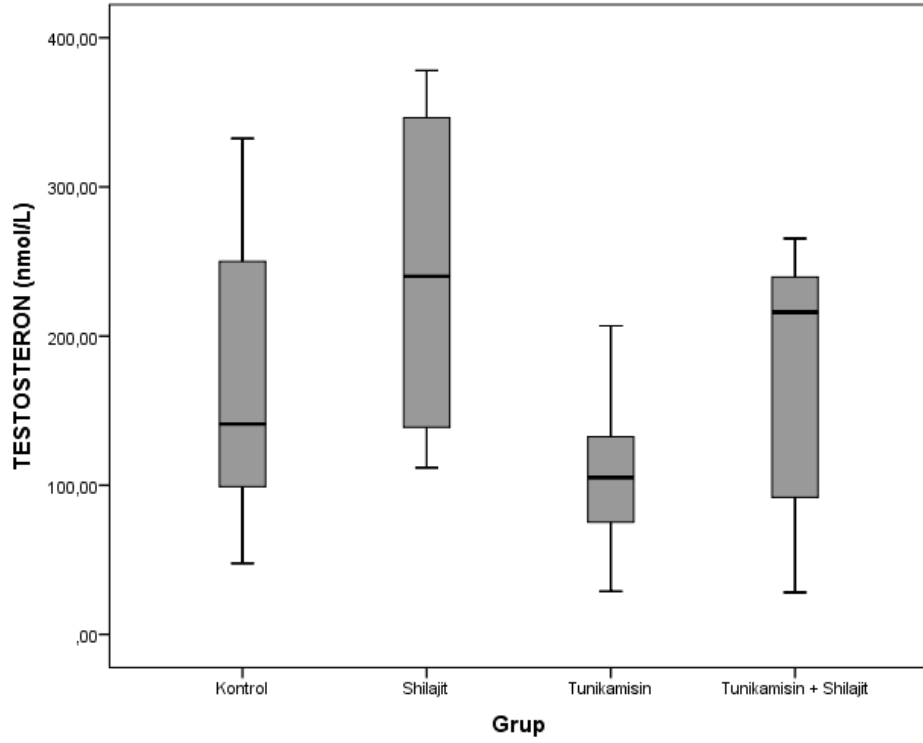


\* Shilajit grubunun kontrol ve TM grubuna göre ( $p<0.05$ ), ° ise TM grubunun Shilajit grubuna göre ( $p<0.05$ ) istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiğini ifade etmektedir.

**Grafik 5.** 4. gün kontrol ve deney gruplarında LH hormon değerinde meydana gelen değişimler



**Grafik 6.** 4. gün kontrol ve deney gruplarında LH hormon değerinde meydana gelen değişimler



#### 4.5. Yirmi Dördüncü Saat Kontrol ve Deney Gruplarında Total Vücut Ağırlığı ve Testis Ağırlığında Meydana Gelen Değişiklikler

Deneyin başlangıcında, TM uygulanmasından 24. saatte sakrifikasyondan hemen önce tartılan deneklerin ağırlıkları istatistiksel olarak analiz edildi ve Tablo 6'da gösterildi.

Sağ ve sol testis ağırlıkları istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı farklılığın olmadığını saptadık ( $p>0.05$ ).

Sağ testis ağırlığı (gr)/100 gr vücut ağırlığı bakımından ikili kıyaslamalarda, kontrol ve Shilajit grubu arasında, kontrol ve TM+Shilajit, kontrol ve TM grubu arasında, TM+Shilajit ve TM grubu arasında anlamlı farkın olmadığını tespit ettik. TM ve Shilajit grubu arasında, Shilajit ve TM+Shilajit grubu arasında anlamlı farkın olduğunu saptadık ( $p=0.005$ ). TM grubu, Shilajit grubu kıyaslandığında anlamlı düzeyde bir azalmanın olduğunu saptadık. Shilajit grubu, TM+Shilajit grubu kıyaslandığında anlamlı düzeyde bir artışın olduğunu tespit ettik.

Sol testis ağırlığı (gr)/100 gr vücut ağırlığı bakımından ikili kıyaslamalarda, kontrol ve Shilajit grubu arasında, kontrol ve TM+Shilajit grubu arasında, kontrol ve TM grubu arasında, Shilajit ve TM+Shilajit grubu arasında, TM+Shilajit ve TM grubu arasında anlamlı fark olmadığını tespit ettik. Sadece Shilajit ve TM grubu arasında anlamlı farkın olduğunu saptadık ( $p=0.016$ ). Shilajit grubu, TM grubu kıyaslandığında anlamlı düzeyde bir artışın olduğunu tespit ettik.

**Tablo 6.** 24. sa kontrol ve deney gruplarının total vücut ağırlığı ve testis ağırlıklarında meydana gelen değişiklikler

Gruplar	Kontrol (n=8)	Shilajit (n=8)	Tunikamisin (n=8)	Tunikamisin+ Shilajit (n=8)	p
Sakrifikasyon denek ağırlığı	370 (341-436)	333 (325-352)	373.50 (353-405)	359.50 (319-395)	
Sağ testis ağırlığı	1.56 (1.37-1.80)	1.57 (1.50-1.81)	1.53 (1.44-1.63)	1.48 (1.29-1.70)	0.319
Sol testis ağırlığı	1.60 (1.38-1.77)	1.56 (1.49-1.61)	1.57 (1.40-1.67)	1.53 (1.30-1.66)	0.761
Sağ testis ağırlığı (gr)/100 gr vücut ağırlığı	0.40 (0.39-0.47)	0.46 (0.45-0.56)*	0.40 (0.36-0.45) <sup>a</sup>	0.41 (0.36-0.44)	0.005
Sol testis ağırlığı (gr)/100 gr vücut ağırlığı	0.40 (0.39-0.48)	0.45 (0.44-0.49) <sup>b</sup>	0.41 (0.38-0.46)	0.42 (0.37-0.46)	0.016

Veriler ortanca (minimum-maksimum) olarak sunulmuştur.

p<0.05 olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

<sup>a</sup>p<0.05 Shilajit grubu ile kıyaslandığında.

<sup>b</sup>p<0.05 TM grubu ile kıyaslandığında.

\*p<0.05 TM+ Shilajit grubu ile kıyaslandığında.

#### 4.6. Dördüncü Gün Kontrol ve Deney Gruplarında Total Vücut Ağırlığı ve Testis Ağırlığında Meydana Gelen Değişiklikler

Deneyin başlangıcında, TM uygulanmasından 4. günde sakrifikasyondan hemen önce tartılan deneklerin ağırlıkları istatistiksel olarak analiz edildi ve Tablo 7’de gösterildi.

Sağ ve sol testis ağırlıkları istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı farklılığın olmadığını saptadık (p>0.05).

Sağ testis ağırlığı (gr)/100 gr vücut ağırlığı bakımından gruplar arasındaki farkın anlamlı olmadığını tespit ettik (p=0.499).

Sol testis ağırlığı (gr)/100 gr vücut ağırlığı bakımından gruplar arasındaki farkın anlamlı olmadığını saptadık (p=0.697).

**Tablo 7.** 4. gün kontrol ve deney gruplarının total vücut ağırlığı ve testis ağırlıklarında meydana gelen değişiklikler

Gruplar	Kontrol (n=8)	Shilajit (n=8)	Tunikamisin (n=8)	Tunikamisin+ Shilajit (n=8)	p
Sakrifikasyon denek ağırlığı	365.50 (330-386)	360.50 (324-383)	314.50 (287-336)	335.00 (312-503)	
Sağ testis ağırlığı	1.63 (1.38-1.77)	1.51 (1.36-1.62)	1.48 (1.23-1.57)	1.63 (1.34-2.15)	0.156
Sol testis ağırlığı	1.68 (1.40-1.78)	1.50 (1.39-1.70)	1.48 (1.22-1.63)	1.63 (1.30-2)	0.100
Sağ testis ağırlığı (gr)/100 gr vücut ağırlığı	0.45 (0.39-0.52)	0.41 (0.36-0.47)	0.45 (0.37-0.53)	0.42 (0.39-0.62)	0.499
Sol testis ağırlığı (gr)/100 gr vücut ağırlığı	0.46 (0.40-0.53)	0.42 (0.37-0.51)	0.44 (0.37-0.55)	0.40 (0.38-0.64)	0.697

Veriler ortanca (minimum-maksimum) olarak sunulmuştur.

$p < 0.05$  olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

#### **4.7. Yirmi Dördüncü Saat ve Dördüncü Gün Kontrol ve Deney Gruplarında Total Vücut Ağırlığı ve Testis Ağırlığında Meydana Gelen Değişikliklerin Karşılaştırılması**

24. saat ve 4. gün kontrol ve deney gruplarına ait deneklerin sakrifikasyon günü total vücut ağırlığı ve testis ağırlıklarında meydana gelen değişikliklerin birlikte karşılaştırılması istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve Tablo 8’de gösterilmiştir.

Kontrol grubu için; sağ testisin 24. saat ile 4. gün ölçümü arasında farkın anlamlı bulunmadığını saptadık ( $p=0.833$ ). Sol testisin 24. saat ile 4. gün ölçümü arasında farkın anlamlı bulunmadığını tespit ettik ( $p=0.484$ ).

Shilajit grubu için; sağ testisin 24. saat ile 4. gün ölçümü arasında farkın anlamlı bulunmadığını saptadık ( $p=0.092$ ). Sol testisin 24. saat ile 4. gün ölçümü arasında farkın anlamlı bulunmadığını tespit ettik ( $p=0.445$ ).

TM grubu için; sağ testisin 24. saat ile 4. gün ölçümü arasında farkın anlamlı bulunmadığını tespit ettik ( $p=0.068$ ). Sol testisin 24. saat ile 4. gün ölçümü arasında farkın anlamlı bulunduğunu saptadık ( $p=0.017$ ). 4. gündeki ölçümün, 24. saatteki ölçüme göre anlamlı derecede düşük olduğunu tespit ettik.

TM+Shilajit grubu için; sağ testisin 24. saat ile 4. gün ölçümü arasında farkın anlamlı bulunmadığını saptadık ( $p=0.161$ ). Sol testisin 24. saat ile 4. gün ölçümü arasında farkın anlamlı bulunmadığını tespit ettik (0.161).

**Tablo 8.** 24.sa ve 4. gün kontrol ve deney gruplarının total vücut ağırlığı ve testis ağırlığında gözlenen değişikliklerin karşılaştırılması

		24. Saat	4.Gün	p	
Kontrol	n=8	Sakrifikasyon Denek Ağırlığı	370 (341-436)	365.50 (330-386)	0.833
		Sağ Testis Ağırlığı	1.56 (1.37-1.80)	1.63 (1.38-1.77)	
		Sol Testis Ağırlığı	1.60 (1.38-1.77)	1.68 (1.40-1.78)	
Shilajit	n=8	Sakrifikasyon Denek Ağırlığı	333 (325-352)	360.50 (324-383)	0.092
		Sağ Testis Ağırlığı	1.57 (1.50-1.81)	1.51 (1.36-1.62)	
		Sol Testis Ağırlığı	1.56 (1.49-1.61)	1.48 (1.22-1.63)	
Tunikamisin	n=8	Sakrifikasyon Denek Ağırlığı	373.50 (353-405)	314.50 (287-336)	0.068
		Sağ Testis Ağırlığı	1.53 (1.44-1.63)	1.48 (1.23-1.57)	
		Sol Testis Ağırlığı	1.57 (1.40-1.67)	1.48 (1.22-1.63) <sup>a</sup>	
Tunikamisin + Shilajit	n=8	Sakrifikasyon Denek Ağırlığı	359.50 (319-395)	335 (312-503)	0.161
		Sağ Testis Ağırlığı	1.48 (1.29-1.70)	1.63 (1.34-2.15)	
		Sol Testis Ağırlığı	1.53 (1.30-1.66)	1.63 (1.30-2)	

Veriler ortanca (minimum-maksimum) olarak sunulmuştur.

p<0.05 olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir

<sup>a</sup>p<0.05 TM grubu 24. saatteki ölçüm ile kıyaslandığında.

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, endoplazmik retikulum stresine bağlı testis seminifer tübüllerinde meydana gelen apoptozis ile infertilite arasındaki ilişki, Shilajit'in Endoplazmik retikulum stresini baskılayarak apoptozis ve infertiliteyi önlemedeki ve tedavideki etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda deneyin 1. günü tek doz 200 µg/ kg Tunikamisın (TM) s.c. yoldan uygulanmış olup, 24. saat ve 4. gün sonra deneklerden elde edilen testis dokusunun öncelikle genel morfolojisi değerlendirilmiş, ardından 4. gün deneklerinden elde edilen testis dokusunda, TM indüklü endoplazmik retikulum (ER) stresine bağlı seminifer tübüllerdeki hasar Cosentino skoru ile semikantitatif olarak analiz edilmiştir. Aynı zamanda yine 4. gün grubundan elde edilen testis dokusunda, seminifer tübül hücrelerindeki ER stresinin varlığı, GRP78/BİP immünreaktivitesindeki değişiklikler ile değerlendirilmiş olup aynı zamanda CHOP ve Kaspaz-3 immünreaktivitesindeki değişiklikler de araştırılmıştır. Ek olarak 4. günü sakrifiye edilen deneklerin kardiyak kan örneklerinde total LH, FSH ve testosteron düzeyleri ELISA kitleri ile incelenmiştir. Ayrıca bu süreçte deneyin 1. günü antioksidan olarak oral yoldan gün aşırı uygulanmaya başlayan Shilajit'in (100 mg/kg) etkinliği araştırılmıştır.

ER stresi uyarıcısı olan TM, ökaryotik hücrelerde oligosakkarit zincirlerinin proteinlerdeki asparagin gruplarına bağlanması için etkili olan dolikol N-asetilglukozamin disülfid sentezini durdurmaktadır (9, 12, 59, 74, 75). Böylece hücrelerde N-glikozilasyonu inhibe ederek ER stresine neden olur (90, 91). Bir N-glikozilasyon inhibitörü olan TM, katlanmamış protein yanıtına neden olduğundan dolayı ER stresinin farmakolojik indükleyicisi olarak birçok biyolojik çalışmada yaygın olarak kullanılmaktadır (6, 10, 62, 90, 92).

ER stresi ile ilgili deneysel çalışmalarda, TM dışında farklı stres ajanları da kullanılmaktadır. Örneğin; Ji ve ark. (8), testiste germ hücrelerinin apoptozisini ve ER stresini tetikleyen farklı bir uyarıcı toksik madde olan Kadmiyum ile yapmış olduğu çalışmada, erkek farelere (i.p.) olarak 2.0 mg/kg Kadmiyum klorür uygulamış olup Askorbik asit'in ER stresi ve UPR'yi inhibe ederek testis germ hücrelerinin apoptozisten korunduğunu gözlemlemişlerdir

Gong ve ark. (7), farklı bir ER stresi ajanı Nonilfenol ile Sertoli hücre kültüründe yaptıkları çalışmada, ER stresi, hücrede morfolojik değişiklikler, apoptoziste artış ve canlılığın azalması gibi bulguları göstermişlerdir.



Kim ve ark. (93), C57BL/6 farelerde, günde 42 °C'de 15 dk uyguladıkları üç ya da beş çevrim testiküler hipertermi işlemi ile oluşturdukları ER stresi çalışmasında, Leydig hücrelerinin apoptozisi sonucu testosteron üretiminin azaldığını saptamışlardır. Ayrıca GRP78/BİP ve CHOP seviyelerinde artış, steroidojenik enzim ve progesteron düzeylerinde azalma gözlenmiştir.

Tabuchi ve ark. (94), fare testiküler Sertoli hücre kültüründe, ER stresine eşlik eden hücre hasarda rol oynayan mekanizmaları saptamak için yaptıkları gen ağı analizinde, ER stresi ajanı olarak endokrin bozucu bir kimyasal olan Bisphenol A kullanmışlardır.

Chung ve ark. (95), sıçan kortikal nöronal primer hücre kültürü ile yapmış oldukları çalışmada, ER stresini uyarmak için Thapsigargin uygulaması yapmışlardır.

Zhang ve ark. (96), rat bağırsak epitel hücrelerinde (IEC-6) yapmış oldukları çalışmada, 10 Gy ışınlama yaparak ER stresini uyarmışlardır. Işınlanmış hücrelerde, ATF6'nın aktif formunun önemli bir değişiklik göstermediği fakat PERK ve IRE1 sinyal yollarının bu tür ER stresine ilişkili olduğunu bulmuşlardır.

Balcan ve ark. (13), TM'in embriyonik dönemin 17. günü ile 1. ve 3. postnatal günlerine ait fare dalak dokularına etkisinin araştırıldığı çalışmada, ekstrasellüler matriks (ECM) bileşenlerinin glikozilasyonunun, hücre-hücre ve hücre-ECM etkileşimlerinin düzenlenmesinde önemli olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca TM uygulamasından kaynaklı glikozilasyon değişiminin ya da eksikliklerinin, gelişen dalak dokularında apoptotik etkiler oluşturduğu ve apoptotik hücre sayısını artırdığını belirtmişlerdir.

Shen ve ark. (64), TM ile yaptıkları çalışmada, ER stresi ile uyarılan primer kültürdeki yenidoğan sıçan kardiyomyositlerinde apoptozisi araştırmışlardır.

Lu ve ark. (97), sıçan dorsal kök ganglion nöronlarında, in vitro ortamda ER stresini oluşturmak için TM kullanmışlardır. ER stresinin aktivasyonu sonucu rat dorsal kök ganglion (DRG) nöronlarında apoptoz ve mikondriyal disfonksiyon meydana gelmiştir ve nörotoksite, nöro-inflamasyona karşı Isoquercetin'in düzenleyici etkinliği araştırılmış ve apoptoz yollarında konsantrasyona bağlı koruyucu bir rolü olduğu rapor edilmiştir.

Jang ve ark. (91), TM ile uyarılan ER stresinin, osteoblast farklılaşmasında sorumlu olan BMP-2 (Kemik morfojenik protein 2) üzerindeki negatif etkisini göstermişlerdir. Yaptıkları bu çalışmada TM, osteoblast hücrelerinde CREBH (Siklik AMP (cAMP) yanıt elementini bağlayıcı protein H) aktivasyonu seviyesini ve

mRNA ekspresyonunu artırmıştır. Buna ek olarak TM ile artmış CREBH ekspresyonunun, osteoblastlarda ALP (Alkalin fosfotaz) ve OC (Osteokalsin) gibi gen ekspresyonlarını düzenleyerek BMP-2'ye bağlı osteoblast farklılaşmasını etkileyip etkilemediğini incelemişlerdir. Sonuç olarak; TM ile indüklenen ER stresinin osteoblast farklılaşmasını baskıladığını bulmuşlardır.

Tanaka ve ark. (98), TM ile indüklenen ER stresini nöroblast hücre kültüründe yaptıkları çalışmada göstermiş ve bu hücrelerde indüklenen sitotoksosite üzerine genipin maddesinin koruyucu etkinliğini saptamışlardır.

Nugent ve ark. (99), sığır dizinden izole edilen kondrosit hücre kültüründe yaptıkları bir çalışmada ER stresi indükleyicisi olarak TM ve Thapsigargin kullanmışlardır. Ayrıca glukoz yoksunluğunun da ER stresi yanıtı oluşturduğunu GRP78 ve GADD153 ekspresyon düzeylerine bakarak gözlemlemişlerdir. Çalışmanın sonucunda ekstrasellüler matriks varlığının, ER stresörlerinden koruma sağladığı bulunmuştur.

Seo ve ark. (100), rat hepatoma hücre kültürü ile yaptığı çalışmada, ER stresinin hepatik glukoneogenezi etkileyip etkilemediğini incelemek için ER stresi indükleyicisi olarak TM ve Thapsigargin kullanmıştır. Çalışma sonucunda karaciğerde artan ER stresinin hepatik glukoz metabolizmasını bozduğu öne sürülmüştür.

Güzel ve ark. (14), 38 fertil kadından histerektomi ya da laparoskopi sırasında elde ettikleri endometriyum dokusunu kültüre ettikten sonra yaptıkları çalışmada, UPR anahtar proteini olan HSPA5 ile östrojen sinyali arasındaki çift yönlü etkileşimi incelemişlerdir ve ER stresi ajanı olarak TM kullanmışlardır.

Inokuchi ve ark. (101), sıçan gangliyon hücre hattında yaptıkları çalışmada, ER stresi kaynaklı retinal hücre ölümünü değerlendirmişlerdir ve bir moleküler şaperon olan GRP78/BİP 'in indükleyici etkisini incelemişlerdir. Bunun için çalışmalarında ER stresi uyarıcı olarak TM kullanmışlardır.

Arslan ve ark. (74), farelerde 16, 17 ve 18 günlük embriyonik, 1 ve 3 günlük postnatal dönemlerde gelişmeye başlayan timus ve dalak dokularında apoptozisi, glikozaminoglikanlardaki ve laminindeki değişiklikleri değerlendirmek için yaptıkları çalışmada bir antibiyotik grubu olan TM'i kullanmışlardır. Çalışma sonucunda TM uygulaması ile apoptozisin arttığını TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) yöntemiyle saptamışlardır.

Sylvester ve ark. (102), sıçan Sertoli hücre kültürü ile yaptıkları çalışmada, TM uygulamasının Sertoli hücreleri tarafından salgılanan dimerik asidik glikoprotein (DAG-protein) sentezine etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak; TM varlığında salgılanan DAG-protein polipeptitlerinin N-glikozilasyonunun olmadığı saptanmıştır. Peterson ark. (76), 12 haftalık sıçanlar üzerinde yaptığı bir çalışmada, 133 µg/kg, 200 µg/kg, 300 µg/kg ve 350 µg/kg olarak tek doz s.c. TM enjeksiyonu yapmış ve 200 µg/kg 'dan düşük dozların herhangi bir toksik etki oluşturmadığı, 200 µg/kg ve üzeri dozların ise dokuda hasara ve öldürücü etkiye neden olduğunu gözlenmiştir. Testis ağırlıklarında ise doza bağlı olarak farklılıklar saptanmıştır. 133 µg/kg TM verilen grupta testis ağırlıkları kontrol grubuna göre kıyaslandığında önemli bir farklılık bulunmamıştır. Fakat 200 µg/kg ve 300 µg/kg TM verilen gruplarda testis ağırlıkları kontrol grubundan %38 ve %59 daha düşük olarak gözlenmiştir. Ayrıca enjeksiyondan sonra seminifer tübül epitelinde, 3. ve 5. günlerde hasarın başladığını ve 19. günden sonra da hasarın daha fazla olduğunu (%95) belirtmişlerdir. Bunlara ek olarak 56. günde sadece Sertoli hücrelerinin (%95) hayatta kaldığını gözlemlemişlerdir. Fakat yaptığımız çalışmada 24. saat ve 4. gün TM verilen gruplarda testis ağırlığı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

TM etkisi, farklı dokularda da araştırılmıştır. Arslan ve ark. (74), TM'nin embriyonik ve yenidoğan fare lenfoid dokularında etkisini incelemiş ve sonuç olarak apoptozisin gelişen dalak dokularında TM uygulaması ile arttığını TUNEL yöntemi ile göstermiştir. Ek olarak laminin moleküllerinin ekspresyonlarının TM uygulamasıyla azaldığını immünoblotting analizler ile belirlemişlerdir. Ayrıca TM uygulaması yapılan gruplarda hücreler arası alanların genişlediği saptanmıştır.

Bu bilgiler ışığında yaptığımız çalışmada, ER stresinin sıçanlarda testis seminifer tübül hücrelerine verdiği hasarı incelemek için pek çok deneysel çalışmada olduğu gibi bizde ER stresinin indüklenmesinde, TM kullanmayı tercih ettik.

ER, hücrede lipit ve proteinlerin sentezinden, katlanmasından ve  $Ca^{+2}$  homeostazından sorumlu bir organeldir. ER'de katlanmamış ya da hatalı katlanmış proteinlerin artması ve birikmesi neticesinde, ER homeostazında değişiklikler meydana gelmektedir. Bu durum ER fonksiyonlarının bozulmasına dolayısı ile ER stresine neden olmaktadır. Bu stresin ortadan kaldırılması ve homeostazın tekrar sağlanabilmesi için, katlanmamış protein cevabı (UPR) olarak bilinen sinyal yolağı aktive olmaktadır. Eğer ki UPR hücresel stresi ortadan kaldıramaz ve homeostaz

sağlanamazsa hücreler apoptozise yönlendirilmektedir. Katlanmamış proteinlerin birikimi hücreler için toksik etki oluşturmakta ve hücreye zarar vermektedir. Katlanmamış proteinler, protein kümelerini meydana getirmeye eğilimli olan ve protein içerisinde yer alan hidrofobik aminoait kalıntılarını ortaya çıkarmaktadır. Toksik etkiye sahip bu protein kümelerinin pek çok hastalıkla ilişkisinin olduğu bilinmektedir. Parkinson, Alzheimer ve Huntington gibi nörodejeneratif hastalıklar ve obezite, Tip 2 Diyabet (55) gibi metabolik hastalıklar, Arteriosklerozis, kanser gibi hastalıklar ER stresi ile ilişkilendirilmiştir (12, 103).

ER stresinin testis seminifer tübül hücrelerinde oluşturduğu hasarı araştırmak, spermatogenez üzerindeki etkisini irdelemek ve de ER stresinin infertilite ilişkisini açıklamak amacıyla son yıllarda pek çok araştırmalar yapılmaktadır (12, 104, 105).

Farklı ajanlar ile oluşan ER stresinin infertiliteye sebep olduğu bildirilmiştir. Özellikle son yıllarda artan infertilite oranları ve sperm kalitesinde meydana gelen düşüş nedeniyle ER stresi üzerinde araştırmalara yoğunlaşmıştır (105).

İnfertilite, evrensel bir sorundur. Dünyada infertilite oranı %8-12 iken (106) bu oran Türkiye'de %10-20 arasında değişmektedir (105). Özellikle son dönemlerde infertilite kliniklerine başvuran hastaların tüm tetkikleri normal çıkmasına rağmen gebelik olmaması durumunda, bu hastalara nedeni açıklanamayan infertilite tanısı konulmaktadır. Açıklanamayan infertilite oranı ise %22-28 arasında değişmektedir (107).

Ji ve ark. (108), yetişkin CD-1 fareleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada Kadmiyum ile uyarılan ER stresinin, testiküler germ hücre apoptozisini tetiklediğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca ER stresi indükleyici olarak çalışmalarda kullanılan Nonilfenol'ün, kronik sulu maruziyetinin erişkin medekada (*Oryzias latipes*) Sertoli hücre apoptozisini artırdığı bildirilmiştir (109).

Yapılan ER stresi çalışmalarında genellikle GRP78/BİP, CHOP ve Kaspaz-3 seviyelerine bakılarak çalışmanın ER stresi ile ilişkisi irdelenmiştir (1, 110).

Güzel ve ark. (14), insan endometriyumunda yapmış oldukları çalışmada ER stresini, GRP78/BİP immünoreaktivitesi ile göstermişlerdir.

Gong ve ark. (111), Sertoli hücre kültüründe yaptıkları çalışmada Western blot ve GRP78/BİP ekspresyonu tayini yaparak, ER stresinin verilen Nonilfenol dozuna bağlı olarak artış gösterdiğini bulmuşlardır.

Demirkıran ve ark. (12), TM indüklü ER stresinin sıçan testiküler dokusu üzerindeki etkisini göstermek için yaptıkları çalışmada, GRP78/BİP

immünohistokimya işaretlemesini ER stresini göstermek amacıyla yapmış ve sonuç olarak en güçlü immün reaksiyonu 21 gün grubunda gözlemlemişlerdir.

Bizde çalışmamızda, ER stresini belirlemek amacıyla 4. gün grubu deneklerden elde ettiğimiz testis kesitlerine GRP78/BİP immünohistokimya işaretlemesi yaparak GRP78/BİP 'in ekspresyon düzeylerini H skor analizi ile değerlendirdik. Yapılan istatistiksel analizlere göre ikili karşılaştırmalar sonucunda, kontrol ve Shilajit grubu arasında, kontrol ve TM+Shilajit grubu arasında, TM+Shilajit ve TM grubu arasında H skorun anlamlı bir farklılık göstermediğini saptadık. Shilajit ve TM+Shilajit grubu arasında, Shilajit ve TM grubu arasında, kontrol ve TM grubu arasında H skorun anlamlı farklılık gösterdiğini saptadık ( $p<0.001$ ). Bu bulguların TM'e bağli meydana gelen ER stresini ve sonucunda oluştüküler hücresel hasarın şiddetini belirgin olarak ortaya koyduğunu düşünmekteyiz. Shilajit'in (TM+Shilajit grubu) antioksidan kullanımı da GRP78/BİP immünoaktivitesi açısından tedavisiz (TM grubu) gruba kıyasla anlamlı fark yaratmamıştır. TM+Shilajit grubunda yer alan deneklerimizin gerek morfolojik gerekse de histopatolojik bulguları kullandığımız dozun beklenen koruma ve iyileşmeyi sağlayamadığını göstermektedir.

Zhang ve ark. (110), uzun süreli aşırı florür maruziyetinin, erkek üreme sistemi üzerindeki toksik etkisinin altında yatan moleküler mekanizmayı araştırmak üzere yaptıkları çalışmada, ER stresi ve inflamatuvar yanıtın rolünü değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak florür maruziyetinin MDA birikimini artırdığını, SOD aktivitesini azalttığını ve bununla birlikte germ hücre apoptozisini de artırdığını bulmuşlardır. Aynı zamanda florürün, mRNA, GRP78/BİP, IRE1 ve CHOP seviyelerini artırması, ER stres sinyalinin aktivasyonunu göstermiştir. Bu durum spermatogonialarda hasar, spermatositlerin azalması, uzun spermatidlerin yokluğu gibi histopatolojik lezyonlar ile hem de testislerde ciddi ultrastrüktürel anormallikler ile ilişkilendirilmiştir. Bu sebepten dolayı bizde çalışmamızda TM maruziyetinin meydana getirdiği ER stresini açıklamak ve testiküler apoptoz ile ilişkilendirmek amacıyla 4. gün grubu deneklerden elde ettiğimiz testis kesitlerine CHOP immünohistokimya işaretlemesi yaparak CHOP'un ekspresyon düzeylerini H skor analizi ile değerlendirdik. CHOP immünoaktivitesi için gruplar arasındaki ikili kıyaslamalarda, kontrol ve Shilajit grubu arasında, kontrol ve TM+Shilajit grubu arasında, Shilajit ve TM+Shilajit grubu arasında, TM+Shilajit ve TM grubu arasında H skorun anlamlı farklılık göstermediğini saptadık. Kontrol ve TM grubu arasında

Shilajit ve TM grubu arasında H skorun anlamlı farklılık gösterdiğini saptadık (p=0.001).

Bu bulguların TM'e bağlameydana gelen ER stresini ve sonucunda oluşantestiküler hücresel hasarın şiddetini belirgin olarak ortaya koyduğunu düşünmekteyiz. Shilajit'in (TM+Shilajit grubu) antioksidan kullanımı da CHOP immünoreaktivitesi açısından tedavisiz (TM grubu) gruba kıyasla anlamlı fark yaratmamıştır. TM+Shilajit grubunda yer alan deneklerimizin gerek morfolojik gerekse de histopatolojik bulguları kullandığımız dozun beklenen koruma ve iyileşmeyi sağlayamadığını göstermektedir.

Kim ve ark. (1), testislerin sıcaklığa duyarlı olmasından yola çıkarak testis hipertermisinden 12 saat sonra sakrifiye edilen C57/BLR farelerinde yaptıkları çalışmada, heat shock gibi ER stresini destekleyen koşulların UPR ile ilişkisini açıklamaya çalışmıştır. ER stresi altında, UPR yolaklarının testiküler hipertermi (43°C, 15 dk/gün, üç ya da beş döngü) ile spermatogenez altında yatan moleküler mekanizmayı araştırmak için, ER stresine bağlı apoptozu CHOP, fosfo-JNK, Kaspaz-3 ile göstermişlerdir. Sonucunda anti-apoptotik fosfo-JNK (p54) düzeyi üç hipertermi döngüsünden kademeli olarak azalmış, CHOP ekspresyonu ise artmıştır. Beş hipertermi döngüsünden sonra ise Kaspaz-3 ve TUNEL-pozitif apoptotik spermatozoidlerin seviyesi artmıştır. Bu durum testiküler hiperterminin UPR sinyal yolunu indüklediği ve tekrarlanan hipertermi sikluslarının, spermatozoidlerin apoptozisine yol açtığını göstermiştir.

Bizde çalışmamızda TM maruziyetinin meydana getirdiği ER stresini açıklamak ve testiküler apoptoz ile ilişkilendirmek amacıyla 4. gün grubu deneklerden elde ettiğimiz testis kesitlerine Kaspaz-3 immünohistokimya işaretleme yapılarak Kaspaz-3'ün ekspresyon düzeylerini H skor analizi ile değerlendirdik. Kaspaz-3 immünoreaktivitesi içingruplar arasındaki ikili kıyaslamalarda, kontrol ve Shilajit grubu arasında, kontrol ve TM+Shilajit grubu arasında, Shilajit ve TM+Shilajit grubu arasında, TM+Shilajit ve TM grubu arasında H skorun anlamlı farklılık göstermediğini saptadık. Kontrol ve TM grubu arasında, Shilajit ve TM grubu arasında H skorun anlamlı farklılık gösterdiğini saptadık (p<0.001).

Bu bulguların TM'e bağlameydana gelen ER stresini ve sonucunda oluşantestiküler hücresel hasarın şiddetini belirgin olarak ortaya koyduğunu düşünmekteyiz. Shilajit'in (TM+Shilajit grubu) antioksidan kullanımı da Kaspaz-3 immünoreaktivitesi açısından tedavisiz (TM grubu) gruba kıyasla anlamlı fark

yaratmamıştır. TM+Shilajit grubunda yer alan deneklerimizin gerek morfolojik gerekse de histopatolojik bulguları kullandığımız dozun beklenen koruma ve iyileşmeyi sağlayamadığını göstermektedir.

ER stresinin testis germ hücre apoptozisine neden olduğu kanıtlandıktan sonra, günümüzde antioksidanların koruyucu etkisini araştırmak üzere çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Li ve ark.(8), 8 haftalık yetişkin CD-1 farelere periton içerisine, tek doz testiküler toksik etkiye sahip 2.0 mg/kg Kadmiyum klorür (i.p.) olarak enjekte edilmiş ve antioksidan olarak her 8 saatte bir, intraperitoneal olarak 100 mg/kg askorbik asit enjeksiyonu yapılmıştır. Enjeksiyondan 24 saat sonra tübül başına düşen apoptotik hücre sayısının arttığını TUNEL yöntemiyle göstermişlerdir. Sonuç olarak askorbik asidin, fareleri Kadmiyum ile tetiklenen testis germ hücre apoptozisinden koruduğunu ER stresi ve UPR'yi inhibe ederek göstermişlerdir.

Bizde çalışmamızda Shilajit ve TM+Shilajit gruplarındaki deneklere, iyi bir antioksidan, antidiabetik, antialerjik, antiülserojenik, immünomodülatör, antiinflamatuvar, spermatojenik ve oojenik etkileri bulunan Shilajit'i deneyin ilk günü ve 4. gün boyunca, gün aşırı oral olarak 100 mg/kg dozda uyguladık ve Shilajit'in ER stresine bağlı ortaya çıkan histopatolojik, immünohistokimyasal ve hormon düzeyleri değişiklikleri bakımından nasıl etkilediğini 4. gün grubu deneklerinde araştırdık.

Geleneksel Hint tıbbında kullanımı çok eskilere uzanan Shilajit'in kökenini açıklayan günümüzde jeolojik, biyolojik ve biyo-mineralojik olarak üç teori bulunmaktadır. Ayurveda'ya göre ise Shilajit, hayvansal ya da bitkisel bir ürün değil, sıcak bölgelerde kayalardan sızan mineral içerikli bir zifttir. Shilajit'in asıl fizyolojik etkinliğinin, aktif bileşenler için taşıyıcı moleküller olan fulvik ve humik asit ile beraber biyoaktif dibenzo-alfa-pironların varlığıyla ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Ödem, obezite, diabetes mellitus gibi geniş bir farmakolojik etkinliği olduğu bilinmektedir (23).

Son yıllarda Shilajit'in fertilitate artırıcı bir ajan olarak kullanılabilirliğinin yanı sıra pek çok etkinliğini araştırmak için deneysel modeller oluşturulmuş ve pek çok çalışma yapılmıştır. Mandlik ve ark. (112), alloksan ile diyabet modeli oluşturdukları sıçanlara 3 gün sonra Shilajit'inde dahil olduğu polih Herbal bir formülasyonu 300 ve 600 mg/kg dozlarında bir defa uygulamışlardır. Deneklerden alınıp hazırlanan pankreatik doku homojenatları gözlemlendiğinde diabetik sıçanlarda katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX) gibi antioksidan enzim aktivitesi

seviyesinin düştüğü, lipid peroksidasyonunun yükseldiği bulunurken, 300 ve 600 mg/kg dozlarda verilen Shilajit içerikli polherbal formülasyonun CAT ve GPX seviyelerini yükselttiği, lipid peroksidasyonunu da düşürdüğü bulunmuştur.

Biswas ve ark. (41), oligospermik hastalarda işlenmiş Shilajit'in spermatojenik aktivitesini değerlendirmişlerdir. Bunun için semende toplam sperm sayısı 20 milyon ml<sup>-1</sup> altında olan 35 infertil erkek hasta oligospermik olarak kabul edilerek çalışmaya alınmış ve 100 mg'lık Shilajit kapsüllerinden 90 gün süreyle günde iki kez verilmiştir. Semenogram sonucunda toplam sperm sayısının ve motilitenin anlamlı olarak arttığı (sırasıyla %61.4 ve %12.4-17.4) (p<0.001) ve beraberinde iltihap ve epitelyal hücre sayısının anlamlı düzeyde azaldığı (sırasıyla %55.5, %81.1) (p<0.001), 90 gün sonunda normal sperm yüzdesinin anlamlı olarak (18.9) (p<0.001) arttığı bulunmuştur. Ayrıca spermatogenezde önemli rolleri olan testosteron, LH, FSH gibi biyokimyasal belirteçler incelenmiştir. Sonuç olarak serum testosteron ve FSH düzeylerinde anlamlı bir artış olduğu (sırasıyla %23.5 (p<0.001), %9.4 (p<0.05)) gözlemlenmiş, serum LH düzeyinde ise anlamlı bir değişim gözlemlenmiştir.

Keçeci ve ark. (73), radyasyon ile oluşturulan ovaryum hasarında Shilajit'in etkilerini incelemişlerdir. Bunun için 40 adet prepubertal *Wistar albino* dişi sıçanlar kullanılmış ve kontrol, Shilajit, Radyasyon ve Radyasyon+Shilajit olarak dört gruba ayrılmıştır. Radyasyon+Shilajit grubundaki deneklere ışınlamadan 10 gün önce ve ışınlamadan sonraki 4. güne kadar Shilajit gün aşırı oral yoldan 100 mg/kg olarak verilmiştir. Radyasyonlu gruplarda ise denekler tüm vücut tek doz 8.3 Gy (Gray) X ışınına maruz bırakılmıştır. Işınlamadan sonra 4. günde sakrifiye edilen deneklerin ovaryumları alınmıştır. Çalışmanın sonucunda primordial folikül sayısı bakımından yapılan incelemede Shilajit grubu ile kontrol grubu arasındaki fark anlamlı bulunmuştur. Aynı zamanda radyasyon grubu ile Radyasyon+Shilajit grubu arasında da anlamlı bir fark (p<0.001) saptanmıştır. Sonuç olarak tüm vücut X ışınlamaya bağlı foliküler atreziyi ve infertiliteyi önlemede Shilajit'in etkisinin araştırıldığı bu çalışmada Shilajit'in primordial folikül rezervini koruduğu gözlemlenmiştir.

Pandit ve ark. (113), 45 ile 55 yaş arasındaki toplam 75 sağlıklı gönüllü erkeklerde yapılan klinik çalışmada, Shilajit'in testosteron seviyesi üzerindeki etkinliğini araştırmıştır. Bunun için Shilajit ile tedavi edilen rastgele seçilmiş 38 deneğe günde iki doz 250 mg/kapsül saflaştırılmış Shilajit oral olarak verilmiştir. Diğer ikinci gruptaki 37 denek ise 250 mg dozda plasebo ile tedavi edilmiştir.



Çalışmanın sonucunda toplam testosteron miktarında anlamlı bir fark ( $p<0.05$ ) olduğu saptanılmış ve LH, FSH seviyelerinin iyi korunduğu gözlenmiştir.

Yaptığımız literatür incelemelerinde Shilajit'in, TM indüklü ER stresi ile ilişkisi üzerine testis dokusunda herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Çalışmamızda deneyin 1. günü tek doz ve s.c. yoldan 200 µg/kg Tunikamisin uygulamasının, sıçan testislerinde 24. saat ve 4. gün sonunda çeşitli morfolojik hasara neden olduğu görülmüştür. Fakat bu hasar, 4. gün grubu deneklerinin testis dokusunda daha belirgin olarak görüldüğü için Cosentino kriterlerine göre skorlama yapılmıştır. 4. gün sonrası bu hasarlar ışık mikroskopik düzeyde incelendiğinde; tübüllerde çok fazla sayıda vakuolizasyon, seminifer tübül lümenine atılmış olgunlaşmamış germ hücrelerinin oluşumu, aşırı düzeyde tübüler dejenerasyon, seminifer tübül epitelinde Sertoli hücreleri, spermatogonyum ve primer spermatositlere rastlanması, interstisyel alanda hafif düzeyde hemoraji ve ödem oluşumu, iki seminifer tübüldeki bazal membran birleşmeleri şeklinde bulgular elde edilmiştir. Elde ettiğimiz bulgular, ER stresi ile ilgili yapılan pek çok testis çalışmaları ile uygunluk göstermektedir. TM verilip ardından Shilajit ile tedavi sağlanılmaya çalışılan grubun deneklerinden elde ettiğimiz testis preparatlarının, ışık mikroskopisinde incelenmesi neticesinde bu grupta da hafif düzeyde aynı morfolojik bulgulara rastlanılmıştır. Çalışmamızda uyguladığımız 100 mg/kg Shilajit dozu çeşitli infertilite üzerine olan çalışmalardan yararlanılarak seçilmiş olup, uyguladığımız TM dozunda istatistiksel olarak anlamlı bir koruma sağlayamamıştır. Hasarın hafif düzeyde de devam ediyor olması uygulanan Shilajit dozunun hasarı tam olarak iyileştiremediği izlenimini uyandırmaktadır. Gerek istatistiksel olarak elde edilen testis ağırlık bulgularında gerekse de spermatogenezi değerlendirdiğimiz Cosentino skorlamasında kısmen olumlu bulgular elde edilmiş olsa da TM verilen grup ile TM+Shilajit grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farkın olmayışı bu durumu desteklemektedir.

Demirkıran ve ark. (12), TM indüklü ER stresinin sıçan testiküler Sertoli hücreleri üzerindeki etkisini araştırmak üzere yaptıkları çalışmada, 1. gün, tek doz ve s.c. olarak 200 µg/kg TM verilip kontrol, 7, 14 ve 21 gün grubu olarak 4 grup arasında Sertoli hücrelerinde oluşabilecek apoptozisi belirlemek amacıyla yaptıkları TUNEL yönteminde 7 gün grubunda apoptotik Sertoli hücrelerinde, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermediğini bulmuşlardır ( $p<0.05$ ). 14 gün grubunda apoptotik Sertoli hücrelerinde, kontrol ve 7 gün grubuna göre

istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunmamıştır ( $p<0.05$ ). 21 gün grubunda ise apoptotik Sertoli hücrelerinde, 14 gün grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik bulunmazken, kontrol ve 7 gün grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı bir artış bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Ayrıca 21 gün grubunun testis kesitlerinde ışık mikroskopik olarak Sertoli hücre morfolojilerinde belirgin değişiklikler gözlenmemiştir.

Bizde yapmış olduğumuz çalışmada 24. saat ve 4. gün TM grubununun H+E boyalı testis kesitlerinin ışık mikroskopisi incelemelerinde, Sertoli hücrelerinin varlığını koruduğunu ve morfolojilerinde belirgin olarak bir değişikliğin olmadığını gözlemledik.

Normal spermatogenezin başlaması ve sonuçta üremeyi sağlamak için yeterli sperm sayısının üretilmesi, kan-testis bariyerinin oluşumunun yanı sıra germ hücrelerinin desteklenmesi ve beslenmesinde önemli fonksiyonlar sergileyen Sertoli hücrelerine bağlıdır (111).

Sertoli hücreleri, spermatogenezde önemli rollerinin olması nedeniyle toksik hasar için hedef hücrelerdir. Sertoli hücrelerinde meydana gelebilecek herhangi bir fonksiyonel bozulma, germ hücrelerinin hayatta kalmalarını olumsuz yönde etkilemektedir. Çeşitli sitotoksik ajanlara maruziyet sonucunda bu hücrelerde ölüm meydana gelmektedir. Sertoli hücreleri, dış etkenler nedeniyle apoptozise karşı dayanıklı hücreler olmakla birlikte, fonksiyonel bozulmalara karşı da hassastırlar. Bu nedenle Sertoli hücrelerinde apoptoz ya da nekroz çok az gözlenmektedir. Fakat metabolik ve düzenleyici yollardaki aksaklıklar sonucunda bu hücreler kolayca etkilenmekte ve fonksiyonlarında bir takım aksaklıklar oluşmaktadır. Bunun en iyi göstergesi ise germ hücrelerinde meydana gelen dejenerasyonun artışıdır (12).

Bizde yapmış olduğumuz çalışmada, tüm gruplara ait deneklerin histokimyasal analizler doğrultusunda elde edilen preparatlarının ışık mikroskopisinde incelemesi neticesinde Sertoli hücrelerinin varlığını tespit ettik. Bu durum TM maruziyeti sonucu oluşan ER stresine karşı 24. saat ve 4. günlerde Sertoli hücrelerinin dirençli olduğunu gözler önüne sermektedir.

Spermatogenez sürecinde, testis hormonu olan testosteron ile hipofiz hormonları olan FSH, LH ve androjen taşıyıcı proteinlerin rolü oldukça önemlidir ve spermatogenezin sağlıklı bir şekilde ilerliyişi için gereklidir. Testisin temel endokrin salgısı testosterondur ve interstisyel alandabulunan Leydig hücreleri tarafından salgılanır. Hipofizin anterior lobundan salgılanan FSH, spermatogenezini stimüle etmektedir. FSH, Sertoli hücrelerini direk etkileyerek androjen bağlayıcı protein

sentezi ve salınımını stimüle etmektedir. Androjen bağlayıcı protein testosteron ile bağlanıp seminifer tübül lümenine salınmaktadır. Aynı zamanda Sertoli hücrelerinden inhibin adı verilen testiküler başka bir testiküler hormonda salgılanmaktadır. İnhibin ise kana geçerek ön hipofizden FSH salınımını inhibe etmektedir. Ergenliğe gelindiğinde hipofiz ön lobundan salgılanan LH ise, Leydig hücrelerini etkileyerek testosteronun salgılanmasını sağlamaktadır. FSH spermatogenez sürecinin başlatılmasında, LH ve testosteron ise sürekliliği için gereklidir (36).

Son yıllarda yapılan ER stresinin testis dokusu üzerindeki etkilerini incelemek üzere yapılan çalışmalarda, bu hormon düzeylerindeki değişimler de araştırılmıştır (41, 93).

Kim ve ark. (93), C57BL/6 farelerinde hipertermi (15 dk boyunca 42°C) kaynaklı ER stresinin, Leydig hücrelerinde steroidojenik enzim ekspresyonunu ve testosteron üretimini etkilediğini göstermeyi amaçlamışlardır. Sonuç olarak testislere uygulanan ısı işleminin, ER stresini artırdığını ve böylece Leydig hücrelerinin apoptozuna neden olarak testosteron üretiminin azaldığını gözlemlemişlerdir. İmmünohistokimyasal analizler ile Leydig hücrelerinde Kaspaz-3 ekspresyonunun yükseldiğini belirtmişlerdir.

Bizde çalışmamızda spermatogenezde etkin role sahip FSH, LH, testosteron seviyelerini araştırdık. İstatistiksel analiz sonucunda, FSH için ikili kıyaslamalarda kontrol ve TM+Shilajit grubu arasında, kontrol ve TM grubu arasında, Shilajit ve TM+Shilajit grubu arasında, TM+Shilajit ve TM arasında anlamlı farklılığın olmadığını saptadık. Shilajit ve TM grubu arasında, Shilajit ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılığın olduğunu gözlemledik ( $p=0.001$ ). Aynı zamanda Shilajit verilen grupların kan serumlarında FSH düzeyinde azalma olduğunu saptadık. Bu bulgular ışığında Shilajit kullanımının (TM+Shilajit grubu) FSH düzeyi bakımından tedavisiz gruba kıyasla (TM grubu) anlamlı bir fark yaratmadığı görülmektedir. Buna ek olarak LH ve testosteron düzeyleri Shilajit verilen grupta artma göstermesine rağmen istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı farklılığın olmadığını saptadık ( $p>0.05$ ). Elde ettiğimiz verilere göre kullandığımız dozun, beklenen koruma ve iyileşmeyi sağlayamadığı düşünülmektedir.

Bu bağlamda Shilajit'in antioksidan etkisi doz bağımlıdır. Ghosal ve ark. (114), işlenmiş Shilajit'in sülfid anyonları, hidroksi ve nitrik oksit serbest radikallerini nötralize etme özelliğini değerlendirdikleri bir çalışma yapmışlardır.

Araştırmada Shilajit'le ve Shilajit'siz olarak serbest radikaller ile kimyasal polimerizasyon ölçülmüştür. İşlenmiş Shilajit'in metil metakrilatı hidroksil radikali ile uyarılan polimerizasyona karşı kısmen koruduğunu ve metil metakrilatin sülfid serbest radikali ile uyarılan polimerizasyonu anlamlı düzeyde inhibe ettiği bulunmuştur. Shilajit, nitrik oksit serbest radikallerini yakalamıştır. Bu alışmada Shilajit'in antioksidan etkisinin doza bağımlı olduğu ve daha yüksek konsantrasyonlarda denendiğinde serbest radikallere karşı korucuyucu özelliğinin dearttığı vurgulanmıştır.

Park ve ark.(22), Shilajit'in fertilitate ajanı olarak kullanılabilirliğini araştırmak için yaptıkları çalışmada,7 haftalık erkek ve dişi sıçanlara 6 haftalık periyot süresince, distile suda çözdükleri Shilajit'ten 2 mg/kg hacimde günlük olarak 25 mg/kg, 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozda oral yoldan gavaj uygulaması yapmışlardır. Sonuçta kontrol grubu ile kıyaslandığında Shilajit'in doza bağlı olarak testis ve epididimiste sperm sayısını artırdığını göstermişlerdir. Özellikle 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozlu grupların epididimisinde, sperm sayısında önemli bir artış saptanmıştır. Ayrıca Shilajit'in testis ve epididimis ağırlıklarını değiştirmedeği ve spermatogenezde doza bağlı bir artışın olduğu gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra testiste histopatolojik bir değişikliğin oluşmadığını göstermişlerdir. Dişi sıçanlarda ise Shilajit'in oositlerin proliferasyonunu ve diferansiyasyonunu desteklediği ve diöstrus evresini kısaltarak ovülasyon frekasını artırdığı bulgusu saptanılmıştır. Bizde alışmamızda antioksidan olarak kullandığımız Shilajit'in testis ağırlıklarında anlamlı düzeyde bir farklılık oluşturmadığını ve kontrol grubuna göre histopatolojik olarak bir değişiklik meydana getirmediğini gözlemledik.

Bu bağlamda koruyucu etkisinin olduğunu düşündüğümüz, ancak uyguladığımız dozda etkili bir koruma ve iyileşme sağlayamayan, antioksidan yeteneği ile iyi bilinen Shilajit'in bundan sonra planlanacak doz kontrollü deneysel modellerinin, TM'nin aşırı toksik etkisinin olduğu düşünüldüğünde, ER stresi kaynaklı infertilite üzerindeki dozunun araştırılmasına ihtiyaç olduğu kanaatindeyiz.

## 6. SONUÇLAR

ER'nin normal fonksiyonunda meydana gelen aksaklıklar neticesinde, proteinlerin olgunlaşması ve katlanması aşamasında oluşan hatalar ER lümeninde proteinlerin birikmesine yol açmaktadır. Hatalı katlanmış ya da katlanmamış proteinlerin birikimi ise ER stresini oluşturmaktadır. Günümüzdeki çoğu hastalığın patogeneğinde ER stresi ve UPR yolları araştırılmış ve bu hastalıkların patogeneğinde ER stresinin aktif rol aldığı bulunmuştur. UPR mekanizmalarının aydınlatılması için yapılan çalışmalar sayesinde ER stresi ve pek çok hastalığın birbiri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. ER stresinin testiste gözlenen ve infertiliteye neden olan hücre hasarını önlemede, Shilajit'in etkisini morfolojik, immünohistokimyasal ve hormon düzeyleri açısından değerlendirmeyi amaçladığımız çalışmada, bu ajanın deneklerimizde TM ile oluşturulan testiküler hasarı önlemede beklenen etkin düzeyi gösteremediğini saptadık. Shilajit'in antioksidan, antiinflamatuvar, antiülserojenik, immünomodülatör, antidiabetik, antialerjik, antihiperlipidemik, spermatojenik ve oojenik etkilerinin ortaya konduğu prelinik ve klinik çalışma olmasına rağmen, uyguladığımız TM dozunda, oluşan hücre ve doku hasarını önlemede seçmiş olduğumuz dozun yeterli optimum düzeyde olmadığını belirledik.

Sonuç olarak, istatistiksel açıdan bir anlamlılık oluşturmasa da Shilajit tedavisi uygulanan gruptaki deneklerin testis kesitlerinde, bazı seminifer tübüllerde hasarın azalması ve yenilenmenin gözlenmesi dolayısıyla bundan sonra planlanacak yeni doz çalışmaları ile Shilajit'in koruyucu etkisinin daha belirgin olarak ortaya konulabileceği düşüncesindeyiz.

## 7. KAYNAKLAR

1. Kim JH, Park SJ, Kim TS, Park HJ, Park J, Kim BK, Kim GR, Kim JM, Huang SM, Chae JI, Park CK, Lee DS. Testicular hyperthermia induces Unfolded Protein Response signaling activation in spermatocyte. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 17;434(4):861-6, 2013.
2. Lin P, Chen F, Sun J, Zhou J, Wang X, Wang N, Li X, Zhang Z, Wang A, Jin Y. Mycotoxin zearalenone induces apoptosis in mouse Leydig cells via an endoplasmic reticulum stress-dependent signalling pathway. *Reproductive Toxicology* 52:71-7, 2015.
3. Yang Y, Lin X, Huang H, Feng D, Ba Y, Cheng X, Cui L. Sodium fluoride induces apoptosis through reactive oxygen species-mediated endoplasmic reticulum stress pathway in Sertoli cells. *Journal on Environmental Sciences* 1;30:81-9, 2014.
4. Seydel GŞ, Aksoy K. Endoplazmik retikulum stresi ve apoptozis mekanizması. *Archives Medical Review Journal* 21(4):221-235, 2012.
5. Düzgün A, Alaçam H, Okuyucu A. Endoplazmik retikulum stresi ve katlanmamış protein cevabı. *Journal of Experimental and Clinical Medicine Deneysel ve Klinik Tıp Dergisi* 29(2):95-100, 2012.
6. Bull VH, Thiede B. Proteome analysis of tunicamycin-induced ER stress. *Electrophoresis* 33(12):1814-23, 2012.
7. Gong Y, Wu J, Huang Y, Shen S, Han X. Nonylphenol induces apoptosis in rat testicular Sertoli cells via endoplasmic reticulum stress. *Toxicology Letters* 186(2):84-95, 2009.
8. Ji YL, Wang Z, Wang H, Zhang C, Zhang Y, Zhao M, Chen YH, Meng XH, Xu DX. Ascorbic acid protects against cadmium-induced endoplasmic reticulum stress and germ cell apoptosis in testes. *Reproductive Toxicology* 34(3):357-363, 2012.

9. Kanai Y, Hayashi Y, Kawakami H, Takata K, Kurohmaru M, Hirano H, Nishida T. Effect of tunicamycin, an inhibitor of protein glycosylation, on testicular cord organization in fetal mouse gonadal explants in vitro. *The Anatomical Record* 230(2):199-208, 1991.
10. Hsu JL, Chiang PC, Guh JH. Tunicamycin induces resistance to camptothecin and etoposide in human hepatocellular carcinoma cells: role of cell-cycle arrest and GRP78. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 380(5):373-382, 2009.
11. Schönthal AH. Pharmacological targeting of endoplasmic reticulum stress signaling in cancer. *Biochem Pharmacol* 1;85(5):653-66, 2013.
12. Demirkıran ÖD. Tunikamisin ile uyarılan endoplazmik retikulum stresinin sıçan testiküler sertoli hücreleri üzerindeki etkisinin ışık ve elektron mikroskopik incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2013.
13. Balcan E, Arslan Ö, Gümüş A. Tunikamisin'in embriyonik ve yeni doğan fare lenfoid dokularına etkisi. *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi* 15(5):651-660, 2009.
14. Güzel E, Başar M, Ocak N, Arıcı A, Kayışlı AÜ. Bidirectional interaction between unfolded-protein-response key protein HSPA5 and estrogen signaling in human endometrium. *Biology of Reproduction* 85(1):121-127, 2011.
15. Tanaka M, Yamazaki M, Chiba K. Neuroprotective action of genipin on tunicamycin-induced cytotoxicity in neuro2a cells. *Biol Pharm Bull* 32(7):1220-3, 2009.
16. Fujinami Y, Mutai H, Mizutari K, Nakagawa S, Matsunaga T. A novel animal model of hearing loss caused by acute endoplasmic reticulum stress in the cochlea. *J Pharmacol Sci* 118(3):363-72, 2012.
17. Shi Y, Tang B, Yu PW, Tang B, Hao YX, Lei X, Luo HX, Zeng DZ. Autophagy protects against oxaliplatin-induced cell death via ER stress and ROS and Caco-2 cells. *PLoS One* 7(11):e51076, 2012.

18. Asselah T, Bieche I, Mansouri A ve ark. In vivo hepatic endoplasmic reticulum stres in patients with chronic hepatitis C. J Pathol 221(3):264-74, 2010.
19. Kamat B. Skrotal radyoterapide curcuminin profilaktik kullanımı testis dokusunda PARP-1 immün reaktivitesini ve spermatogenezi nasıl etkiler?. Bülent Ecevit Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak, 2013.
20. Atal S. Erişkin erkek sıçanlarda metotreksat kaynaklı testis hasarında kurkuminin etkisi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, 2014.
21. Özpak L, Pazarbaşı A. Erkek infertilitesinin sitogenetiği. Arşiv 20:230, 2011.
22. Park JS, Kim GY, Han K. The spermatogenic and ovogenic effects of chronically administered Shilajit to rats. J Ethnopharmacol 107(3):349-53, 2006.
23. Keçeci M. Geçmişten günümüze şilajit'in terapötik kullanımı: derleme. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 7(4):271-285, 2015.
24. Kierszenbaum AL, Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. (Çev.Ed: Demir R) s.531-550, Palme Yayıncılık, Ankara, 2006.
25. Çelik E. Ratlarda deneysel testis torsiyonu ile oluşturulan iskemi/reperfüzyon hasarından korunmada hesperetinin etkileri. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, Malatya, 2002.
26. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. (Çev. Ed: Dalçık H) 10. Basım, s.260-264, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2016.
27. Eşrefoğlu M. Embriyoloji. 1. Basım, s.131-136, İstanbul Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2017.
28. Ross MH, Pawlina W. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas İlişkili Hücre Biyolojisi ve Moleküler Biyoloji İle. (Çev.Ed: Baykal B) 6. Basım, s.784-829, Palme Yayıncılık, Ankara, 2014.



29. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. 2. Basım, s.335-353, İstanbul Tıp Kitapevi, İstanbul, 2016.
30. Gartner LP, Hiatt JL. Renkli Histoloji Atlası. (Çev.Ed: Dağdeviren A, Müftüoğlu S, Karabay G)4. Basım, s.369-386, Güneş Tıp Kitapevleri, Ankara, 2009.
31. Tekeli AG. Anormal semen parametreleri olan erkeklerde semen analizi ve semende mast hücresi ile lökositin sperm hareketliliği ve morfolojisi üzerine etkileri. Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak, 2011.
32. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji Text & Atlas. (Çev. Ed: Solakoğlu S, Aytekin Y) s. 425-427, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2009.
33. Ogava ve ark. Abnormal sperm morphology caused by defects in Sertoli cells of Cnot7 knockout mice. Arch Histol Cytol 67 (4):307-314, 2004.
34. Nah WH, Lee JE, Park HJ, Park NC, Gye MC. Claudin-11 expression increased in spermatogenic defect in human testes. Fertil Steril 95(1):385-8, 2011.
35. Guyton AC, Hall JE. Tıbbi Fizyoloji. (Çev.Ed: Çavuşoğlu H) 10. Basım, s.916-928, Nobel Tıp Kitabevleri, 2011.
36. Özcan S, Doğantekin E. Çevresel etkenler ve spermatogenez. Androloji Bülteni 18(66):183-187, 2016.
37. Yaman Ö. Prepubertal sıçan testislerinde Cisplatin maruziyetinin neden olduğu seminifer tübül hasarı ve erişkin sperm parametreleri üzerine L- karnitinin koruyucu etkisi. Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Edirne, 2015.
38. Eroschenko VP. Difiore'nin Histoloji Atlası. (Çev.Ed: Demir R) 12. Basım, s.477-492, Palme Yayıncılık, Ankara, 2013.
39. Doğantekin E, Özcan S, Çevresel etkenler ve spermatogenez. Androjeni Bülteni 18(66):183-187, 2016.

40. Çelik Ö. Yardımcı Üreme Teknikleri, Temel Klinik ve Embriyolojik Uygulamalar. s. 60-63, Nobel Kitabevi, Adana, 2011.
41. Biswas TK, Pandit S, Mondal S, Biswas SK, Jana U, Ghosh T, Tripathi PC, Debnath PK, Auddy RG, Auddy B. Clinical evaluation of spermatogenic activity of processed Shilajit in oligospermia. *Andrologia* 42(1):48-56, 2010.
42. Gültekin B. Sisplatin toksisitesinin sıçan testisinde yarattığı histolojik değişimlere Çinko'nun etkisinin araştırılması. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Konya, 2013.
43. Yumru AE, Öndeş B. İnfertil çiftte yaklaşım in vitro fertilizasyona doğru hasta seçimi. *Jarem* 1:57-60, 2011.
44. Güneş HV. Moleküler Hücre Biyolojisi. 3. Basım, s.23-66, 311-312, İstanbul Tıp Kitabevi, İstanbul, 2014.
45. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of The Cell*. 4. Basım, s.584-614, 908-929, Garland Science Yayınevi, New York, 2002.
46. Çarın MN, Aydın F, Gürtekin M. *Tıbbi Biyoloji* 2. Basım, s.223-255, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2014.
47. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A, Ploegh H, Matsudaira P. *Moleküler Hücre Biyolojisi* (Çev. Ed: Geçkil H, Özmen M, Yeşilada Ö) 6. Basım, s.375-376, 549, Palme Yayıncılık, Ankara, 2011.
48. Dobson CM, Sali A, Karplus M. Protein folding: A perspective from theory and experiment. *Angew Chem Int Ed* 37:868-893, 1998.
49. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of Endoplasmic reticulum stress- induced apoptosis. *EMBO reports* 7(9):880-885, 2006.
50. Tu BP, Ho-Schleyer SC, Travers KJ, Weissman JS. Biochemical basis of oxidative folding in the Endoplasmic reticulum. *Science* 290(5496):1571-4, 2000.

51. Coe H, Michalak M. Calcium binding chaperones of the Endoplasmic reticulum. *Gen Physiol Biophys* 28:F96-F103, 2009.
52. Halperin L, Jung J, Michalak M. The many functions of the Endoplasmic reticulum chaperones and folding enzymes. *IUBMB Life* 66(5):318-326, 2014.
53. Hausman RE, Cooper GM. Hücre Moleküler Yaklaşım (Çev. Ed: Sakızlı M, Atabey N) 3. Basım, s.299-302, İzmir Tıp Kitapevi, İzmir, 2006.
54. Gündeşli H, Dinçer P. Endoplazmik retikulum stresinin moleküler mekanizması ve kas patolojisi arasındaki ilişki. *Hacettepe Tıp Dergisi* 39:109-114, 2008.
55. Çelik S, Şen S, Hazman Ö. Endoplazmik retikulum stresine cevap yolları ve tip 2 diyabet patogeneğinde endoplazmik retikulum stres aracılı beta hücre apoptozisinin rolü. *Kocatepe Medical Journal* 16(3):227-237, 2015.
56. Wang M, Kaufman RJ. Protein misfolding in the Endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature* 529(7586):326-35, 2016.
57. Zhang K, Kaufman RJ. Signaling the unfolded protein response from the Endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry* 279(25):25935-25938, 2004.
58. Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to ER: coping with stress. *Trends In Cell Biology* 14(1):20-8, 2004.
59. Fougère F, Fromenty B. Role of Endoplasmic reticulum stress in drug-induced toxicity. *Pharmacol Res Perspect* 4(1):e00211, 2016.
60. Scull CM, Tabas I. Mechanisms of ER stress-induced apoptosis in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31(12):2792-2797, 2011.
61. Ryoo HD. Long and short (timeframe) of Endoplasmic Reticulum stress-induced cell death. *The Febs Journal* 283(20):3718-3722, 2016.
62. He L, Kim SO, Kwon O, Jeong SJ, Kim MS, Lee HG, Osada H, Jung M, Ahn JS, Kim YB. ATM blocks tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress. *Febs Letters* 583(5):903-908, 2009.

63. Vaughn LS, Snee B, Patel RC. Inhibition of PKR protects against tunicamycin-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Gene* 536(1):90-6, 2014.
64. Shen M, Wang L, Guo X, Xue Q, Huo C, Li X, Fan L, Wang X. A novel endoplasmic reticulum stress induced apoptosis model using tunicamycin in primary cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Molecular Medicine Reports* 12(4):5149-5154, 2015.
65. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins Temel Patoloji (Çev. Ed: Tuzlalı S, Güllüoğlu M, Çevikbaş U) 9. Basım, s.22, Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 2013.
66. Jiang X, Chen HQ, Cui ZH, Yin L, Zhang WL, Liu WB, Han F, Ao L, Cao J, Liu JY. Low-dose and combined effects of oral exposure to Bisphenol A and diethylstilbestrol on the male reproductive system in adult Sprague-Dawley rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 43:94-102, 2016.
67. Durak MS. Karaciğer hücrelerinde endoplazmik retikulum stresi ile visfatin ekspresyonu arasındaki ilişkinin incelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Tezi, Ankara, 2011.
68. Çalışkaner ZO. Endoplazmik retikulum stresinin SIK2 yolağı üzerindeki etkisi. Gebze İleri Teknoloji Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Gebze, 2013.
69. Zeng T, Peng L, Chao H, Xi H, Fu B, Wang Y, Zhu Z, Wang G. IRE1 $\alpha$ -TRAF2-ASK1 complex-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction contribute to CXC195-induced apoptosis in human bladder carcinoma T24 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 460(3):530-6, 2015.
70. Yerlikaya A, Dokudur H. Proteinlerin yıkımının önemi. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 35(2):93-99, 2009.
71. Güleş Ö, Eren Ü. Methods for detection of apoptosis. Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi 2:73-78, 2008.
72. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4):239-57, 1972.

73. Keçeci M. Sıçan ovaryan foliküllerinde radyasyona bağlı apoptozis üzerine Shilajit'in etkileri. Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Zonguldak, 2014.
74. Arslan Ö. Tunikamisin'in embriyonik ve yeni doğan fare lenfoid dokularına etkisi. Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Manisa, 2008.
75. Savage KE, Baur PS. Effect of tunicamycin, an inhibitor of protein glycosylation, on division of tumour cells in vitro. *Journal of Cell Science* 64:295-306, 1983.
76. Peterson JE, Jago MV, Stewart PL. Permanent testicular damage induced in rats by a single dose of tunicamycin. *Reproductive Toxicology* 10(1):61-9, 1996.
77. Xing Y, Ge Y, Liu C, Zhang X, Jiang J, Wei Y. ER stres inducer tunicamycin suppresses the self-renewal of glioma-initiating cell partly through inhibiting Sox2 translation. *Oncotarget* 7(24):36395-36406, 2016.
78. Finnie JW, O'Shea JD. Pathological and pathogenetic changes in the central nervous system of guinea pigs given tunicamycin. *Acta Neuropathol* 75(4):411-21, 1988.
79. Schneider EG, Nguyen HT, Lennarz WJ. The effect of tunicamycin, an inhibitor of protein glycosylation, on embryonic development in the sea urchin. *The Journal of Biological Chemistry* 253(7):2348-55, 1978.
80. Wilson E, Rajamanickam GV, Dubey GP, Klose P, Musial F, Saha FJ, Rampp T, Michalsen A, Dobos GJ. Review on Shilajit used in traditional Indian medicine. *Journal Of Ethnopharmacology* 136(1):1-9, 2011.
81. Khanna R, Witt M, Anwer MK, Agarwal SP, Koch BP. Spectroscopic characterization of fulvic acids extracted from the rock exudate Shilajit. *Organic Geochemistry* 39(12):1719-1724, 2008.
82. Frolova LN, Kiseleva TL. Chemical composition of mumijo and methods for determining its authenticity and quality (a review). *Pharmaceutical Chemistry Journal* 30(8):49-53, 1996.

83. Aqarwal SP, Khanna R, Karmarkar R, Anwer MK, Khar RK. Shilajit: a review. *Phytotherapy Research* 21(5):401-5, 2007.
84. Schpetkin I, Khlebnikov A, Kwon BS. Medical drugs from humus matter: focus on mumie. *Drug Development Research* 57:140-159, 2002.
85. Ghosal S, Lal J, Singh SK, Goel RK, Jaiswal AK, BhattacharyaSK. The need formulation of shilajit by its isolated active constituents. *Phytotherapy Research* 5(5):211-216, 1991.
86. Al- Himaidi AR, Umar M. Safe use of salajeet during the pregnancy of female mice. *Online Journal of Biological Science* 3(8):681-684, 2003.
87. Ghosal S. Chemistry of shilajit, an immunomodulatory ayurvedic rasayan. *Pure and Applied Chemistry* 62(7):1285-1288, 1990.
88. Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R, Cockett AT. Histopathology of prepubertal rat testes subjected to various durations of spermatic cord torsion. *Journal of Andrology* 7(1):23-31, 1986.
89. Rooij DG, Kant HJ, Dol R, Wagemaker G, van Buul PP, van Duijn-Goedhart, de Jong FH, Broerse JJ. Long-term effects of irradiation before adulthood on reproductive function in the male rhesus monkey. *Biology of Reproduction* 66(2):486-494, 2002.
90. Tong J, Okutani F, Murata Y, Taniguchi M, Namba T, Wang YJ, Kaba H. Tunicamycin impairs olfactory learning and synaptic plasticity in the olfactory bulb. *Neuroscience* 344:371-379, 2017.
91. Jang WG, Kim EJ, Koh JT. Tunicamycin negatively regulates BMP2-induced osteoblast differentiation through CREBH expression in MC3T3E1 cells. *BMB Reports* 44(11):735-740, 2011.
92. Xing Y, Ge Y, Liu C, Zhang X, Jiang J, Wei Y. ER stress inducer tunicamycin suppresses the self-renewal of glioma-initiating cell partly through inhibiting Sox2 translation. *Oncotarget* 7(24):36395-36406, 2016.

93. Kim JH, Park SJ, Kim TS, Kim JM, Lee DS. Testosterone production by a Leydig tumor cell line is suppressed by hyperthermia-induced endoplasmic reticulum stress in mice. *Life Sciences* 1;146:184-191, 2016.
94. Tabuchi Y, Takasaki I, Kondo T. Identification of genetic networks involved in the cell injury accompanying endoplasmic reticulum stress induced by Bisphenol A in testicular Sertoli cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345(3):1044-1050, 2006.
95. Chung H, Chung HY, Bae CW, Kim CJ, Park S. Ghrelin suppresses tunicamycin or thapsigargin triggered endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis in primary cultured rat cortical neuronal cells. *Endocrine Journal* 58(5):409-420, 2011.
96. Zhang B, Wang Y, Pang X, Su Y, Ai G, Wang T. ER stress induced by ionising radiation in IEC-R cells. *International Journal of Radiation Biology* 86(6):429-35, 2010.
97. Lu T, Zhang C, Chai M, An Y. Isoquercetin ameliorates tunicamycin induced apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons via suppressing ROS dependent endoplasmic reticulum stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 80:343-351, 2016.
98. Tanaka M, Yamazaki M, Chiba K. Neuroprotective action of genipin on tunicamycin-induced cytotoxicity in neuro2a cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 32(7):1220-3, 2009.
99. Nugent AE, McBurney DL, Horton WJ. The presence of extracellular matrix alters the chondrocyte response to endoplasmic reticulum stress. *Journal of Cellular Biochemistry* 112(4):1118-29, 2011.
100. Seo HY, Kim MK, Min AK, Kim HS, Ryu SY ve ark. Endoplasmic reticulum stress-induced activation of activating transcription factor 6 decreases Camp-stimulated hepatic gluconeogenesis via inhibition of CREB. *Endocrinology* 151(2):561-8, 2010.
101. Inokuchi Y, Nakajima Y, Shimazawa M, Kurita T, Kubo M ve ark. Effect of an inducer of BIP, A molecular chaperone, on endoplasmic reticulum (ER) stress-induced retinal cell death. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50(1):334-44, 2009.

102. Sylvester SR, Skinner MK, Griswold MD. A sulfated glycoprotein synthesized by Sertoli cells and by epididymal cells is a component of the sperm membrane. *Biology of Reproduction* 31(5):1087-101, 1984.
103. Tatar M, Tatar T. Endoplazmik retikulum stresi ve ilişkili hastalıklar. *Osmangazi Tıp Dergisi* 10.20515/otd.417682, 2018.
104. Kim JH, Park SJ, Kim TS, Park HJ, Park J, Kim BK, Kim GR, Kim JM, Huang SM, Chae JI, Park CK, Lee DS. Testicular hyperthermia induces Unfolded Protein Response signaling activation in spermatocyte. *Biochem Biophys Res Commun* 17;434(4):861-6, 2013.
105. Abuç ÖÖ. Nanopartiküllerin fare testis dokusunda endoplazmik retikulum stresi üzerine olan etkileri. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Erzurum, 2015.
106. Wiersema NJ, Drukker AJ, Mai BT, Giang HN, NguyenTN, Lambalk CB. Consequences of infertility in developing countries: result of a questionnaire and interview survey in the South of Vietnam. *J Transl Med* 27;4:54, 2006.
107. Kan Ö, Alkılıç A, Yüce T, Berker B. Açıklanamayan infertilitede yönetim. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 23(3):506-518, 2014.
108. Ji YL, Wang H, Zhao XF, Wang Q, Zhang C, Zhang Y, Zhao M, Chen YH, Meng XH, Xu DX. Crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mitochondrial pathway mediates cadmium-induced germ cell apoptosis in testes. *Toxicol Sci* 124(2):446-59, 2011.
109. Weber LP, Kiparissis Y, Hwang GS, Niimi AJ, Janz DM, Metcalfe CD. Increased cellular apoptosis after chronic aqueous exposure to nonylphenol and quercetin in adult medaka (*Oryzias latipes*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 131(1):51-9, 2002.
110. Zhang S, Jiang C, Liu H, Guan Z, Zen Q ve ark. Fluoride-elicited developmental testicular toxicity in rats: roles of endoplasmic reticulum stress and inflammatory response. *Toxicol Appl Pharmacol* 1;271(2):206-15, 2013.



111. Gong Y, Wu J, Huang Y, Shen S, Han X. Nonylphenol induces apoptosis in rat testicular Sertoli cells via endoplasmic reticulum stress. *Toxicol Lett* 186(2):84-95, 2009.


112. Mandlik RV, Desai SK, Naik SR, Sharma G, Kohli RK. Antidiabetic activity of a polyherbal formulation (DRF/AY/5001). *Indian J Exp Biol* 46(8):599-606, 2008.

113. Pandit S, Biswas S, Jana U, De RK, Mukhopadhyay SC, Biswas TK. Clinical evaluation of purified Shilajit on testosterone levels in healthy volunteers. *Andrologia* 48(5):570-5, 2016.




114. Ghosal S, Lata S, Kumar Y, Gaur B, Misra N. Interaction of Shilajit with biogenic free radicals. *Indian J Chem* 34:596-602, 1995.

## 8. EKLER

### Ek 1. Türkçe Etik Kurul Onayı

	<b>T.C.</b> <b>BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ</b> <b>Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu</b>	
<b>TOPLANTI TARİHİ</b> : 05.05.2016 <b>TOPLANTI NO</b> : 2016/05		
<p>9- Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 2016-32-05/05 Protokol no'lu "Tunikamisin ile Uyarılmış Endoplazmik Retikulum Stresine Bağlı Gelişen Apoptozis Üzerine Shilajit'in Etkileri" konulu çalışmasının Etik Kurul İlkelerine uygun olduğuna,</p> <p>Oy birliği ile karar verildi.</p>		
 <b>ASLI GİBİDİR</b>		
<b>Prof. Dr. K. Varım NUMANOĞLU</b> <b>Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı</b>		
<hr/> <small>B.E.Ü. HADYEK , 67600 Kozlu/ZONGULDAK, Tel:0 372 261 3175-3136-3360 Fax: 0 372 261 02 65</small>		

## Ek 2. İngilizce Etik Kurul Onayı

	<b>T.C.</b> <b>Bülent Ecevit University</b> <b>Animal Experiments Local Ethical Committee</b>	
<b>Date of Meeting :</b> May 5, 2016 <b>Meeting No :</b> 2016/05		
<p>9- Research Application Registered by 2016-32-05/05 and titled "The Effects of Shilajit on Tunicamycin Induced Endoplasmic Reticulum Stress Caused by Apoptosis" has been approved by the Animal Experiments Local Ethical Committee</p>		
		
<b>Prof. Dr. K. Varım NUMANOĞLU</b> <b>Animal Experiments Local Ethical Committee Director</b>		
<small>B.E.Ü. HADYEN, 67600 Kozlu/ZONGULDAK, Tel:0 372 261 3135-3136-3260 Fax:0 372 261 02 65</small>		

## 9. ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında İstanbul'da doğdum. 2005 yılında Öğretmen Selma Akay İlköğretim Okulu'ndan, 2009 yılında Hacı Hatice Bayraktar Düz Lisesi'nden mezun olarak ilk ve orta öğrenimimi İstanbul'da tamamladım. 2014 yılında Bülent Ecevit Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden mezun oldum. 2015 yılında Bülent Ecevit Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimime başladım. Halen bu bölümde çalışmalarına devam etmekteyim.

