

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

ERİŞKİN SIÇAN TESTİSİNDE VARİKOSELİN
POLARİTE PROTEİNLERİ VE İLİŞKİLİ ADEZYON
MOLEKÜLLERİNİN EKSPRESYONLARI ÜZERİNE
ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Simla Su AKKAN

DOKTORA TEZİ

2023-ANTALYA

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

ERİŞKİN SIÇAN TESTİSİNDE VARİKOSELİN
POLARİTE PROTEİNLERİ VE İLİŞKİLİ ADEZYON
MOLEKÜLLERİNİN EKSPRESYONLARI ÜZERİNE
ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Simla Su AKKAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2021-5737 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2023-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Histoloji ve Embriyoloji Programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 20/01/2023

Tez Danışmanı : Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL

Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Gökhan AKKOYUNLU

Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Mustafa Faruk USTA

Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Sevil ÇAYLI

Yıldırım Beyazıt Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Hakan ÖNER

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

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

Müdürü

Enstitü

ETİK BEYAN

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

Simla Su AKKAN

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL

İmza

TEŞEKKÜR

Öncelikle hayatımın her aşamasında, hep ileri bakmamı sağlayan, ellerini her zaman omzumda hissettiğim canım çekirdek ailem; annem Selvi AKKAN, babam Necdet AKKAN, abim Eray AKKAN, ablam Hatice AKKAN, canım İdil AKKAN ile değerli büyüklerim; ananem Hayriye DUMLU ve rahmetli dedem Sadık DUMLU'ya çok teşekkür ederim.

Diğer en büyük destekçim, her zaman yanımda olan Oğuz ÜNLÜ'ye çok teşekkür ederim.

Saygıdeğer hocam Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL'e bir danışman hoca olarak yol göstermenin yanında, bir baba şefkatiyle bizden desteğini hiç esirgemediği için çok teşekkür ederim.

İlk günden itibaren desteğini her anlamda yanımda hissettiğim sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÖZBEY ÜNLÜ'ye,

Doktora eğitimim boyunca, ihtiyacım olduğunda yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyerek, teknik açıdan gelişmemde büyük emeği olan Sibel ÖZDEN ÖZER'e çok teşekkür ederim.

Akdeniz Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm hocalarıma, asistan arkadaşlarıma ve çalışanlarına hem eğitim hayatıma hem de kişisel gelişimime yaptıkları katkılar için çok teşekkür ederim.

Yardımları ile her zaman yanımda olan Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli elemanlarına teşekkür ederim.

ÖZET

Amaç: Varikoselin neden olduğu hipertermi/hipoksi durumlarında ROS ve NO düzeylerinin artması sonucu adezyon moleküllerinde değişiklikler meydana geldiği bilinmektedir. Bu durumun Sertoli hücresinin iskeletini ve spermatogenezi etkilediği düşünülmektedir. Çalışmamızda ise; kan-testis bariyerinde ve spermiyasyonda önemli görevleri olduğu bilinen polarite proteinlerinin (Vangl2, Par6, Scribble) ve ilişkili adezyon moleküllerinin (F-aktin, N-kaderin, ZO-1) ekspresyonları üzerine varikoselin etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışma, 42 adet Wistar ırkı, erkek sıçan ile yürütüldü. Sıçanlar, rastgele üç ayrı gruba [Kontrol (n:14); Sham(n:14) ve Varikosel(n:14)] ayrıldı. Deney modeli oluşturulmasından 13 hafta sonra, testis dokuları alınarak rutin histolojik parametreler için doku takibine alındı ve Hematoksilen-Eozin ile boyandı. Vangl2, Par6, Scribble, F-aktin, N-kaderin ve ZO-1 Western Blot ve İmmunfloresan ile değerlendirildi. Deneysel modeli doğrulamak adına, western blot ile İNOS ve aktif Kaspaz-3' incelendi.

Bulgular: Yapmış olduğumuz analizler sonucunda, varikosel grubunda, seminifer tübül dejenerasyonunun önemli ölçüde arttığı görüldü. Ayrıca, İNOS ve aktif Kaspaz 3'ün ekspresyonunda anlamlı bir artış ($p<0,05$), Vangl2, Scribble, ZO-1 ve N-kaderinin ise kontrol grubuna oranla belirgin miktarda azaldıkları saptandı ($p<0,05$). Par 6 ve F-aktinde ise anlamlı bir değişiklik gözlenmedi ($p>0,05$).

Sonuç: Sonuç olarak varikosel, testislerde ektoplazmik özelleşmelerin yapı ve fonksiyonunun bozulmasına neden oldu. Bulgularımız, fizyolojik olarak kontrol edilemeyecek kadar artan NO seviyelerinin, polarite proteinleri ile ilişkili adezyon moleküllerinin iletişimde hakimiyet kurarak hem kan-testis bariyerinde hem de spermiyasyon mekanizmasında aksaklıklara neden olduğunu gösterdi. Bu açıdan tez çalışmamız, varikoselin erkek infertilitesi üzerindeki patolojik mekanizmalarını anlamak adına önemli kanıtlar sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: testis, varikosel, oksidatif stres, Sertoli hücresi, polarite

ABSTRACT

Objective: Changes in adhesion molecules are known to occur as a result of an increase in ROS and NO levels in hyperthermia/hypoxia conditions caused by varicocele. This change is thought to affect the structure of the Sertoli cell and spermatogenesis. In our study; it was aimed to investigate the effect of varicocele on the expressions of polarity proteins (Vangl2, Par6, Scribble) and related adhesion molecules (F-actin, N-cadherin, ZO-1), which are known to have important roles in the blood testicular barrier and spermiation.

Method: The study was carried out with 42 male Wistar rats obtained. The rats were randomly divided into three groups as control, sham and varicocele. Thirteen weeks after the experimental model was created, testicular tissues were taken and processed for histological evaluation and stained with Hematoxylin-Eosin. Vangl2, Par6, Scribble, F-actin, N-cadherin and ZO-1 were examined by Western Blot and Immunofluorescence. In addition to these proteins, Western blot analysis of iNOS and cleaved Caspase-3 was used to corroborate the experimental model.

Results: According to the data, the degradation of the seminiferous tubule was dramatically higher in the varicocele group. In addition, there was a significant increase in the expression of iNOS and activeCaspase3($p<0.05$), while Vangl2, Scribble, ZO-1 and N-cadherin were significantly decreased compared to the control group($p<0.05$). Par6 and F-actin showed no significant change($p>0,05$).

Conclusion: As a result, varicocele caused damage on the structure and disfunction of ectoplasmic specializations in the testes. Our findings showed that physiologically an uncontrollable increase in NO levels dominate the communication between polarity proteins and adhesion molecules associated with these proteins, causing disruptions in both the BTB and the spermiation. In this context, our study provides important evidence to understand the pathological mechanisms of varicocele on male infertility.

Key words: testis, varicocele, oxidative stress, Sertoli cell, polarity

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Hipotez ve Amaç	
2. GENEL BİLGİLER	
2.1. Testis Histolojisi	3
2.2. Testisin Fonksiyonel Organizasyonu	5
2.3. Spermatogenez	5
2.3.1. Sıçanlara Özgü Seminifer EpiteLin Evrelendirilmesi	6
2.4. Sertoli Hücresi	11
2.4.1. Sertoli Hücre Mimarisi ve Adezyon Molekülleri	12
2.4.2. Ektoplazmik Özelleşmeler	13
2.4.3. Tübülobulbar Kompleksler	14
2.4.4. Sertoli Hücre Polaritesi ve Polarite Proteinleri	16
2.4.5. Düzlemsel Hücre Polaritesi (DHP; Planer Cell Polarity; PCP)	18

2.4.6.	Spermatogenez sırasında hücre polaritesi neden önemlidir?	21
2.5.	Varikosel	22
2.5.1.	Varikosel, Oksidatif Stres, Kan-Testis Bariyer İlişkisi	23
3.	GEREÇ ve YÖNTEM	
3.1.	Denekler, Deney Grupları ve Cerrahi Modelin Oluşturulması	26
3.1.1.	Denekler	26
3.1.2.	Deney grupları	26
3.1.3.	Varikosel Modelinin Oluşturulması	27
3.2.1.	Spermatik Ven Çapının Ölçümü	28
3.2.2.	Epididimal Sperm ve Motilite Hesaplanması	28
3.2.3.	Testis Ağırlıkları	29
3.2.4.	Doku Temini ve Deney Parametreleri İçin Hazırlanması	29
3.2.5.	Rutin Histolojik Değerlendirme	29
3.3.	Western Blot (İB) analizleri Kullanılan Solüsyonlar ve Cihazlar	30
3.4.	Çift İşaretli İmmunofloresan (İF) Boyanmalar için Kullanılan Malzemeler, Solüsyonlar ve Cihazlar	33
3.5.	İstatiksel Analiz	35
4.	BULGULAR	
4.1.	Oluşturulan Varikosel Modelinin Başarı Durumunun Belirlenmesi	36
4.1.1.	Spermatik Ven Çapının Ölçümü	36

4.1.2.	Testis Ağırlıkları	37
4.1.3.	Epididimal Sperm ve Motilite Hesaplanması	38
4.2.	Varikosel Sonucu Seminifer Tübülde Meydana Gelen Bozulmaların Histokimyasal İncelemesi	39
4.3.	Western Blot Bulguları	43
4.4.	Çiftli İmmunfluoresan Bulguları	51
4.4.1.	Vangl 2 ve F aktin Çiftli İmmunfluoresan Boyanması	52
4.4.2.	Kan-Testis bariyerinde Vangl2'nin ZO-1 ve N Kaderin ile Çiftli İmmunfluoresan Bulguları	53
4.4.3.	PAR 6 ve F aktin Çiftli İmmunfluoresan Boyanması:	56
4.4.4.	Kan-Testis bariyerinde PAR 6'nın ZO-1 ve N Kaderin ile Çiftli İmmunfluoresan Bulguları	58
4.4.5.	Scribble ve F aktin Çiftli İmmunfluoresan Boyanması	60
4.4.6.	Kan-Testis bariyerinde Scribble'ın ZO-1 ve N Kaderin ile Çiftli İmmunfluoresan Bulguları	63
5.	TARTIŞMA	67
6.	SONUÇ ve ÖNERİLER	75
	KAYNAKLAR	76
	ÖZGEÇMİŞ	83

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Çiftli İmmunfloresan İçin Hazırlanan Primer Antikor Miksleri	36
--	----

Tablo 3.2. Primer ve Sekonder Antikorlar	37
---	----



ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1.	Testis Genel Histolojik Yapıları	4
2.2.	Spermatogenez Şeması	6
2.3.	Sıçanlarda Spermiyogenezde Basamak 1'den 19'a Kadar Olan Spermatidler	7
2.4.	Yetişkin Sıçan Testislerinde Seminifer Epitelyal Döngünün Evreleri	10
2.5.	Seminifer Epitelin Hücre İskeleti Organizasyonu	13
2.6.	Sertoli-Spermatid Arası Ektoplazmik Özelleşmeye Ait TEM Görüntüsü	14
2.7.	Sertoli / Spermatid Bağlanma Bölgeleri İle İlişkili Tubulobulbar Komplekslerinin Konumu ve TEM Görüntüsü	15
2.8.	Sertoli- Sertoli hücresi ve Sertoli – Spermatid Arasındaki Polarite Proteinleri	17
2.9.	Vangl2'nin RNAi ile Susturulmasının Ardından Seminifer Epitel	19
2.10.	Testiste, Vangl2'nin Susturulması Sonucunda Seminifer Epitelde Mikrotübül (MT) Organizasyonunu	20
2.11.	Varikosel Kaynaklı Pampiniform Dilatasyonu	23

3.1.	Sıçana Ait Anatomik Çizim ve Tek Taraflı (Sol) Varikosel Oluşturulan Cerrahi Model	29
4.1.	Model Oluşturulduktan 13 Hafta Sonra, Aynı Hayvana Ait Sağ ve Sol V. Testicularis	38
4.2.	Sol ve Sağ Spermatik Ven Çaplarının (mm) Değerlendirilmesi	39
4.3.	Sol ve Sağ Testis Ağırlıklarının (g) Değerlendirilmesi	40
4.4.	Sperm Motilitelerinin (%) Değerlendirilmesi	41
4.5.	Kontrol ve Sham Grubu Seminifer Tübül Hematoksilen & Eozin Boyanması	43
4.6.	Varikosel Grubunda Farklı Sıçanlara Ait Testis Kesitlerinin Hematoksilen & Eozin Boyanması	44
4.7.	Varikosel Grubuna Ait Seminifer Tübül Dejenerasyon Değerlendirmesi (Hematoksilen & Eozin)	45
4.8.	Aktif Kaspaz ve iNOS Protein Ekspresyon Düzeyleri	47
4.9.	Vangl 2 Protein Miktarları ve Western Blot Analiz Sonuçları	48
4.10.	PAR 6 Protein Miktarları ve Western Blot Analiz Sonuçları	49
4.11.	Scribble Protein Miktarları ve Western Blot Analiz Sonuçları	50

4.12.	F aktin Protein Miktarları ve Western Blot Analiz Sonuçları	51
4.13.	ZO-1 Protein Miktarları ve Western Blot Analiz Sonuçları	52
4.14.	N Kaderin Protein Miktarları ve Western Blot Analiz Sonuçları	53
4.15.	Germ Hücrelerinin Gruplara göre Diziliş Farklılıkları	54
4.16.	Vangl 2 - F aktin Çiftli İmmunfloresan Boyanması (Evre VIII)	56
4.17.	Vangl 2 – ZO-1 Çiftli İmmunfloresan Boyanması (Evre V)	58
4.18.	Vangl 2 – N Kaderin Çiftli İmmunfloresan Boyanması (Evre V)	59
4.19.	PAR 6 - F aktin Çiftli İmmunfloresan Boyanması (Evre VIII)	60
4.20.	PAR 6 - F aktin Çiftli İmmunfloresan Boyanması (Evre V)	61
4.21.	PAR 6 – ZO-1 Çiftli İmmunfloresan Boyanması (Evre V)	62
4.22.	PAR 6 – N Kaderin Çiftli İmmunfloresan Boyanması (Evre V)	63
4.23.	Scribble - F aktin Çiftli İmmunfloresan Boyanması (Evre VIII)	65
4.24.	Scribble - F aktin Çiftli İmmunfloresan Boyanması (Evre V)	66
4.25.	Scribble – ZO-1 Çiftli İmmunfloresan Boyanması (Evre V)	68

4.26. Scribble – N Kaderin Çiftli İmmunfloresan Boyanması (Evre V) 70



SİMGELER ve KISALTMALAR

AEÖ	:Apikal Ektoplazmik Özelleşme
AJ	:Adherens Junction, Aderens Bağlantı
aPKC	:Atipik Protein Kinaz -C
BEÖ	:Bazal Ektoplazmik Özelleşme
Ca	:Kalsiyum
CRB	:Crumbs
DHP	:Düzlemsel Hücre Polaritesi
eNOS	:Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
EÖ	:Ektoplazmik Özelleşme
FITC	:Floresan İzotiyosiyanat
GER	:Granüllü Endoplazmik Retikulum
iNOS	:İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
KD	:Knock-Down
KO	:Knock-Out
KTB	:Kan Testis Bariyeri
MCT 2	:Monokarboksilat Taşıyıcı 2
MT	:Mikrotübül
NO	:Nitrik Oksit
NOS	:Nitrik Oksit Sentaz
PE	:Fikoeritrin
PKG	:Protein Kinaz G
ROS	:Reaktif Oksijen Türleri

sGC	:Solubl Guanilat Siklaz
SOR	:Serbest Oksijen Radikalleri
TAC	:Total Antioksidan Kapasitesi
TBK	:Tubulobulbar kompleksler
Vangl 2	:Van Gogh Like 2
ZO-1	:Zonula okludens-1



1.GİRİŞ

1.1.Hipotez ve Amaç

Dünya Sağlık Örgütü'nün resmi istatistiklerine göre en az 48 milyon çiftin ve 186 milyon kişinin infertilite sorunu yaşadığı bildirilmiştir. Varikosel, erkek infertilitesinin önde gelen nedeni olarak kabul edilmektedir ve tüm erkeklerin yaklaşık %15 ila %20'sinde görülür, ancak infertil erkeklerin yaklaşık %40'ında bulunur (Leslie ve ark., 2022; K. Wang ve ark., 2022).

Pampiniform pleksus içindeki testiküler venlerin anormal dilatasyonu olarak bilinen varikoselin (Noske ve Weidner, 1999) etiyolojisinin tam olarak aydınlatılamadığı gibi; bu hastalığın infertiliteyle de ilişkisi net bir şekilde ortaya konulamamıştır. Birkaç teori olmasına rağmen, bir varikoselin sperm üretimini, yapısını ve işlevini nasıl bozduğu tam olarak açık değildir.

Varikoselde venöz reflü veya staz sonucu damar genişlemesiyle ortaya çıkan hipertermi, testiküler serbest oksijen radikallerinin (SOR) artışına sebep olur. Hipertermi/hipoksi kaynaklı SOR artışı testiküler oksidatif stresi artırır (Ahmet Karakeçi 2019). Varikosel sonucu, venöz duvarlar üzerindeki artan basınç reaktif oksijen türlerinin (Reactive Oxygen Species; ROS) salınımına neden olur. Oksidatif stres beraberinde açığa çıkan reaktif oksijen türleri (ROS), varikosel seyri boyunca önemli bir patojenik faktör olarak gösterilmektedir ve çok çeşitli patofizyolojik süreçler üzerinden testiküler ve epididimal bozukluklara sebep olabilir. Yüksek ROS seviyeleri, yalnızca lipid peroksidasyonu veya DNA hasarı yoluyla değil, aynı zamanda spermatogenezdeki enzimleri ve proteinleri etkisiz hale getirerek de infertiliteye yol açabilir (K. Wang ve ark., 2022).

Şöyle ki; ROS, hücre zarında birtakım bozukluklara sebep olduğundan, kaderin ve katenin gibi transmembran proteinlerin, ROS'a daha duyarlı olduğu söylenebilir. Ek olarak, ROS'un spermatositlerin ara bağlantılarını (Zonula adherens; Adherens junction; AJ) bozarak, Sertoli hücreleri ile preleptoten / leptoten aşamasındaki spermatositler arasında tutunma gücüne neden olarak infertiliteye sebep olabileceği

vurgulanmıştır (Ha ve ark., 2011). Bu alanda yapılan birçok çalışmada, varikoselin seminifer epitel üzerindeki etkileri henüz tam olarak bilinmemekle birlikte literatürde, özellikle Sertoli hücrelerine özgü bağlantı komplekslerine etkisini inceleyen araştırmalar sınırlı sayıda olup, polarite proteinlerindeki etkisini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Sunulan tez çalışmamızda, varikoselin, artan ROS ve apoptoz ile ilişkisi hakkındaki mevcut verilerden yola çıkarak, varikosel ile birlikte Sertoli hücresinin kompleks yapısında ve spermatogez sürecinde meydana gelen değişimleri ortaya koymak adına; Erişkin sıçan testisinde, gerek kan-testis bariyerinde gerekse spermiyasyonda önemli görevleri olduğu bilinen polarite proteinleri ve ilişkili oldukları adezyon moleküllerinin ekspresyonları üzerinde varikosel etkisinin Western Blot ve İmmunfloresan yöntemleri ile incelenmesi amaçlanmıştır.

Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamızın hipotezi; “Erişkin sıçan testis dokusunda varlığı bilinen PAR6, Scribble ve Vangl2 gibi polarite proteinlerinin ve ilişkili oldukları F-Aktin, Zonula okludens-1 ve N-kaderin gibi adezyon moleküllerinin ekspresyonları, varikosel sonucu değişerek spermatogenez mekanizmasını etkiler.” şeklinde kurulmuştur.

2.GENEL BİLGİLER

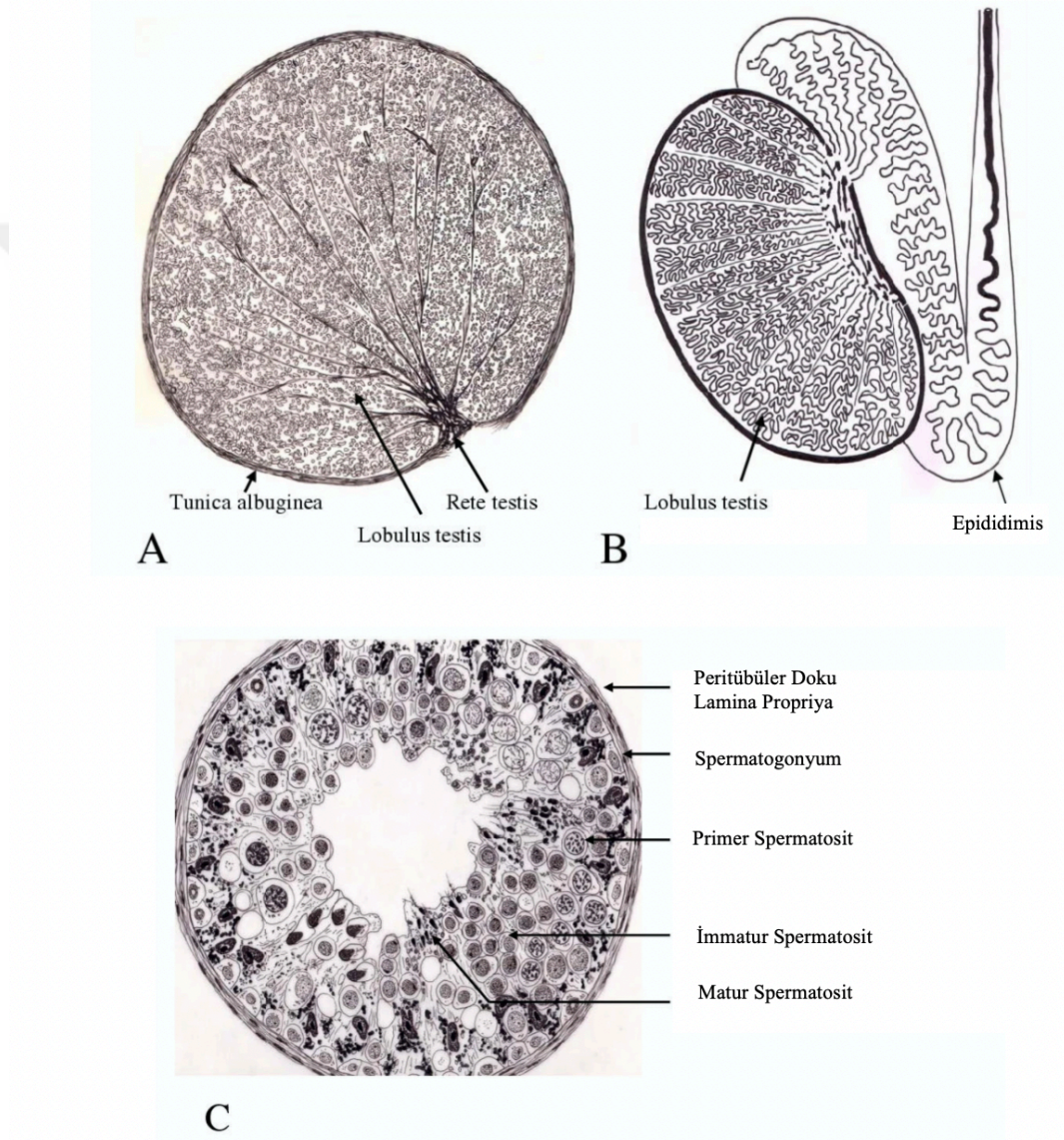
2.1.Testis Histolojisi

Ekstraabdominal bölgede, skrotum içerisinde yer alan testislerin temel görevleri üreme hücresini (sperm) ve cinsiyet hormonlarını (androjenler) üretmektir. Yapısal olarak bakıldığında, ilk olarak, skrotumu iç kısmını döşeyen, peritondan gelişmiş seröz bir kese olan tunika vajinalis bulunmaktadır. Hemen altında bulunan tunica albuginea ise, iç içe geçmiş kollajen ve düz kas demetlerinden oluşan fibröz bir kapsül olarak testisi sarmaktadır. Mediastinum testis, testisi yaklaşık 250-400 lobüle bölen çok sayıda septanın (trabekül - septula testis) ortaya çıktığı tunica albugineanın bir invajinasyonudur (Liguori ve ark., 2011). Her bir lobülde 1-4 arası seminifer tübül ve Leydig hücrelerini içeren bağ dokusu bulunur (Mescher, 2018). Bir testiste yaklaşık 250-1000 arası seminifer tübül bulunur ve her tübül 150-250 µm çapında, 70 cm uzunluğundadır. İki ucu U şeklinde olan tübüller rete testise açılır. Mediastinum içerisinde, anastomozlaşan kanallar sistemi olarak bilinen rete testiste seminifer epitelin ürünleri olan sperm, salgısal proteinler-iyonlar toplanır. Seminifer tübül, en dıştan çevreleyen tunica propriya, bazal membran ve çok katlı, kompleks bir epitelden oluşmaktadır. Tunika propriyaya ait, bazal laminaya yapışık olan katmanda düz kas karakterinde, yassı şekilli miyoid hücreler bulunur. Bu hücreler ritmik kasılarak hareketsiz spermleri rete testise ulaştırır. Spermler daha sonra motilite özelliklerini kazanmak üzere epididimise geçer (Kierszenbaum, 2006).

Epitel ise testise özgü olarak, seminifer veya germinal epitel olarak isimlendirilmektedir. Seminifer epitel iki belirgin hücre popülasyonunun oluşturduğu sıradışı bir dizilime sahiptir; 1) Somatik – Sertoli hücreleri, 2) Germ hücreleri (Spermatogonya, Spermatosit, Spermatid).

Tübüllerin dışında kalan intertübübüler boşluk veya intersitisyel doku olarak adlandırılan alanda; kan damarları, lenfatik kanalları, makrofajlar ve Leydig hücreleri bulunmaktadır (Kierszenbaum, 2006; Mescher, 2018). İntertubuler boşlukta kılcak damarları çevrelerinde kümeler halinde bulunan Leydig hücreleri, testesteronu

üretiminden ve salgılanmasından sorumludur. Testesteron, hipofiz-testis eksenini aktive ederek spermatogenezin başlatılmasında ve sürdürülmesinde önemli rol oynar (Suede ve ark., 2022). Testise ait histolojik yapılar **şekil.2.1**'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Testis genel histolojik yapıları (A) İnsan testisinin enine kesitinin çizimi. $\times 2.5$. (B) İnsan testisindeki seminifer tübüllerin ve epididimisin kanal sisteminin düzenlenmesi. Yarı şematik çizim. (C) 32 yaşındaki fertil bir erkeğin seminifer tübülünün kesit çizimi. $\times 300$ (Holstein ve ark., 2003).

2.2.Testisin Fonksiyonel Organizasyonu

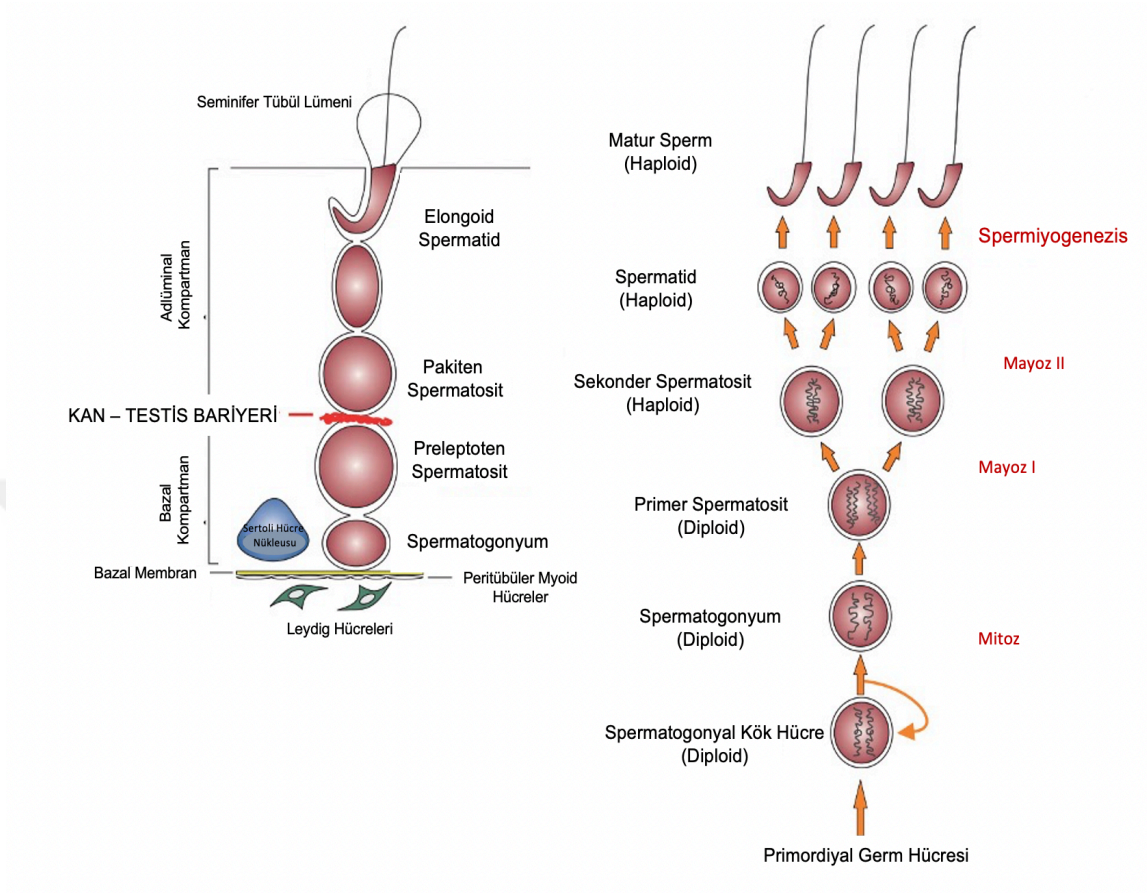
Testisler erkek gametlerini ve erkek cinsiyet hormonlarını (androjenler) üretir. Spermatogenez terimi, gamet üretiminde yer alan tüm süreçleri tanımlar ve içerir, bunun yanında steroidogenez ise, erkek steroid hormonlarının üretimine yol açan enzimatik reaksiyonları ifade eder. Spermatogenez ve steroidogenez morfolojik ve fonksiyonel olarak birbirinden ayırt edilebilen iki farklı kompartmanda gerçekleşir. Sırasıyla seminifer tübüllerde ve interstisyel alanlarda gerçekleşen bu iki temel mekanizma, anatomik olarak ayrı olmasına rağmen birbirleriyle yakından bağlantılıdır.

Kantitatif ve kalitatif olarak normal bir sperm üretimi için her iki mekanizmanın bütünlüğü gereklidir. Testisin işlevi ve dolayısıyla kompartmanların işlevi hipotalamus ve hipofiz bezi tarafından yönetilir (endokrin düzenleme). Bu endokrin etkilere testis seviyesinde yerel kontrol mekanizmaları aracılık ederek parakrin ve otokrin faktörler tarafından modüle edilir (Nieschlag ve ark., 2010).

2.3.Spermatogenez

Spermatogenez, spermatogonyal kök hücrelerin bölünmesiyle başlar ve olgun sperm oluşumuyla sona erer. Spermatogenez sırasında germ hücrelerin geçirdiği tüm spermatojenik süreç dört aşamaya ayrılabilir (**Şekil.2.2**):

1. Diploid germ hücrelerinin (spermatogonia) mitotik proliferasyonu ve farklılaşması (spermatogoniogenesis)
2. Tetraploid germ hücrelerinin mayotik bölünmesi (spermato-haploid germ hücreleri (spermatidler) ile sonuçlanan
3. Spermatidlerin testiküler sperme dönüşümü (spermiyogenez)
4. Spermin germinal epitelden tübüler lümene salınması (spermiasyon) (Nieschlag ve ark., 2010).



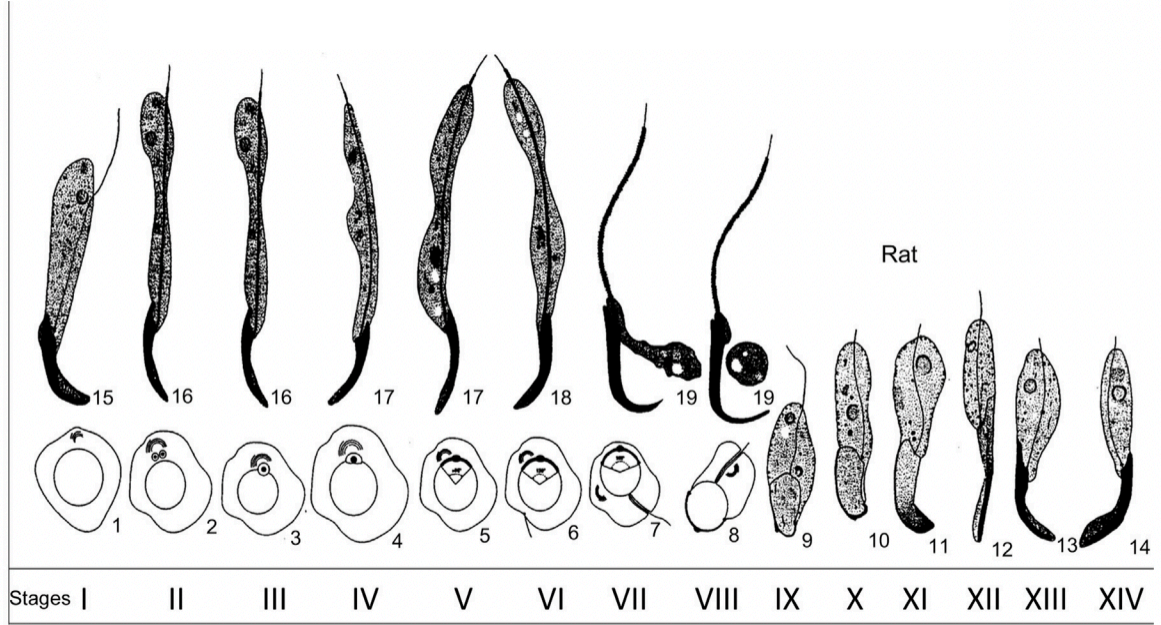
Şekil 2.2. Spermatogenez Şeması (C. Y. Cheng ve Mruk, 2010a)

Yukarıda bahsedilen aşamaların herhangi birinde, tüm sürecin başarısız olmasına neden olabilecek fonksiyonel anormallikler meydana gelebilir. Bu anormallikler kusurlu veya azalmış sperm üretimine yol açabilir. Daha şiddetli koşullarda, spermatozoanın tamamen yokluğu ile sonuçlanarak infertiliteye yol açabilir. Testis kendi içerisinde kompleks bir histoloji ve fizyolojiye sahiptir. Bu karmaşık mekanizmayı daha iyi anlamak için, kemirgenler ve primatlar üzerinde tamamlanan deneysel çalışmalar oldukça önem arz etmektedir. Özellikle sıçanlar için, spermatogenezin tüm süreçleri evreleriyle beraber aşağıda ayrıntılı bir şekilde anlatılmıştır.

2.3.1. Sıçanlara Özgü Seminifer Epitelin Evrelendirilmesi

Senkronize spermatogenez süreci, germ hücrelerinin seminifer epitel içerisinde ilerlemesine veya değişmesine olanak sağlar. Germ hücreleri, spermatogenik diziyi oluştururken gelişimlerinin farklı aşamalarında, birbirleri ve Sertoli hücreleri ile birlikte

epitel içerisinde evreye-özgü bir dağılım gösterirler. Evreler, spermatidlerin akrozomik özelliklerine odaklanarak (Şekil 2.3.), seminifer tübülün enine kesitlerinde histolojik olarak incelenmeler ile tanımlanır (Şekil 2.4.) (R. Hess, 1998).



Şekil 2.3. Sıçanlarda spermiyogeneze basamak 1'den 19'a kadar olan spermatidler; Basamak 1-7 arasında, Golgi tarafından salgılanan, glikoproteince zengin proakrozomik granüller yavaş yavaş çekirdeğin yüzeyinde birleşmesiyle tek katlı bir zar şeklinde akrozom başlığını oluşturmaya başlarlar. Çekirdek hızla elongoid hale geldikçe, kromatin kondense olur ve spermin baş bölgesi orak şeklini alır (Basamak 9-14). Spermiyogenezin son aşamalarında (basamak 15-19), fazlalık sitoplazma (rezidüel cisimcik) atılır ve Sertoli hücresi tarafından fagosite edilir. Böylece basamak 19 spermatid oluşur (Haschek, 2013).

Yetişkin sıçan testislerinde, seminifer epitel döngüsü 14 evreye bölünebilir (farelerde 12 evre ve insanlarda 6 evre) (De Kretser ve Kerr, 1994). Şekil 2.3.2.'te gösterildiği gibi seminifer epiteldeki bu evreler (Leblond ve Clermont, 1952; Parvinen, 1982; C. Y. Cheng ve Sun, 2008); Sertoli hücreleri ile gelişmekte olan spermatidler arasındaki benzersiz ilişki ile karakterize edilir (Wong ve Cheng, 2009).

Spermatogenezisin başlangıç aşamasında, bazal laminanın hemen yakınında konumlanan iki tip spermatogonyal hücre tipi bulunur; 1) Tip A (insan testisinde A koyu ve A açık), 2) Tip B Spermatogonyum (Kierszenbaum, 2006). Tip A spermatogonyal kök hücrelerden bazıları tip B spermatogonyaya dönüşmek için mitoz geçirirler. Bu sürece ait mekanizma(lar) tam olarak tanımlanmamış olsa da hangi tip B

spermatogonyumların primer spermatositlere farklılaşacağına önceden karar verildiği düşünülmektedir (Wong ve Cheng, 2009). Bunlar, hücre döngüsünü ilerleterek preleptoten spermatositlere farklılaşacak olan germ hücreleridir (**Şekil.2**). Daha sonra, preleptoten spermatositler, leptoten ve zigoten spermatositlere farklılaşırken epitel döngüsünün VIII-IX evrelerinde Kan-Testis Bariyerini (KTB) geçmeye başlarlar (Russell, 1977).

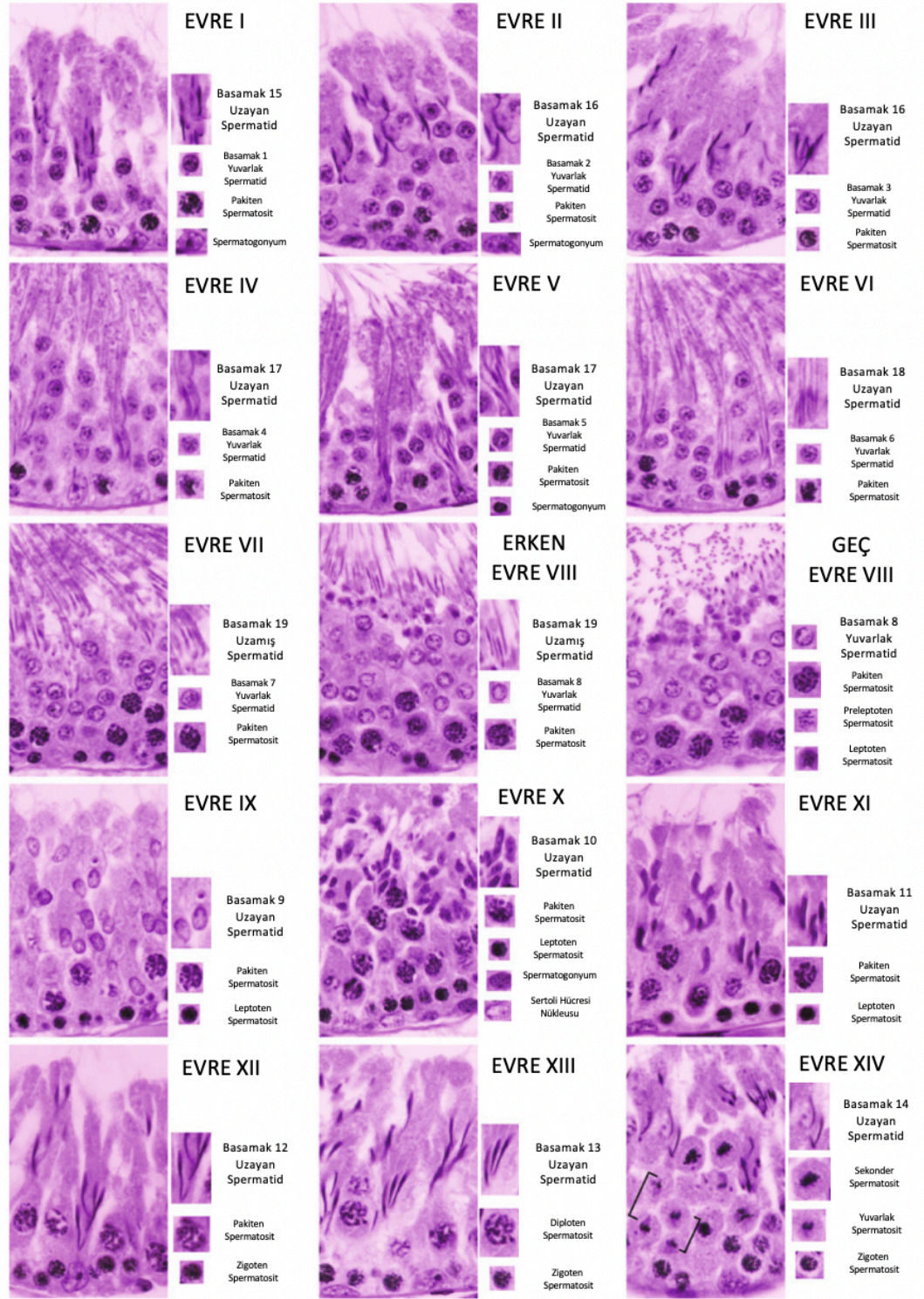
Bu olaylarla eş zamanlı olarak, KTB'deki primer spermatositlerin geçişi sırasında kromatin materyallerin yoğunlaşması ve replikasyonu gerçekleşir, böylece diploten spermatositler (tetraploid, $4n$) diyakineziye uğrar. Bunu mayoz I ve ardından yuvarlak spermatidleri (basamak 1 spermatid, haploid, $1n$) oluşturmak için XIV. evrede gerçekleşen mayoz II takip eder (Wong ve Cheng, 2009).

Mayoz tamamlandığında, spermatidler (haploid, $1n$), sıçan testislerinde basamak 1'den basamak 19'a kadar çeşitli morfolojik değişikliklere uğrayarak spermatogenik diziyi tamamlamış olurlar (**Şekil 2.3.1.**). Tamamen gelişmiş uzun spermatidler (basamak 19), epitel döngüsünün VIII. evresinde epitelin adluminal kenarında sıralanır. Bu esnada basamak 19 spermatidler ile Sertoli hücresi arasındaki adezyon protein kompleksinin bozulmasıyla spermiyasyon gerçekleşir. Böylece seminifer tübül lümenine salınan spermatozoalar sonraki olgunlaşmaları için epididimise taşınırlar (Wong ve Cheng, 2009; Xiao ve ark., 2014). Ayrıca, evre VIII'de gerçekleşen spermiyasyonun yanında primer spermatositlerin KTB'den geçişini kolaylaştırmak için bariyerin yeniden yapılandırılması da eş zamanlı gerçekleşir. İlginç bir şekilde, aynı evrede gerçekleşen bu üç hücresel olay, yani (i) spermiyasyon, (ii) KTB yeniden yapılandırılması ve (iii) germ hücre döngüsünün ilerlemesi, Sertoli hücresinin zıt uçlarında gerçekleşir. Bu nedenle, epitel döngüde, bu çoklu hücresel olayları senkronize bir şekilde koordine edebilmek için seminifer epitelde (özellikle de Sertoli hücresinde) ciddi bir kontrol mekanizması gerekmektedir.

Spermiyogenez ve spermiyasyon esnasında, seminifer epitelde meydana gelen bu hücresel olaylar arasından dikkat çeken diğer nokta; “gelişen spermatidlerin doğru yönelimi veya Sertoli hücresine doğru açıda tutunması”dır. Basamak 1'den 19 kadar,

gelişmekte olan spermatidlerin baş kısımlarının, epitel döngünün tüm evrelerinde bazal membranı işaret ettiği kaydedilmiştir. Apikal ektoplazmik özelleşme (EÖ) olarak isimlendirilen, testise özgü bir atipik aderens bağlantı (AJ) ile spermiyogenez sırasında spermatid oryantasyonu sağladığı bildirilmiştir (A. Vogl, Vaid, Guttman, ve ark., 2008; Wong, Mruk, & Cheng, 2008). Ektoplazmik özelleşmelerin spermatid polaritesini nasıl sağladığı ile ilgili çalışmalar son yıllarda oldukça artmıştır (Wong ve Cheng, 2009).





Şekil 2.4. Yetişkin sıçan testislerinde spermatogenez boyunca seminifer epitelyal döngünün farklı evreleri (I-XIV) (Wong ve Cheng, 2009).

2.4. Sertoli Hücresi:

Sertoli hücrelerinin karmaşık morfolojisi ve germ hücreleri ile etkileşimleri, Enrico Sertoli tarafından 1865'te ilk kez tanımlanmasından bu yana araştırmacıların; hücrenin spermatogenezdeki rolünü anlamak ve erkek fertilitesiyle ilgisini ortaya koymak adına odak noktası olmuştur (Griswold, 2018).

Sertoli hücreleri, seminifer epitelde yer alan somatik hücrelerdir. Postpubertal dönemde, bu hücreler mitotik açıdan inaktiftir. Bazal laminanın üzerinde yer alan Sertoli hücreleri, seminifer tübülün lümenine kadar uzanan, dallı ve çıkıntılı bir sitoplazmaya sahiptir. Bu yönden seminifer epitelin destekleyici ve iskelet rolünü üstlendiği söylenebilir. Oldukça aktif bir hücrenin yansıması olan ökromatik nükleusu ise genellikle üçgen veya oval şekliyle karşımıza çıkarken yerleşimleri değişkenlik gösterir (Ross ve ark., 2002).

Sertoli hücreleri hem ekzokrin hem de endokrin salgı fonksiyonlarına sahiptir (Ross ve ark., 2002); çok çeşitli faktörleri sentezler ve salgılarlar: Proteinler, sitokinler, büyüme faktörleri, opioidler, steroidler, prostaglandinler, hücre bölünmesi modülatörleri vb. Bu karmaşık hücrenin morfolojisi de dahil olduğu birçok fizyolojik fonksiyonlarına göre gelişmiştir. Sitoplazmasında hem granülsüz endoplazmik retikulum (ER) (steroid sentezi) hem de granüllü ER (protein sentezi) içerir. Ayrıca belirgin bir golgi cisimciği (salgı ürünlerin işlenmesi-taşınması), lizozomal granüller (fagositoz) ve yapısal olarak da mikrotübüller, ara filamanlar (değişken epitel tipine adaptasyon) bulunur. Tüm bunların yanında testise özgü hücreler arası adezyon bağlantılarıyla Kan-Testis Bariyerini oluşturarak immunité görevini de üstlenmiştir. Genel olarak, bu benzersiz hücrenin, spermatogenez sürecini topoğrafik ve işlevsel olarak koordine ettiği varsayılmaktadır (Nieschlag ve ark., 2010).

2.4.1. Sertoli Hücre Mimarisi ve Adezyon Molekülleri:

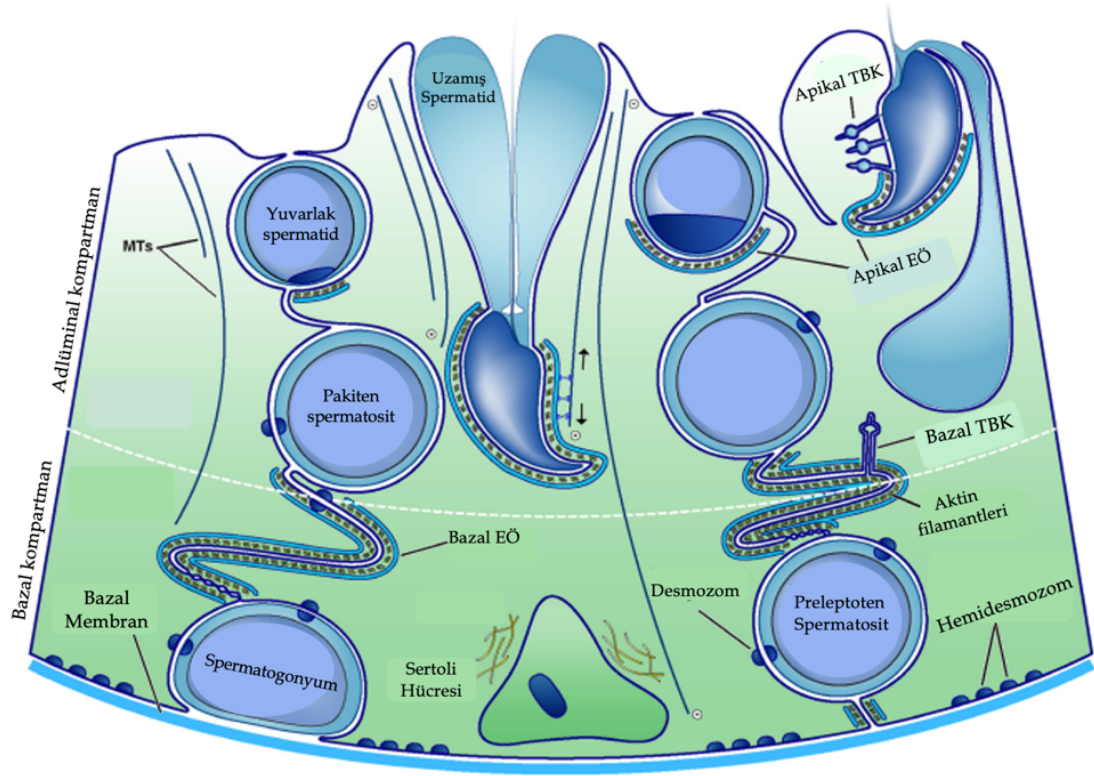
Testis dokusunda Sertoli hücresi, spermatogenezin çok önemli bir düzenleyicisidir (A Wayne Vogl ve ark., 2009). Spermatogenez, testisin fonksiyonel birimi olan seminifer tübüllerde gerçekleşir. Yetişkin bir erkek fare, sıçan ve insan testisinden sırasıyla günde ~ 8, 70 ve 200 milyon sperm üretilir. Bu nedenle; seminifer tübül boyunca, epitelde gelişmekte olan milyonlarca spermatidin spermatogenezinin desteklenmesi için muazzam bir hücresel mekanizma gerekmektedir (Chen ve ark., 2018). Sertoli hücresinde bulunan, polarite protein kompleksleri ve düzlemsel hücre polarite kompleksleri ile aktin, ara filamanlar ve mikrotübül temelli hücre iskeleti yapıları senkronize bir şekilde çalışarak spermatogenezin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesini sağlarlar.

Sertoli hücrelerinde, adezyon molekülleri, hücre iskeleti yapıları ile ilişkili halde bulunurlar ve seminifer epitel içerisinde hücrelerin translokasyonunda, tutunmalarında büyük önem taşırlar. Sertoli-spermatid adezyonunu sağlayan adezyon protein komplekslerinden bazıları; $\alpha 6 \beta 1$ integrin, laminin ve nektin-3 gibi proteinlerdir. İki Sertoli hücresi arasında oluşan adezyonlar ise; N-kaderin, β -aktin ve nektin, afadin gibi komplekslerdir. Sıkı bağlantılardan (Tight junction; TJ); Okludin, klauidin-11, JAM gibi transmembran proteinler, Sertoli hücre bariyerinin bileşenleri olarak tanımlanmış ve ektoplazmik özelleşmeler ile ilişkilendirilmiştir (C. Y. Cheng ve Mruk, 2002; Skinner ve Griswold, 2004). Bu moleküllerinin intraselüler kısımları zonula okludenslerle birleşerek aktin zincirleri ile bağlantı haldedirler (Toyama ve ark., 2001).

Sertoli hücrelerinin hücre iskeletleri, diğer hücrelerden çok farklı ve daha kompleks bir yapıya sahiptir. Mikrotübüller, aktin filamanları ve ara filamanlar, Sertoli hücresinin hücre iskeletinin ana bileşenleri olarak spermatogenezin döngüsel sürecinde büyük rol oynarlar. Hücre iskeleti öğelerinin her biri, seminifer epitel içerisindeki, sperm salımına kadar olan tüm dinamikten sorumludur. Bu üç element genel olarak; hücrenin yapısının, şeklinin ve polaritesinin korunması, hücre içi organellerin hareketi ve konumlarının sabitlenmesi, mikrovillus gibi sitoplazmik uzantıların oluşması gibi önemli yapısal görevleri üstlenirler (Skinner ve Griswold, 2004).

Sertoli hücrelerinde mevcut olan mikrotübül dizileri, seminifer epitel boyunca, germ hücrelerinin olgunlaşma süresince, spermatidlerin translokasyonunu sağlayan ve Sertoli hücresinin lümene doğru uzanan kolonumsu yapısını oluştururlar (Smith ve ark., 2012).

Sertoli hücrelerinde, aktin filamentleri, plazma membran proteinleri ile ilişkili halde, bazal ve apikalde özelleşen iki ana bölgede bulunurlar; bunlardan ilki ektoplazmik özelleşmeler (EÖ) iken, ikincisi tübülobulbar kompleks (TBK) yapılarıdır (**Şekil 2.5.**).

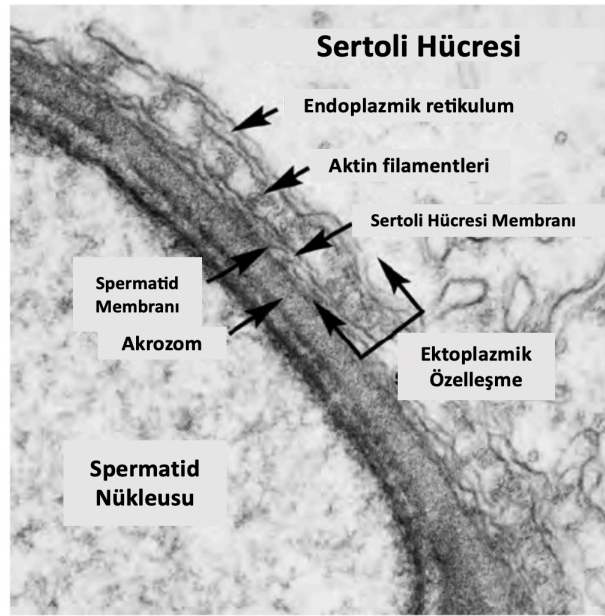


Şekil 2.5. Seminifer epitelin hücre iskeleti organizasyonu (Dunleavy ve ark., 2019)

2.4.2. Ektoplazmik Özelleşmeler

Ektoplazmik özelleşmeler (EÖ), Sertoli hücrelerinde, uzamış spermatidlere veya komşu Sertoli hücrelerine bağlanma bölgelerinde bulunan sitoskeletal topluluklardır. Ektoplazmik özelleşmeler, Sertoli hücresinin plazma zarı ile endoplazmik retikulumun sisternasının arasında paralel şekilde dizilmiş aktin demetleri tabakası içeren benzersiz bir bağlantı plağını oluştururlar (**Şekil 2.6.**) (Bartles ve ark., 1996).

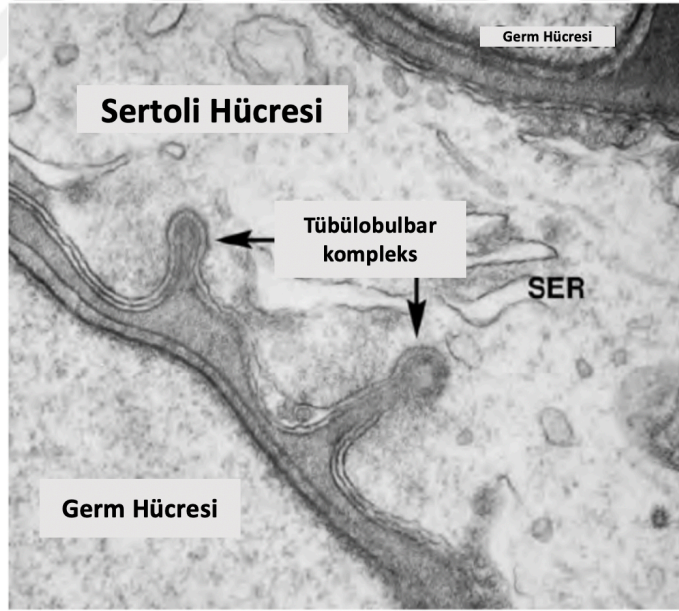
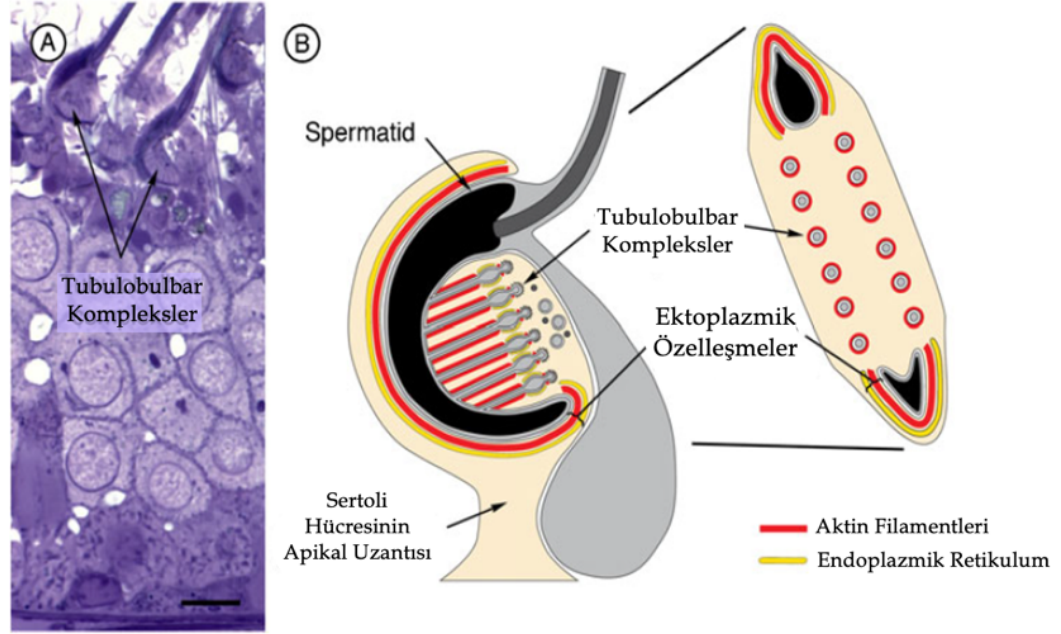
Spermatid-ektoplazmik özelleşmelerin arayüzü, son derece sıkı bir adezyon bağlantısı olarak işlev görür (A. W. Vogl, Vaid, & Guttman, 2008). Bu benzersiz bağlantı kompleksleri iki kortikal alanda konumlanır. Kan-testis bariyerini oluşturan bazal ektoplazmik özelleşmeler, seminifer epitelin tabanının yakınında yoğunlaşırken, akrozomu saran apikal ektoplazmik özelleşmeler, seminifer tübülün lümenine yakın halde bulunur. Haploid spermatidler ile Sertoli hücreleri arasında spermiyasyona kadar tutunma aracı olarak görev alırlar (O'Donnell ve ark., 2011; A. W. Vogl ve ark., 2014; L. Li ve ark., 2020).



Şekil 2.6. Sertoli-Spermatid arası ektoplazmik özelleşmeye ait TEM görüntüsü (Rex A Hess ve França, 2005)

2.4.3. Tübülobulbar Kompleksler

Tübülobulbar kompleksleri (TBK), Sertoli hücrelerinin spermatid plazma membranı ile yaptığı, tubuler invajinasyon olarak tanımlanır (Şekil 2.7.). İlk olarak spermiyasyonun başlangıcında belirgin hale gelir ve spermin tübül lümenine salınmasına kadar gözlenir. Daha çok geç spermatid ile Sertoli hücresi arasında görülür, fakat aynı zamanda evre spesifik olarak kan-testis bariyerinde de ortaya çıkar. TBK'nın en iyi bilinen işlevi, hücreler arası EÖ yapışma bağlantılarını ortadan kaldırmadaki rolüdür. TBK, aynı zamanda spermiyasyon sırasında spermatid başının ve akrozomun şekillendirilmesine yardımcı olduğu düşünülmektedir (O'Donnell ve ark., 2011).



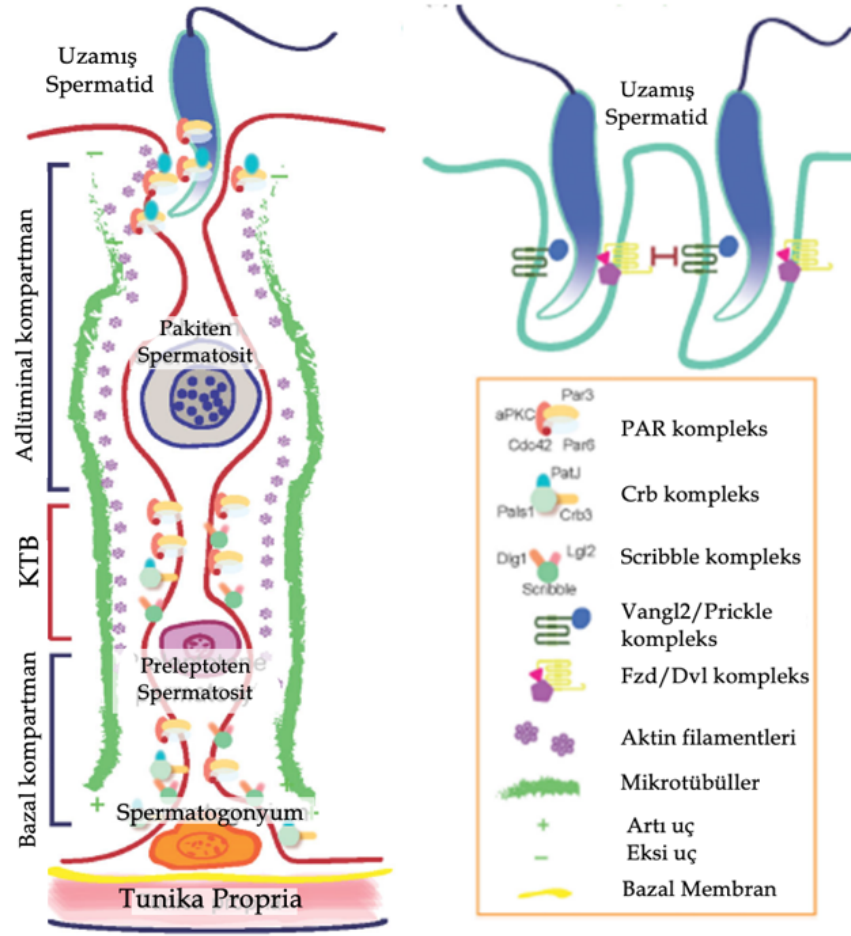
Şekil 2.7.: Sıçan seminifer epitelinde Sertoli / spermatid bağlanma bölgeleri ile ilişkili tubulobulbar komplekslerinin konumu ve düzeni a. Epitelin tepesindeki kanca şeklindeki spermatid başlarının içbükey yüzeylerine bitişik tubulobulbar kompleksleri kümelerini gösteren spermatogenez VII evresinde 1 μ m kalınlığında kesit. Çubuk = 10 μ m. b. Olgun spermatidlere bitişik tubulobulbar düzenlenmesinin şematik gösterimi (Young ve ark., 2012). c. Tübülobulbar kompleksin TEM görüntüsü (Rex A Hess ve França, 2005)

2.4.4. Sertoli Hücre Polaritesi ve Polarite Proteinleri

Hücre polaritesi, hücre iskeleti veya hücre içi moleküller gibi birçok hücresel bileşenin asimetrik organizasyonu sonucu hemen hemen her hücrenin kendi içerisinde kurmuş olduğu şekil, yapı ve fonksiyonundaki farklılıkları ifade eder. Bu asimetrinin, bir hücrenin bölünmesi veya farklılaşması, göç kabiliyeti, nöronal sinyallerin iletimi ya da bir epitel hücresi için bariyer kurabilme fonksiyonu gibi hücresel süreçlerde büyük katkısı vardır.

Sertoli hücreleri, spermatogenez sırasında seminifer epitelde belirgin hücre polaritesi gösterirler. Bu sayede iki Sertoli hücresi arasında kurulan sıkı bağlantılar ile seminifer epitelyumu apikal ve bazal kompartmanlara böler. Öte yandan fagozomlar gibi hücre içi organeller, rezidual cismin lizozomal aktivitesi gereği spermatogenez sırasında apikal kompartmandan bazal kompartmana hızla taşınır. Ek olarak, spermatid başlarının bazal membrana neredeyse dik olarak ve kuyrukları tübül lümenini işaret ederek polarize bir şekilde hizalanması gibi olaylar Sertoli hücresinin başarılı bir spermatogenez süreci için kurduğu hücre polaritesini gösterir (L. Li ve ark., 2020).

Sertoli hücresi tarafından kurulan polarite, bilinen üç adet ‘‘Hücre Polarite Protein Kompleksi’’ ile desteklenmektedir. Bunlar; **PAR**, **Crumbs (CRB)** ve **Scribble** protein kompleksleridir (**Şekil 2.8.**) (Wong ve Cheng, 2009; W. H. Su, Mruk, ve ark., 2012; L. Li ve ark., 2020).



Şekil 2.8. Sertoli- Sertoli hücresi ve Sertoli – spermatid arasındaki polarite proteinleri (L. Li ve ark., 2020)

Par, CRB ve Scribble bazlı protein modüllerini içeren polarite protein kompleksleri, embriyogenez ve gelişim sırasında apiko-bazal polariteyi sağlamak için çok önemlidir. Memelilerde spermatogenez dahil olmak üzere birçok hücre polaritesinin ve doku/hücre fonksiyonunun düzenlenmesi için gereklidirler (Yeaman ve ark., 1999; Assemat ve ark., 2008; Iden ve Collard, 2008; Gao ve Cheng, 2016).

Ayrıca araştırmalar, bu proteinlerin mutasyonlarının insanlarda ve kemirgenlerde farklı hastalıklara, patolojik durumlara yol açtığını ve tümöregenez ve/veya metastazda kritik rol oynadıklarını göstermiştir (Gissen ve Arias, 2015; Lin ve ark., 2015; Gao ve Cheng, 2016).

PAR polarite kompleksi; PAR 6, PAR 3, aPKC (atipik protein kinaz-C) ve Cdc42 proteinlerinden oluşur ve yetişkin sıçan testisinde hem Sertoli hücrelerinin hem de germ hücrelerinde ekspresyonları gösterilmiştir (Wong, Mruk, Lee, ve ark., 2008; Wong ve Cheng, 2009). PAR kompleksinin proteinleri sitozolik proteinlerdir ve seminifer epiteldeki Sertoli hücreleri dahil tüm memeli hücrelerinde TJ yakınında bulunurlar (Wong ve Cheng, 2009). Böylece PAR6, bazal membrana yakın KTB'de belirgin bir şekilde eksprese edilir (Wong, Mruk, Lee, ve ark., 2008; Wong ve Cheng, 2009). Diğer polarite kompleklerinden Crumbs (CRB) protein kompleksi; CRB3 (crumbs homolog-3), PALS1, PATJ (PALS1 ilişkili tight junction protein) proteinlerinden oluşur (Gao ve ark., 2016). Polarite protein komplekslerinin üçüncüsü, Scribble protein kompleksi ise; Scribble, Lgl2 ve Dlg1 proteinlerinden oluşmaktadır (W. Su, Wong, ve ark., 2012) ve hücre polaritesine ek olarak bu protein kompleksinin hücre adezyonunda, hücre döngüsü ilerlemesinde, hücre sinyalleşmesini ve vezikül trafiğini düzenlemekte görev aldığı bilinmektedir (C. Y. Cheng ve Mruk, 2010b; C. Y. Cheng ve ark., 2011; W. Su, Wong, ve ark., 2012).

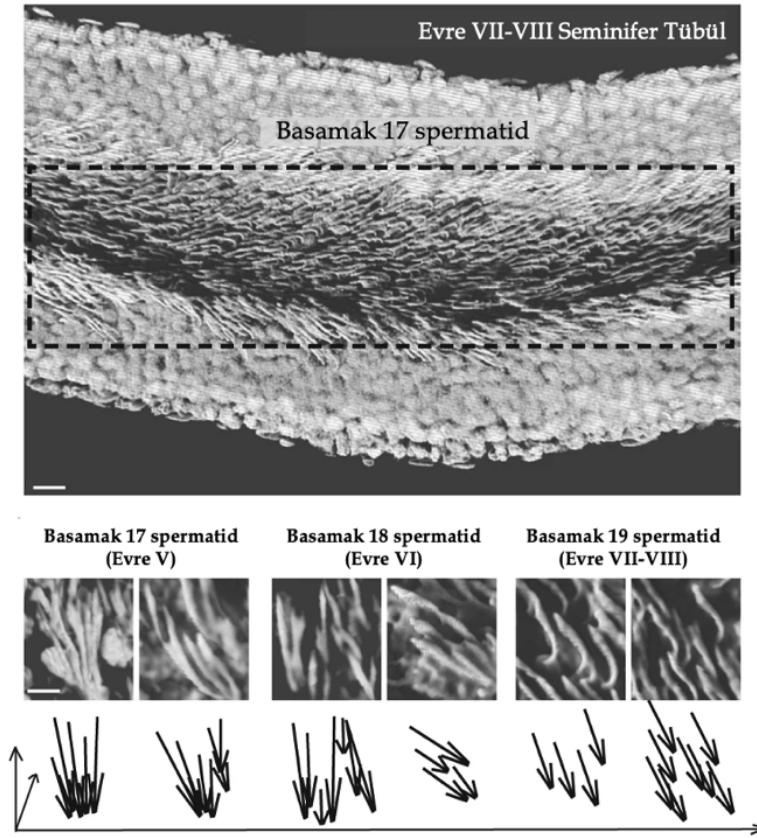
2.4.5. Düzlemsel Hücre Polaritesi - DHP (Planer Cell Polarity; PCP)

Düzlemsel hücre polaritesi (DHP), tipik olarak, bir epitelin, hücresel bileşenlerinin koordineli ve ortak bir şekilde farklılaşabileceği, bölünebileceği veya hareket edebileceği şekilde, doku düzlemi boyunca yönsel bilgiyi iletme kapasitesini ifade eder (Bailly ve ark., 2018). Hücre polaritesi proteinleri ve düzlemsel hücre polaritesi (DHP) proteinleri üzerine yapılan çalışmalar önceleri, *Drosophila* ve *C. elegans*'ta ile sınırlıydı. Yetişkin memelilerde, hücre polaritesi ve DHP'nin, spermatogenezi destekleme rolü ile ilgili çalışmalar ise yaklaşık son on yıldır devam etmektedir. Yetişkin memelilerde, hücre polaritesi ve DHP en çok koklear kıl hücrelerinde belirgindir (L. Li ve ark., 2020).

Düzlemsel hücre polarite proteinleri, DHP proteinleri (örn., Van Gogh benzeri protein, Frizzled proteinler ve Disheveled segment polarite proteinleri), efektörleri (örn., Fuzzy düzlemsel hücre polaritesi proteinleri), ligandlar (örn., Wnt5a, tirozin protein kinaz Ror2) olarak sınıflandırılır. En çok araştırılan DHP proteinlerinden biri, ilk olarak *Drosophila*'da bulunan ve aynı zamanda strabismus olarak da bilinen Van Gogh'un bir homologu olan Van Gogh benzeri proteindir (Van Gogh like - Vangl). Memeli

hücrelerinde Vangl1 ve Vangl2 olmak üzere iki Vangl homologu bulunur ve bu iki homolog, polipeptit dizilerinde yaklaşık %70 benzerlik gösterirler (Chen ve ark., 2016).

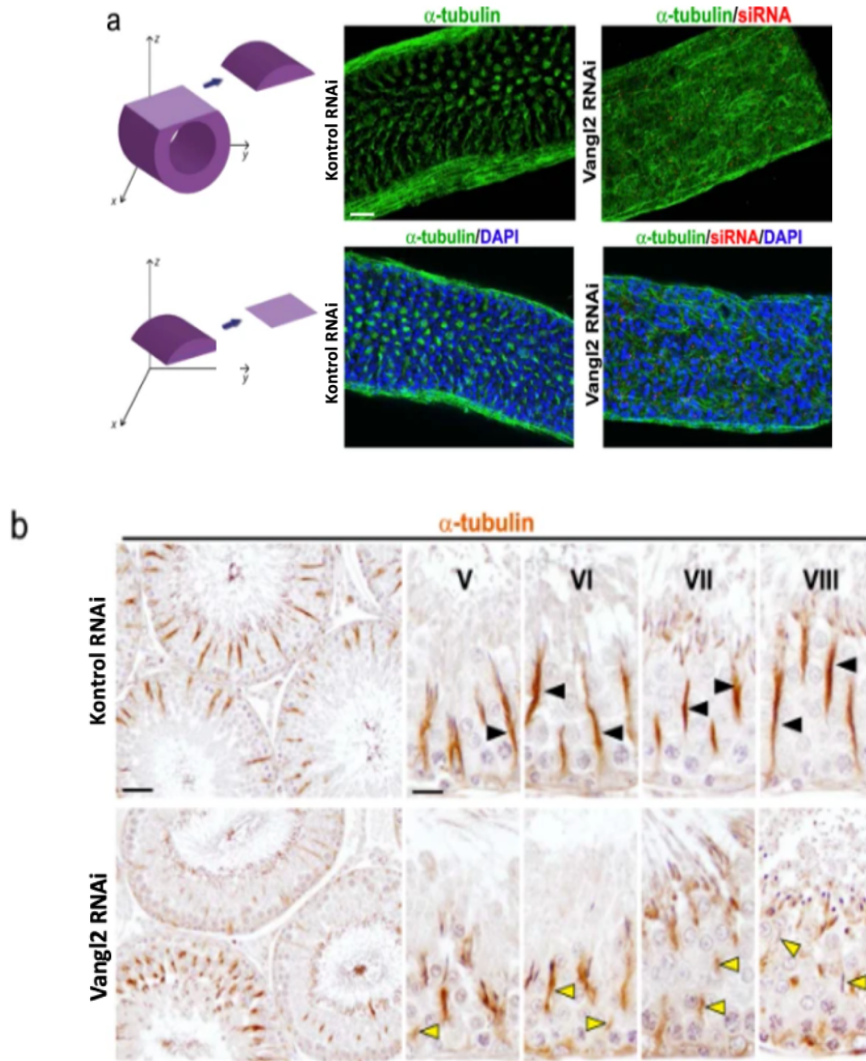
Spermatogenez sırasında gelişen uzayan / uzamış spermatidler, benzersiz apiko-bazal polarite gösteren oldukça polarize hücrelerdir. Özellikle evre VII – VIII tübüllerdeki basamak 17-19 spermatidler, başları bazal membrana dik ve kuyrukları tübül lümenine doğru bakacak şekilde hizalanır (**Şekil 2.4.5.**). Bu polarize spermatidler, kokleadaki (iç kulak) diğer kıl hücrelerinde bulunan düzlemsel hücre polaritesini (DHP) taklit ederek bu tutunmayı gerçekleştirirler. Bu sayede, maksimum spermatid sayısı, seminifer epitelin sınırlı alanı içinde paketlenir ve desteklenir (Chen ve ark., 2018).



Şekil 2.9. Vangl2'nin RNAi ile susturulmasının ardından seminifer epiteldeki uzatılmış spermatid DHP'si bozulur. Scale bar =10 µm (Chen ve ark., 2018).

Vangl2, polarite ve hücre yapışmasında önemli bir protein olan Scribble (Bailly ve ark., 2018) ile yapısal etkileşim halindedir (Milgrom-Hoffman ve Humbert, 2018). Yapılan bir çalışmada, Vangl2'nin susturulması (knock-down, KD) sonucunda düzlemsel hücre

polaritesinin bozulmasıyla birlikte spermatid tutunmalarındaki zayıflama konfokal mikroskop ile görüntülenmiştir. Vangl2, yetişkin sıçan testislerinin seminifer epitelinde mikrotübüllerle birlikte lokalize olur. Vangl2'nin susturulması, mikrotübül ve F-aktin bazlı organizasyonu bozarak spermatogenezde kusurlara yol açtığı gösterilmiştir. Mikrotübüller, normalde seminifer epitel boyunca bazal membrana dik şekilde hizalanırken Vangl2'nin susturulduğu (KD-Knock Down) modelde bu kolonumsu yapı bozularak hem hücre içi organellerin veya moleküllerin hem de spermatidlerin taşınmasında aksamalara neden olmuştur (Chen ve ark., 2018) (Şekil 2.4.5.2.-a, b).



Şekil 2.10. Testiste, *in vivo* olarak Vangl2'nin susturulması sonucunda seminifer epitelde mikrotübül (MT) organizasyonunu büyük ölçüde bozar. **a.** Her iki gruba ait seminifer tübüllerin 3B konfokal mikroskop görüntüleri **b.** Seminifer epitelde, epitel döngünün tüm aşamalarındaki MT organizasyonunun büyük ölçüde bozulmasını gösteren bir immünohistokimya çalışması (C. Y. Cheng ve Mruk, 2002)

2.4.6. Spermatogenez Sırasında Hücre Polaritesi Neden Önemlidir?

1) Spermatogenez sırasında maksimum sperm çıkışı karşılayabilmek adına seminifer epitelde, sınırlı alana sahip olan Sertoli hücresine sistemli bir şekilde germ hücrelerinin yerleşimini-tutunmasını sağlamak

Seminifer epitel içerisindeki germ hücre oranını korumak oldukça önemlidir. Günlük sperm üretimi, fare, sıçan ve insanda sırasıyla yaklaşık 8, 70 ve 200 milyon spermatozoidir (Amann ve Howards, 1980; Johnson ve ark., 1980; Auharek ve ark., 2011). Çok sayıda gelişmekte olan spermatidin, seminifer epitelde ardı ardına döngüler halinde spermatogenik diziyi tamamlayıp olgun bir spermatozoa olarak lümene salınmaktadır. Bu nedenle, spermatidler, seminifer epitelin sınırlı alanında uygun şekilde (baş, bazal laminaya dönük; kuruk, lümene bakacak şekilde) düzenlenmeli ve hizalanmalıdır; fare, sıçan ve insanda testis başına sırasıyla yaklaşık 4 (Auharek ve ark., 2011), 30-40 (Wing ve Christensen, 1982; Z. X. Wang ve ark., 1989; Berndtson ve Thompson, 1990) ve 300-500 (Johnson ve ark., 1984) milyon Sertoli hücresi sabit sayısı ile desteklenebilir ve beslenebilirler. Sıçan testisinde yapılan morfolometrik analizler, tek bir Sertoli hücresinin, yaklaşık 30-50 germ hücresinin (Weber ve ark., 1983) gelişimini ve beslenmesini, aynı anda spermatogenezin tüm aşamalarında eş zamanlı olarak sağlayabildiğini göstermiştir (Gao ve Cheng, 2016).

2) Sertoli'deki hücre organellerinin germ hücrelerine göre uygun bir şekilde konumlanmasını ve taşınmasını sağlamak

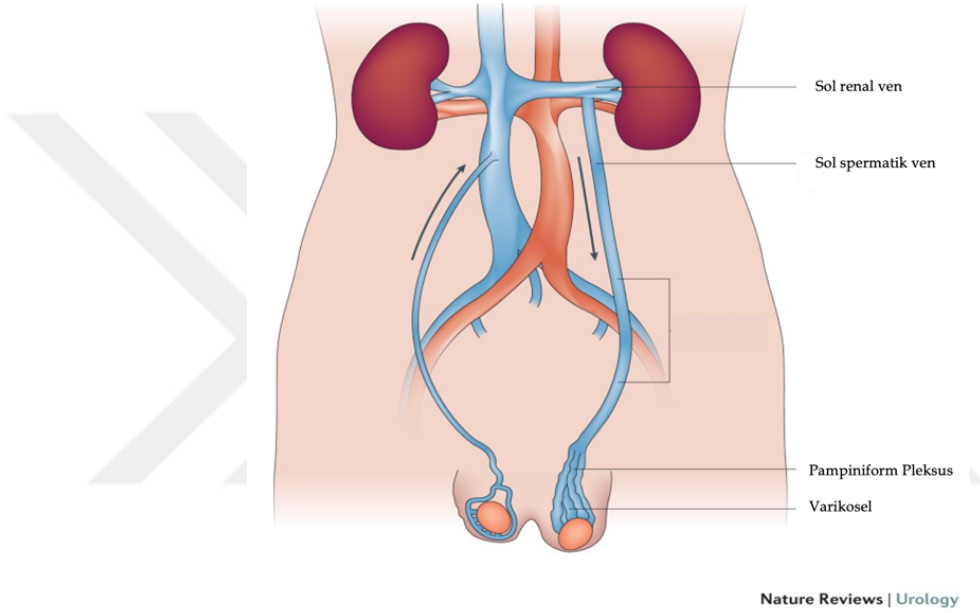
Adluminal bölgedeki germ hücrelerinin besin ve oksijen tedariği tamamen Sertoli hücresi tarafından sağlanır. Spermatositler ve spermatidler glikoz kullanamazlar ve enerji üretimi için laktat ve/veya piruvatı Sertoli hücresinden alırlar (Creasy ve Chapin, 2013) Ve bu noktada MCT2 (monokarboksilat taşıyıcı 2) gibi laktatın spesifik taşıyıcılarının düzenli bir şekilde germ hücrelerine iletilmesi gerekmektedir. Böyle spesifik taşıyıcılar dışında, Sertoli hücrelerinin bu gibi birden çok hücresel görevinin olduğu düşünüldüğünde; spermatogenez sırasında seminifer epitel boyunca farklı hücresel olayların senkronize bir şekilde yapılabilmesi için zamanında ve doğru

sinyal/kimyasal iletimin sağlanması gerekmektedir. Bir başka örnek ise; hücre içi fagositoz süreçlerinde görev alan fagozomlar bazal membran yakınlarında konumlanır. Geç evre VIII'de, spermatozoa salımı gerçekleştiğinde (O'Donnell ve ark., 2011; C. Y. Cheng ve Mruk, 2015) Sertoli hücresi tarafından fagosit edilecek rezidüel cisimler, tübül lümeninin yakınındaki adluminal (apikal) bölgede bulunurlar ve fagositoz için bu kompartmandan bazale taşınması gerekir. Burada da Sertoli-Sertoli, Sertoli-germ ve germ-germ hücreleri arasında bulunan, polarite proteinlerinin kontrolü altında olan oluklu bağlantılar (Gap junction), interselüler köprüler ve ektoplazmik özelleşmeler devreye girmektedir (Gao ve Cheng, 2016).

3).Polarite proteinlerinin KTB'deki baskın lokalizasyonunun ve seminifer epitel döngüsü sırasında evreye özgü ekspresyonlarındaki değişim, desmozom ve oluklu bağlantıları (GJ) etkilemektedir. Kan testis bariyerinden geçiş esnasında hücre polaritesini sağlamak, biyomoleküllerin, iyonların, elektrolitlerin ve suyun, bazal tabakadan adluminal tabakaya endositoz, transitoz gibi paraselüler taşınmasını sınırlamak ve immünolojik bir koruma sağlamak için çok önemlidir (C. Y. Cheng ve ark., 2011).

2.5. Varikozel :

Varikozel, “pampiniform pleksus içindeki testiküler venlerin anormal dilatasyonu” olarak, 1843’de Curling tarafından tanımlanmıştır (Noske ve Weidner, 1999). Yüzyıllardır bilinen bu hastalığın etiyolojisinin tam olarak aydınlatılamadığı gibi; infertiliteyle de ilişkisi net bir şekilde ortaya konulamamıştır.



Şekil 2.11. Varikozel kaynaklı pampiniform dilatasyonu (Jensen ve ark., 2017)

Varikozel, tüm erkeklerin yaklaşık %15 ile %20'sinde görülürken, infertil erkeklerin yaklaşık %40'ında bulunduğu ortaya konmuştur (Leslie ve ark., 2022). En sık saptanan erkek infertilite sebebi olarak görülen varikozel; tipik olarak asemptomatiktir, ancak varikozelli hastaların yalnızca %2 ile %10'u ağrıdan şikayetçidir (Peterson ve ark., 1998; Paick ve Choi, 2019). Aynı zamanda klinik olarak, anormal semen analizi, düşük sperm sayısı, azalmış sperm hareketliliği ve anormal sperm morfolojisi gibi önemli semptomların en yaygın nedeni olarak kabul edilir (Leslie ve ark., 2022).

Varikozelin patofizyolojik etkisi tam anlamıyla açıklanamazsa da, genel haliyle beş ayrı mekanizma ile özetlenebilir: Bu mekanizmalar; skrotal hipertermi, testiküler hipoksi, adrenal veya renal metabolitlerin reflüsü, kadmium birikimi ve hipogonadizm olarak sıralanabilir (Cho ve ark., 2016; Hassanin ve ark., 2018).

2.5.1. Varikosel, Oksidatif Stres, Kan-Testis Bariyer İlişkisi:

Reprodüktif fizyolojik süreçler için, skrotumun en uygun ortamsal ısı düzeyi, vücut ısısından yaklaşık olarak 2,5°C daha düşüktür. Varikoselde venöz reflü veya staz sonucu damar genişlemesiyle ortaya çıkan hipertermi, testiküler serbest oksijen radikallerinin (SOR) artışına sebep olur. Hipertermi/hipoksi kaynaklı SOR artışı testiküler oksidatif stresi arttırır (Ahmet Karakeçi 2019).

Venöz duvarlar üzerindeki artan basınç reaktif oksijen türlerinin (Reactive Oxygen Species; ROS) salınımına neden olur ve daha yüksek dereceli varikosellerin daha yüksek oksidatif stres seviyeleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Isı stresinin mitokondriyal membranlardan, sitoplazma ve peroksizomlardan ROS üretimi yoluyla oksidatif stresi artırdığı gösterilmiştir ve benzer şekilde hipoksi, inflamatuvar reaksiyonlar yoluyla oksidatif stresi artırabilir. ROS, hücresel metabolizmanın yan ürünleri olarak üretilir. Bu yan ürünlerin (hidroksil, superoksid, nitrik oksit (NO) vb ...) belirli seviyede bulunması gerekir, fakat herhangi bir durumda artışı, çeşitli disfonksiyonlara sebep olabilir. ROS'un fizyolojik seviyesi antioksidanlarla dengede tutulmaktadır (Hassanin ve ark., 2018). ROS genellikle doğrudan DNA parçalanması veya hücreler arası kalsiyum iyon konsantrasyonlarının değiştirilmesi yoluyla spermin apoptozunu indükler (Saleh ve ark., 2003; Agarwal ve Said, 2005; Ha ve ark., 2011). Hücre içi iyon konsantrasyonlarının değiştirilmesi, sıkı bağlantı (Zonula occludens; Tight junction; TJ) veya Ara bağlantı (Zonula adherens; Adherens junction; AJ) kompleksi ile ilişkili mekanizmaları etkileyebilir. ROS hücre zarında birtakım bozukluklara sebep olduğundan, kaderin ve katenin gibi transmembran proteinlerin, ROS'a daha duyarlı olduğu söylenebilir (Ha ve ark., 2011). Varikosel ile ilgili yapılan bir çalışmada, ROS'un, Sertoli hücrelerini etkileyip; E-kaderin ve α -katenin ekspresyonunu azalttığı belirtilmiştir. Bu bulgu, ROS'un kan testis bariyeri (KTB)'nin bozulmasına neden olabileceğini düşündürmüştür. Ek olarak, aynı çalışmada, ROS'un spermatositlerin AJ'lerini bozarak, Sertoli hücreleri ile preleptoten / leptoten aşamasındaki spermatositler arasında tutunma gücüne neden olarak infertiliteye sebep olabileceği vurgulanmıştır (Ha ve ark., 2011).

NO, hücre içi sinyal yolları için açıkça önemli olmakla birlikte, kan testis bariyeri içindeki sıkı bağlantıların düzenlenmesinde ve birleştirilmesinde de rol oynar. Bu

bariyer, lümen sıvısının kimyasal bileşimindeki değişiklikler yoluyla germ hücrelerinin geliştiği bir ortam yaratır. Kan testis bariyeri ayrıca toksik maddelerin seminifer tübüllere geçişini engeller. NO, spermatogenez, germ hücresi olgunlaşması ve gelişim süreçleri için gerekli olduğu bulunan bu bariyerin zamanında açılıp kapanmasını özellikle kontrol eder (Lee ve Cheng, 2004; Yan ve Cheng, 2005; Lee ve Cheng, 2008; Doshi ve ark., 2012). NO; NO sentaz (NOS) aracılığıyla L- argininden üretilir. NOS'un seviyesi ve aktivitesi, büyüme faktörleri, iyonlar, sitokinler ve hormonlar gibi birkaç farklı düzenleyici tarafından uyarılabilir. Son çalışmalar, Sertoli hücre TJ dinamiklerinin, proteazlar, proteaz inhibitörleri, sitokinler, cAMP, protein fosforilasyonu veya defosforilasyon ve hücre içi Ca^{+2} düzeyini içeren bir dizi molekül tarafından düzenlendiğini göstermiştir (Lee ve Cheng, 2004). Son zamanlarda, Nitrik oksid (NO)'in, testiste varsayılan bir TJ regülatörü olduğu gösterilmiştir. İndüklenebilir NOS (iNOS) ve endotelial NOS (eNOS) testiste yapısal olarak okludin gibi TJ-integral membran proteinlerine ve aktin, vimentin ve α -tübülin gibi sitoskeletal proteinlere bağlı olduğu gösterilmiştir. NO, muhtemelen sıkı bağlantı (TJ) dinamiklerinin bilinen modülatörleri olan cAMP ve cGMP üzerindeki etkileri yoluyla bağlantı dinamikleri dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynar. Yapılan bir in vitro çalışma göstermiştir ki; testiste, NO, sGC (solubl guanilat siklaz) / cGMP / PKG (protein kinaz G) sinyal yolu aracılığıyla, bir TJ-integral membran proteini olan okludinin seviyesini düşürür ve böylece TJ bariyeri açılmış olur (Lee ve Cheng, 2003).

Varikoselde, Leydig hücreleri tarafından sentezlenen testosteron seviyesinin düştüğü bilinmektedir. Testosteronun önemli bir rolü, spermiyogenezin uzama aşaması nın (uzamış spermatide dönüşme aşaması) hemen öncesinde, spermatidin 7. basamaktan 8. basamaktaki yuvarlak spermatidlere dönüştürülmesidir (O'Donnell ve ark., 1994; O'Donnell ve ark., 1996). Testesteronun baskılandığı bir çalışmada, 8. basamak yuvarlak spermatidlerin yaklaşık %80 'i Sertoli hücresi ile temasını kaybettiği ve direkt seminifer tübül lümenine döküldüğü gözlenmiştir (O'Donnell ve ark., 1996). Geriye kalan basamak 8 spermatidleri ise, seminifer epitel içinde dejenere olduğu ve uzama fazına hemen hemen hiçbir spermatidin ilerleyemediği gözlenmiştir (O'Donnell ve ark., 1994; O'Donnell ve ark., 2000).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Denekler ve Deney Grupları ve Cerrahi Modelin Oluşturulması:

3.1.1. Denekler:

Çalışma, Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (ADAM)'nden alınan 42 adet erişkin (12 Haftalık) ağırlıkları 200-250 gr arasında olan Wistar ırkı erkek sıçan ile yürütüldü. Tüm sıçanlar standart laboratuvar yemi ve musluk suyu ile beslendi. Deneye başlamadan önce her sıçan tartılarak canlı ağırlığı kaydedildi.

3.1.2. Deney grupları:

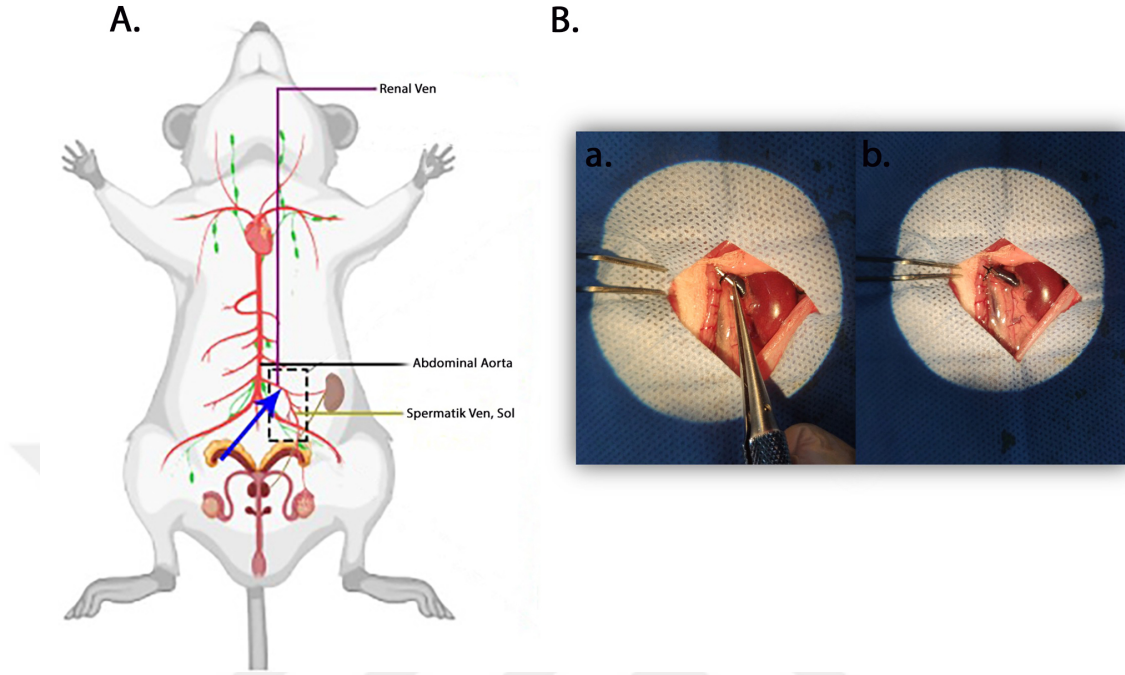
Deneylerde kullanılacak sıçan sayısını belirlemek için G*Power 3.1.9.4 programı kullanılarak güç analizi gerçekleştirilmiştir. Cohen d katsayısı 0,8 (geniş etki büyüklüğü) olarak alındı. Her bir deney grubunun sıçan sayıları eşit olduğunda, alfa 0,05 anlamlılık ve 0,95 güç düzeyinde her grup için 10 sıçanın gerektiği sonucuna ulaşıldı.

Fakat deney grubunda, varikozel hayvan modelini oluşturmak adına gerçekleştirilen cerrahi operasyon sırasında veya post-operatif bakım sırasında gerçekleşebilecek hayvan ölümleri göz önünde bulundurulduğunda, her bir grup için 14 sıçan ile çalışılması uygun görüldü.

1. **Kontrol grubu** (n=14): Bu gruptaki deneklere herhangi bir deneysel işlem yapılmadı.
2. **Sham grubu** (n=14): Bu grupta yer alan sıçanlara, varikozel grubu sıçanlarda varikozel modelinin oluşturulduğu gün, cerrahi işlemin etkilerini görmek amacı ile sadece batın açma kapaması yapıldı.
3. **Varikozel grubu** (n=14): Bu grupta yer alan sıçanlara literatürde belirtildiği şekilde deneysel olarak unilateral (sol) varikozel modeli oluşturuldu.

3.1.3. Varikosel Modelinin Oluşturulması:

Varikosel modeli, Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (ADAM)'nde oluşturuldu. Varikosel, intramüsküler olarak %5' lik ketamin hidroklorid (44 mg/kg) anestezi altında kısmi olarak sol renal venin ligasyonu ile oluşturuldu. Anesteziyi (ksilasin 15 mg/kg, i.m - ketamin 75 mg/kg, i.m.) takiben üst sol abdominal bölgeye median hattın insizyonu ile ulaşıldı. İç organlar dikkatlice paketlenip sağı çekilerek sol böbrek, adrenal ve renal venler ile sol spermatik venin sol renal vene girişi görünür hale getirildi. Dikkatli bir diseksiyon ile spermatik ve adrenal venlerin sol renal vene girdiğı medial yüz yağ ve bağ dokularından temizlendi. Sol renal venin arka yüzünün körleme dönülmesi sırasında olası kanamalar bir süre yapılan basınçlı tamponlama ile durduruldu. Renal ven ligasyonunun yapılacağı bölüme 0,85 mm çaplı metal tel yerleştirildikten sonra 4,0 ipek suture ile daraltma işlemi yapıldı (**Şekil 3.1**). Ven daraltıldıktan sonra tel dikkatlice çekildi. Böylece damarın dış çapının 1 mm'ye düşürülmesi sağlanmış oldu. Olası enfeksiyon riski ortadan kaldırmak adına abdominal boşluk içerisine Gentamisin sülfat (10 mg/ml) uygulandı. Bu işlem sonrasında da, abdominal duvar ve ön abdominal kaslar 4,0 kromik katküt ile ayrı ayrı dikilerek insizyon alanı kapatıldı. Bu daraltma işlemi ile damarın lateralinde artmış damar içi basınca neden olurken, bu basıncın spermatik vene aktarılması ile deneysel varikosel modelin oluşması amaçlanmıştır. Tüm cerrahi işlemler 3,5x objektif büyütmesi altında yapılmıştır (Sahin ve ark., 2005).



Şekil 3.1. A. Sıçana ait anatomik çizim (Albano Nogueira ve ark., 2022) Ligasyonun yapıldığı alan mavi ok ile gösterilmiştir. **B.** 12 haftalık sıçanlar, tek taraflı (sol) varikosel oluşturulan cerrahi model **a. Penset ucu**; 0,85mm çaplı metal tel yerleştirilip 4,0 ipek suture ile daraltma yapılmıştır. **b.** Ligasyon sonucu sol renal ven üzerinde gelişen dilatasyon

Varikosel modelinin oluşturulmasından 13 hafta sonra, oluşturulan varikosel modelinin başarı durumu spermatic ven çapının ölçümü, epididimal sperm motilite hesaplanması, sağ ve sol testis ağırlıklarına bakılarak ortaya konmuştur.

3.2.1. Spermatic Ven Çapının Ölçümü

İliolumbar venin çaprazladığı bölgede loop ile yapılacaktır. Normal erişkin Wistar ırkı sıçanlarda, spermatic venler tipik 0,6-0,8mm çapındayken, cerrahi model uygulanmış sıçanlarda spermatic venlerin çaplarının gözle görülür bir şekilde artması beklenir. Bu yüzden, dijital bir kumpas yardımıyla her gruba ait hayvanların sağ ve sol ven çapları ölçüldü ve not edildi.

3.2.2. Epididimal Sperm ve Motilite Hesaplanması

Sol epididimis total olarak testisten ayrılıp, vaz deferens başlangıç kısmını da alarak diseke edildi ve ayrılan doku bir petri kabına aldı. Spermin çıkacağı vaz deferens başlangıç kısmına 100 µm PBS (Phosphate Buffer Saline, Invitrogen, 003002) eklenerek

bir bistüri yardımıyla küçük baskılar uygulanarak sperm çıkışı sağlandı, ardından mikropipet yardımıyla alınan sperm hücreleri, lama alınıp üzeri lamelle kapatıldı ve ışık mikroskobu altında bir counter/sayaç yardımıyla hareketli ve hareketsiz spermler sayılarak % motilite hesaplanmıştır. Bu işlem, aynı lamın 3 farklı bölgesinde tekrarlanarak, elde edilen değerlerin ortalaması alınmıştır (Celik-Ozenci ve ark., 2011).

3.2.3. Testis Ağırlıkları:

Çevre dokularından tamamen temizlenen sağ ve sol testisler, hassas terazi ile ağırlık ölçümleri yapılarak not edildi.

3.2.4. Doku Temini ve Deney Parametreleri İçin Hazırlanması:

DeneySEL varikosel modeli oluşturulması amacıyla gerçekleştirilen operasyondan 13.hafta sonra kontrol, sham ve varikosel gruplarına ait sıçanlardan anestezi altında sol testis dokuları alındı ve ardından ötanazi uygulandı. Her gruba ait sıçanlardan elde edilen testis dokuları ikiye ayırıp immunfloresan ve western blot yöntemleri için kullanılmak üzere rutin işlemlere tabii tutularak uygun koşullarda depolandı.

3.2.5. Rutin Histolojik Değerlendirme:

Her gruba ait testis doku örnekleri, Bouin's fiksatif ile fikse edildi, doku örneklerine rutin parafin teknikleri uygulanarak ve 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitlere Hematoksilen-Eozin boyaması yapılarak ışık mikroskobu ile değerlendirildi.

Bouin's Fiksatifinin Hazırlanışı:

- Pikrik Asit (Sigma Aldrich, 197378-100G); 75ml
- Formaldehit %37 (MERCK, 1.04002.2500); 25ml
- Asetik Asit; 5 ml

3.3. Western Blot Analizleri Kullanılan Solüsyonlar ve Cihazlar

Total Testis Lizatı Hazırlama:

Kullanılan solüsyonlar

Lizis Buffer:

- 10ml 0,1M Tris (pH 7.4), (BIO-RAD, #1610719)
- 90ml distile su, 1ml 100X Na-orthovanadate (Sigma, #S6508)
- 1gr SDS (BIO-RAD, #1610302)

Proteaz İnhibitör Kokteyli (1X):

- 40 µl PİK 25X (2 ml dH₂O + 1 tablet PİK (Roche, #11697498001))
- 600 µl dH₂O

PBS:

- 100 ml Distile su
- 1 adet Phosphate Buffer Saline (PBS) Tablet (Invitrogen, #003002)

Sonikatör (Bendelin UW2070)

Soğutmalı Santrifüj (Beckman&Coulter Microfuge 22R (+4°C))

Sıvı azot tankından çıkarılan testisten alınan taze doku örnekleri, cam bir zeminde bisturi yardımıyla mekanik olarak ezildi. Ezilen dokular endorf tüplerine alınıp darası alınarak tartıldı. Tartım sonrasında her 0,2 g doku için 600µl lysis buffer ve 10µl proteaz inhibitör kokteyli tüplerine eklendi ve vortekslendi. Daha sonra +4°C de 15.000 g'de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantları alınıp pelet kısımları atıldı.

Protein miktarının belirlenmesi

- **BCA kit:** Pierce BCA Protein Assay Kit, THERMO, Kat.No 23225
- **Spektrofotometre:** µQuant BioTek Spectrophotometer
- **İnkübatör:** Nüve EN 500

İçerdiği protein miktarları BCA kit kullanılarak tespit edildi. Bu yöntemde kitin protokolüne uygun olarak 2mg/ml olan BSA'lar S0 için dilüe ederek standart kabul edilen 1mg/ml BSA olarak kullanıldı. BSA'nın S0 (1000µg/ml), S1 (500µg/ml protein), S2 (250µg/ml), S3 (125µg/ml), S4 (62,5µg/ml), S5 (31,3µg/ml), S6 (15,6µg/ml), S7 (7,8µg/ml) şeklinde dilüsyonlar hazırlanarak standart protein aralığı hazırlandı. Hazırlanan doku lizatları, 1:50 oranında lizis buffer ile dilüe edilerek iyice vortekslendi. BCA kit içeriğindeki Regent A ve Regent B karışımı (50:1) 8ml/160µl miktarlarında çalışma solüsyonu hazırlandı. Standartlar, blank ve örnekler her kuyucuğa 25'er µl olacak şekilde 96 kuyucuklu plate içerisine yüklendi. Üzerlerine her kuyucuğa 200 µl olacak şekilde çalışma solüsyonu eklendi. Daha sonra 60°C'lik inkübatörde 15 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası spektrofotometrede 562 nm dalga boyunda okunması için ayarlandı. Spektrofotometre sonuçlarında standartlar ile karşılaştırılarak her bir numunenin protein miktarı tespit edildi. Protein miktarları hesaplanarak laemli (2X, Laemmli electrophoresis Reagent, Sigma, #S-3401) ve distile su ile örnekler hazırlandı. Böylece tüm örneklerin protein miktarlarını eşitlenmiş oldu.

Western Blot protokolü:

Kullanılan Solüsyonlar

- ❖ **%30'luk Akrilamid Solüsyonu Hazırlanışı:** 37:5:1'lik akr-bis 15,4g 40ml dH₂O'da çözündürülür.
- ❖ **Üst SDS-jel malzemeleri:** %30 Akrilamid (BIO-RAD, #1610125) + TRIS
pH: 8,8 +Distile Su+ TEMED+ APS
- ❖ **Alt SDS-jel malzemeleri:** %30 Akrilamid (BIO-RAD, #1610125) + TRIS
pH: 6,8 +Distile Su+ TEMED+ APS
- ❖ **5X Elektroforez Yürütme Tamponu:**
 - Tris (Bio-Rad, #161-0719) ; 9 g
 - Glisin (Bio-Rad, #161-0718) ; 43.2 g
 - SDS (Sigma, #L4390) ; 3g

- 600 ml Distile Su
- Distile su ile 1X şeklinde dilüe edilerek kullanıldı. (180ml 5X stok +720ml dH₂O)

❖ **Transfer - Blot Tamponu:**

- Glisin (Bio-Rad, #161-0718) ; 14.3 g
- Tris (Bio-Rad, #161-0719) ; 3 g
- 700 ml dH₂O içerisinde çözöldü
- 200 ml Metanol (Merck, #1.06.008.2500) eklendi ve toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

❖ **10X TBS (Tris Buffered Saline) Tamponu:**

- Tris (Bio-Rad, #161-0719) ; 60.55 g
- NaCl (Supelco, 1.06404.1000) ; 87.66 g
- 800 ml dH₂O
- pH HCl ile 7.4'e ayarlanır. pH ayarlandıktan sonra toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. 1X için; (9+1) şeklinde dilüe edildi.

❖ **TBS-T Solösyonu:**

- 1 litre 1X TBS içerisinde 1000µl Tween-20 (SIGMA, P1379) eklendi.

❖ **Bloklama Solösyonu (%5'lik süt tozu):**

- 100 ml TBS-T içerisinde 5g süt tozu (Bio-Rad, #170-6404) çözölerek %5'lik blok solösyonu hazırlandı.

Örnekler, elektroforezden önce, 100°C'deki suda 5 dakika kaynatılıp; jel elektroforezi için %10'luk poliakrilamid jel hazırıldı. İlk kuyucuğa 5 µl marker (MERCK, SIGMA, Amersham ECL Rainbow Marker, GERPN800E) yüklenip diğerk kuyucuklara 20'şer µl örnek yüklendi ve Mini Protean Sistem III tankının içine yerleştirildi. Mini Protean Sistem III tankına elektroforez solusyonu eklenerek, tank güç kaynağına bağlandı. Proteinler güç kaynağı aracılığı ile 100 Volt, 50 miliamperde 80-100 dakika elektroforez edildi. Proteinler jelde yürüdükten sonra, jel üzerine PVDF membran (BIO-RAD, #162-

0177) ardından üstte ve altta 3'er adet filtre kağıdı olacak şekilde sandviç biçiminde hazırlandı. PVDF membran üzerine proteinleri içeren jel konularak hazırlanan sandviç Mini protean III sistemindeki tank blot içerisine alındı. Ardından tanka transfer solüsyonu eklenerek ve +4°C ve 32 Volt'da, gece boyu proteinlerin jelden membrana transfer olması sağlandı. Proteinlerin PVDF membrana transferinden sonra elde edilen membran, TBS-t ile hazırlanan %5'lik süt tozu ile oda ısısında 1 saat çalkalayıcı üzerinde bloklandı. Membran, üreticinin tavsiyesine göre hazırlanmış ve bloklama solüsyonu içinde sulandırılmış olan primer antikor (PAR-6, Scribble, Vangl2, N-kadherin, ZO-1, F aktin, Aktif Kaspaz 3, iNOS) (**Tablo 3.2.**) ve pozitif kontrol olarak da β -aktin ve GAPDH kullanılarak +4°C'de gece boyu karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 30 dakika boyunca 10 dakikada bir TBS-T solüsyonu yenilenerek yıkama yapıldı. Membran, primer antikor için uygun olan ve bloklama solüsyonu ile sulandırılmış peroksidaz (HRP) konjuge sekonder antikorla oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBS-t ile 30 dakika boyunca 10 dakikada bir TBS-T solüsyonu yenilenerek yıkama yapıldı. Membran Supersignal West Pico chemiluminescent Substrate (Thermo, #34080) sistemi ile 1 dakika inkübe edildi ve görüntüleme cihazında membran görüntülenmesi yapıldı.

Not: Tez projemizde bulunmamasına rağmen; deneysel varikozel modelinin oluştuğuna dair daha sağlam ek kanıtlar sunması adına, literatürde varikozel ile birlikte artış gösterdiği bilinen aktif (cleaved) kaspaz 3 (Yoon, 2013; Zhao ve ark., 2019) ve iNOS (Santoro ve ark., 2001; Mazhari ve ark., 2018) proteinlerin değişimleri de Western Blot yöntemi ile incelendi.

3.4. Çift İşaretli İmmunofloresan (İF) Boyanmalar için Kullanılan malzemeler, solüsyonlar ve cihazlar

Solüsyonlar ve Cihaz;

- ❖ Antikor dilüent solüsyonu (İnvitrogen, 003118)
- ❖ Phosphate buffered saline çözeltisi (PBS) Tablet (Invitrogen, 003002)
- ❖ Tris-EDTA (pH:9) – Tween20 ;
 - Tris (BIO-RAD, #1610719) ; 1,21 g

- EDTA (BIO-RAD, #1610728) ; 0,372g
- 1000ml distile su içerisinde çözöldü.
- HCl ile pH:9'a ayarlanır.
- Tween 20 (SIGMA Aldrich, P1379) ; 500 µl

- ❖ Ultra V Blok (Thermo Scientific, TA-125-UB)
- ❖ DAPI'li Kapatma Solösyonu (VECTOR, VECTASHIELD, H-1200)
- ❖ Olympus BX61 floresan mikroskop

Boyanma Protokolü;

Ksilol ve alkol serilerinden geçirildikten sonra slaytlar 5 dakika distile suda bekletildi, Antijen Retrieval olarak hazırlanan Tris EDTA (pH:9) 7 dakika kaynatıldı (800 Watt'da). Ardından 20 dk soğutmaya bırakılarak ve (3 x 5 dk) PBS ile yıkandıktan sonra kesitlerin çevresi hidrofobik kalem (pap pen) ile çizildi. Nemli bir ortam sağlamak için ısıtılan chambera yerleştirilen slaytlara UV Blok solösyonu damlatılarak 7 dk beklendi. Bloklamadan ardından, yıkama işlemi yapılmadan, miks şeklinde hazırlanmış olan primer antikorlar (**Tablo 3.1**) damlatılıp gece boyu +4°C'de inkübe edildi. Ertesi gün 3 x 5 dk PBS ile yıkanarak primer antikorlar uzaklaştırıldı. Sekonder antikorlar da miks şeklinde hazırlandıktan sonra kesitler üzerine damlatılıp 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Karanlıkta (3 x 5 dk) PBS ile yıkandıktan sonra DAPI'li kapatma solösyonu ile kapatma işlemi gerçekleştirildi.

Çift işaretli immunoflüoresan boyama için, F-aktin, ZO-1, N-kaderin boyamaları FITC (yeşil) ile işaretlenirken, dokuda ikinci hedef proteinler; Vangl2, PAR-6, Scribble ise PE (kırmızı) ile işaretlendi (**Tablo 3.1**). Hücre nükleusları DAPI ile işaretlenerek mavi renkte gösterildi. Floresan görüntüler, Olympus BX61 floresan mikroskop ile fotoğrafları çekilerek birlikte-lokalizasyonları gösterildi. Antikor dilösyonları **Tablo 3.2.**'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Çiftli İmmunfloresan için hazırlanan primer antikor miksları

	1.Grup;		2.Grup;		3.Grup;	
1.miks	Vangl2	F-aktin	PAR6	F-aktin	Scribble	F-aktin
2.miks	Vangl2	N-kaderin	PAR6	N-kaderin	Scribble	N-kaderin
3.miks	Vangl2	ZO-1	PAR6	ZO-1	Scribble	ZO-1

Tablo 3.2. Primer ve Sekonder Antikorlar

ANTİKOR	MARKA	KAT. NO	DİLÜSYON		kDa
			IF	WB	
VANGL 2	PROTEINTECH	21492-1-AP	1/100	1/750	60-70
PAR 6	BIOSS	bs-5733-R	1/100	1/2000	37
SCRIBBLE	BOSTER	A01651	1/40	1/1000	175
F AKTİN	GENETEX	GTX20205	1/100	1/250	43
ZO-1 (1A12)	INVITROGEN	# 33-9100	1/50	1/500	225
N KADERİN	INVITROGEN	# 33-3900	1/700	1/1000	140
(cleaved) AKTİF KASPAZ 3	CELL SIGNALING	# 9661	-	1/1000	17-19
İNOS	ABCAM	ab3523	-	1/500	135
Alexa Fluor™ (488)	INVITROGEN	# A-21202	1/400	-	-
Alexa Fluor™ (647)	INVITROGEN	# A-31573	1/400	-	-
Anti-Fare Peroksidaz	VECTOR	PI-2000	-	1/2000	-
Anti-Tavşan Peroksidaz	VECTOR	PI-1000	-	1/2000	-

3.5. İstatiksel Analiz:

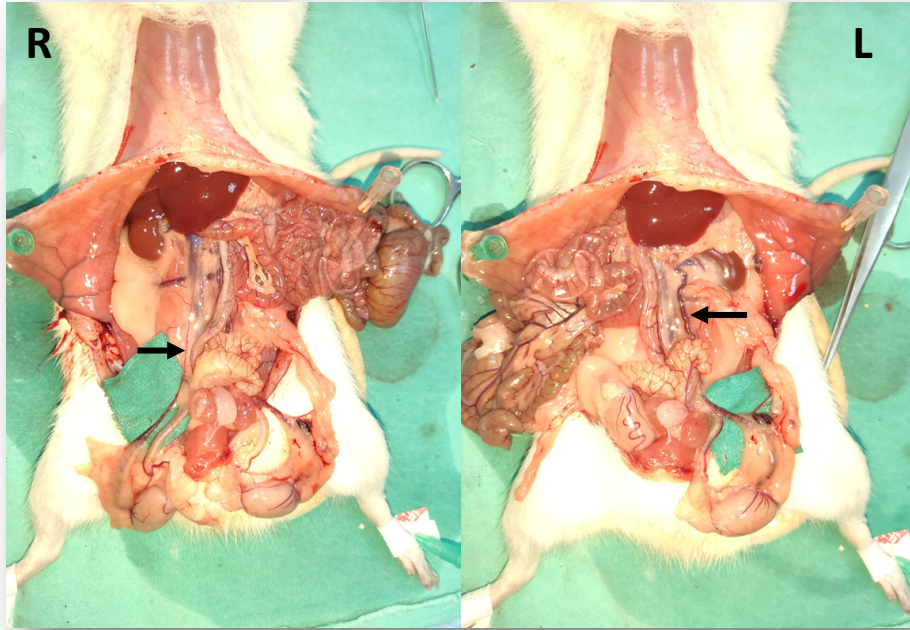
Tüm deneyler en az üç kez tekrarlandı. Western Blot sonuçları ImageJ programı ile analiz edildi. Western blot analizlerinde one way anova ve ardından Tukey post hoc testi ile veriler karşılaştırıldı. Antikorlar arasından sadece Scribble için Dunnett's Testi kullanıldı. Histopatolojik değerlendirmelerden spermatik ven çapının ölçümü ve sağ - sol testis ağırlıkları, two way anova ile analiz edilirken epididimal sperm motilitesi hesaplanması için one way anova kullanıldı. Tüm analizler Prism9 (GraphPAD) programında gerçekleştirildi. Gruplar arasında yapılan karşılaştırmalarda, $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

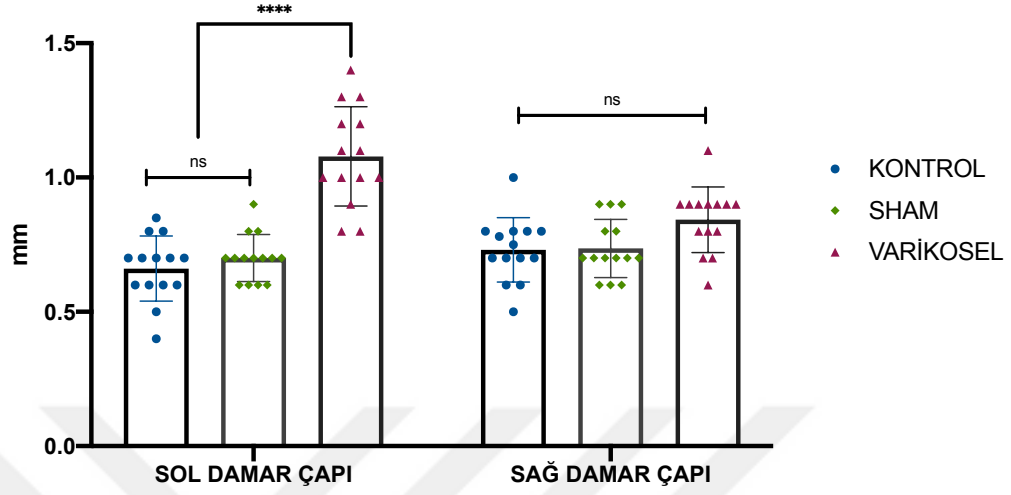
4.1.Oluşturulan Varikosel Modelinin Başarı Durumunun Belirlenmesi:

4.1.1.Spermatik Ven Çapının Ölçümü:

İlk olarak, varikoselin en önemli sebeplerinden kabul edilen spermatik venlerde meydana gelen dilatasyon değeri değerlendirildi. Yaptığımız ölçümlere göre; Sol spermatik vende sağ taraftakine oranla belirgin bir dilatasyon saptandı (Şekil 4.1). Sağ spermatik venlerin çaplarında, gruplar arası anlamlı bir fark bulunmazken, varikosel oluşturulan grupta sol spermatik ven çaplarının kontrol ve sham grubuna oranla anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi ($p < 0,0001$)) (şekil 4.2)



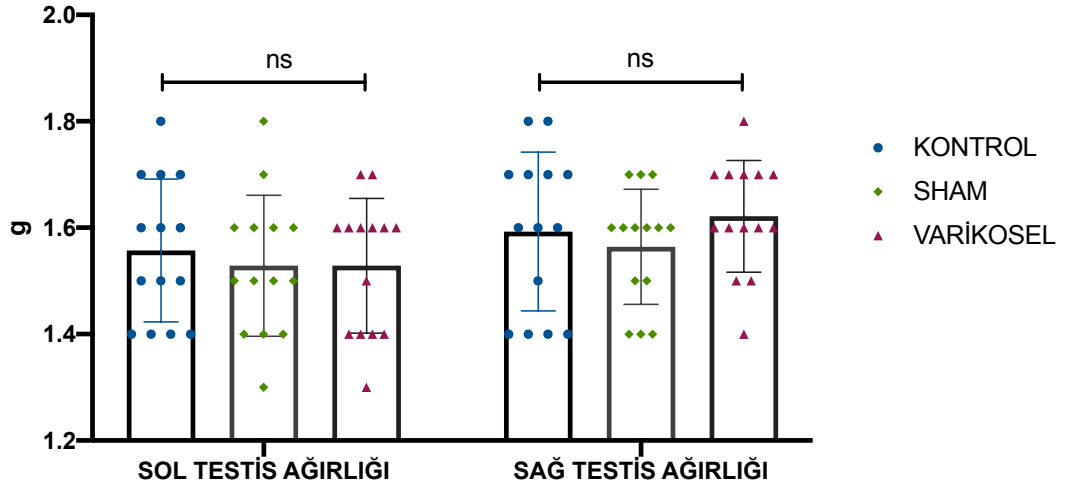
Şekil 4.1 Model oluşturulduktan 13 hafta sonra, aynı hayvana ait sağ ve sol v. testicularis ok ile gösterildi.



Şekil 4.2. Sol ve sağ spermatic ven çaplarının (mm) değerlendirilmesi (**** ; $p < 0,0001$)

4.1.2. Testis Ağırlıkları:

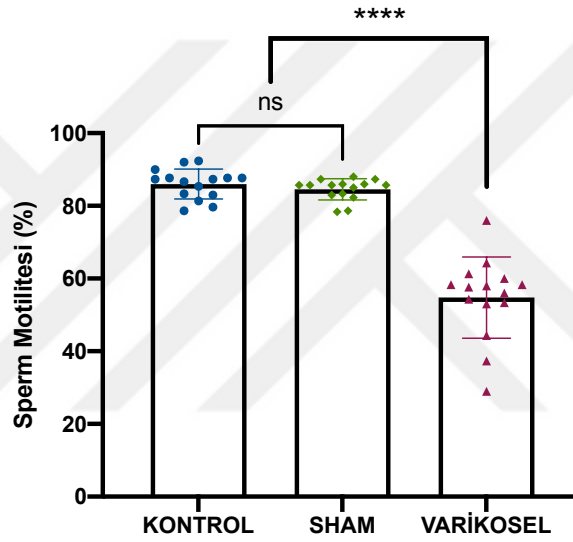
Sağ ve sol testis ağırlıkları, gruplar arasında karşılaştırıldığında herhangi bir fark gözlenmedi. Sol testis ağırlıklarında bir miktar azalma görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Sol ve sağ testis ağırlıklarının (g) değerlendirilmesi

4.1.3.Epididimal Sperm ve Motilite Hesaplanması:

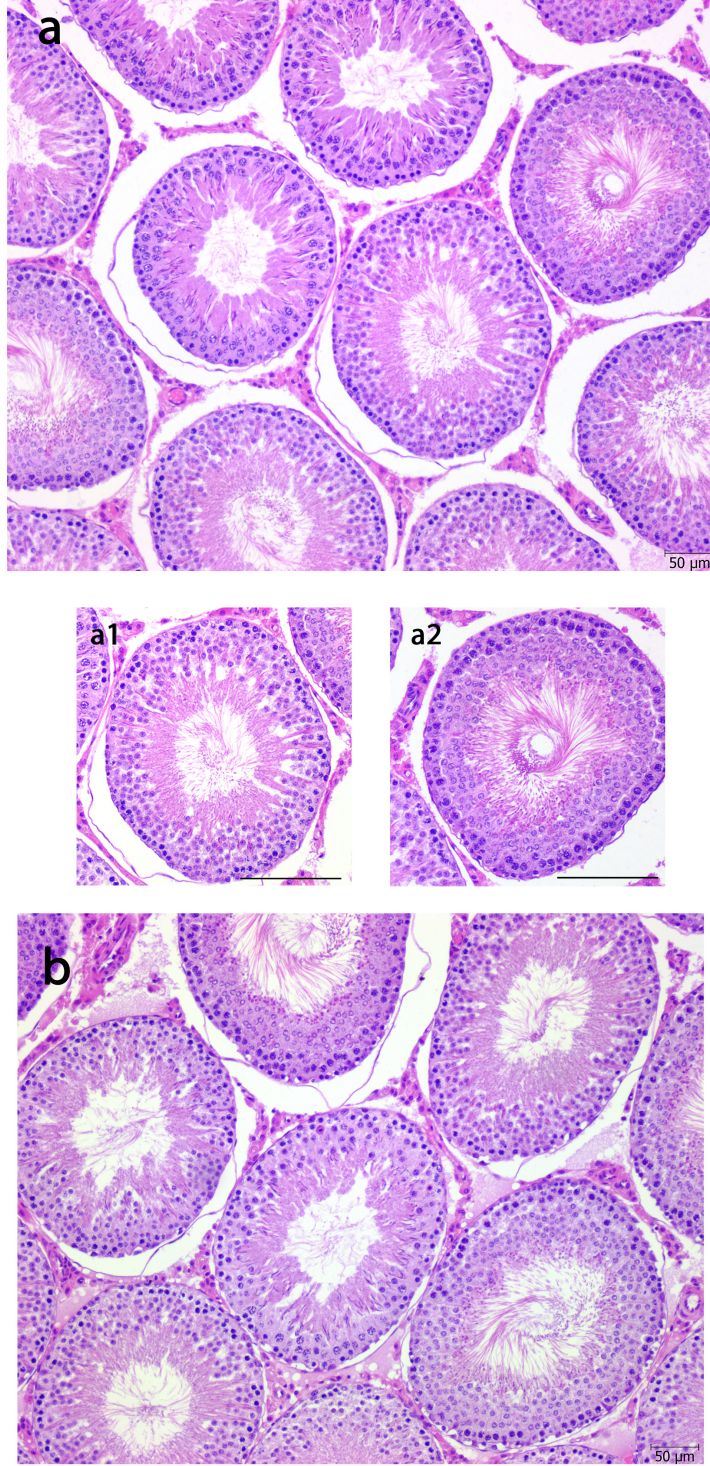
Sperm motilitesinin karşılaştırılması için epididimisin kauda kısmından alınan sperm örnekleri mikroskop altında sayılarak yüzdeleri alındı. Kontrol ve sham grupları arasında bir anlamlı bir fark görülmezken varikozel grubunda dramatik bir düşüş gözlemlendi ($p<0,0001$) (şekil 4.4).



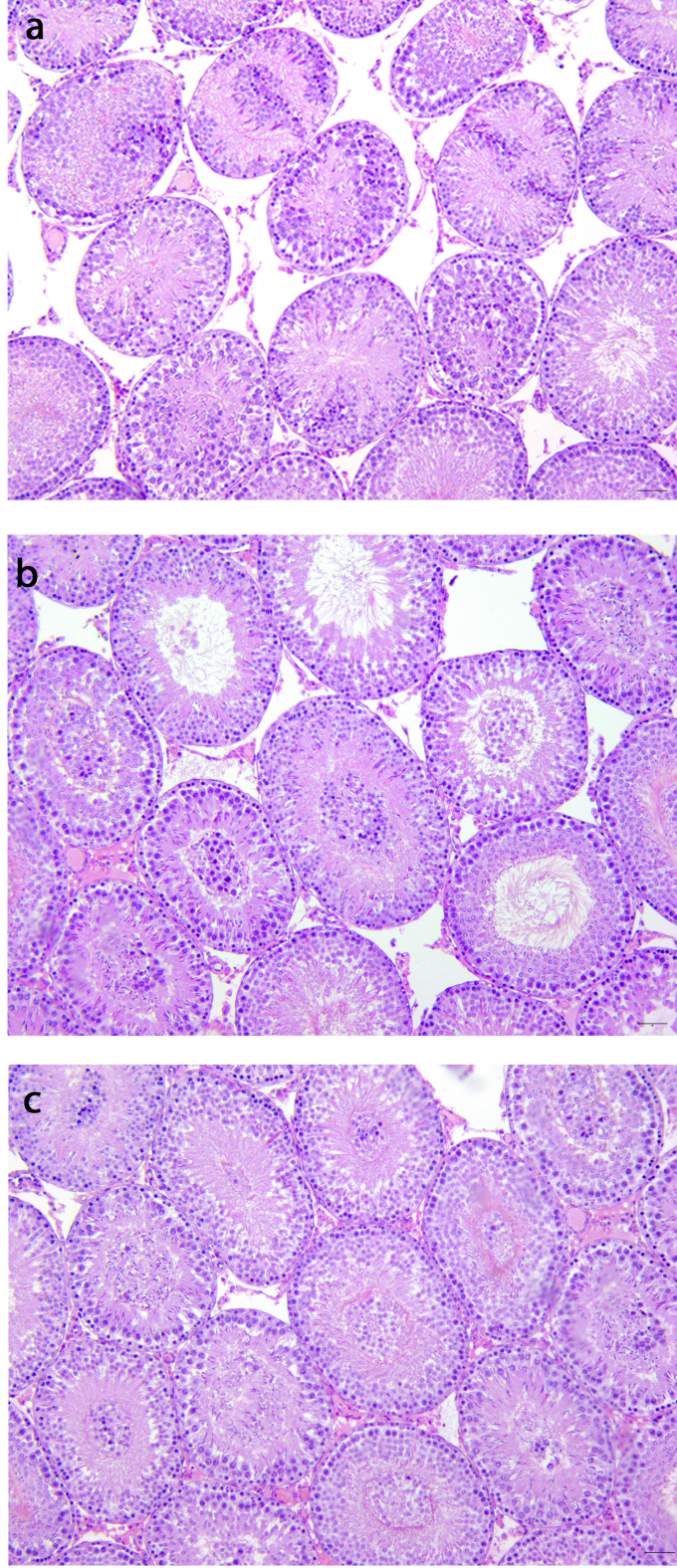
Şekil 4.4. Sperm motilitelerinin (%) değerlendirilmesi (****; $p < 0,0001$)

4.2. Varikosel Sonucu Seminifer Tübülde Meydana Gelen Bozulmaların Histokimyasal İncelemesi

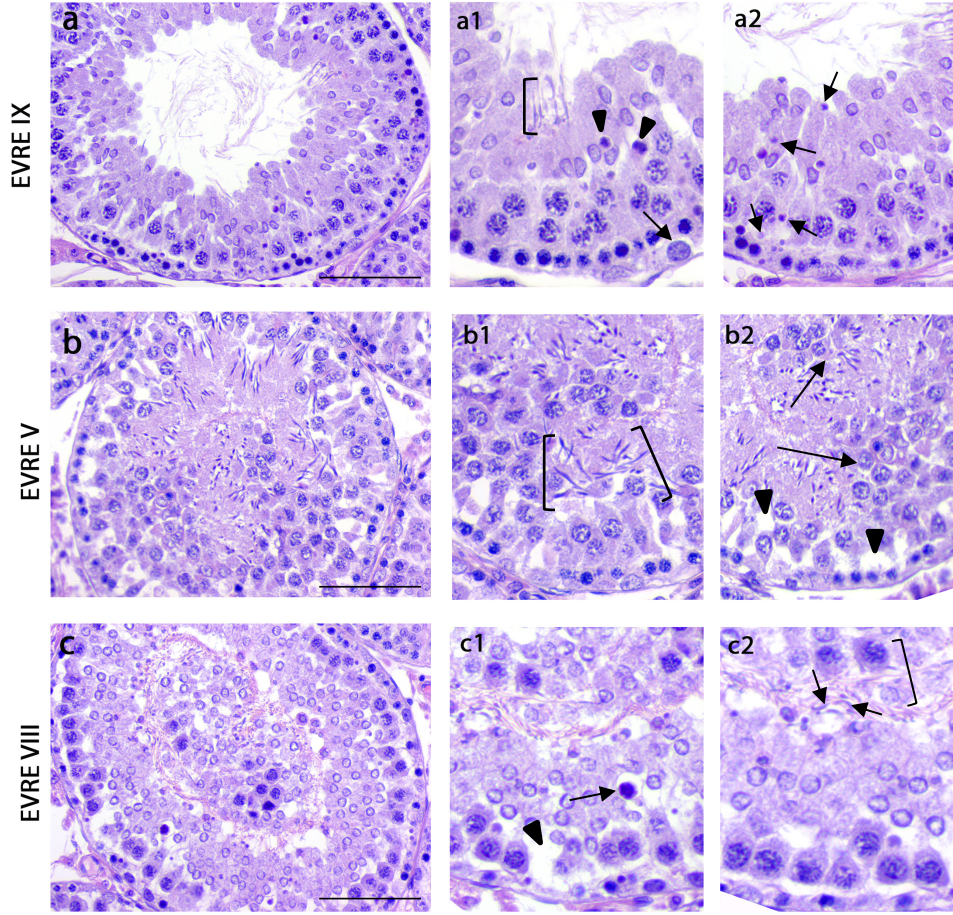
Hematoksilen ve Eozin ile boyanan preparatlar ışık mikroskobu altında incelendi. Kontrol, sham ve deney gruplarına ait kesitler evreleme yapılarak spermatogenik dizideki hücrelerin yapıları incelendi. Kontrol ve sham grubuna ait seminifer tübül epitel görünümleri normal yapıda olduğu gözlemlendi (**Şekil 4.5**). Varikosel gruplarına ait testis kesitleri incelendiğinde; kontrol grubundan farklı olarak, hücre bağlı hücreler arası ayrılmalar, evre bağımsız şekilde polaritelerini kaybetmiş elongoid spermatidler (Sertoli hücrelerine dağınık tutulum), bazal laminaya ulaşamamış fagozomlar ve oldukça fazla sayıda tübülde görülen lümene dökülmüş germ hücreleri göze çarptı. Diğer yandan morfolojik bozuklukların yanında apoptoza yönelmiş pignotik çekirdekli spermatidler ve çok çekirdekli polimorfik dev hücreler de dikkat çekti (**Şekil 4.6 ve Şekil 4.7**).



Şekil 4.5. Kontrol ve Sham Grubu Seminifer Tübül Hematoksilen & Eozin Boyanması **a.** Kontrol grubu, 200X görüntüsü **a1.** Kontrol grubuna ait evre V seminifer tübülü (400X) **a2.** Kontrol grubuna ait evre VIII seminifer tübülü (400X) **b.** Sham grubu, 200X görüntüsü (Skala bar: 50 µm)



Şekil.4.6. Varikozel grubundan farklı sıçanlara ait testis kesitlerinin Hematoksilen & Eozin Boyanması, 100X Görüntüleri (Skala bar: 50 μ m)

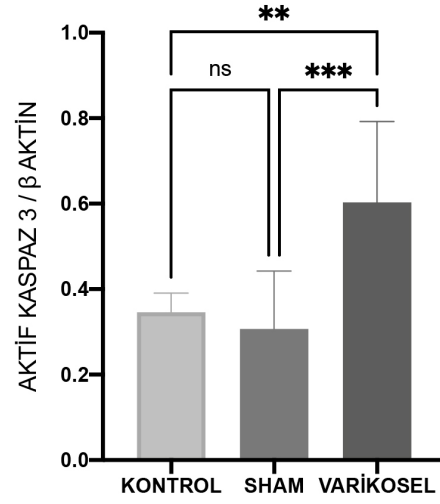
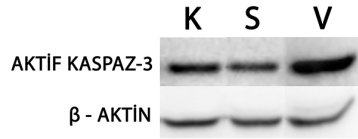


Şekil 4.7. Varikosel grubuna ait Seminifer Tübül, Hematoksilen & Eozin Boyanması, 400X Görüntüleri **a.** Evre IX seminifer tübülü **a1.** Bir önceki evrede lümene dökülmesi gerekirken dökülememiş spermatidler (köşeli parantez), pignotik çekirdekli (basamak 9) spermatidler (ok başı), çok çekirdekli polimorfik dev hücre (ok) **a2.** Bazal laminaya konumlanması gerekirken farklı lokalizasyonlarda bulunan fagozomlar (ok) **b.** Evre V seminifer tübülü **b1.** Bazal laminaya 90 derecelik dik açıyla tutunamayan polaritelerini kaybetmiş elongoid spermatidler (köşeli parantezler) **b2.** Lokalizasyonları bozulmuş spermatik hücreler, lümene dökülen germ hücreleri (oklar), epitel içerisinde ayrılmalar (ok başı) **c.** Evre VIII seminifer tübülü **c1.** pignotik çekirdekli (basamak 8) spermatid (ok), epitel içerisinde ayrılmalar (ok başı) **c2.** Lokalizasyonları bozulmuş seminifer epitel, lümene dökülen germ hücreleri (köşeli parantez), bazal laminaya 90 derecelik dik açıyla tutunamayarak yatay pozisyonda konumlanan, polaritelerini kaybetmiş elongoid spermatidler (oklar) (Skala bar: 50 µm)

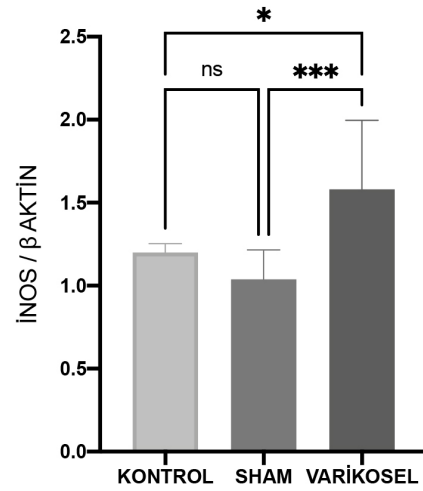
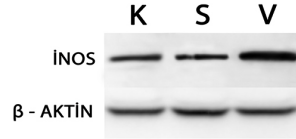
4.3. Western Blot Bulguları

Tez projemizde bulunmamasına rağmen; deneysel varikozel modelinin oluştuğuna dair daha sağlam, ek kanıtlar sunması adına, literatürde varikozel ile birlikte artış gösterdiği bilinen Aktif (Cleaved) kaspaz 3 ve İNOS proteinlerin değişimleri Western Blot yöntemi ile incelendi. Aktif kaspaz-3'ün protein miktarı, kontrol ve sham grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmezken varikozel gruplarında hem kontrol grubuna (**; $p=0,0016$) hem de sham grubuna (***; $p=0,0003$) göre anlamlı dercede artış görüldü (**Şekil. 4.8.A**). İNOS'ta ise kontrol ve sham gruplarında anlamlı bir fark bulunmazken, varikozel gruplarında kontrol grubuna (*; $p=0,0135$) ve sham grubuna (***; $p=0,0006$) göre protein miktarlarının anlamlı dercede arttığı görüldü (**Şekil 4.8.B**).

A.

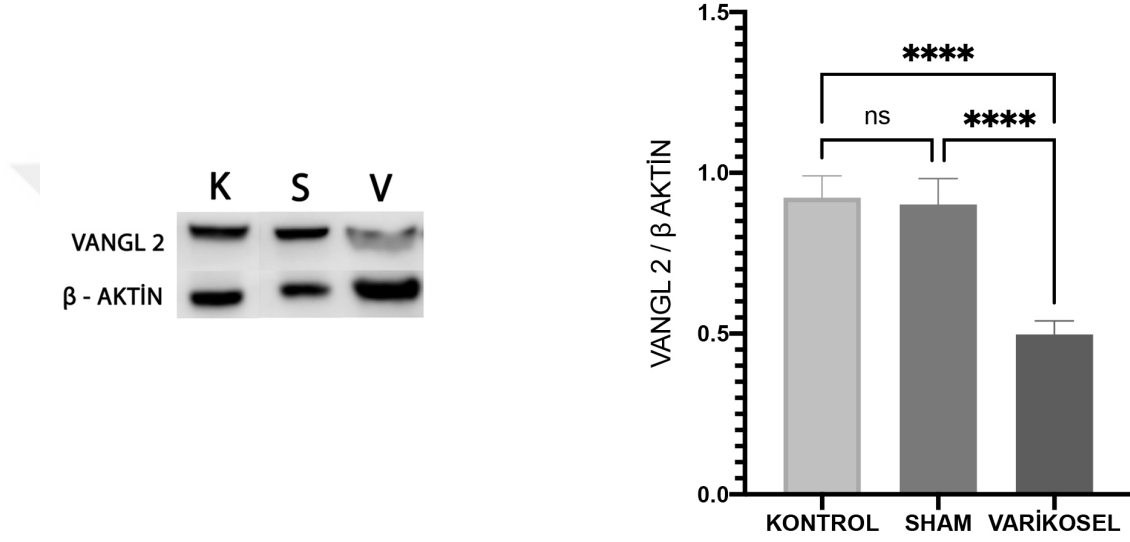


B.



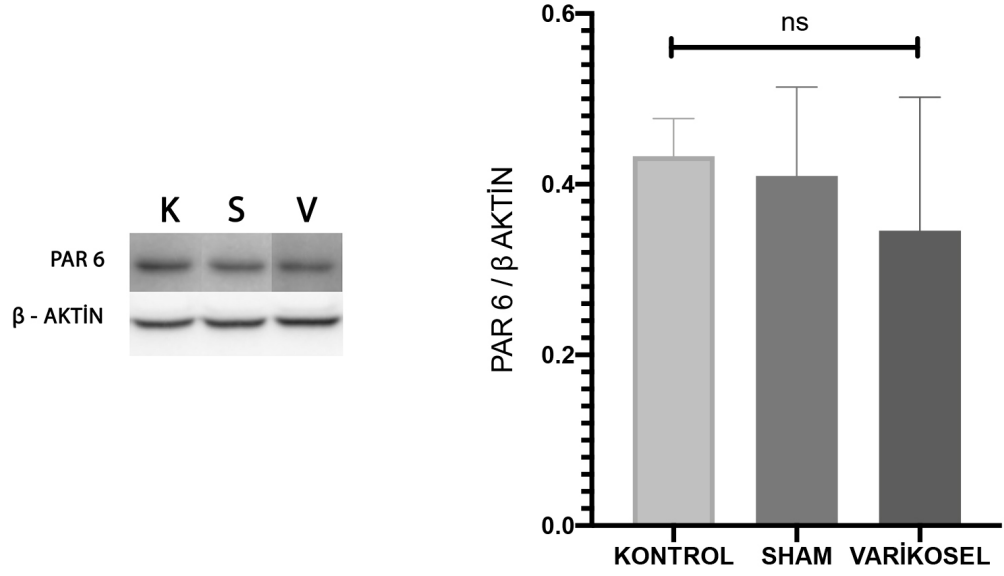
Şekil 4.8 A. Aktif Kaspaz-3 proteini seviyesinin Western Blot analizi sonuçları (**; p=0,0016, ***; p=0,0003). B. İNOS protein seviyesinin Western Blot analizi sonuçları (*; p=0,0135, ***; p=0,0006). β-Aktin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Vangl 2'nin protein seviyeleri değerlendirildiğinde, kontrol ve sham grupları arasında anlamlı bir fark bulunmazken varikozel ile birlikte bu seviyenin düşüş gösterdiği görüldü (****; $p<0,0001$).



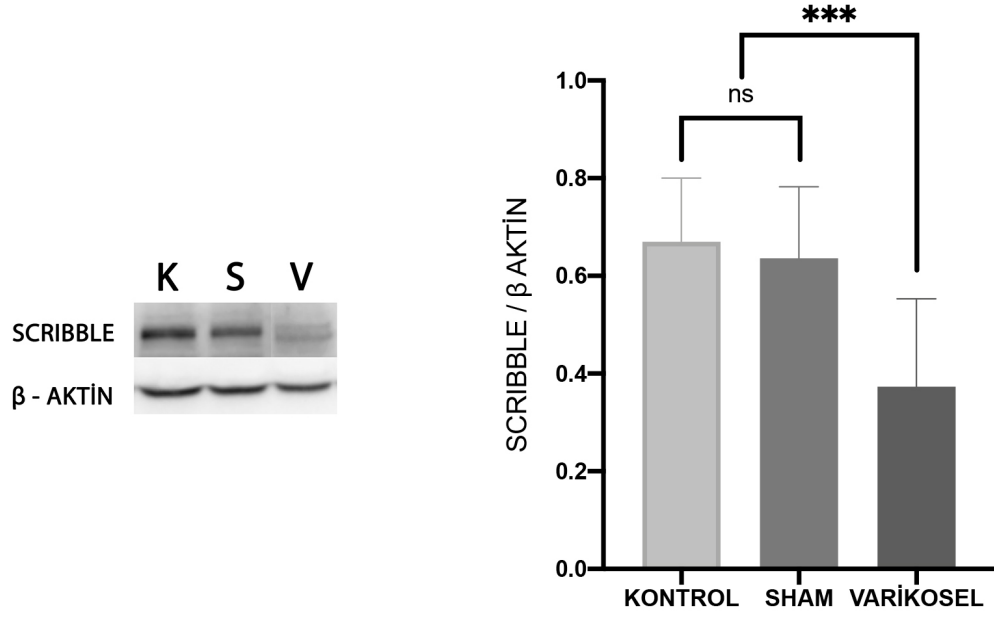
Şekil 4.9. Vangl 2 protein seviyesinin Western Blot analizi sonuçları (****; $p<0,0001$). β-Aktin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Bir diğ er polarite proteini olan PAR 6'nın protein seviyesinin kontrol ve sham gruplarına göre varikosel grubunda bir azalış sergilemesine rağmen bu azalma oranı istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).



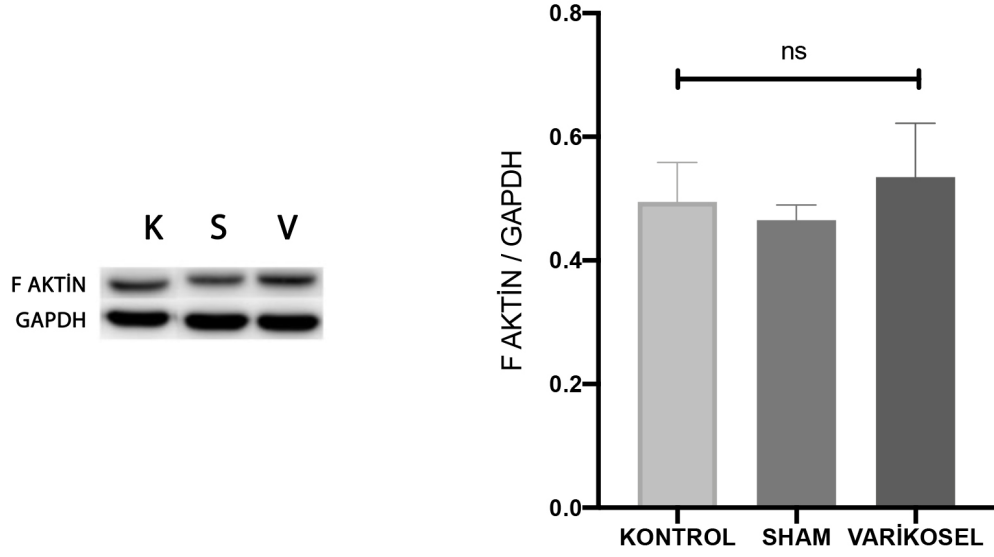
şekil 4.10. PAR 6 protein seviyesinin Western Blot analizi sonuçları.  -Aktin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Scribble'ın protein miktarları incelendiğinde, kontrol ve sham grupları arasında anlamlı bir fark görülmedi. Bu seviye varikozel gruplarında ise ciddi bir düşüş sergiledi (***, $p=0,0008$).



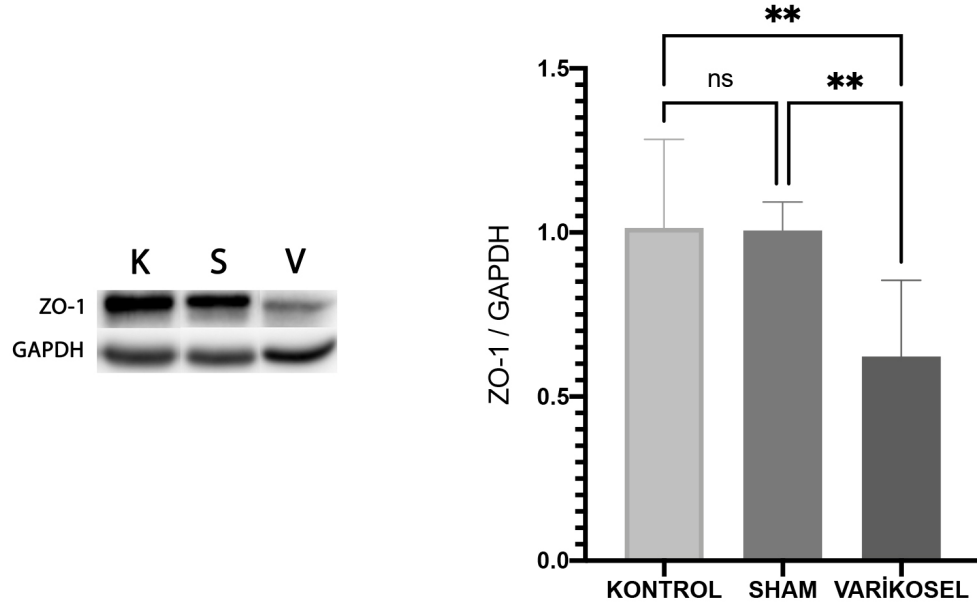
Şekil 4.11. Scribble protein seviyesinin Western Blot analizi sonuçları (***, $p=0,0008$). β-Aktin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Total testis dokusundan hazırlanan lizatların ayrılan süpernatant kısımları ile yapılan Western Blot sonuçlarında, F aktin seviyesinin gruplar arasında bir fark sergilemediği gözlemlendi ($p>0.05$).



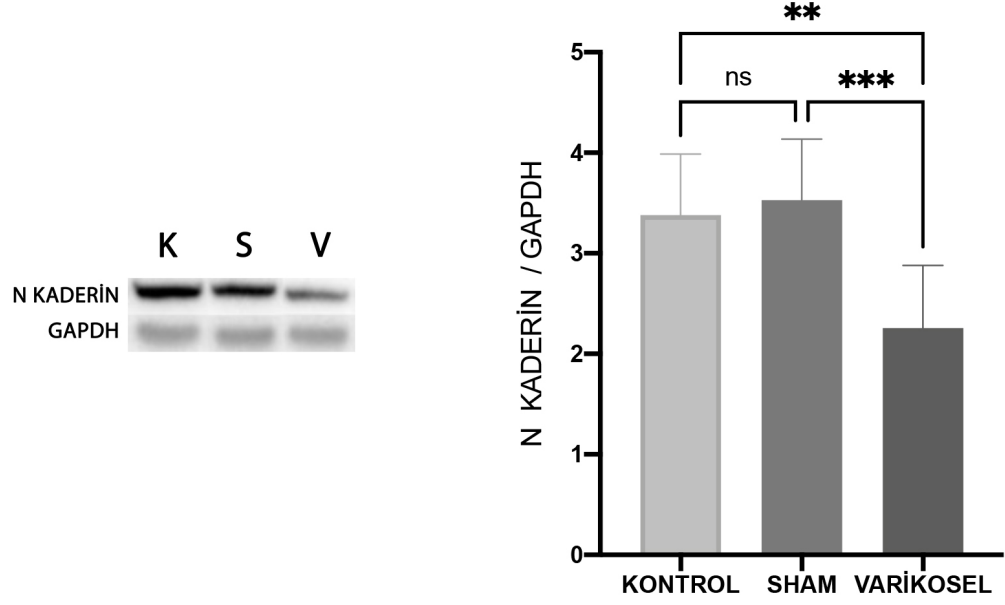
Şekil 4.12. F aktin protein seviyesinin Western Blot analizi sonuçları. Gliseraldehit-3 fosfatdehidrogenaz (GAPDH) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Kan testis bariyerinde görev alan adezyon moleküllerinden ZO-1'in varikosel ile değişimi incelendiğinde kontrol ve sham grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Varikosel grubunda ise hem kontrol (**; $p=0,0017$) hem de sham grubuna (**; $p=0,0021$) kıyasla protein seviyesinde, belirgin düşüş görüldü.



Şekil 4.13. ZO-1 protein seviyesinin Western Blot analizi sonuçları. Gliseraldehit-3 fosfatdehidrogenaz (GAPDH) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

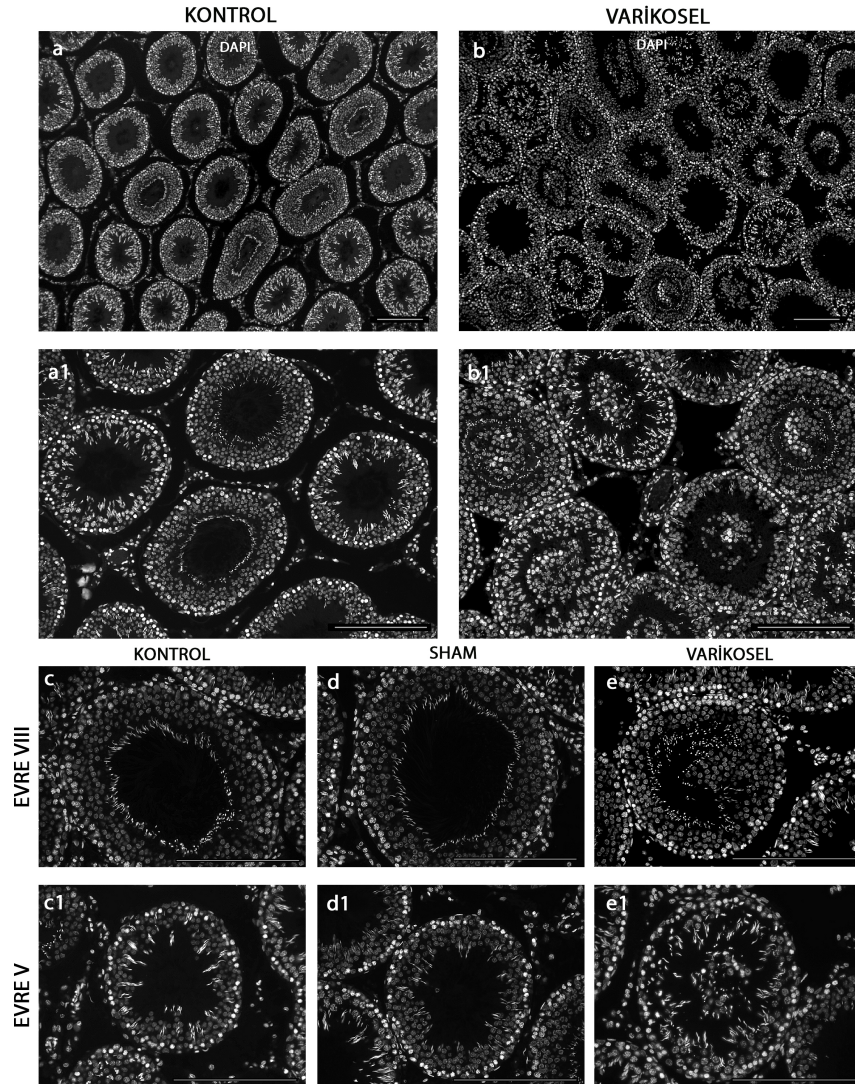
Bir diğ r adezyon molekülü, N kaderin'in protein seviyeleri karşılaştırıldığında kontrol ve sham arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Buna karşın varikosel gruplarında protein miktarlarının, kontrol (**; $p=0,0020$) ve sham (***; $p= 0,0006$) gruplarına göre anlamlı bir seviyede azaldığı gözlendi.



şekil 4.14. N Kaderin protein seviyesinin Western Blot analizi sonuçları. Gliseraldehit-3 fosfatdehidrogenaz (GAPDH) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

4.4. Çiftli İmmunflouresan Bulguları

Her bir polarite proteini ilişkili olduğu bilinen F-aktin, Zonula Okludens ve N-kaderin ile ko-lokalizasyonlarını göstermek için çiftli immunflouresan boyanmalar gerçekleştirildi. Buna ek olarak, germ hücrelerinin dizilişindeki farklılıkları daha net göstermek amacıyla, yalnız hücre nükleuslarının gösterildiği DAPI (beyaz) boyanması ile bir panel de hazırlandı (Şekil 4.15).

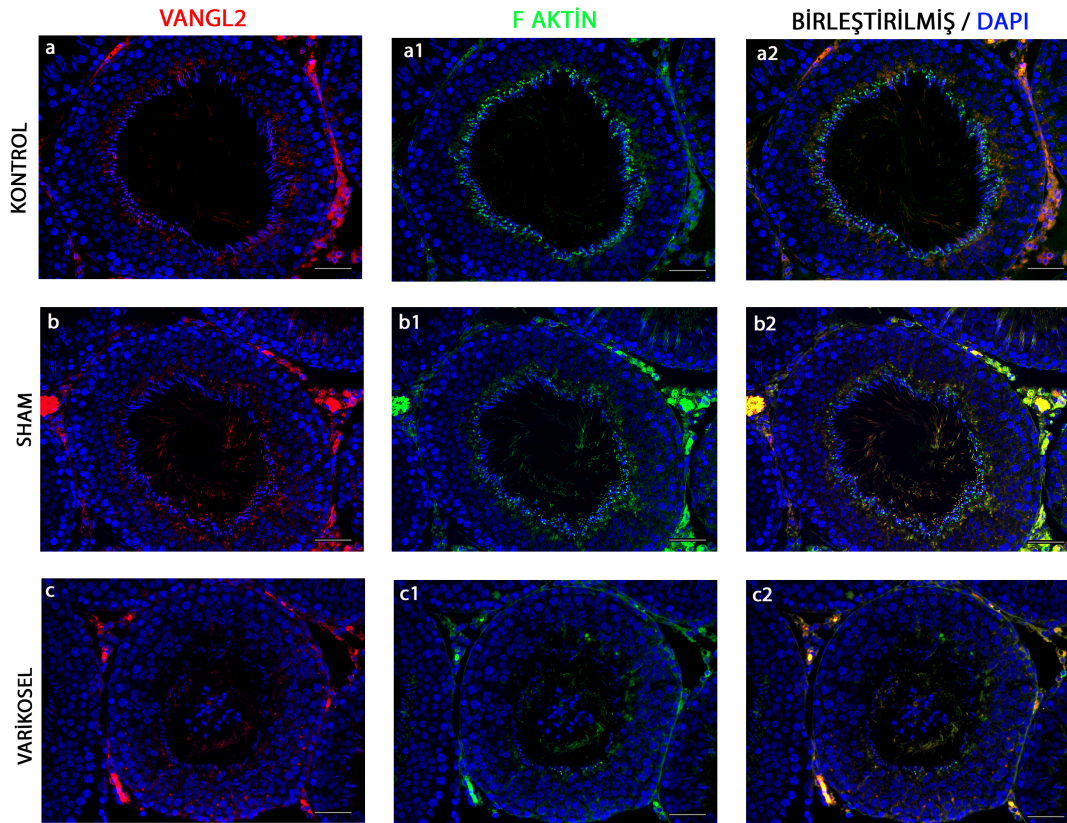


Şekil 4.15. a-a1; Kontrol (100X ve 200X), b-b1; Varikozel (100X ve 200X). c-d-e; Evre VIII tübüllere ve c1-d1-e1; Evre V tübüllere ait 400X görüntüler (Skala bar: 200 µm)

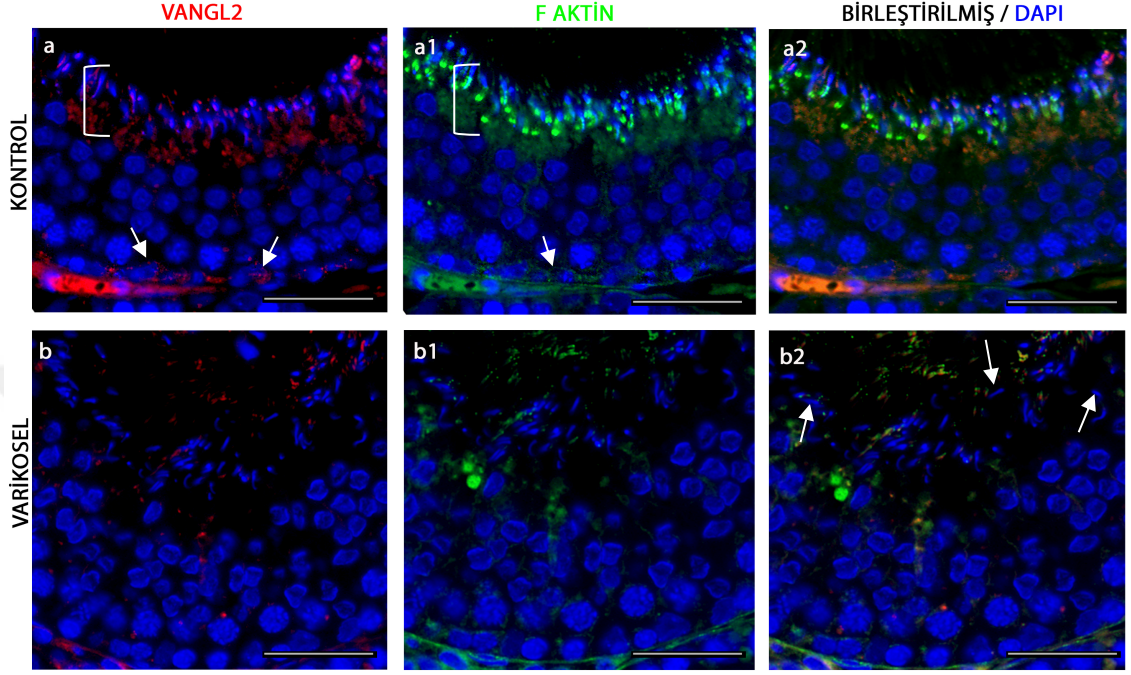
4.4.1. Vangl 2 ve F Aktin Çiftli İmmunfloresan Boyanması:

Vangl2 proteininin yerleşimi, özellikle geç evre VII ve evre VIII'de spermatidlerin Sertoli hücrelerine tutunduğu apikal ektoplazma özelleşmelerde ve kan-testis bariyerini oluşturan bazal ektoplazma özelleşmelerde F-aktinle birlikte lokalizasyonları immunofloresan yöntemi ile gösterildi (**Şekil 4.16**). Her iki proteinin sham grubundaki lokalizasyonlarında bir değişiklik gözlenmedi (**Şekil 4.16.b-b2**). Buna karşın varikozel grubunda apikalde spermatidlerin başlarında ve bazal ektoplazmik özelleşmelerde, lokalizasyonların yer yer kaybolduğu ve dağınık bir yerleşim sergilediği gözlemlendi (**Şekil 4.16.A.c-c2 ve Şekil 4.16.B.b-b2**). Ayrıca geç evre VII / evre VIII'de spermatidlerin Sertoli hücrelerine doğru bir şekilde tutunamadığı, polaritelerini kaybettikleri ve lümene dökülmeleri dikkat çekti (**Şekil 4.16.B.b2**).

A



B.

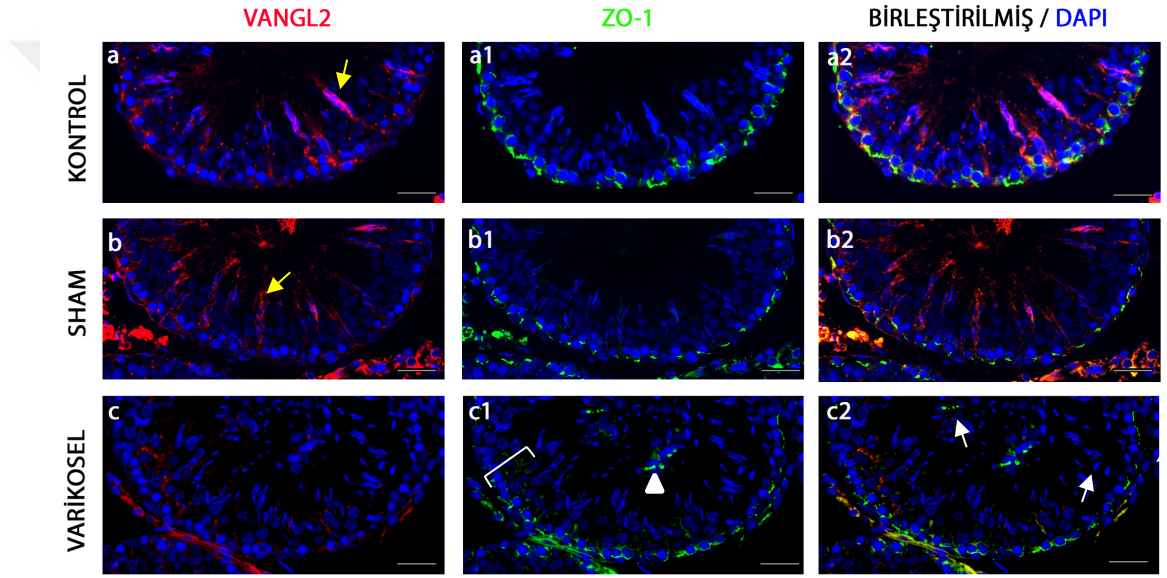


Şekil 4.16. Vangl 2- F aktin çiftli immunfloresan, evre VIII tübüllerine ait 400X görüntüler. (Vangl2; kırmızı-PE, F aktin; yeşil-FITC ve nükleuslar; mavi-DAPI) **A. a-a1-a2;** Kontrol grubu, **b-b1-b2;** Sham grubu, **c-c1-c2;** Varikosele grubuna ait görüntülerdir. **B.** Kontrol ve varikosele ait aynı fotoğrafların yakınlaştırılmasıyla oluşturulmuştur. Kontrol grubunda (**a-a1-a2**) apikal ektoplazmik özelleşmeler; köşeli parantez ile bazal ektoplazmik özelleşme – KTB; oklar ile gösterildi. Varikosele grubunda (**b-b1-b2**) ise polaritelerini kaybetmiş spermatidler okla gösterildi. (Skala bar: 50 µm)

4.4.2. Kan-Testis bariyerinde Vangl 2'nin, ZO-1 ve N Kaderin ile Çiftli İmmunfloresan Bulguları:

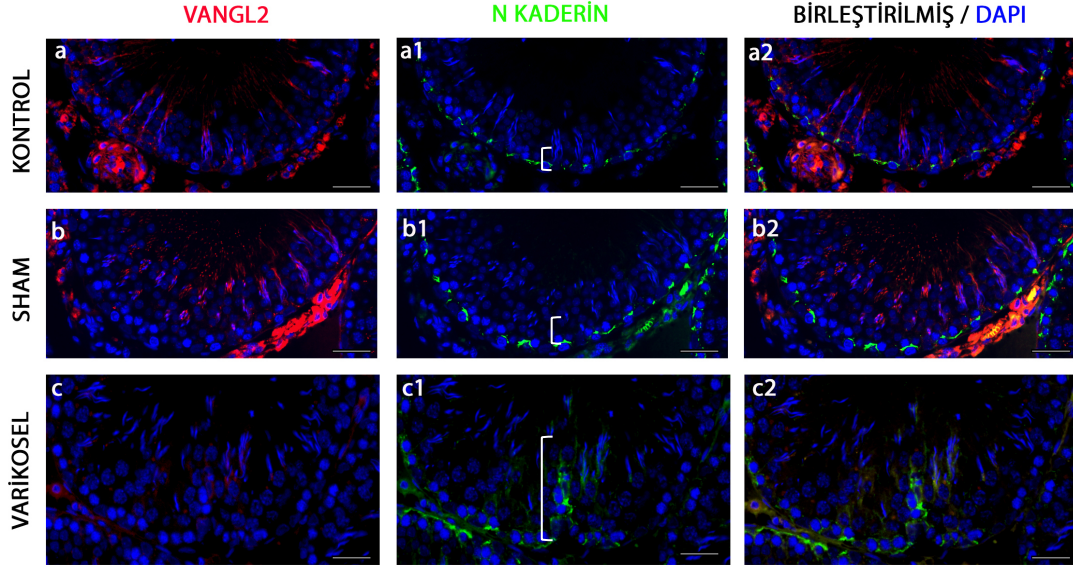
Bazal ektoplazmik özelleşmeler için özellikle evre V'de kan-testis bariyerine ait adezyon molekülleriyle birlikte Vangl2 ifadeleri incelendi. İlk olarak Vangl2 ile ZO-1'in birlikte lokalizasyonları **şekil 4.17'de** gösterildi. Evre V'de Vangl2'nin bazal ektoplazmik özelleşmelerde yer almasının yanında bazal laminaya yakınında bulunan basamak 17 spermatidlerde de ekspresyonunun güçlü olduğu dikkat çekti (**şekil 4.17.a-a2**). Vangl2'nin kontrol ve sham gruplarında benzer ifadeler sergilerken varikosele grubunda hem bazal ektoplazmik özelleşmelerde hem de spermatid başlarında ekspresyonların oldukça azaldığı, neredeyse kaybolduğu dikkat çekti. Bununla birlikte elongoid spermatidlerin lümene gelişigüzel dağıldığı gözlemlendi (**şekil 4.17.c-c2**).

ZO-1 'in lokalizasyonları kontrol ve sham gruplarında tek sıra halinde, tüm tübülde pakiten spermatidlerin altında, bazal laminaya paralel seyretti (**şekil 4.17. a1, b1**). Varikosel grubunda bu ifadenin epitelin içlerine doğru dağılmalar şeklinde, spermatidlerin üzerinde lokalizasyonlar gösterdi (**şekil 4.17.c1**). Bu durum varikosel grubunda kan-testis bariyerinin işlevini yitirdiğini açıkça ortaya koydu. Buna bağlı olarak aynı grupta germ hücrelerinin lümene döküldüğü ve seminifer epitelde ciddi bozulmalar olduğu gözlemlendi (**şekil 4.17.c-c1**)



Şekil 4.17. Vangl2 – ZO-1 çiftli immunfloresan, evre V tübüllerine ait 400X görüntüler. (Vangl2; kırmızı-PE, ZO-1; yeşil-FITC ve nükleuslar; mavi-DAPI). **a-a1-a2**; Kontrol grubu, **b-b1-b2**; Sham grubu, **c-c1-c2**; Varikosel grubuna ait görüntülerdir. **a ve b**'de Vangl2'nin spermatid başlarındaki ekspresyonları sarı ok ile gösterilmiştir. **c1**'de ZO-1'in lokalizasyonlarındaki dağılmalar parantez ile belirtilirken lümene dökülen germ hücreleri etrafında ki ZO-1 ifadesi ok başı ile gösterildi. **c2**'de ise lümene dağılan, polariteleri bozulmuş spermatidler ok ile gösterildi. (Skala bar: 50 µm)

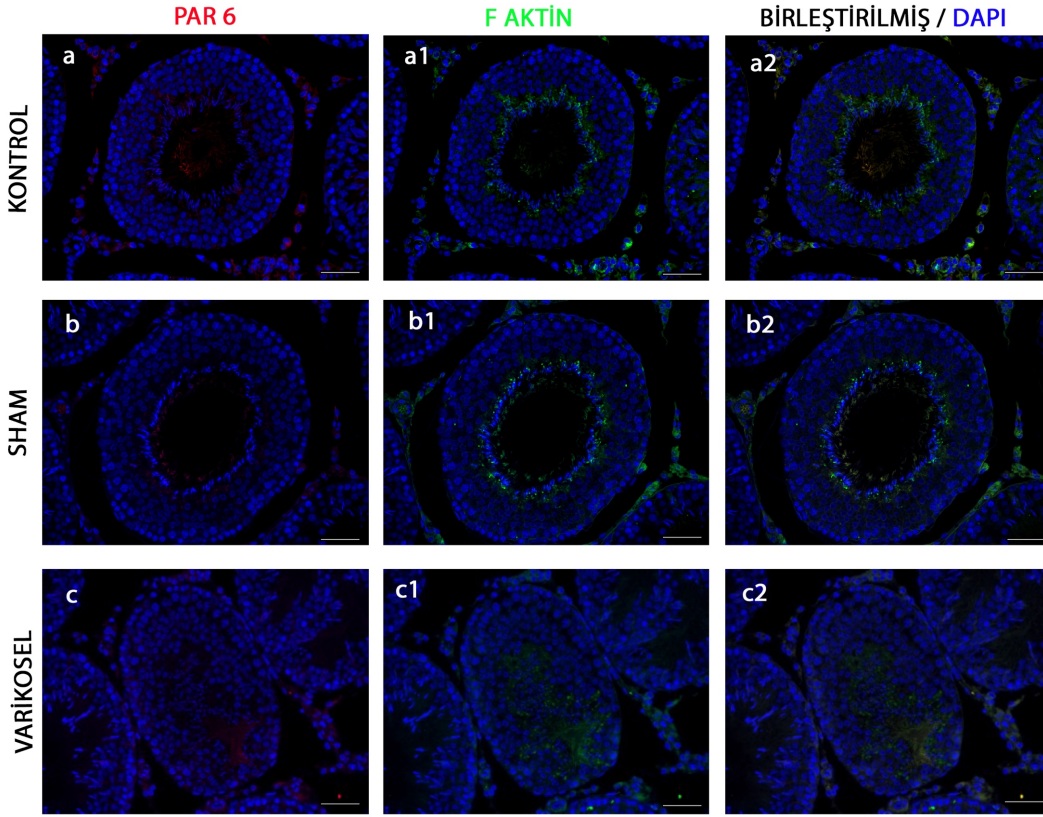
Kan-testis bariyerinde görev alan bir diğer protein olan N kaderinin, Vangl2 ile birlikte lokalizasyonları evre V tübüllerde incelendi (Şekil 4.18.). Kontrol ve sham gruplarında lokalizasyonlar, kan-testis bariyeri boyunca görülürken varikozel grubunda epitelin içlerine doğru dağılmalar şeklinde gözlemlendi (şekil 4.18 a1, b1, c1; parantez). Vangl2 lokalizasyonlarında da ciddi şekilde bozulmalar görüldü (Şekil 4.18.c).



Şekil 4.18. Vangl2 – N Kaderin çiftli immunfloresan, evre V tübüllerine ait 400X görüntüler. (Vangl2; kırmızı-PE, N kaderin; yeşil-FITC ve nükleuslar; mavi-DAPI). **a-a1-a2**; Kontrol grubu, **b-b1-b2**; Sham grubu, **c-c1-c2**; Varikozel grubuna ait görüntülerdir. **a1-b1-c1**; Tübül içerisinde N kaderin lokalizasyonlarında ki dağılım parantez ile gösterildi. (Skala bar: 50 µm)

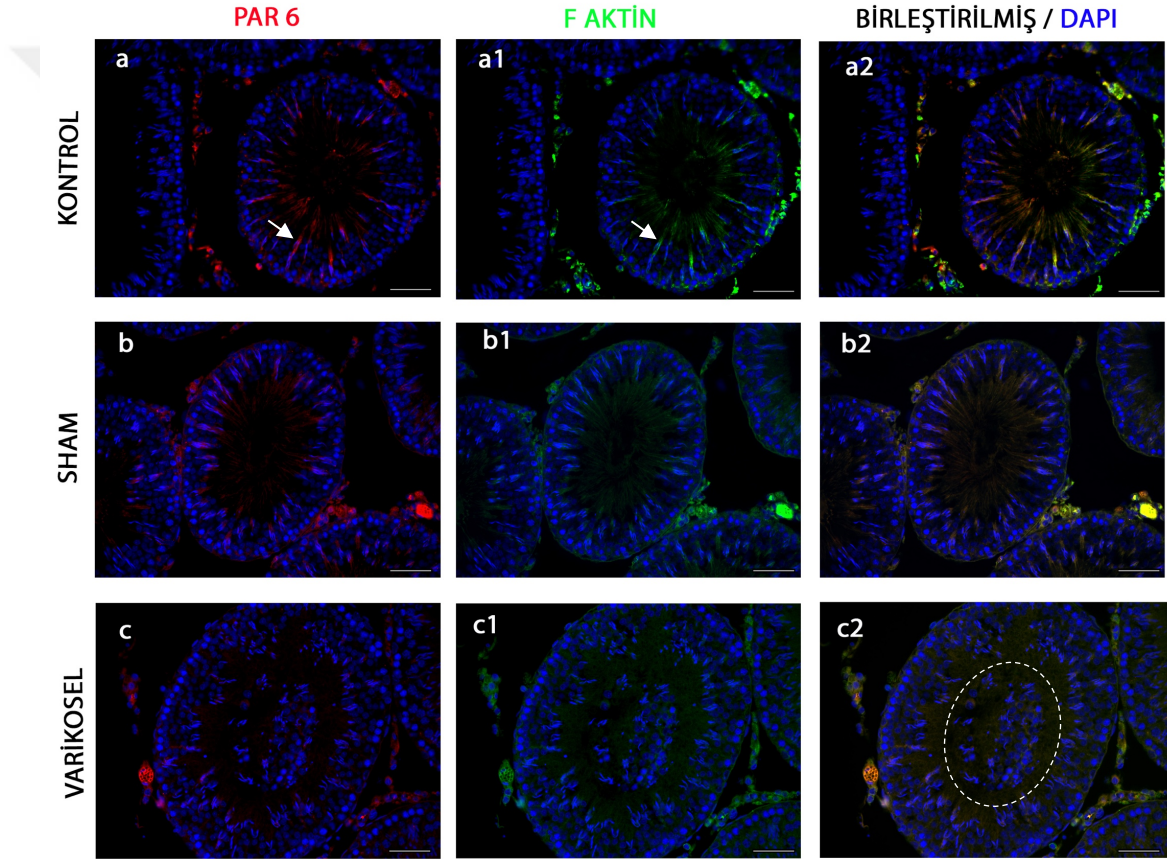
4.4.3. Par 6 ve F aktin Çiftli İmmunfluoresan Boyanması:

Bir diğer polarite kompleksini temsil etmesi açısından Par 6'nın evre VIII ve evre V tübüllerde ifadeleri incelendi (Şekil 4.19,20). Kontrol gruplarında, Par 6, evre VII-VIII'de yok denilecek kadar düşük bir seviyede gözlemlendi (Şekil 4.19.a). F-aktinle birlikte her iki proteinin sham grubundaki lokalizasyonlarında bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 4.19.b-b2). Varikozel grubunda da Par 6'nın ekspresyon seviyesinde değişim görülmedi (Şekil 4.19.c). Bununla birlikte F aktin'in lokalizasyonlarında değişimler ve bozulmalar gözlemlendi. Vangl2 görüntülerinde olduğu gibi tübül lümenlerine dökülmeler ve epitel dizisinde bozulmalar dikkat çekti (Şekil 4.19.c-c2).



Şekil 4.19. PAR 6 - F aktin çiftli immünfloresan, evre VIII tübüllerine ait 400X görüntüler. (PAR 6; kırmızı-PE, F aktin; yeşil-FITC ve nükleuslar; mavi-DAPI) **a-a1-a2**; Kontrol grubu, **b-b1-b2**; Sham grubu, **c-c1-c2**; Varikozel grubuna ait görüntülerdir. (Skala bar: 50 µm)

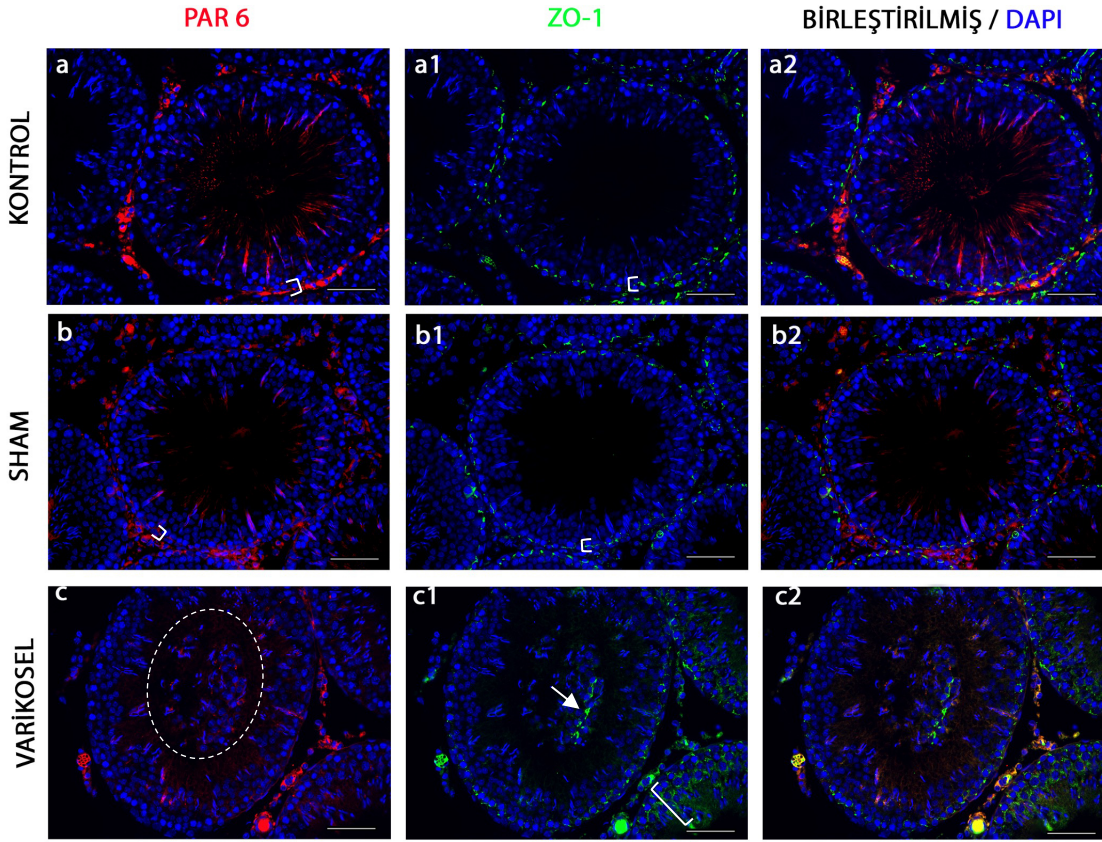
Par 6'nın evre VIII tübüllerindeki düşük ekspresyonun ardından evre V tübüllerindeki ifadesi değerlendirildi (Şekil 4.20). Oldukça belirgin düzeyde eksprese olan Par 6'nın, F aktinle birlikte lokalizasyon göstererek hem spermatid başlarında hem de bazal ektoplazmik özelleşmelerde konumlandığı görüldü (Şekil 4.20.a-a2). Kontrol ve sham gruplarında spermatidlerde ve epitel düzeninde herhangi bir değişiklik görülmemesine rağmen varikozel gruplarında, iki proteinin de ekspresyonlarının lokalizasyonlarında ve seviyelerinde farklılıklar gözlemlendi (Şekil 4.20. a-c2).



Şekil 4.20. PAR 6- F aktin çiftli immunfloresan, evre V tübüllerine ait 400X görüntüler. (PAR 6; kırmızı-PE, F aktin; yeşil-FITC ve nükleuslar; mavi-DAPI) **a-a1-a2**; Kontrol grubu, **b-b1-b2**; Sham grubu, **c-c1-c2**; Varikozel grubuna ait görüntülerdir. **a1 ve a2** 'de uzayan spermatidler ile birlikte konumlanan Par 6 ve F aktin (ok). **c2**'de lümene dökülen uzayan spermatidler ve germ hücreleri (daire). (Skala bar: 50 µm)

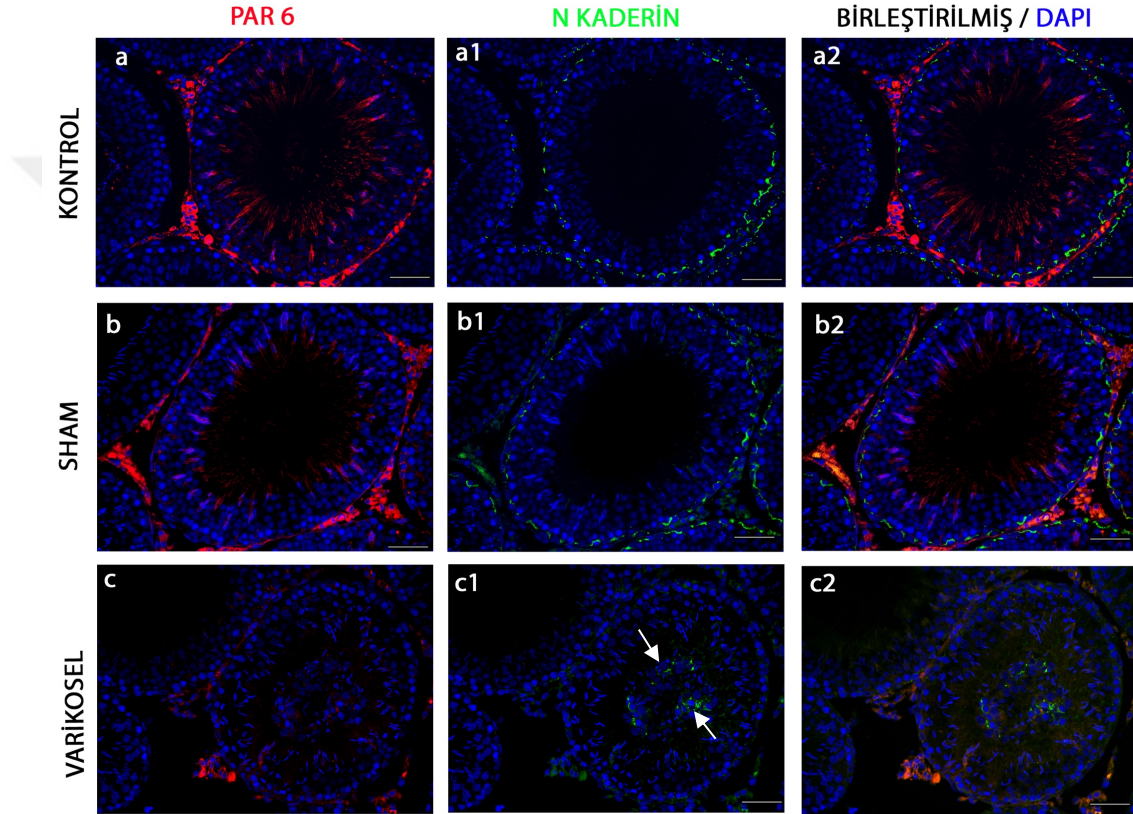
4.4.4. Kan-Testis bariyerinde PAR 6'nın ZO-1 ve N Kaderin ile Çiftli İmmunfloresan Bulguları:

Testis dokusunda, bazal ektoplazmik alanlarda lokalize olduğu bilinen Par 6'nın evre V'te kan-testis bariyerini oluşturan adezyon molekülleriyle birlikte lokalizasyonları değerlendirildi (Şekil 4.21,22). Par 6 ve ZO-1'in lokalizasyonları incelendiğinde; basamak 17 spermatidlerdeki ekspresyonların varikozel gruplarında kaybolduğu görüldü aynı zamanda epitel içerisindeki dökülmeler ve germ hücre kayıpları sebebiyle ZO-1'in lümen içerisinde de ekspresyonlarına rastlanıldı (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. PAR 6 – ZO-1 çiftli immunfloresan, evre V tübüllerine ait 400X görüntüler. (PAR 6; kırmızı-PE, ZO-1; yeşil-FITC ve nükleuslar; mavi-DAPI) **a-a1-a2**; Kontrol grubu, **b-b1-b2**; Sham grubu, **c-c1-c2**; Varikozel grubuna ait görüntülerdir. **a1, b1 ve c1**'de ZO-1'in epitel içerisindeki dağılımları (parantez). **c'** de lümen içerisine dökülen germ hücreler (daire). **c1**'de lümen içerisinde görülen ZO-1 ekspresyonları (ok). (Skala bar: 50 µm)

N kaderin ifadesinin kontrol ve sham gruplarından farklı olarak bazal kompartmanda dramatik bir şekilde azalarak, dökülen germ hücrelerle birlikte lümen içerisinde gözlemlendi (**Şekil 4.22.c1; ok**). Par 6'nın bozulan lokalizasyonların yanında bazal ektoplazmik özelleşme proteini olan N kaderin'in de bozulması, epitel içerisindeki düzenin ortadan kalktığını ortaya koymuştur (**şekil 22.c-c2**).

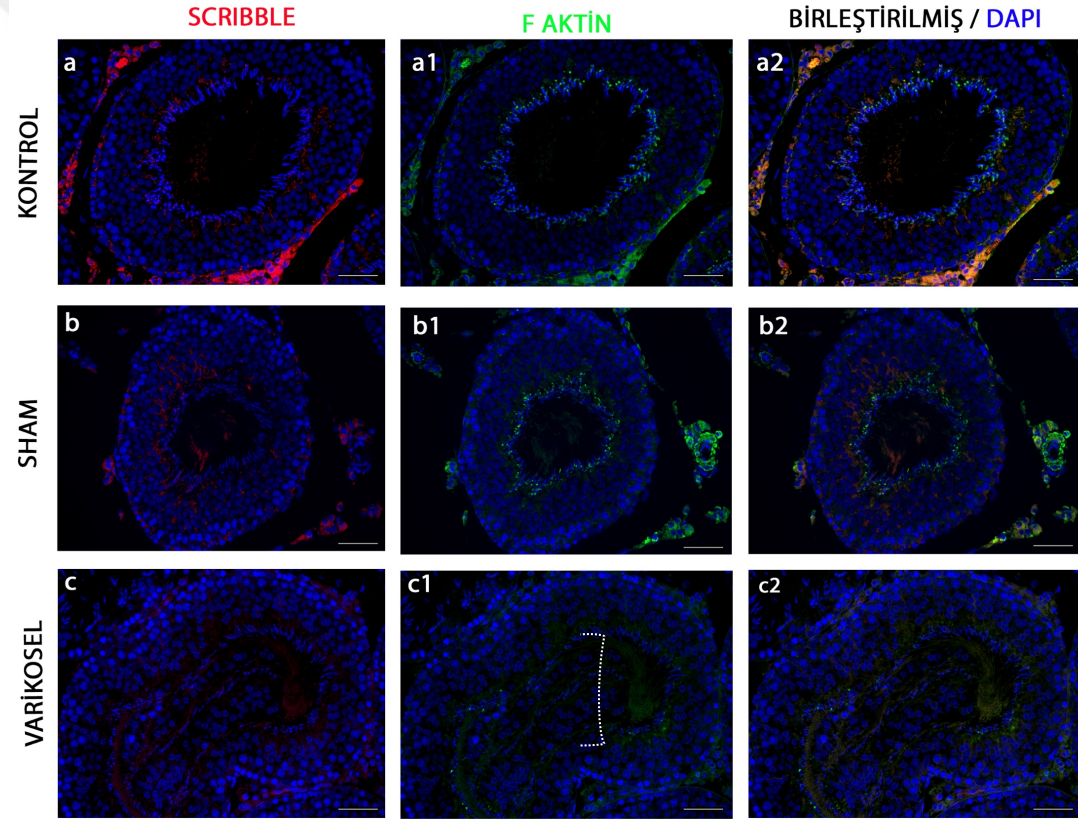


Şekil 4.22 PAR 6 - N Kaderin çiftli immunfloresan, evre V tübüllerine ait 400X görüntüler. (PAR 6; kırmızı-PE, N Kaderin; yeşil-FITC ve nükleuslar; mavi-DAPI) **a-a1-a2**; Kontrol grubu, **b-b1-b2**; Sham grubu, **c-c1-c2**; Varikosel grubuna ait görüntülerdir. **c1**' de bazal kompartmanda görülmezken lümen içerisinde görülen N kaderin ekspresyonları (ok). (Skala bar: 50 μ m)

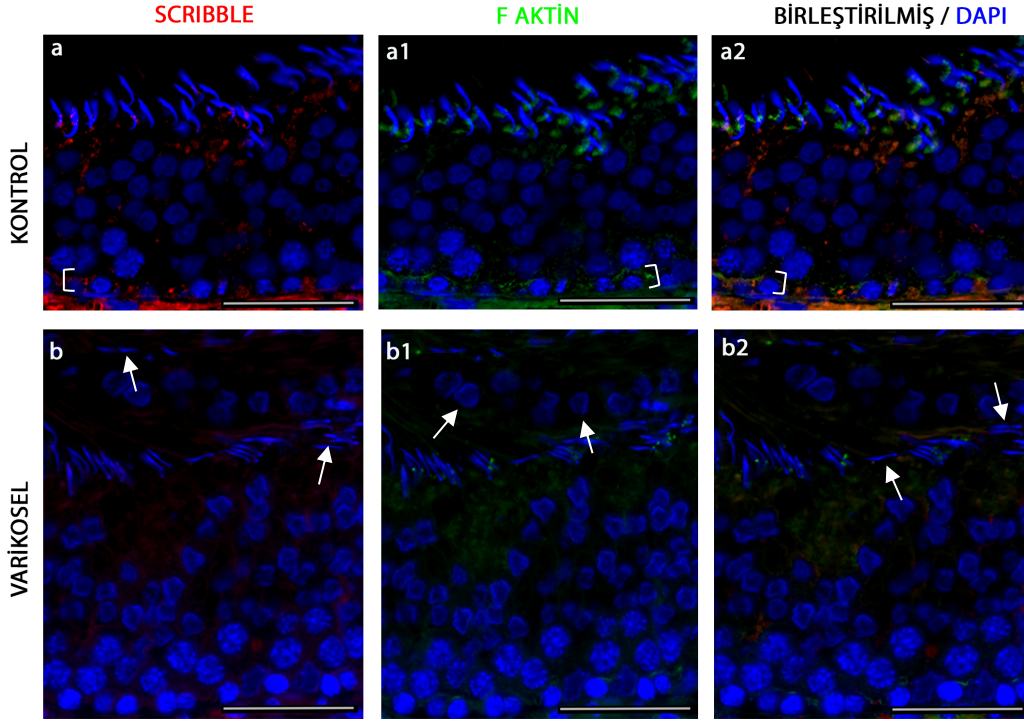
4.4.5. Scribble ve F aktin Çiftli İmmunfluoresan Boyanması:

Kontrol ve sham gruplarına ait evre VIII tübüller incelendiğinde özellikle apikal ve bazal ektoplazmik özelleşmelerde birlikte lokalize oldukları görüldü (şekil 4.23.a-b2). Varikozel gruplarında ise her iki proteine ait ekspresyonların dağınık bir şekilde başka bölgelere yayıldığı ve bununla birlikte seminifer epitel düzeninin bozulduğu gözlemlendi (şekil 4.23.c-c2).

A.

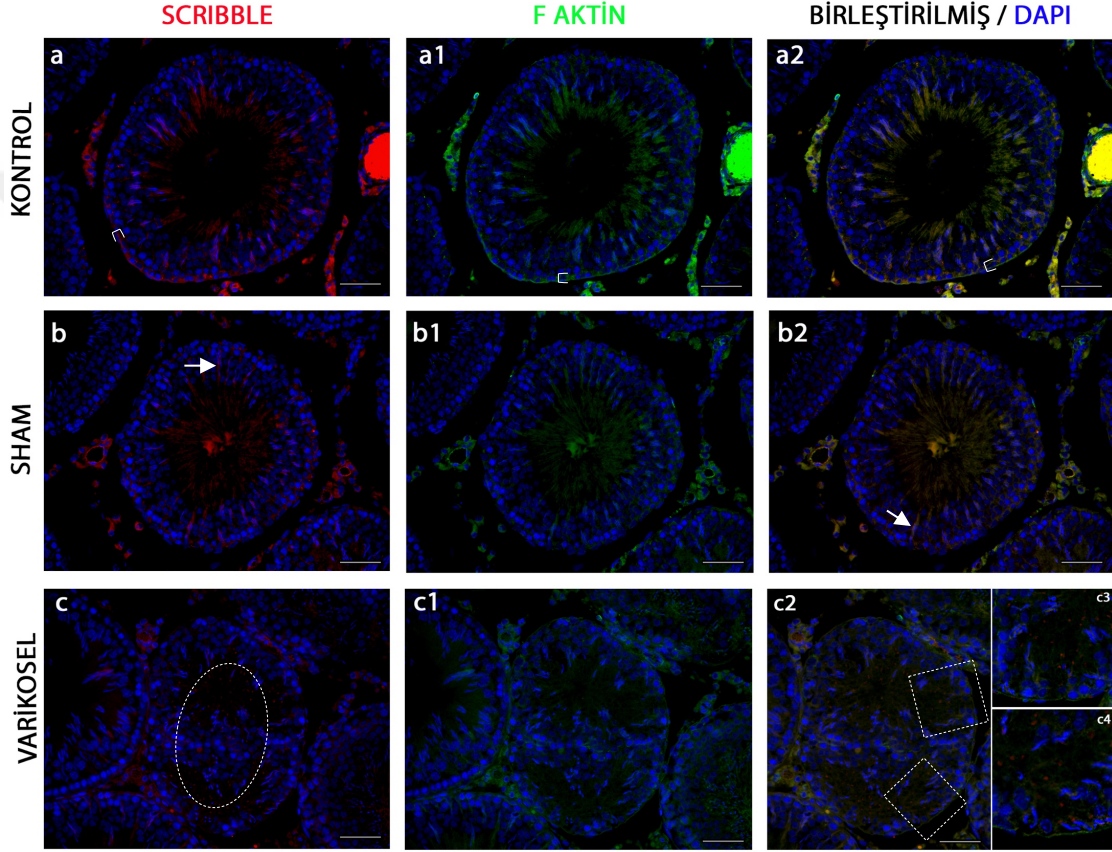


B.



Şekil 4.23. Scribble - F aktin çiftli immunfloresan, evre VIII tübüllerine ait 400X görüntüler. (Scribble; kırmızı-PE, F aktin; yeşil-FITC ve nükleuslar; mavi-DAPI) **A. Üst panelde** gösterilen **a-a1-a2**; Kontrol grubu, **b-b1-b2**; Sham grubu, **c-c1-c2**; Varikosele grubuna ait görüntülerdir. **c1**'de lümene dökülen hücreler kesikli parantez ile gösterildi. **B. Alt panel** ise kontrol ve varikosele ait aynı fotoğrafların yakınlaştırılmasıyla oluşturulmuştur. Kontrol grubunda (**a-a1-a2**) Bazal ektoplazmik özelleşme – KTB, parantez ile; Varikosele grubunda (**b-b1-b2**) ise lümene dökülen hücreler ve polaritelerini kaybetmiş spermatidler okla gösterildi. (Skala bar: 50 µm)

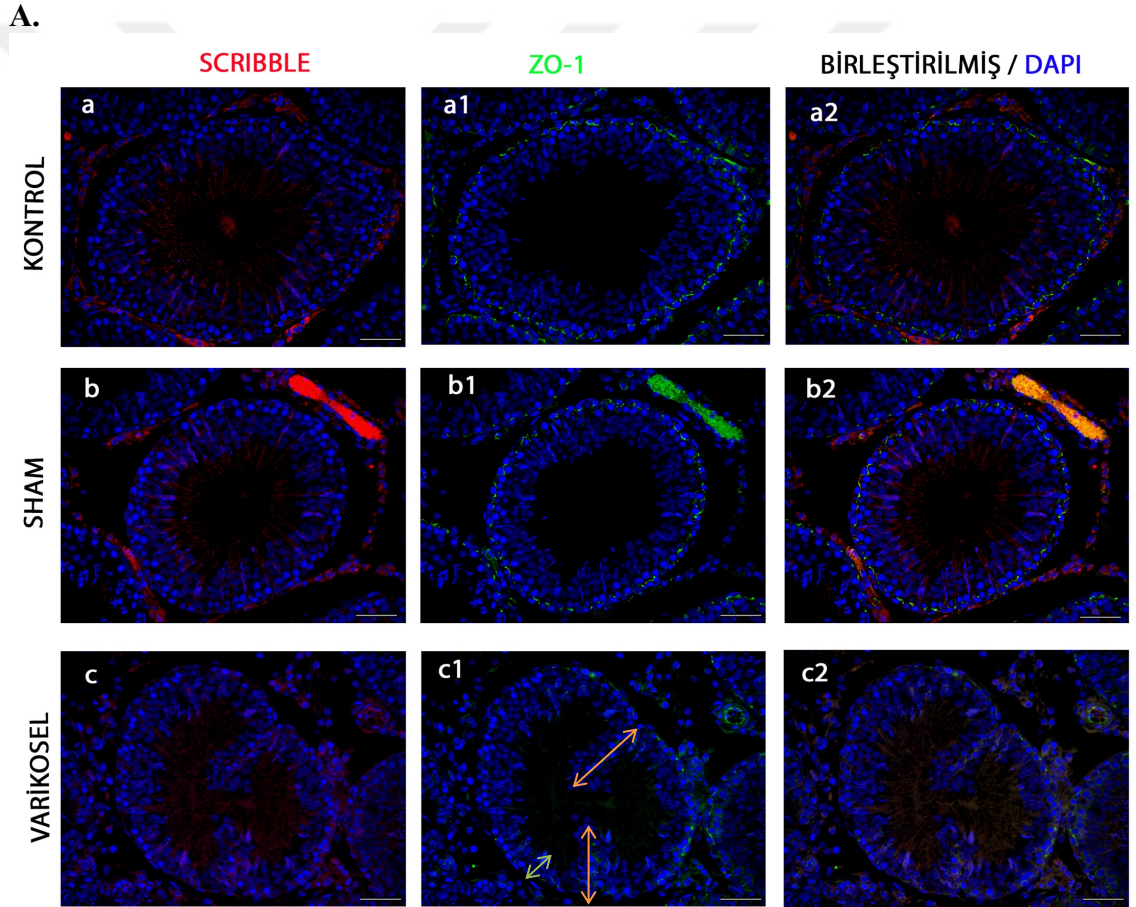
Evre V tübüleri incelendiğinde kontrol gruplarında Scribble'ın kan-testis bariyerinde belirgin ekspresyonu dikkat çekerken varikozel grubunda bu lokalizasyonun neredeyse kaybolduğu görüldü (**Şekil 4.24. a,b,c**). Ayrıca varikozel gruplarının epitellerinin yer yer, tamamen döküldüğü bölgelere rastanıldı (**Şekil 4.24. c2,c3,c4**).



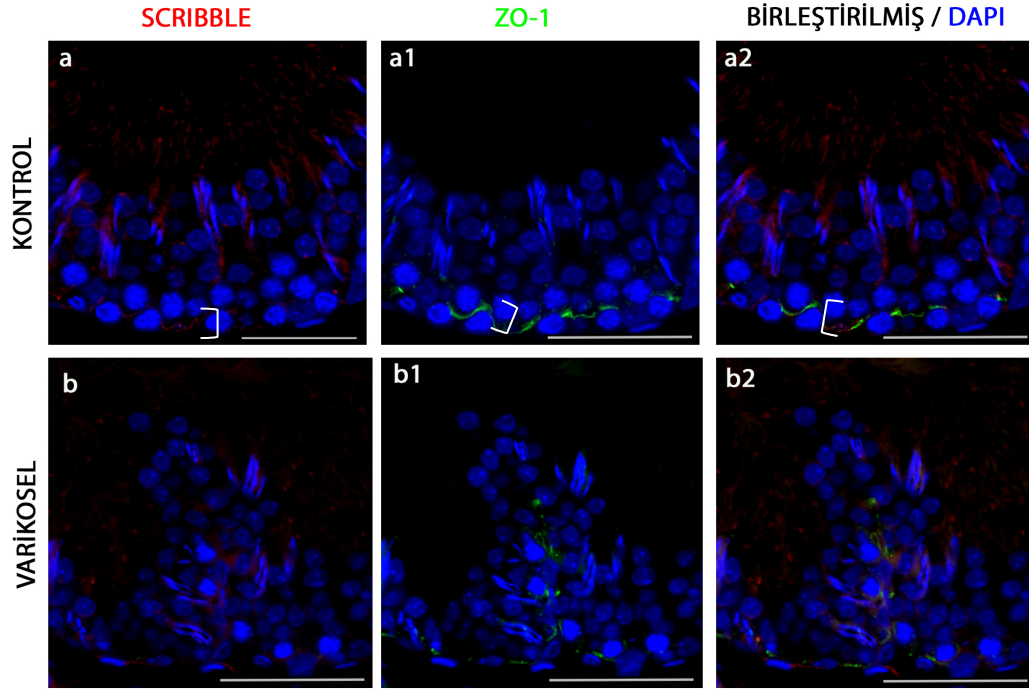
Şekil.4.24. Scribble- F aktin çiftli immunfloresan, evre V tübüllerine ait 400X görüntüler. (Scribble; kırmızı-PE, F aktin; yeşil-FITC ve nükleuslar; mavi-DAPI) **a-a1-a2**; Kontrol grubu, **b-b1-b2**; Sham grubu, **c-c1-c2**; Varikozel grubuna ait görüntülerdir. **a-a1-a2'de** kan-testis bariyerin boyunca devam eden ekspresyonlar, parantez ile ; **b-b1-b2'de** uzayan spermatidlerde görülen ekspresyonlar ok ile ; **c'de** lümene dökülen hücreler ise kesikli daire ile gösterildi. **c2'de** bazal membranın üzerindeki epitelin tamamen döküldüğü bölgeler (kesikli dikdörtgen) , **c3 ve c4'de** yakınlştırılmış şekilde gösterildi. (Skala bar: 50 µm)

4.4.6. Kan-Testis bariyerinde Scribble'nin ZO-1 ve N Kaderin ile Çiftli İmmunfluoresan Bulguları:

Scribble, kontrol ve sham gruplarında bazal ektoplazmik özelleşmeler boyunca ZO-1 ile ko-lokalize oldukları görüldü (Şekil 4.25.A.a-b2). Varikozel gruplarında bu birlikteliğin neredeyse kaybolduğu dikkat çekti. Aynı grupta seminifer epitelin yüksekliğinin yer yer değiştiği ve bazal membrandan ayrıldığı görüldü (Şekil 4.25.A.c-c2 ve Şekil 4.25.B.b-b2).



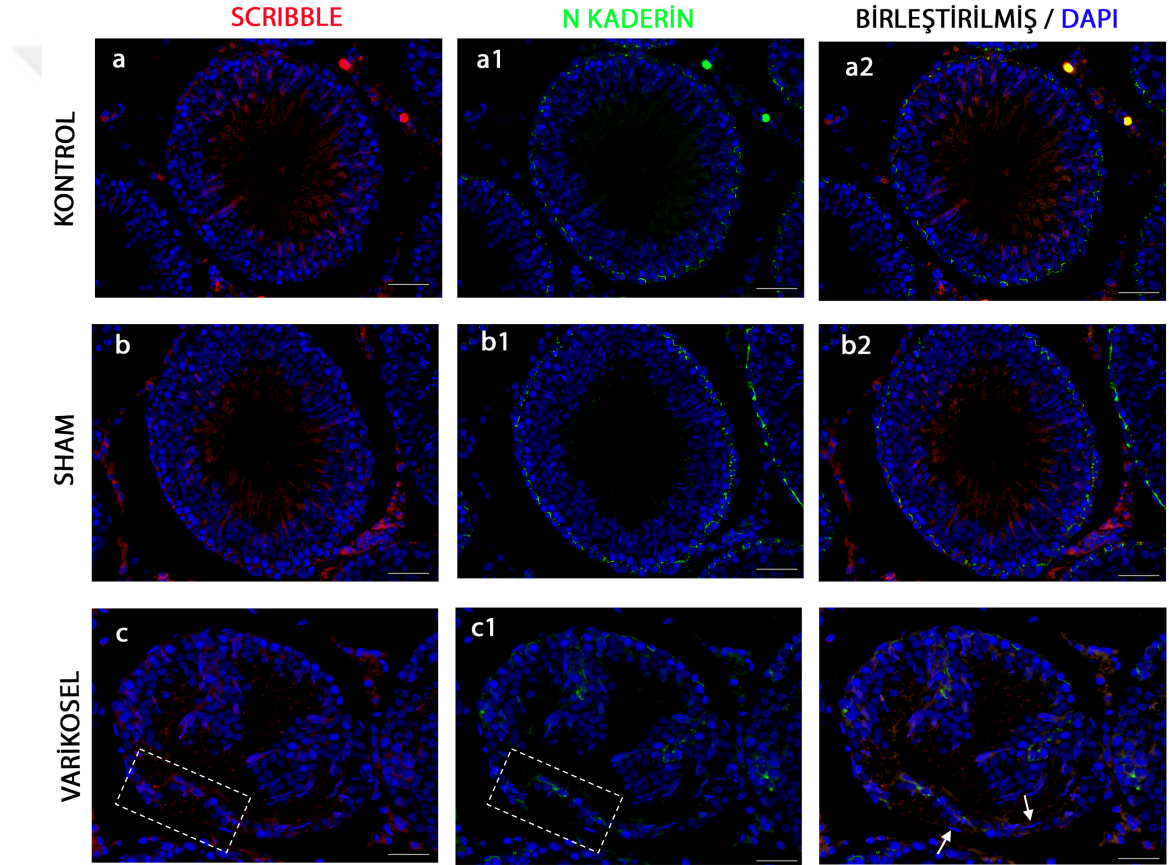
B.



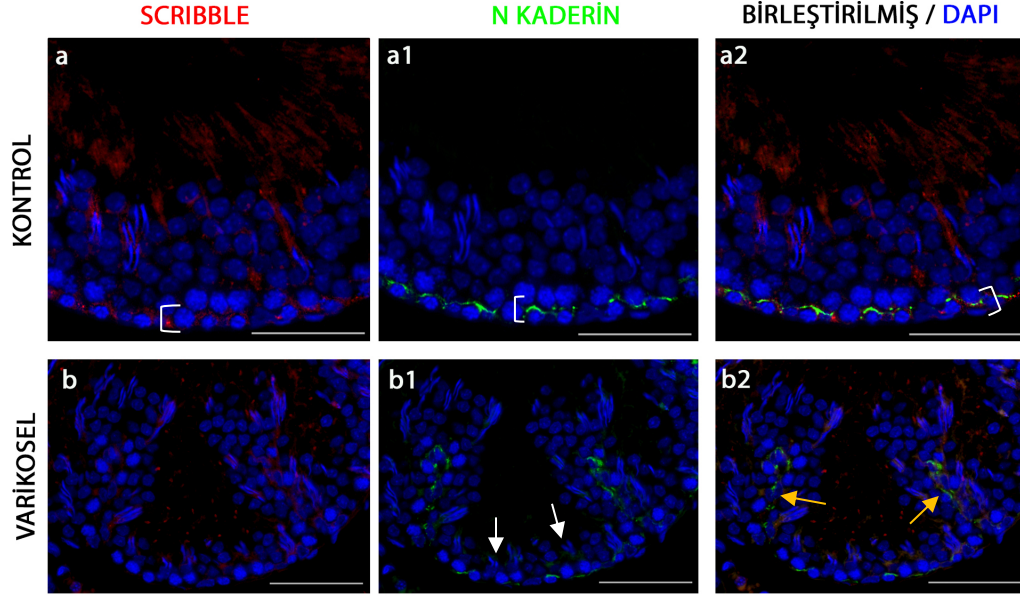
Şekil.4.25. Scribble – ZO-1 çiftli immunfloresan, evre V tübüllerine ait 400X görüntüler. (Scribble; kırmızı-PE, ZO-1; yeşil-FITC ve nükleuslar; mavi-DAPI) **A. a-a1-a2;** Kontrol grubu, **b-b1-b2;** Sham grubu, **c-c1-c2;** Varikosele grubuna ait görüntülerdir. **c-c2’de** tübül içerisinde farklı seviyelerde lümene ulaşan epitel grupları (turuncu ve yeşil ok) **B.** Kontrol ve varikosele ait aynı görüntülerin yakınlaştırılmasıyla oluşturulmuştur. Kontrol grubunda (**a-a1-a2**) Bazal ektoplazmik özelleşme – KTB, parantez ile; Varikosele grubunda (**b-b1-b2**) ZO-1 ifadelerinin epitelin içerisine doğru dağıldığı ve epitelin düzensiz hale geldiği gözlemlendi. (Skala bar: 50 μ m)

N kaderin ve Scribble lokalizasyonları kontrol ve sham gruplarında bazal ektoplazmik özelleşmeler boyunca seyretti. (Şekil 4.26.a-b2). Varikozel gruplarında bu ekspresyonlar gözle görünür bir azalma sergilerken epitel düzeninde dikkat çekici bozulmalar gözlemlendi. Seminifer epitelin yüksekliğinin yer yer değişmesinin yanında bazal membrandan tamamen kopmuş hücre grupları ve polariteleri bozulmuş spermatidler, tübül içerisinde gelişti güzel bir dağılım gösterdi. (Şekil 4.26.A.c-c2 ve Şekil 4.26.B.b-b2).

A.



B.



Şekil.4.26. Scribble – N Kaderin çiftli immunfloresan, evre V tübüllerine ait 400X görüntüler. (Scribble; kırmızı-PE, N Kaderin; yeşil-FITC ve nükleuslar; mavi-DAPI) **A. a-a1-a2;** Kontrol grubu, **b-b1-b2;** Sham grubu, **c-c1-c2;** Varikozel grubuna ait görüntülerdir. **c-c1’de** Bazal membran ile bağlantısı tamamen ayrılmış epitel grupları kesikli dikdörtgenlerle; **c2’de**, epitelin tamamen döküldüğü bölgelerde bazal membranın yakınılarında gelişi güzel dağılan elongoid spermatidler (ok) **B.** kontrol ve varikozele ait aynı fotoğrafların yakınlaştırılmasıyla oluşturulmuştur. Kontrol grubunda (**a-a1-a2**) Bazal ektoplazmik özelleşme – KTB, parantez ile; Varikozel grubunda (**b-b1-b2**) dökülen epitelde polariteleri bozulmuş spermatidler beyaz ok (**b1**); Epitelin içerisine doğru dağılan N Kaderin ekspresyonları turuncu ok (**b2**) ile gösterildi. (Skala bar: 50 µm)

5. TARTIŞMA

Varikosel, erkek infertilitesinin en yaygın sebebi olarak tanımlanabilir (Damsgaard ve ark., 2016; Clavijo ve ark., 2017). Son yıllarda varikosel ile erkek infertilitesi arasındaki bağlantı hakkında, özellikle germ hücrelerinde oksidatif stres, apoptotoz gibi patomekanizmalara ilişkin birçok moleküler çalışmalar ortaya çıkarken, mekanizması hala tam olarak aydınlatılamamıştır (He ve ark., 2019). Çoğu çalışma genel hatlarıyla varikosele, “Vücuttaki antioksidanlar ve serbest oksijen radikalleri (SOR) arasındaki dengenin bozulmasıyla ortaya çıkan oksidatif stres, spermatozoalarda hasara yol açar, devamında infertiliteye sebep olabilir” şeklinde bir düşünceyle yaklaşmaktadır (K. Zhang ve ark., 2016; Foroozan-Broojeni ve ark., 2019). Diğer yandan germ hücreleri üzerindeki etkisine bakıldığında, varikoselle artan oksidatif stresin ve apoptozun spermatogenezde bozulmalara yol açtığı da bilinmektedir. Biz de bu çalışmamızda varikosel ile artan oksidatif stresin, Sertoli hücresinin ultrastrüktürü üzerinde sebep olduğu bozukluklara odaklanarak spermatogenez sürecindeki etkilerini inceledik.

Programlanmış hücre ölümü olan apoptoz, memelilerde, fizyolojik spermatogenez için gereklidir. Apoptozun, homeostazı koruyarak Sertoli ile germ hücreleri arasındaki dengeyi düzenlediği düşünülür (Said ve ark., 2004). Varikoselde apoptozun arttığını vurgulayan birçok çalışma bulunmaktadır (Simsek ve ark., 1998; Barqawi ve ark., 2004). ROS gibi birçok stres faktörünün apoptozu tetiklendiği bilinmektedir (Thompson, 1995).

Çalışmamızda öncelikle, uygulanan deneysel varikosel modeli sonucunda artan reaktif oksijen türleri ve apoptotik ortam hakkında bilgi vermesi açısından Aktif kaspaz-3 ve İNOS miktarları incelendi. Her iki belirtecin protein miktarlarında varikosel grubunda, kontrol ve sham gruplarına göre anlamlı bir artış görüldü. Varikosel grubunda artan aktif (cleaved) kaspaz-3 (Yoon, 2013; Zhao ve ark., 2019) ve İNOS (Santoro ve ark., 2001; Mazhari ve ark., 2018) daha önceki yapılan çalışmaların bulguları ile de uyumludur.

Aynı zamanda varikosel modelinin oluşturulmasından 13 hafta sonra, oluşturulan varikosel modelinin başarı durumu spermatik ven çapının ölçümü, epididimal sperm

motilite hesaplanması, sağ ve sol testis ağırlıklarına bakılarak analiz edildi. Varikosel grubunda, sol spermatik ven çapında anlamlı bir artış gözlenirken, testis ağırlıklarında bir fark gözlenmedi. Varikoselin önemli sonuçlarından olan epididimal sperm motilitesi gruplar arası karşılaştırıldığında varikoselli hayvanların motilitelerinde anlamlı bir düşüş gözlemlendi.

Memeli testisinde gelişen germ hücreleri, özellikle uzayan/uzamış spermatidler ve Sertoli hücreleri, kemirgenlerde ve insanlarda spermatogenezin seminifer epitelyal döngüsü boyunca dikkate değer hücre polaritesi sergiler (De Kretser ve Kerr, 1994; C. Cheng ve ark., 2015). Örneğin tüm uzayan spermatidlerin başları bazal membrana, kuyrukları ise tübül lümenine bakması ya da Sertoli hücrelerine ait çekirdeğin, Golgi aparatının, bazal ektoplazmik özelleşmelerin bazal membrana neredeyse bitişik olması (Clermont ve ark., 1987; De Kretser ve Kerr, 1994; Hermo ve ark., 2010; Gao ve Cheng, 2016) tesadüfi olmayıp tamamen spermatogenez sürecinin alt yapısını oluşturan mimarisel düzenlenimlerdir. Bu katı yerleşim, çok sayıda gelişmekte olan spermatik hücrelerin, fonksiyonel olarak sabit sayıda bulunan Sertoli hücre popülasyonu tarafından desteklenebilmesi açısından bir düzen sağlar (Sharpe ve ark., 2003; Hermo ve ark., 2010; Wen, Mruk, ve ark., 2018).

Testis dokusunun rutin Hematoksilen ve Eozin boyanması ile gerçekleştirilen morfolojik değerlendirmelerimize göre; kontrol grubuna ait seminifer tübül görüntüleri normal yapıda gözlenirken, varikosel grubuna ait testis dokusunda, Evre IX tübüllerde; bir önceki evrede lümeneye dökülmesi gerekirken dökülememiş uzamış spermatidler ve pignotik çekirdekli basamak 9 spermatidler gözlemlendi. Ayrıca bazal kompartmanlarda çok çekirdekli polimorfik dev hücreler de bulunmaktaydı. Evre VIII tübüllerde ise; fagozomların bazal kompartmana iletilmesi gerekirken epitelin farklı lokalizasyonlarda bulunduklarına rastlanıldı. Evre V seminifer tübülü ; Bazal laminaya 90 derecelik dik açıyla tutunamayan polaritelerini kaybetmiş elongoid spermatidler ve lokalizasyonları bozulmuş seminifer epitel hücreleri, lümeneye pul pul dökülen germ hücreleri, epitel içerisinde ayrılmalara gözlemlendi. Bunlar dışında tamamen epitel düzeninin bozulduğu ve bazal membrandan ayrılmalara olduğu birçok tübül dikkat çekti. Varikoselli tübüllerde görülen tüm bu bozukluklar (fagozomların taşınamaması, spermatidlerin bas/eksen

polaritelerinin kaybetmesi, germ hücrelerinin Sertoli hücrelerine tutunamayıp dökülmeleri vb.) polarizasyon eksikliğini işaret etmektedir. Bulgularımız, seminifer epiteldeki yapısal elemanların disfonksiyonu sonucuyla ortaya çıkan polarite bozukluklarını ifade eden daha önceki çalışmalarla uyumlu gözükmektedir (N. Li ve ark., 2015).

Seminifer tübül içerisinde birden çok hücrenin tüm bu sistematik ve dinamik organizasyondan sorumlu olan üç polarite kompleksinin ve iletişimde olduğu yapısal proteinlerin birlikte kusursuz bir şekilde çalışması spermatogenez açısından hayati önem taşımaktadır. Bu komplekslerin yanında ilk olarak 2016'da düzlemsel hücre proteinleri olarak adlandırılan Vangl2/Pk kompleksinin de, Sertoli ve spermatik hücrelerin polarizasyonundan sorumlu olduğu tanımlanmıştır (Chen ve ark., 2016).

Vangl2'nin in vivo olarak susturulması (Knockdown-KD) sonucunda, spermatidlerin düzlemsel hücre polaritelerinin bozulmasının yanı sıra mayoz süreçlerinde görülen bozulmalar da büyük ölçüde dikkat çekmiştir. Evre XIV tübüllerinde mayoz bölünmesi neredeyse %50 azaldığı gözlenmiştir. Özellikle germ hücrelerinin, lümene pul pul dökülmesi, spermatid-Sertoli tutulumunda önemli bozulmalar olduğunu ortaya koymuştur (Chen ve ark., 2016).

Çalışmamıza ait bulgulara, varikozel ile birlikte Vangl2'nin protein miktarında anlamlı bir azalış olduğu gözlemlendi. Bu azalma, varikozelde meydana gelen uzamış spermatidlerin baş-kuyruk eksenlerinin bozularak gelişigüzel hizalanmasını ve lümene zamansız dökülmelerini açıklar niteliktedir. Yapılan bir diğer çalışmada, Vangl2'nin susturulması (knock-down, KD) sonucunda düzlemsel hücre polaritesinin bozulmasıyla birlikte mikrotübül ve F aktin bazlı organizasyonunu bozarak spermatogenezde kusurlara yol açtığı gösterilmiştir (Chen ve ark., 2018).

Vangl2 ve F aktin ile yapmış olduğumuz çiftli immunfloresan boyanmada, kontrol ve sham dokularında hem apikal hem de bazal ektoplazmik özelleşmelerde birlikte lokalize olduklarını fakat varikozel gruplarında bu yapıların bozulduğu gözlemledik. Evre VIII'de spermatidlerin aktin tabanlı-apikal ektoplazmik özelleşmelerinin varikozel sonrası dağıldığı ve spermlerin polarizasyonlarını kaybettiği görüldü. Total testis

dokularından hazırlanan lizatların supernatantlarında yapılan western blot sonuçlarında F aktin miktarında değişiklik gözlenmedi. F aktinin, bir kit “Actin Spin-Down Assay “ yardımıyla kademeli çökeltme ile G aktinden ayrılarak ölçüldüğünde gruplar arası protein değişimi hakkında daha sağlıklı bilgi alınabilir.

Spermatogenez sırasında gelişen germ hücreleri, özellikle kendi başlarına hareketsiz hücreler olan post-mayotik spermatitler, spermiyogenez sırasında tüm seminifer epitel boyunca taşınmalıdır, böylece tamamen gelişmiş spermatidler (yani, spermatozoa) lümen kenarında sıralanır ve apikalde epitel döngüsünün VIII evresinde spermiyasyonda salınmaları için hazırlanır (R. A. Hess ve Renato de Franca, 2008; C. Y. Cheng ve Mruk, 2010b; O'Donnell ve ark., 2011). Germ hücreleri, epitel döngüsü sırasında seminifer epitel boyunca taşınabilmeleri için destek sağlamak üzere Sertoli hücrelerine, özellikle de Sertoli hücrelerindeki aktin ve mikrotübül (MT) bazlı hücre iskeletlerine güvenir (O'Donnell ve O'Bryan, 2014; Tang, Lee, ve ark., 2016; Tang, Mruk, ve ark., 2016; Wen ve ark., 2016). Varikosel de karşımız çıkan tabloda, F aktin'ın lokalizasyonlarının düzensizleştiğı hatta yer yer kaybolduğı gözükmemektedir. Sertoli hücresinin yapısını oluşturan temel proteinlerin başında gelen F aktinin gerek apikal EÖ'leri gerekse kan-testis bariyerini oluşturan bazal EÖ'leri destekleyememesi seminifer epitelde ciddi hasarlara neden olduğu açıktır (Wen, Li, ve ark., 2018) .

Spermatogenez açısından en büyük tehlikelerden biri de kan-testis bariyerinin bozulmasıdır. Bazal EÖ, spermatogenez için özel bir mikroçevresel ve bağışıklık bariyeri oluşturan ve evre VIII'de preleptoten ve leptoten spermatositlerin zamanında geçişine izin veren sıkı bağlantılarla (TJ'ler) ve boşluk bağlantılarıyla birleştirilmiş kan testis bariyerini (KTB) oluşturur (Chen ve ark., 2016). Vangl2'nin, KTB/bazal EÖ'de lokalize olduğu bilinmektedir. Özellikle epitel döngüsünün V-VI evrelerinde KTB'de bulunduğu ve hücre-hücre ara yüzünde TJ proteini olan ZO-1 ve bazal EÖ proteini N kaderinle ko-lokalize oldukları, 2016 yılında C.Yan Cheng ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Varikoselli dokularda lokalizasyonlarını karşılaştırdığımızda, kontrol ve sham kesitlerinde tek sıra halinde, tüm tübülde pakiten spermatidlerin altında, seyreden ZO-1 ve N kaderin ifadelerinin, yer yer azaldığı ve epitelin içlerine doğru dağılmalar şeklinde, spermatidlerin üzerinde lokalizasyonlar gösterdikleri dikkat çekti. Bunun

yanında protein miktarları değerlendirildiğinde, varikosel ile birlikte hem N kaderin hem de ZO-1'in seviyelerinde azalma gözlemlendi. Elde edilen bu veriler, kan-testis bariyerinin işlevini yitirdiğini açıkça ortaya koydu. Buna bağlı olarak germ hücrelerinin lümene döküldüğü ve seminifer epitelde ciddi bozulmalar olduğu gözlemlendi.

TJ'ler ve aktin bağımlı ektoplozmik özelleşmeler arasında sıkı bir fonksiyonel ve yapısal bağlantı bulunmaktadır, TJ dinamiklerinin efektörleri aynı zamanda doğrudan veya dolaylı bir şekilde hareket ederek ektoplazmik özelleşme dinamiklerinin (örneğin hormonlar ve sitokinler) modülatörleri olarak kabul edilir (L. Zhang ve ark., 2021). Hormonlara ve sitokinlere ek olarak nitrik oksidin (NO) son zamanlarda testiste bir TJ düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir. Testisteki NO/soluble Guanilat Siklaz/ cGMP/ Protein kinaz G sinyal yolu aracılığıyla TJ-integral membran proteini olan okludinin seviyesini azaltarak TJ bariyerinin açılmasını düzenlendiği bildirilmiştir. (16) Bununla birlikte, nitrik oksit/nitrik oksit sentazın (NO/NOS) testis de dahil olmak üzere birçok organda ve spermatogenezde epitel bariyer fonksiyonundaki önemli rolünü açıkça vurgulanmıştır (Lee ve Cheng, 2004). NO seviyesinin, ektoplazmik özelleşmelerin ve TJ proteinlerinin üzerindeki etkileri düşünüldüğünde yüksek seviyede NO artışı gözlemlenen varikoselli dokularda N kaderinin ve ZO-1'in seviyesinin azalmasını açıklamaktadır. 2021'de yapılan bir araştırmada, çalışmamızla uyumlu olarak, Ca^{+2} bağımlı N kaderinin protein seviyesinin varikosel ile azaldığı gösterilmiştir (L. Zhang ve ark., 2021).

Diğer yandan başka bir çalışmada ise varikosel gruplarında N kaderin'in mRNA seviyesinde azalış gözlenirken, ZO-1 seviyesinin artışı gösterilmiştir (Oh ve ark., 2016). Bizim çalışmamızda ise ZO-1'in protein miktarının varikosel gruplarında azaldığı yöndedir.

Bu çalışmada PAR, CRB ve Scribble bazlı protein modüllerini içeren polarite protein kompleksleri arasından kan-testis bariyeri üzerinde zıt etkileri olan PAR ve Scribble kompleksleri üzerine odaklandık. **PAR kompleksini** temsil etmesi adına PAR6 proteinini incelediğimizde tüm gruplarda evre VIII tubüllerde ekspresyonun neredeyse yok denilecek kadar azaldığını gördük. Buna karşın evre V tubüllerde ise ekspresyonun oldukça arttı. Özellikle kan-testis bariyeri ve basamak 17 spermatidin baş bölgelerinde belirgin bir lokalizasyon gösterdi. Bu bulgularımız literatürle de uyumaktaydı (Wong,

Mruk, Lee, ve ark., 2008; Wong ve Cheng, 2009). Evre V'ten VIII'e kadar olan süreçte apikal EÖ'de güçlü bir şekilde eksprese edilmesi epitel döngüsünün bu aşamalarında spermatid polaritesini sağlamak adına olabilir. Daha da önemlisi, PAR6'nın ekspresyonunun, evre VIII tübüllerinde hem apikal hem de bazal EÖ/KTB'de yok denecek kadar azalmasının, spermin salınması ve kan testis bariyerinin açılması anına denk gelmesi (Wong, Mruk, Lee, ve ark., 2008) PAR6'nın bu hücrel translokasyon olaylarının kolaylaştırabileceğini düşündürmektedir (L. Li ve ark., 2020).

Kontrol ve sham gruplarında evre V'te her iki özelleşmede de görülen lokalizasyonların varikozel gruplarında belirgin bir şekilde kaybolduğu gözlemlendi. Varikozel ile birlikte azalan PAR6 ifadesine rağmen protein miktarlarına bakıldığında gruplar arası anlamlı bir değişiklik görülmedi.

PAR6'nın özellikle bazal EÖ 'de TJ 'ların yakınında yer aldığı bilinmektedir. ZO-1 ile birlikte boyanmalarına baktığımızda PAR6'nın varikozel grubunda azalan ekspresyonlarının yanında epitel içerisindeki dökülmeler ve germ hücre kayıpları sebebiyle ZO-1'in lümen içerisinde de ifadelerine rastlanıldı. Aynı zamanda N kaderin boyanmalarında, neredeyse bazal kompartmanda ekspresyon gözlenmezken lümen içerisinde N kaderin ifadeleri gözlemlendi. Bu durum varikozelin, kan-testis elemanlarının ekspresyonlarının devam etmesine rağmen lokalizasyonlarındaki ciddi değişimler sebebiyle bariyerin, fonksiyonel görevini ortadan kaldırdığını açıkça ortaya koydu. **Diğer polarite kompleksi Scribble;** Scribble, Lgl2 ve Dlg1 proteinlerinden oluşmaktadır. Scribble aynı zamanda düzlemsel hücre polaritesi (PCP) proteinidir (Milgrom-Hoffman ve Humbert, 2018; Bonello ve Peifer, 2019) ve testiste Vangl2'ye bağlanır (L. Li ve ark., 2020) (Chen ve ark., 2016).

Çalışmamızda, Vangl2'de görüldüğü gibi; varikozelli dokularda Scribble'nın protein miktarında, anlamlı derecede azalma gözlemlendi. F aktinle birlikte evre VIII tübüllerde hem uzamış spermatidlerde lokalize olurken hem de kan-testis bariyerinde lokalizasyon gösterdiği gözlemlendi. Varikozelde lokalizasyonların bozulmasıyla beraber lümene dökülen hücreler ve polaritelerini kaybetmiş spermatidler görüldü.

Evre V tübüllerde kontrol ve sham gruplarında özellikle kan-testis bariyerinde daha belirgin Scribble - Faktin ifadesi gözlenirken varikozel gruplarında ekspresyonun azalmasına ile birlikte bazal membrandan kopmuş epitel grupları oldukça fazla sayıdaydı. Vezikül trafiğinde görev aldığı bilinen Scribble'ın ifadesi kontrolde, uzayan spermatid başlarında gözlenirken varikozelde yerini lümen içerisinde noktalar şeklinde ekspresyonlara bıraktığı gözlemlendi.

Scribble'ın ZO-1 ve N kaderin ile birlikte lokalizasyonları incelendiğinde, kontrol ve sham dokularında bazal kompartmanda birlikte lokalize olurken; varikozelde kan testis elemanlarına ait ekspresyonların epitel içlerine dağıldığını veya lümene doğru uzandığını görülmektedir. Epitel yüksekliklerinde eşitsizlik olan ve belirli bölgelerde epitelin bazal membrandan tamamen koptuğu tübüllerin varlığı dikkat çekti.

Tüm bu bulguların yanında literatür, testiste bulunan polarite komplekslerinden PAR ve CRB polarite kompleksleri birlikte kan-testis bariyerini destekleyici yönde çalışırken, Vangl2'nin ve Scribble protein kompleksi tam tersi yönde çalışmakta olduğunu vurguluyor (Wong, Mruk, Lee, ve ark., 2008; W. Su, Wong, ve ark., 2012; Chen ve ark., 2016; Gao ve ark., 2016; L. Li ve ark., 2020). Bu çalışmalar biri; Sertoli hücrelerinde Vangl2'nin RNAi tarafından susturulması ile, bazal EÖ/KTB proteini N-cadherin ve TJ proteinleri claudin 11 ve ZO-1'in Sertoli hücre-hücre arayüzüne TJ fonksiyonunu arttırdığı in vivo ve in vitro koşullarda gösterdi (Chen ve ark., 2016). Diğer bir in vitro çalışmada; Scribble/ Lgl2/ Dlg1 gen üçlüsünün birlikte susturulması (triple knock-down) işleminin oluşturulduğu bir modelde, Sertoli hücresinin, TJ temelli bariyer fonksiyonunu daha da sıkı hale getirerek kan testis bariyerini desteklediği gözlenmiştir (W. Su, Wong, ve ark., 2012).

Bizim çalışmamızda, Vangl2 ve Scribble'ın azalmasına rağmen N kaderin ve ZO-1 ifadelerinde artış gözlenmedi. Aksine ciddi bir azalma ve lokalizasyonlarda dağılmalar gözlemlendi. Buradaki farklılığın hipoksik ve apoptotik bir mikroçevreye sebebiyet veren varikozel modelimizden kaynaklandığını düşünüyoruz. Her ne kadar fizyolojik koşullarda azalan Vangl2 ve Scribble 'ın EÖ/KTB elemanlarını güçlendirmesini beklense de NO'in, TJ'nin önemli bir regülatörü olarak, kan-testis bariyerini yıkımı yönünde çalışacaktır. Varikozelde total antioksidanlar (TAC) tarafından dengede

tutulamayan NO'nun toksik artışı kan-tetsis bariyeri elemanlarının yıkımı konusunda daha baskın gelmiş olabilir. Diğer yandan varikozel sonucu ektooplomik özelleşmelerde meydana gelen bu tahribata karşı koyabilmek adına Sertoli hücresi, TJ proteinlerindeki bağlantıyı arttırmak için polarite proteinlerini devreye sokmuş olabilir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, varikosel, testislerde ektoplazmik özelleşmelerin yapı ve fonksiyonunun bozulmasına neden olduğu belirlendi. Bulgularımız, fizyolojik olarak kontrol edilemeyecek kadar artan NO seviyelerinin, polarite proteinleri; Vangl2, Par 6 ve Scribble ile ilişkili adezyon moleküllerinin iletişimde hakimiyet kurduğunu düşündürmektedir. Bu durum hem apikal ektoplazmik özelleşmelerde F Aktin ile birlikte spermiyasyon mekanizmasında aksamalar olarak, hem de bazal ektoplazmik özelleşmelerde ZO-1 ve N Kaderin ile birlikte kan-testis bariyerinde fonksiyonel ve yapısal bozulmalar şeklinde kendini göstermektedir. Bu açıdan tez çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular, varikoselin erkek infertilitesi üzerindeki patolojik mekanizmalarını anlamak ve yeni terapötik hedefler belirlemek için önemli kanıtlar sunmaktadır.

Bununla birlikte, Sertoli hücrelerinin karmaşık yapısı ve işlevi, varikoselin birden çok etiyolojiye sahip olması ve ayrıca tüm sonuçların *in vivo* çalışmadan elde edilmiş olması gibi çalışmaya ait sınırlamaların olması sebebiyle, yapısal ve miktar olarak değişim gösteren polarite proteinlerinin varikosel infertilitesi ile doğrudan ilişkili olup olmadığı konusu hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Kesin mekanizmayı doğrulamak, patolojiye ait diğer indükleyicileri değerlendirmek ve bu hipotezleri araştırmak için ileri moleküler teknikler kullanılarak, hem *in vitro* hem de *in vivo* deneyler içeren gelecek çalışmalara gereksinim bulunmaktadır.

7. KAYNAKLAR

- Agarwal, A., & Said, T. M. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: A clinical approach. *BJU international*. 2005; 95 (4): 503-507.
- Ahmet Karakeçi , İ. O. Pathophysiology of varicocele. 2019.
- Albano Nogueira, G. A. K., Maciel Junior, V. L., Minas, A., & Antoniassi, M. P. Characterization of varicocele-induced animal models: Potential role of inflammasome complex in the varicocele pathophysiology. *J Reprod Immunol*. 2022; 149: 103442.
- Amann, R. P., & Howards, S. S. Daily spermatozoal production and epididymal spermatozoal reserves of the human male. *J Urol*. 1980; 124 (2): 211-215.
- Assemat, E., Bazellieres, E., Pallesi-Pocachard, E., Le Bivic, A., & Massey-Harroche, D. Polarity complex proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1778 (3): 614-630.
- Auharek, S. A., Avelar, G. F., Lara, N. L., Sharpe, R. M., & Franca, L. R. Sertoli cell numbers and spermatogenic efficiency are increased in inducible nitric oxide synthase mutant mice. *Int J Androl*. 2011; 34 (6 Pt 2): e621-629.
- Bailly, E., Walton, A., & Borg, J. P. The planar cell polarity vangl2 protein: From genetics to cellular and molecular functions. *Semin Cell Dev Biol*. 2018; 81: 62-70.
- Barqawi, A., Caruso, A., & Meacham, R. B. Experimental varicocele induces testicular germ cell apoptosis in the rat. *J Urol*. 2004; 171 (1): 501-503.
- Bartles, J. R., Wierda, A., & Zheng, L. Identification and characterization of espin, an actin-binding protein localized to the f-actin-rich junctional plaques of sertoli cell ectoplasmic specializations. *Journal of cell science*. 1996; 109 (Pt 6): 1229-1239.
- Berndtson, W. E., & Thompson, T. L. Changing relationships between testis size, sertoli cell number and spermatogenesis in sprague-dawley rats. *J Androl*. 1990; 11 (5): 429-435.
- Bonello, T. T., & Peifer, M. Scribble: A master scaffold in polarity, adhesion, synaptogenesis, and proliferation. *J Cell Biol*. 2019; 218 (3): 742-756.
- Celik-Ozenci, C., Tasatargil, A., Tekcan, M., Sati, L., Gungor, E., Isbir, M., & Demir, R. Effects of abamectin exposure on male fertility in rats: Potential role of oxidative stress-mediated poly(adp-ribose) polymerase (parp) activation. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*. 2011; 61 (3): 310-317.
- Chen, H., Mruk, D. D., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. Planar cell polarity (pcp) protein vangl2 regulates ectoplasmic specialization dynamics via its effects on actin microfilaments in the testes of male rats. *Endocrinology*. 2016; 157 (5): 2140-2159.
- Chen, H., Xiao, X., Lui, W. Y., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. Vangl2 regulates spermatid planar cell polarity through microtubule (mt)-based cytoskeleton in the rat testis. *Cell Death Dis*. 2018; 9 (3): 340.
- Cheng, C., Mruk, D., & Griswold, M. Sertoli cell biology. 2015.
- Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev*. 2002; 82 (4): 825-874.

- Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. The biology of spermatogenesis: The past, present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2010a; 365 (1546): 1459-1463.
- Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. A local autocrine axis in the testes that regulates spermatogenesis. *Nat Rev Endocrinol.* 2010b; 6 (7): 380-395.
- Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2015). Biochemistry of sertoli cell/germ cell junctions, germ cell transport, and spermiation in the seminiferous epithelium. In *Sertoli cell biology* (pp. 333-383): Elsevier.
- Cheng, C. Y., & Sun, F. Molecular mechanisms in spermatogenesis (Vol. 636): Springer; 2008, p:
- Cheng, C. Y., Wong, E. W., Lie, P. P., Li, M. W., Mruk, D. D., Yan, H. H., . . . Silvestrini, B. Regulation of blood-testis barrier dynamics by desmosome, gap junction, hemidesmosome and polarity proteins: An unexpected turn of events. *Spermatogenesis.* 2011; 1 (2): 105-115.
- Cho, C. L., Esteves, S. C., & Agarwal, A. Novel insights into the pathophysiology of varicocele and its association with reactive oxygen species and sperm DNA fragmentation. *Asian journal of andrology.* 2016; 18 (2): 186-193.
- Clavijo, R. I., Carrasquillo, R., & Ramasamy, R. Varicoceles: Prevalence and pathogenesis in adult men. *Fertility and sterility.* 2017; 108 (3): 364-369.
- Clermont, Y., Morales, C., & Hermo, L. Endocytic activities of sertoli cells in the rat. *Ann N Y Acad Sci.* 1987; 513: 1-15.
- Creasy, D. M., & Chapin, R. E. (2013). Chapter 59 - male reproductive system. In W. M. Haschek, C. G. Rousseaux, & M. A. Wallig (Eds.), *Haschek and rousseaux's handbook of toxicologic pathology (third edition)* (pp. 2493-2598). Boston: Academic Press.
- Damsgaard, J., Joensen, U. N., Carlsen, E., Erenpreiss, J., Blomberg Jensen, M., Matulevicius, V., . . . Jorgensen, N. Varicocele is associated with impaired semen quality and reproductive hormone levels: A study of 7035 healthy young men from six european countries. *Eur Urol.* 2016; 70 (6): 1019-1029.
- De Kretser, D., & Kerr, J. The physiology of reproduction. Knobil, E. 1994: 837-932.
- Doshi, S. B., Khullar, K., Sharma, R. K., & Agarwal, A. Role of reactive nitrogen species in male infertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 2012; 10: 109.
- Dunleavy, J. E. M., O'Bryan, M. K., Stanton, P. G., & O'Donnell, L. The cytoskeleton in spermatogenesis. *Reproduction.* 2019; 157 (2): R53-R72.
- Foroozan-Broojeni, S., Tavalae, M., Lockshin, R. A., Zakeri, Z., Abbasi, H., & Nasr-Esfahani, M. H. Comparison of main molecular markers involved in autophagy and apoptosis pathways between spermatozoa of infertile men with varicocele and fertile individuals. *Andrologia.* 2019; 51 (2): e13177.
- Gao, Y., & Cheng, C. Y. Does cell polarity matter during spermatogenesis? *Spermatogenesis.* 2016; 6 (2): e1218408.
- Gao, Y., Lui, W. Y., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. Polarity protein crumbs homolog-3 (crb3) regulates ectoplasmic specialization dynamics through its action on f-actin organization in sertoli cells. *Sci Rep.* 2016; 6: 28589.
- Gissen, P., & Arias, I. M. Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. *J Hepatol.* 2015; 63 (4): 1023-1037.
- Griswold, M. D. 50 years of spermatogenesis: Sertoli cells and their interactions with germ cells. *Biology of Reproduction.* 2018; 99 (1): 87-100.

- Ha, H. K., Park, H. J., & Park, N. C. Expression of e-cadherin and alpha-catenin in a varicocele-induced infertility rat model. *Asian journal of andrology*. 2011; 13 (3): 470-475.
- Haschek, W. M. Haschek and rousseaux's handbook of toxicologic pathology (3rd ed. ed.). Amsterdam ;: Elsevier/AP; 2013, p:
- Hassanin, A. M., Ahmed, H. H., & Kaddah, A. N. A global view of the pathophysiology of varicocele. *Andrology*. 2018; 6 (5): 654-661.
- He, Q. Q., Wu, X., Liu, X. P., Yang, X. J., Yuan, Z. M., & Zhang, Y. 14-3-3 epsilon plays an important role in testicular germ cell apoptosis: A functional proteomic study of experimental varicocele. *Andrologia*. 2019; 51 (6): e13275.
- Hermo, L., Pelletier, R. M., Cyr, D. G., & Smith, C. E. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: Background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. *Microscopy research and technique*. 2010; 73 (4): 241-278.
- Hess, R. (1998). Spermatogenesis, overview. In (Vol. 4, pp. 539-545).
- Hess, R. A., & França, L. R. Structure of the sertoli cell. *Sertoli cell biology*. 2005; 40.
- Hess, R. A., & Renato de Franca, L. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Adv Exp Med Biol*. 2008; 636: 1-15.
- Holstein, A. F., Schulze, W., & Davidoff, M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003; 1: 107.
- Iden, S., & Collard, J. G. Crosstalk between small gtpases and polarity proteins in cell polarization. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9 (11): 846-859.
- Jensen, C. F. S., Ostergren, P., Dupree, J. M., Ohl, D. A., Sonksen, J., & Fode, M. Varicocele and male infertility. *Nat Rev Urol*. 2017; 14 (9): 523-533.
- Johnson, L., Petty, C. S., & Neaves, W. B. A comparative study of daily sperm production and testicular composition in humans and rats. *Biol Reprod*. 1980; 22 (5): 1233-1243.
- Johnson, L., Zane, R. S., Petty, C. S., & Neaves, W. B. Quantification of the human sertoli cell population: Its distribution, relation to germ cell numbers, and age-related decline. *Biol Reprod*. 1984; 31 (4): 785-795.
- Kierszenbaum, A. L. Histoloji ve hücre biyolojisi: Patolojiye giriş: Palme Yayıncılık; 2006, p:
- Leblond, C. P., & Clermont, Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci*. 1952; 55 (4): 548-573.
- Lee, N. P., & Cheng, C. Y. Regulation of sertoli cell tight junction dynamics in the rat testis via the nitric oxide synthase/soluble guanylate cyclase/3',5'-cyclic guanosine monophosphate/protein kinase g signaling pathway: An in vitro study. *Endocrinology*. 2003; 144 (7): 3114-3129.
- Lee, N. P., & Cheng, C. Y. Nitric oxide/nitric oxide synthase, spermatogenesis, and tight junction dynamics. *Biol Reprod*. 2004; 70 (2): 267-276.
- Lee, N. P., & Cheng, C. Y. Nitric oxide and cyclic nucleotides: Their roles in junction dynamics and spermatogenesis. *Adv Exp Med Biol*. 2008; 636: 172-185.
- Leslie, S. W., Sajjad, H., & Siref, L. E. (2022). Varicocele. In *Statpearls*. Treasure Island (FL).
- Li, L., Li, H., Wang, L., Wu, S., Lv, L., Tahir, A., . . . Cheng, C. Y. Role of cell polarity and planar cell polarity (pcp) proteins in spermatogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2020; 55 (1): 71-87.

- Li, N., Mruk, D. D., Wong, C. K., Lee, W. M., Han, D., & Cheng, C. Y. Actin-bundling protein plastin 3 is a regulator of ectoplasmic specialization dynamics during spermatogenesis in the rat testis. *FASEB J.* 2015; 29 (9): 3788-3805.
- Liguori, G., Ollandini, G., Napoli, R., Mazzon, G., Petrovic, M., & Trombetta, C. (2011). Anatomy of the scrotum. In (pp. 27-34).
- Lin, W. H., Asmann, Y. W., & Anastasiadis, P. Z. Expression of polarity genes in human cancer. *Cancer Inform.* 2015; 14 (Suppl 3): 15-28.
- Mazhari, S., Razi, M., & Sadrkhanlou, R. Silymarin and celecoxib ameliorate experimental varicocele-induced pathogenesis: Evidences for oxidative stress and inflammation inhibition. *Int Urol Nephrol.* 2018; 50 (6): 1039-1052.
- Mescher, A. L. (2018). Author. In *Junqueira's basic histology: Text and atlas, 15e*. New York, NY: McGraw-Hill Education.
- Milgrom-Hoffman, M., & Humbert, P. O. Regulation of cellular and pcp signalling by the scribble polarity module. *Semin Cell Dev Biol.* 2018; 81: 33-45.
- Nieschlag, E., Behre, H. M., & Nieschlag, S. *Andrology: Male reproductive health and dysfunction*: Springer Berlin Heidelberg; 2010, p:
- Noske, H. D., & Weidner, W. Varicocele--a historical perspective. *World J Urol.* 1999; 17 (3): 151-157.
- O'Donnell, L., McLachlan, R. I., Wreford, N. G., de Kretser, D. M., & Robertson, D. M. Testosterone withdrawal promotes stage-specific detachment of round spermatids from the rat seminiferous epithelium. *Biol Reprod.* 1996; 55 (4): 895-901.
- O'Donnell, L., McLachlan, R. I., Wreford, N. G., & Robertson, D. M. Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages vii and viii of the rat spermatogenic cycle. *Endocrinology.* 1994; 135 (6): 2608-2614.
- O'Donnell, L., Nicholls, P. K., O'Bryan, M. K., McLachlan, R. I., & Stanton, P. G. Spermiation: The process of sperm release. *Spermatogenesis.* 2011; 1 (1): 14-35.
- O'Donnell, L., & O'Bryan, M. K. Microtubules and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2014; 30: 45-54.
- O'Donnell, L., Stanton, P. G., Bartles, J. R., & Robertson, D. M. Sertoli cell ectoplasmic specializations in the seminiferous epithelium of the testosterone-suppressed adult rat. *Biol Reprod.* 2000; 63 (1): 99-108.
- Oh, Y. S., Jo, N. H., Park, J. K., & Gye, M. C. Changes in inflammatory cytokines accompany deregulation of claudin-11, resulting in inter-sertoli tight junctions in varicocele rat testes. *J Urol.* 2016; 196 (4): 1303-1312.
- Paick, S., & Choi, W. S. Varicocele and testicular pain: A review. *The world journal of men's health.* 2019; 37 (1): 4-11.
- Parvinen, M. Regulation of the seminiferous epithelium. *Endocr Rev.* 1982; 3 (4): 404-417.
- Peterson, A. C., Lance, R. S., & Ruiz, H. E. Outcomes of varicocele ligation done for pain. *J Urol.* 1998; 159 (5): 1565-1567.
- Ross, M. H., Kaye, G. I., & Pawlina, W. *Histology: A text and atlas with cell and molecular biology*: Lippincott Williams & Wilkins; 2002, p:
- Russell, L. Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *Am J Anat.* 1977; 148 (3): 313-328.
- Sahin, Z., Bayram, Z., Celik-Ozenci, C., Akkoyunlu, G., Seval, Y., Erdogru, T., . . . Demir, R. Effect of experimental varicocele on the expressions of notch 1, 2, and

- 3 in rat testes: An immunohistochemical study. *Fertility and sterility*. 2005; 83 (1): 86-94.
- Said, T. M., Paasch, U., Glander, H. J., & Agarwal, A. Role of caspases in male infertility. *Hum Reprod Update*. 2004; 10 (1): 39-51.
- Saleh, R. A., Agarwal, A., Sharma, R. K., Said, T. M., Sikka, S. C., & Thomas, A. J., Jr. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertility and sterility*. 2003; 80 (6): 1431-1436.
- Santoro, G., Romeo, C., Impellizzeri, P., Ientile, R., Cutroneo, G., Trimarchi, F., . . . Gentile, C. Nitric oxide synthase patterns in normal and varicocele testis in adolescents. *BJU international*. 2001; 88 (9): 967-973.
- Sharpe, R. M., McKinnell, C., Kivlin, C., & Fisher, J. S. Proliferation and functional maturation of sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*. 2003; 125 (6): 769-784.
- Simsek, F., Turkeri, L., Cevik, I., Bircan, K., & Akdas, A. Role of apoptosis in testicular tissue damage caused by varicocele. *Arch Esp Urol*. 1998; 51 (9): 947-950.
- Skinner, M. K., & Griswold, M. D. *Sertoli cell biology*: Elsevier; 2004, p:
- Smith, L. B., Milne, L., Nelson, N., Eddie, S., Brown, P., Atanassova, N., . . . Peters, J. Katnall regulation of sertoli cell microtubule dynamics is essential for spermiogenesis and male fertility. *PLoS genetics*. 2012; 8 (5): e1002697.
- Su, W., Wong, E. W., Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. The scribble/lgl/dlg polarity protein complex is a regulator of blood-testis barrier dynamics and spermatid polarity during spermatogenesis. *Endocrinology*. 2012; 153 (12): 6041-6053.
- Su, W. H., Mruk, D. D., Wong, E. W., Lui, W. Y., & Cheng, C. Y. Polarity protein complex scribble/lgl/dlg and epithelial cell barriers. *Adv Exp Med Biol*. 2012; 763: 149-170.
- Suede, S. H., Malik, A., & Sapra, A. (2022). Histology, spermatogenesis. In *Statpearls*. Treasure Island (FL).
- Tang, E. I., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. Coordination of actin- and microtubule-based cytoskeletons supports transport of spermatids and residual bodies/phagosomes during spermatogenesis in the rat testis. *Endocrinology*. 2016; 157 (4): 1644-1659.
- Tang, E. I., Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. Regulation of microtubule (mt)-based cytoskeleton in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2016; 59: 35-45.
- Thompson, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995; 267 (5203): 1456-1462.
- Toyama, Y., Hosoi, I., Ichikawa, S., Maruoka, M., Yashiro, E., Ito, H., & Yuasa, S. Beta-estradiol 3-benzoate affects spermatogenesis in the adult mouse. *Molecular and cellular endocrinology*. 2001; 178 (1-2): 161-168.
- Vogl, A., Vaid, K., Guttman, J., & Cheng, C. *Molecular mechanisms in spermatogenesis*. Springer. 2008.
- Vogl, A. W., Du, M., Wang, X. Y., & Young, J. S. Novel clathrin/actin-based endocytic machinery associated with junction turnover in the seminiferous epithelium. *Semin Cell Dev Biol*. 2014; 30: 55-64.
- Vogl, A. W., Vaid, K. S., & Guttman, J. A. The sertoli cell cytoskeleton. *Adv Exp Med Biol*. 2008; 636: 186-211.

- Vogl, A. W., Vaid, K. S., & Guttman, J. A. The sertoli cell cytoskeleton. *Molecular mechanisms in spermatogenesis*. 2009: 186-211.
- Wang, K., Gao, Y., Wang, C., Liang, M., Liao, Y., & Hu, K. Role of oxidative stress in varicocele. *Front Genet*. 2022; 13: 850114.
- Wang, Z. X., Wreford, N. G., & De Kretser, D. M. Determination of sertoli cell numbers in the developing rat testis by stereological methods. *Int J Androl*. 1989; 12 (1): 58-64.
- Weber, J. E., Russell, L. D., Wong, V., & Peterson, R. N. Three-dimensional reconstruction of a rat stage v sertoli cell: Ii. Morphometry of sertoli--sertoli and sertoli--germ-cell relationships. *Am J Anat*. 1983; 167 (2): 163-179.
- Wen, Q., Li, N., Xiao, X., Lui, W. Y., Chu, D. S., Wong, C. K. C., . . . Cheng, C. Y. Actin nucleator spire 1 is a regulator of ectoplasmic specialization in the testis. *Cell Death Dis*. 2018; 9 (2): 208.
- Wen, Q., Mruk, D., Tang, E. I., Wong, C. K. C., Lui, W. Y., Lee, W. M., . . . Cheng, C. Y. Cell polarity and cytoskeletons-lesson from the testis. *Semin Cell Dev Biol*. 2018; 81: 21-32.
- Wen, Q., Tang, E. I., Xiao, X., Gao, Y., Chu, D. S., Mruk, D. D., . . . Cheng, C. Y. Transport of germ cells across the seminiferous epithelium during spermatogenesis-the involvement of both actin- and microtubule-based cytoskeletons. *Tissue Barriers*. 2016; 4 (4): e1265042.
- Wing, T. Y., & Christensen, A. K. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *Am J Anat*. 1982; 165 (1): 13-25.
- Wong, E. W., & Cheng, C. Y. Polarity proteins and cell-cell interactions in the testis. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2009; 278: 309-353.
- Wong, E. W., Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. Biology and regulation of ectoplasmic specialization, an atypical adherens junction type, in the testis. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1778 (3): 692-708.
- Wong, E. W., Mruk, D. D., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. Par3/par6 polarity complex coordinates apical ectoplasmic specialization and blood-testis barrier restructuring during spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008; 105 (28): 9657-9662.
- Xiao, X., Mruk, D. D., Wong, C. K., & Cheng, C. Y. Germ cell transport across the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Physiology (Bethesda)*. 2014; 29 (4): 286-298.
- Yan, H. H., & Cheng, C. Y. Blood-testis barrier dynamics are regulated by an engagement/disengagement mechanism between tight and adherens junctions via peripheral adaptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005; 102 (33): 11722-11727.
- Yeaman, C., Grindstaff, K. K., & Nelson, W. J. New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity. *Physiol Rev*. 1999; 79 (1): 73-98.
- Yoon, S. P. Apurinic/aprimidinic endonuclease immunoreactivity in germ cells of experimental varicocele-induced rat testes. *Acta Histochem*. 2013; 115 (8): 887-892.
- Young, J. S., De Asis, M., Guttman, J., & Vogl, A. W. Cortactin depletion results in short tubulobulbar complexes and spermiation failure in rat testes. *Biol Open*. 2012; 1 (11): 1069-1077.

- Zhang, K., Wang, Z., Wang, H., Fu, Q., Zhang, H., & Cao, Q. Hypoxia-induced apoptosis and mechanism of epididymal dysfunction in rats with left-side varicocele. *Andrologia*. 2016; 48 (3): 318-324.
- Zhang, L., Zhao, X., & Wang, W. Disruption of anchoring junctions in the testes of experimental varicocele rats. *Exp Ther Med*. 2021; 22 (2): 887.
- Zhao, W., Liu, J., Wang, D., Wang, Y., Zhang, F., Jin, G., . . . Qin, Q. Effect of silencing hif-1alpha gene on testicle spermatogenesis function in varicocele rats. *Cell Tissue Res*. 2019; 378 (3): 543-554.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Simla Su	Uyruğu	T.C.
Soyadı	Akkan	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise		
Lisans		
Yüksek Lisans	-	-
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce		

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)

Burslar-Ödüller:

Yayınlar :

Bildiriler:

Ulusal/Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceeding) basılan bildiriler