



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**KRONİK STRESİN FARE KAN-TESTİS BARIYERİ PROTEİN
YAPISI VE GEÇİRGENLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

BİRCAN KOLBAŞI

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. İLKNUR KESKİN

İSTANBUL- 2019

TEŞEKKÜR

Tüm doktora eğitimim boyunca tecrübelerini, bilgi birikimini ve desteğini benden esirgemeyen, öğrencisi ve asistanı olmaktan gurur duyduğum danışman hocam Doç. Dr. İlknur Keskin'e teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Eğitim ve tez hayatım boyunca deneyim ve bilgi birikimlerini benden esirgemeyen Prof. Dr. Tangül Müdok'a ve Dr. Öğr. Üyesi Seda Karabulut'a teşekkür ederim.

REMER bünyesinde sunduğu imkanlardan dolayı Prof. Dr. Gürkan Öztürk ve Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç'a, yardımlarını ve arkadaşlığını her zaman hissettiğim Kaan Alkan'a, ayrıca tecrübelerini paylaşan tüm REMER ekibine,

Tez çalışmam boyunca desteklerini her zaman yanımda hissettiğim Dok. Öğr. Volkan Bülbül'e, Dr. Mehmet Şerif Aydın'a, Arş. Gör. Olgü Enis Tok'a, Öğr. Gör. Dr. Hilal Eren Gözel'e, Yük. Lis. Öğr. Ceren Erdem Altun'a, Arş. Gör. Oya Korkmaz'a, Arş. Gör. Duygu Gürsoy'a ve bölümdeki diğer tüm yüksek lisans ve doktora öğrencilerine ve Dr. Öğr. Üyesi Nilüfer Ulaş'a,

Tez çalışmam için MEDİTAM imkanlarını sunan Ekrem Musa Özdemir ve tüm MEDİTAM ekibine,

Deney sürecindeki yardımlarından dolayı Dok. Öğr. Çağrı Çakıcı'ya, Dok. Öğr. Serdar Altunay ve Dr. Öğr. Üyesi Gözde Ülfer'e teşekkür ederim.

Akademik hayatın bana kazandırdığı en değerli insanlardan biri olan Dr. Fulya Alkan'a, tüm hayatım boyunca desteklerini, sevgilerini her zaman hissettiğim, annem Özcan Kolbaşı, babam Mehmet Ali Kolbaşı ve hayattaki en büyük desteğim, kardeşlerim Cansu ve Şirin'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No.

| | |
|---|------|
| TEZ ONAYI | i |
| BEYAN | ii |
| TEŞEKKÜR | iii |
| KISALTMALAR LİSTESİ | vii |
| ŞEKİLLER LİSTESİ | viii |
| TABLolar LİSTESİ | ix |
| RESİMLER LİSTESİ | x |
| 1. ÖZET | 1 |
| 2. ABSTRACT | 2 |
| 3. GİRİŞ VE AMAÇ | 3 |
| 4. GENEL BİLGİLER | 5 |
| 4.1. Stres | 5 |
| 4.2. Stresin Patofizyolojisi | 7 |
| 4.3. Stresin Erkek Üreme Sistemi Üzerine Etkileri | 9 |
| 4.4. Testis Histolojisi | 9 |
| 4.5. Kan-Testis Bariyeri | 12 |
| 4.6. Spermatogenez | 16 |
| 5. MATERYAL VE METOT | 18 |
| 5.1. Deney Hayvanları | 18 |
| 5.1.1. Deney Grupları | 18 |
| 5.1.1.1. Unpredictable Kronik Stres (UKS) Modeli | 19 |
| 5.2. Davranış Deneyleri | 23 |
| 5.2.1. Açık Alan Testi | 23 |
| 5.2.2. Yükseltilmiş-O-Labirent Testi | 24 |
| 5.2.3. Kuyruktan Asma | 24 |

| | |
|--|-----------|
| 5.3. Işık Mikroskopik Preparasyon ve Histolojik Skorlama | 25 |
| 5.4. Biyokimyasal Analizler | 26 |
| 5.4.1. Malondialdehit (MDA) Tayini | 26 |
| 5.4.2. Hormon Ölçümleri | 27 |
| 5.5. Sperm Fonksiyon Testleri | 27 |
| 5.5.1. Sperm Konsantrasyonu | 28 |
| 5.5.2. Toplam Motilite ve Progresif Motilite | 28 |
| 5.5.3. Sperm Morfoloji Analizi | 28 |
| 5.5.4. Kromatin Bütünlüğü Analizi | 29 |
| 5.5.5. Akrozomal Reaksiyon Analizleri | 29 |
| 5.5.6. Akrozomal bozukluk Analizi | 30 |
| 5.6. Western- Blot Protein Analizleri | 30 |
| 5.7. İmmünfloresan Analizleri | 31 |
| 5.8. Elektron Mikroskop Analizleri | 32 |
| 5.9. İstatistiksel Analiz | 32 |
| 6. BULGULAR | 33 |
| 6.1. Davranış Deneyleri | 33 |
| 6.1.1. Açık Alan Testi | 33 |
| 6.1.2. Yükseltilmiş-O-Labirent Testi | 34 |
| 6.1.3. Kuyruktan Asma | 35 |
| 6.2. Histopatolojik Skorlama | 35 |
| 6.3. Biyokimyasal Analizler | 38 |
| 6.3.1. MDA Tayini | 38 |
| 6.3.2. Serum Hormon Ölçümleri | 38 |
| 6.4. Sperm Fonksiyon Testleri | 39 |
| 6.4.1. Sperm Konsantrasyonu | 40 |
| 6.4.2. Toplam Motilite ve Progresif Motilite | 40 |
| 6.4.3. Sperm Morfoloji Analizi | 41 |
| 6.4.4. Kromatin Bütünlüğü Analizi | 41 |
| 6.4.5. Akrozomal Reaksiyon Analizi | 41 |
| 6.4.6. Akrozomal Bozukluk Analizi | 42 |
| 6.5.7. Diğer Sperm Parametreleri | 42 |

| | |
|--|-----------|
| 6.5. Western-Blot Analizleri | 43 |
| 6.5.1. ZO-1, Klaudin-11 ve Klatrin Proteinleri Analizi | 43 |
| 6.6. İmmünfloresan Analizleri | 45 |
| 6.7. Elektron Mikroskop Analizleri | 46 |
| 7. TARTIŞMA VE SONUÇ | 48 |
| 8. KAYNAKLAR | 57 |
| 9. ETİK KURUL ONAYI | 64 |
| 10. ÖZGEÇMİŞ | 65 |



KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

| | |
|----------|--|
| DSÖ | Dünya Sağlık Örgütü |
| KTB | Kan Testis Bariyeri |
| UKS | Unpredictable Kronik Stres |
| KBB | Kan Beyin Bariyeri |
| HPA | Hipotalamo-Hipofizer-Adrenal |
| KMS | Kronik Mild Stres |
| AMH | Anti-Müllerian Hormon |
| E2 | Estradiol |
| GnRH | Gonadotropin Salıcı Hormon |
| LH | Luteinizan Hormon |
| ZO-1 | Zonula Okludens-1 |
| FITC-PNA | Fluorescein isothiocyanate – Peanut Agglutinin |
| BSA | Bovin Serum Albumin |
| DAPI | 4,6-diamidino-2-fenilindol |
| SOD | Süperoksit dismutaz |
| StAR | Stereoidojenik akut-düzenleyici |
| PVN | Paraventriküler nukleus |
| KSF | Kortikotropin salgılatıcı faktör |
| ACTH | Adrenokortikotropik hormon |
| ASA | Antisperm antikoru |
| MDA | Malondialdehit |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | | |
|-------------------------|---|----|
| Şekil 4.1.1. | Gallup Raporu 2018 verileri..... | 7 |
| Şekil 4.4.1. | Testis yapısı. Testis bölmeleri ve iletim kanalları..... | 11 |
| Şekil 4.5.1. | KTB yapısında Sertoli hücresi ve bağlantı yapılarının şematize gösterimi. a.) KTB'yi oluşturan bağlantı yapıları, b.) Bağlantıların yapımı, c.) Bağlantıların yıkımı. Spermatogonyum (sg), mayotik (m), post-mayotik (p.m.), leptoten spermatozoid (l.), preleptoten spermatozoid (pl.) | 13 |
| Şekil 4.5.2. | KTB'de sıkı bağlantı, ektooplazmik özelleşmeler, gap junction ve desmozomların içerdiği ana proteinlerin şematize gösterimi..... | 14 |
| Şekil 4.5.3. | Klatrin-bağımlı endositozda vezikülün hücre içine alınmasının şematize gösterimi | 16 |
| Şekil 4.6.1. | Kemirgen, maymun ve insanda spermatogenez aşamalarının karşılaştırılması..... | 17 |
| Şekil 4.6.2. | İnsan (sol) ve kemirgen (sağ) sperminin taramalı elektron mikroskop görüntüsü..... | 17 |
| Şekil 5.1.1.1. | Deney planı | 18 |
| Şekil 5.1.1.1.1. | Kronik stres modeli uygulanma protokolü | 20 |
| Şekil 6.1.1.1. | Açık alan testinde hayvanların katettikleri toplam mesafenin (m) karşılaştırılması (* $p<0,05$) | 33 |
| Şekil 6.1.1.2. | Açık alan testinde rearing (n) aktivitesinin karşılaştırılması (** $p<0.001$) | 34 |
| Şekil 6.1.2.1. | Yükseltilmiş-O-Labirent testinde açık alanda geçirilen zamanın (sn) karşılaştırılması (** $p<0.01$) | 34 |
| Şekil 6.1.3.1. | Kuyruktan asma testinde hareketsiz kalma sürelerinin (sn) karşılaştırılması (** $p<0.001$) | 35 |
| Şekil 6.4.1. | Kontrol ve stres gruplarında sperm parametrelerinin karşılaştırılması. (* $p<0.05$, ** $p<0.001$) | 40 |
| Şekil 6.5.1.1. | A) Kontrol ve stres gruplarında ZO-1, Kludin 11 ve Klatrin protein seviyelerinin western blot analiziyle ölçülmesi. B) Verilerin dansitometrik grafik analizi (** $p<0.001$, * $p<0.05$)..... | 44 |

TABLolar LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Tablo 5.3.1. Johnsen skorlama kriterleri | 26 |
| Tablo 6.2.1. Kontrol ve stres gruplarının Johnsen Skorlamasına göre karşılaştırılması Veri ortalama±SEM olarak verilmiştir (* $p<0.05$) | 36 |
| Tablo 6.3.1.1. Kontrol ve stres grupları arasında MDA miktarının karşılaştırılması Veriler ortalama±SEM olarak verilmiştir. (** $p<0.01$) | 38 |
| Tablo 6.3.2.1. Kontrol ve stres gruplarının kortikosteron ve testosteron seviyelerinin karşılaştırılması. Veriler ortalama±SEM olarak verilmiştir. (** $p<0.01$) | 38 |
| Tablo 6.4.1. Kontrol ve stres grupları arasında sperm parametrelerinin karşılaştırılması. Veriler ortalama±SEM olarak verilmiştir. (* $p<0.05$, ** $p<0.001$)..... | 39 |

RESİMLER LİSTESİ

- Resim 5.1.1.1.1.** UKS modeli oluşturmak için kullanılan stresörler. A) Isı, B) Sallama, C) Hareketsizlik, D)24 Saat aydınlık..... 21
- Resim 5.1.1.1.2.** UKS modeli oluşturmak için kullanılan stresörler. A) Gündüz karanlık (Işık Değişimi), B) Nemli Talaş, C) Eğik kafes, D) Gece aydınlık (Işık Değişimi)22
- Resim 5.2.1.1.** Açık alan testi düzeneği. A) Açık alan kazanı. B) Any-maze yazılımı23
- Resim 5.2.2.1.** Yükseltilmiş-O-labirent testi deney düzeneği. A) ve B) yerden 40 cm yüksekliğe yerleştirilmiş ‘O’ şeklinde labirent düzeneği 24
- Resim 5.2.3.1.** Kuyruktan asma testi deney düzeneği. A) Yerden 60 cm yükseklikteki boruya bantlanmış deney hayvanı 25
- Resim 5.3.3.1.** Diff-quick boyaması ile normal sperm ve sperm morfoloji anomalileri. A) Normal sperm. B) Akrozom anomalisi. C) Baş anomalisi. D) Kuyruksitoplazmik droplet. E) Çift kuyruk. (A-E:100X) 29
- Resim 6.2.1.** A)Kontrol grubunda normal seminifer tübül yapısı. A’) A’daki görüntüde kesikli çizgilerle belirtilen alanine büyütülmüş hali. (A:20X, A’: 40X)..... 36
- Resim 6.2.2.** A) Stres grubunda seminifer tübüll epitelinde açılmalar. A’) A’daki görüntüde kesikli çizgilerle belirtilen alanın büyütülmüş hali. (→) ile seminifer tübül epitelindeki açılmalar gösterilmiştir. (A: 20X, A’: 40X)37
- Resim 6.2.3.** Stres grubunda seminifer tübül epitelinde germ hücre tabakası sayısında azalma görüldü. (←→) (40X)37
- Resim 6.2.4.** Stres grubunda (*) atrofik tübüller (20X)38
- Resim 6.4.4.1.** Toluidin mavisi boyaması. A) Kontrol grubunda soluk renkli (kromatin bütünlüğü bozulmamış) boyanan sperm çekirdekleri (kırmızı ok başı. B) Stres grubunda koyu renkli (kromatin bütünlüğü bozulmuş) boyanan sperm çekirdekleri (siyah ok başı). (A-B: 100X) 41
- Resim 6.4.5.1.** FITC-PNA boyaması. A) Pozitif kontrol (Testis dokusu). B) Kontrol grubunda parçalanmış (beyaz ok başı), ve tamamen kaybolmuş (kırmızı ok başı) spermler. C) Stres grubunda intakt kalmış olan spermler (kırmızı ok). (A:20X, B-C:40X)42
- Resim 6.4.7.1.** Makler kamerası incelemesinde stress grubunda görülen aglütinasyon alanları (Kırmızı ok başı) 43

Resim 6.6.1. A) Kontrol grubunda ZO-1 ekspresyonu. A') A'daki görüntüde kesikli oklarla gösterilen alanın büyütülmüş şekli. Bazal kompartmanda ZO-1 ekspresyonu kırmızı oklarla gösterildi (→). B) Stres grubunda bazal kompartmanda görülen ZO-1 ekspresyonunda azalma. B') B'deki görüntüde kesikli oklarla gösterilen alanın büyütülmüş şekli. Kırmızı ok ile ZO-1 ekspresyonunda azalma olan bölgeler gösterildi (→). C) Kltrin ve ZO-1 ekspresyonun ko-lokalize görüntüsü. Çift taraflı ok ile seminifer epitel dökülmesi gösterildi. C') C'deki görüntüde kesikli çizgiler ile belirtilen alanın büyütülmüş hali46

Resim 6.7.1. A) Stres grubunda seminifer tübül epitelinde açılmalar (*) ve germ hücre dizisinde dökülmeler (↔). B) Stres grubunda bazal membranda KTB yapısında açılmalar. B') B'deki şekilde kesikli çizgilerle belirlenen alanın büyütülmüş hali. Kesikli çizgilerle belirlenen alanda seminifer tübül epitelinde bazal kompartmanda açılmalar. (A: 5.13K X, B: 21.52 K X, B': 51.02 K X)47

1. ÖZET

KRONİK STRESİN FARE KAN-TESTİS BARIYERİ PROTEİN YAPISI VE GEÇİRGENLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Stres, dünya genelinde 21. yüzyılın salgın hastalığı olarak görülmektedir. Stres sonucunda oluşan depresyon, anksiyete ve intihara eğilim gibi semptomların teşhisi ve tedavisi özellikle Amerika Birleşik Devletleri gibi ülkelerde milyarlarca dolara mal olmaktadır. Akut stres vücudu belirli noktalarda tetikte tutmaya yardımcı olurken, kronik stres ciddi hastalıklara zemin hazırlamaktadır. Stresin üreme, gastrointestinal ve üriner sistem üzerine olan etkileri de ayrıca birer araştırma konusudur. Son yıllarda artan tüp bebek oranları ve normal sperm değerlerinin sürekli dramatik şekilde düşmesi, araştırmacıları bu düşüşe neden olan durumları saptamaya yöneltmiştir. Bu nedenler arasında stres ilk üçte yer almaktadır. Döllenme yeteneğine uygun sperm üretiminin testislerde başladığı ve Kan-Testis Bariyer (KTB) yapısının spermatogenez için vazgeçilmez bir yapı olduğu bilinmektedir. KTB yapısını oluşturan proteinlerin ekspresyon seviyesindeki değişimler bariyer yapısını değiştirir ve bunun sonucunda spermatogenez için yaratılan mikroçevre bozulur. Çalışmamızda C57BL/6 tür fare için spesifik olarak geliştirilen unpredictable kronik stres (UKS) modeli kullanılmıştır. Kontrol grubu hayvanlar hiçbir stresöre maruz bırakılmazken, stres grubundaki hayvanlara belirlenen stresörler 7 hafta boyunca rastgele uygulanmıştır. Davranış deneyleri sonucunda hayvanlarda depresyon, anksiyete ve keşif aktivitesinde azalma görülmüş ve modelin oluşturulduğu doğrulanmıştır. Stres grubunda, testisin histopatolojik değerlendirmesinde dejenerasyon, malondialdehit (MDA) ve kortikosteron seviyesinde artma ve testosteron seviyesinde ise azalma görülmüştür. Western blot analizleri ile KTB yapısını oluşturan proteinlerden ZO-1 ve Klaudin 11 seviyesinde azalma, kltrin seviyesinde ise değişme olmadığı kantitatif olarak gösterilmiştir. Elektron mikroskopik incelemeler sonucunda bariyer yapısındaki hasar ultrastrüktürel düzeyde gösterilmiştir. Sperm parametrelerine bakıldığında, sperm motilitesi, konsantrasyonu ve akrozomal reaksiyon indeksinde azalma görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Kan-Testis Bariyeri, Sperm, Testis, Unpredictable Kronik Stres, ZO-1

Bu tez TÜBİTAK tarafından 118S734 numaralı proje ile desteklenmiştir.

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF CHRONIC STRESS ON MICE, BLOOD TESTIS BARRIER PROTEINS AND PERMEABILITY

Stress has been classified as the ‘health epidemic of the 21st century’ all around the world. Diagnosis and treatment of stress-related symptoms such as depression, anxiety and suicide tend to cost billions of dollars, particularly in countries such as the United States. Acute stress helps keep the body alert at certain points, while chronic stress can lead to cause serious illness. The effects of stress on reproduction, gastrointestinal and urinary systems are also another subjects to research. In recent years, increasing IVF rates and continuous dramatic decrease in normal sperm values have led researchers to identify the causes of this decline. Among these reasons stress is in the top three. It is known that sperm production suitable for fertilization starts in the testes and the Blood-Testis Barrier (BTB) structure is an essential structure for spermatogenesis. Changes in the expression level of the proteins constituting the BTB structure change the barrier structure and as a result the microenvironment created for spermatogenesis is disrupted. In our study, we used a specific chronic unpredictable stress (CUS) model which is specifically developed for C57BL/6 mouse strain. While the control group animals were not exposed to any stressors, the stress group animals were exposed to determined stressors randomly for 7 weeks. As a result of stress protocol, depression, anxiety and exploratory activity were decreased in stress group animals which were tested by behavioral tests and so it is confirmed that the model was formed. Histopathological evaluation of testis showed degeneration in seminiferous tubules. In stress group malondialdehyde (MDA) and corticosterone levels were decreased. Western blot analysis showed that ZO-1 and claudin 11 levels were decreased and clathrin levels did not change. As a result of electron microscopic investigations, damage to the barrier structure has been demonstrated at ultrastructural level. When sperm parameters were examined, sperm motility, concentration and acrosomal reaction index decreased.

Key Words: Blood-testis barrier, Sperm, Testis, Unpredictable Chronic Stress, ZO-1

This thesis is supported by TUBITAK with project number 118S734.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Stres, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 21. yüzyılın salgın hastalığı olarak nitelendirilmektedir. Amerika'da yapılan bir çalışmaya göre, çalışanların %50'si stresin negatif etkileriyle başa çıkmaya çalışmakta ve bu durum işteki üretkenliklerini düşürmektedir. Mali açıdan bakıldığında ise verimliliğin düşmesi Amerikan şirketlerine yılda ortalama 300 milyon dolara mal olmaktadır. En kritik verilerden bir diğeri Amerika Birleşik Devletleri'nde değişik gelir seviyelerine sahip bireyler arasında yapılan bir araştırmaya göre, stresin seviyesi 1983-2009 yılları arasında yaklaşık %30 oranında artmıştır (1). Stres sonucu oluşan duygu durum değişiklikleri ve görülen fiziksel etkilerin ölümcül sonuçlara neden olması, araştırmacıları stresin oluşma nedenleri ve stres sonucunda oluşan anomalileri araştırmaya yöneltmiştir.

Stres, genel olarak akut ve kronik olarak ikiye ayrılmaktadır. Akut stresin dışarıdan gelebilecek tehditlere karşı vücudu tetikte tuttuğu savunulmuş olup, hayvani ya da bireyi savaşmaya hazır hale getirdiğinden dolayı genellikle stres sonucunda patolojik durumun oluşmadığı görülmüştür (2). Ancak kronik stres, hem psikolojik hem de fizyolojik olarak travmatik etkilere neden olmaktadır. Kronik stres sonucunda oluşan psikolojik bozuklukların tedavisinde genel olarak antidepresanlara başvurulmaktadır. Kullanılan ilaçların psikolojik bozuklukları kısmen tedavi ettiği ancak yan etkilerinin de olduğu bilinmektedir (3, 4). Stres fiziksel olarak ise nörolojik, kardiyovasküler, gastrointestinal ve üriner bozukluklara neden olmaktadır (5-7).

İnfertilite, çiftlerin 1 yıl korunmasız ilişki sonucunda çocuk sahibi olamaması olarak tanımlanmaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre, 2018 yılında fertilite oranı 1.99'a düşmüştür (8). İnfertilitenin %30'u erkek kaynaklı, %30'u kadın kaynaklı, %20'si açıklanamayan nedenler, %5'i diğer ve %15'i ise hem erkek hem kadın kaynaklı nedenlerden kaynaklandığı bilinmektedir (9). Erkek kaynaklı nedenlere bakıldığında, genellikle üç başlık altında toplanmaktadır; 1. Erkek üreme sisteminde görülen primer patolojik hastalıklar (inmemiş testis, sperm iletim kanallarında tıkanıklık vb.), 2. Çevresel faktörler (stres, sigara, alkol kullanımı vb.) ve 3. Sistemik hastalıklar (diyabet, yüksek tansiyon vb.) (10). Stresin son yıllarda görülme hızının ciddi olarak artması, aynı zamanda infertilite oranının her geçen yıl yükselmesi araştırmacıları stres kaynaklı infertilite alanında çalışmalar yapmaya

yönelmiştir. Günümüzde DSÖ kriterlerine göre normal bir erkekte 1 ml’de görülmesi gereken sperm sayısının ciddi düşüş göstermesi araştırmacıları bu kritik durumun altında yatan nedenleri aydınlatmaya yönelmiştir.

Kronik stres sonucunda sperm sayısında ve testosteron seviyesinde azalma olduğu ayrıca testis histopatolojisinde anomalilere rastlandığı bildirilmiştir (11, 12). Ancak sperm sayısının azalmasının altında yatan mekanizma halen aydınlatılamamıştır. Testislerde gerçekleşen sperm üretiminde; kalite kriterinin Kan-Testis Bariyeri (KTB) olduğunun bilinmesi, araştırmacıları KTB mekanizmasını moleküler düzeyde anlayabilmek için, KTB’de olan değişiklikleri araştırmaya yönelmiştir.

Bu tezde, farede Unpredictable Kronik Stres (UKS) modeli oluşturularak, stresin testisteki KTB yapısı üzerine olan etkilerini protein düzeyinde hem kantitatif hem de mikroskopik olarak incelemek, ayrıca sperm parametrelerindeki değişimleri kantitatif olarak analiz etmek amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Stres

Stres terimi, ilk defa Eski Romalılar tarafından, günümüzde kullanılan kelime anlamıyla değil, bir objenin üzerine uygulanan basınç anlamında kullanılmıştır (13). Latin kökenli olan '*strictus*' kelimesinden türetilmiş olup, birleştirme ve beraber hareket ettirme anlamlarında da kullanılmış (14). Eski Fransızca'da '*estresse*' olarak kullanıldı, bu kelime sıkışıklık ve baskı anlamlarına gelmekteydi (15). İngilizce'de ise '*distress*' kelimesi kullanıldı ve zorluk anlamını taşımaktaydı. İngilizler ve Fransızlar '*distress*' terimini zorlayıcı çevre koşulları için kullanmaya başlamışlardır (14).

19. yüzyılın başlarında Claude Bernard, Sir William Osler ve Walter Cannon stres terimini kullanmasalar da değişen çevre koşullarına karşı verilen tepkiler üzerine deneysel çalışmalar yapmaya başladılar. Bernard, vücudun sürekli olarak iç dengesini korumaya çalıştığını (homeostat) ileri sürdü (16). Osler, çevresel koşullara karşı vücudun tepki verdiğini ve bunun uzun bir süre boyunca devam etmesi sonucunda sağlık üzerine olumsuz etkiler oluşturduğunu söylemiştir (17). Cannon ise I. Dünya Savaşı sırasında yaptığı araştırmalar sonucunda korkuya verilen tepkide hormonların rolünü araştırdı (18). Ancak bu çalışmalarını süresince hiçbir zaman 'akut stres' terimini kullanmamıştır. Cannon'ın bu çalışmaları yürüttüğü yıllarda, stresin 'babası' olarak kabul edilen Hans Selye (1907-1982) kronik strese verilen cevaplarda akut strese verilen cevaplardan farklılıklar olduğunu gözlemledi (19). Hans Selye, 1907'de Viyana'da doğmuştur ve tıp doktoru olarak eğitim almıştır. Ancak mezun olduktan sonra klinik yönde ilerlemekten çok araştırma alanına yönelmeyi tercih etmiştir. Tıp literatürüne 'stres' kelimesini geçiren ilk kişidir (20). Selye stresi 'vücudun her türlü değişime verdiği özel olmayan tepki' olarak tanımlamıştır (21). Selye çalışmasında, strese verilen tepkiyi üç evreye ayırmıştır. 1. evreyi, 'genel adaptasyon sendromu' evresi olarak tanımlamıştır. Bu evrede adrenal bezlerde büyüme, lenfatik sistemde hasar, mide ülseri, kas tonusunu kaybetme, vücut ısısında düşme ve ödem oluşumu gözlemlemiştir. 2. evrede ki bu evre yapılan deneylerde, deney hayvanının 48 saatten fazla etken maddeye maruz bırakılmasını kastetmektedir; adrenal bezde aşırı büyüme, hipofizde aşırı bazofil hücre artışı ve gonadlarda atrofi gözlemlemiştir. Uygulanan

stresörün 1 aydan kısa bir sürede kesilmesi durumunda vücut fonksiyonlarının normal düzeyine döndüğünü, sürenin 1 ayı geçmesi durumunda ise 3. evreye geçildiğini belirtmiştir. 3. evrede tükenmişlik evresine geçildiğini ve strese karşı gösterilen direncin devam edemeyeceğini söylemiştir (22). İleriki çalışmalarında, 1. evrede söz edilen ‘genel adaptasyon sendromu’ terimi yerini ‘stresöre verilen cevap’ terimine bırakacaktır (19). Selye’nin çalışmalarının odak noktası Cannon’dan farklı olarak kronik stres olmuştur. 1943 yılında yaptığı bir araştırmada hipotalamo-hipofizer-adrenal aks (HPA) alanında çalışmış ve vücudun strese verdiği cevapta önemli rol oynayan özellikle glukokortikoid salgılayan hücreleri izole edip tanımlamıştır (23). Selye’nin öncülüğü sayesinde birçok araştırmacı HPA aksının hiperaktivasyonu ve kronik stres arasındaki ilişkiyi araştırmaya yönelmiştir (24).

1980’lerin başından itibaren stres araştırmaları psikoloji, tıp ve genetik gibi multidisipliner hale dönüştü. Birçok akıl hastalığının sınıflandırmasında, stresin varlığı teşhis kriterleri arasında yer almaya başladı (19). Psikologlar, günlük can sıkıntısı, işyeri stresi, ebeveyn stresi ve post travmatik stres gibi değişik stres tipleriyle ilgili deneysel çalışmalar yapmaya başladılar (25-28). Akut ve kronik stresin, fiziksel ve akıl sağlığı üzerine olan etkileri hakkında yeni yaklaşımlar üretilmeye başlandıkça, epidemiyologlar ve halk sağlığı araştırmacıları stresin toplum sağlığı üzerindeki etkilerini keşfetmeye devam ettiler (29). Son yıllarda yapılan en yeni çalışmalar ise stresin jenerasyonlar arasında nasıl geçiş gösterdiği ve epigenetik faktörler nedeniyle annenin bulunduğu çevrenin yeni doğan bireyin fenotipini nasıl etkilediği üzerine yoğunlaşmaktadır (30).

Washington merkezli araştırma şirketi olan Gallup’ın 140’tan fazla ülkede 151.000 kişiyle yaptığı anket sonucunda oluşan ve Şekil 4.1.1.’de gösterilen 2018 raporuna göre dünyada her 3 kişiden birinin stres altında ve endişeli olduğu sonucu ortaya çıkmıştır. Ayrıca bu rapora göre Türkiye, 140 ülke arasından en stresli 11. ülke olmuş ve olumlu deneyimlerin en az yaşandığı ülkeler arasında yerini almıştır (31). Bu kritik tablo araştırmacıları stres kaynaklı olan patolojik durumları araştırmaya yöneltmiştir.

Dünya Çapında Olumlu Deneyimlerin En Az Yaşandığı Ülkeler

| | Olumlu Deneyim İndeksi |
|----------------|------------------------|
| <u>Belarus</u> | 56 |
| Mısır | 56 |
| Karadağ | 56 |
| Sırbistan | 56 |
| Irak | 55 |
| Makedonya | 55 |
| Türkmenistan | 55 |
| Etiyopya | 54 |
| Nepal | 54 |
| Türkiye | 53 |
| Tunus | 50 |
| Yemen | 49 |
| Afganistan | 48 |

Based on Gallup World Polls, 2017

Şekil 4.1.1. Gallup Raporu 2018 verileri [31].

4.2. Stresin Patofizyolojisi

Stresin Selye tarafından literatüre girmesinin ardından, birçok araştırmacı stresin etkilerini araştırmak amacıyla hayvan modelleri geliştirmeye başlamıştır. Stres protokolleri başta akut ve kronik stres olmak üzere ikiye ayrıldı. Kronik stres üzerine çalışan Katz ve ark., çeşitli stresörlere maruz bıraktıkları sıçanların, içme sularına sakkarin ya da sükroz eklenmesi durumunda içme isteklerinin düştüğünü gözlemlemişler ve stresin yarattığı depresyon sonucunda sıçanların anhedonik (haz kaybı) davranış sergilediklerini göstermişlerdir (32). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, etik nedenlerden dolayı stresörlerin ılımlaştırılması, günlük hayatta karşılaşılabilecek stresörler olması ve ekolojik olarak geçerli olan protokollerin

uygulanması için protokollerde bazı manipülasyonlar yapılmıştır. 2015 yılına gelindiğinde, bu modeli çalışan 180 laboratuvardan toplamda 230 yayın çıktığı görülmüştür. Bu çalışmalar gruplandırıldığında sinirbilim, antidepresan ajanlar ve geleneksel tıp olmak üzere 3 başlık altında toplanmaktadır. Yapılan çalışmalarda uygulanan stres modelinin ismine bakıldığında ‘kronik stres’ terimine “unpredictable= belirsiz” kelimesinin eklendiği görülmektedir. Bunun sebebi protokolde uygulanan mikro stresörlerin rastgele düzenlenmesidir. “Mild” kelimesinin eklenmesi ise protokolün ılımlaştırıldığı, diğer bir deyişle daha az şiddetli stresörlerin kullanıldığı anlamına gelmektedir. Bunun sonucunda kronik stres modelleri, Kronik Mild Stres (KMS) ve Unpredictable Kronik Stres (UKS) modelleri olmak üzere temelde ikiye ayrılmıştır (33). Kronik stres modeli ilk olarak antidepresanların etki mekanizmalarını çalışmak, yeni ilaçlar geliştirmek ve depresyonu her yönüyle araştırabilmek amacıyla kullanıldı (34). Stres protokolü uygulanan hayvanların kontrol grubuna göre haz duyusunda azalma, depresyon ve anksiyete belirtileri gösterdiği, ancak 5 farklı antidepresan kullanımı sonucunda stres grubundaki hayvanların kontrol grubundakilere benzer davranışlar sergilemeye başladıkları gösterilmiştir (35-37). Yapılan diğer nörolojik çalışmalarda kronik stresin, hipokampüste yeni nöron oluşumunu baskıladığı, bunun sonucunda dendritik spine yoğunluğunda ve sinaps sayısında azalma ve hafızada bozulmalar meydana getirdiği görülmüş (38). Preklinik çalışmalarda, stresin piramidal nöronların apikal dendritlerinde atrofiye ve yetişkin hipokampusünde dentat girus bölgesinde görülen nörogenezde azalmaya neden olduğu gösterilmiş (39). Kronik stresin kardiyovasküler sistem üzerine etkileri araştırılırken HPA aksındaki aktivasyon sonucunda, renin-angiotensin sisteminin aktive olduğu ve homosistein seviyesindeki artıştan dolayı endotel duvarında hasar olduğu ortaya çıktı. Atrium duvarındaki endotel hasarı sonucunda, duvara makrofaj infiltrasyonu olduğu ve aterosklerotik plak olduğu bildirilmiştir (40). Üriner sistem üzerine yapılan çalışmalarda, kronik stresin mesane duvarında, hipertrofi de dahil olmak üzere, birçok ciddi morfolojik değişikliğe ve mesane/ vücut ağırlık oranında artışa neden olduğu da gösterildi (41). UKS modelinin dişi üreme sistemi üzerine olan etkileri araştırıldığında over rezervinde ve küçük folikül sayısında azalmaya, serum Anti-Müllerin Hormon (AMH), estradiol (E2),

Gonadotropin Salıcı Hormon (GnRH) seviyelerinde düşüşe ve östrus siklusunda uzamaya neden olduğu gösterildi (42).

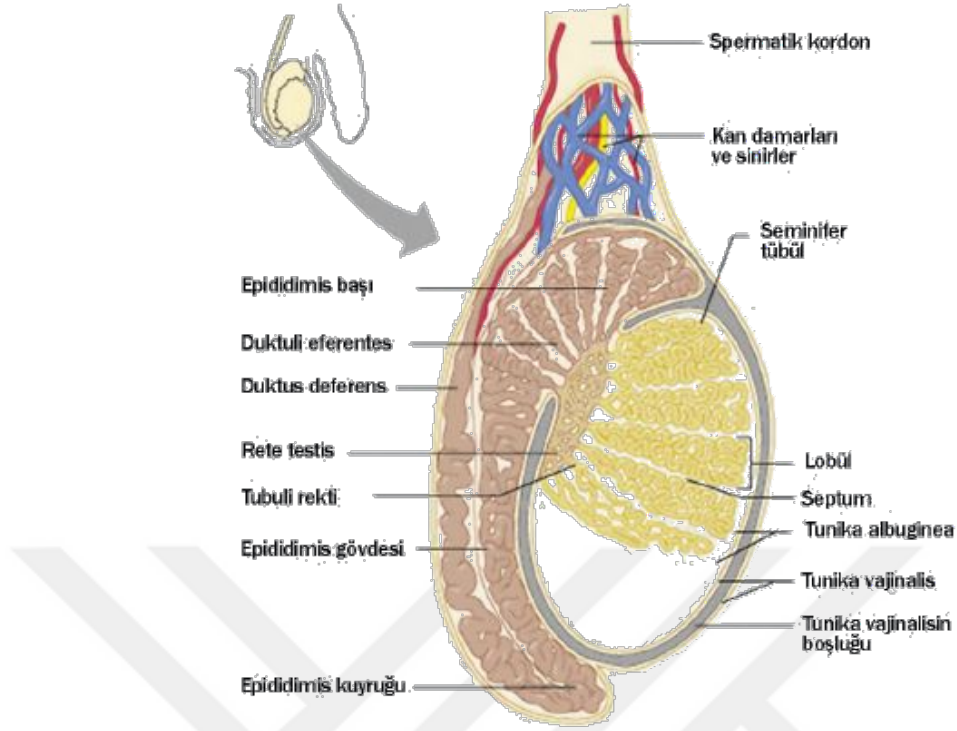
4.3. Stresin Erkek Üreme Sistemi Üzerine Etkileri

Kronik stresin erkek üreme sistemi üzerine etkileriyle ilgili olan çalışmalara bakıldığında, hem testis ve hem de kanal sistemi üzerine etkileri araştırılmakta olup aynı zamanda sperm parametreleri de detaylı olarak incelenmektedir. Hou ve ark.'ın, morfolojik incelemeleri sonucunda kronik stresin seminifer tübül boyutlarında bozulmaya, vakuolizasyona ve spermatogenik seri hücrelerinin birbirinden ayır edilmesinde zorlanmaya neden olduğu gösterildi (43). Yapılan başka bir çalışmada stresin, superoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon, testosteron, serotonin, steroidojenik akut- düzenleyici (StAR) genin protein ekspresyon seviyesinin ve sperm hareketliliğinin azalmasına, malondialdehit (MDA) ve kortikosteron seviyelerinin artmasına neden olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada resveratrolün, antioksidan seviyelerinde, serotonin, StAR gen ekspresyon seviyesinde, sperm hareketliliği ve sayısında artış sağladığı, MDA ve kortikosteron seviyelerinde düşüş sağladığı gösterildi (12). Kronik stresin, arkuat hipotalamik çekirdekte bulunan kispeptin nöronlarının peptid seviyelerinde immünreaktif baskılanma sonucunda, seminifer tübüllerde ss-DNA pozitif hücre sayılarının ve çok nukleuslu dev hücre sayılarının arttığı ortaya konuldu (44). Nirupama ve ark.'ı kronik stresin tip A spermatogonya sayısında azalmaya, abnormal spermatozoa ve germ hücrelerinde görülen apoptozda artışa neden olduğunu ve uygulamanın kesilmesinin üzerinden 4 ay geçmesine rağmen azalan tip A spermatogonya sayısında geri kazanım olmadığını bildirdiler (7). Stres sonucunda testosteron seviyesinin düşmesine bağlı olarak, germ hücre sayısında azalma, prostat ve seminal bez epitelinde incelme görülmesi sonucunda fertilitenin etkilendiği ve doğan yavru sayısının azaldığı yapılan başka bir çalışmada gösterildi (45). Son yıllarda yapılan başka bir çalışmada kronik stresin seminifer tübül epitelinin bazalinde vakuolizasyona, seminifer epitelde dökülmelere ve seminifer tübül lümeninde dejeneratif germ hücrelerinin bulunmasına neden olduğu ortaya konuldu (46).

4.4. Testis Histolojisi

Testis, spermatogenez ve steroidogenezin gerekleŖtiđi erkek üreme sistemine ait bir çift organdır. Testis, sıkı bağ dokusundan oluŖan kalın tunica albuginea ile çevrilidir. Bu kapsül yapısından çıkan fibröz uzantılar testiküler kitleyi yaklaşık 250 adet lobüle bölmektedir. Her bir lobül içerisinde 1-4 adet seminifer tübül bulunur. Seminifer tübül yapıları intersitisyel doku denen bir bağ dokusu ile sarılıdırlar. İnterstisyel doku içerisinde testosteron üretiminden sorumlu Leydig hücreleri (interstisyel hücreler), kan ve lenf damarları ve sinir sonlanmaları bulunmaktadır. Leydig hücreleri büyük, poligonal Ŗekilli, eozinofilik hücrelerdir ve tipik lipid dropletleri içerirler. Testosteron salınımı hipofizin n lobundan salınan Luteinizan Hormon (LH) kontrolü altındadır. Leydig hücreleri erken ftal dönemde farklılaŖır ve embriyonik dönemde erkek üreme organlarının geliŖiminde önem taŖır. Pubertede ise sperm üretim baŖlamasından, aksesuar cinsiyet bezlerinin salgılamasından ve sekonder cinsiyet karakterlerinin geliŖiminden sorumludurlar. YetiŖkinlerde testosteron salınımı spermatogenezin devamlılığı ve sekonder cinsiyet karakterlerinin korunması için gereklidir (47).

Her bir testiste bulunan seminifer tübül sayısı yaklaşık olarak 250-1000 arasındadır ve herbiri yaklaşık 150-250 m çapındadır. Seminifer tübüller kıvrımlıdır ve tübül sonlanırken lümendeki daralma nedeniyle tbli rekti olarak adlandırılır. Tbli rektiler, seminifer tübüllerin rete testis denilen labirente bağlanmasını sağlamaktadırlar. Bu yapılar aracılığıyla testislerde üretilen spermiler ejakülasyon ile atılmak için kanal sistemine aktarılırlar (Ŗekil 4.4.1.) (48).



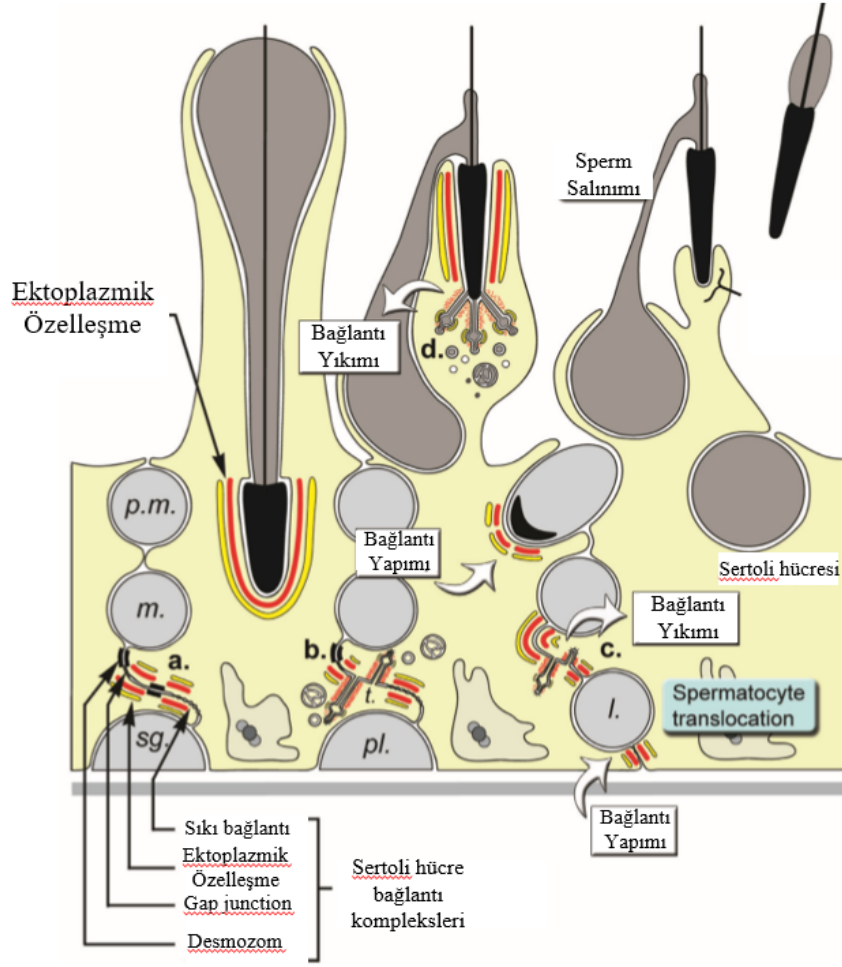
Şekil 4.4.1. Testis yapısı. Testis bölmeleri ve iletim kanalları (48).

Seminifer tübül duvarını döşeyen seminifer epitelde, somatik hücreler olan Sertoli hücreleri (destek hücreleri) ve spermatogenik seri hücreleri olmak üzere 2 tip hücre bulunmaktadır.

Sertoli hücrelerinin görevleri arasında gelişmekte olan spermatozoonların desteklenmesi, beslenmesi ve uygun mikro çevrenin yaratılması, spermiyogenez sırasında oluşan artık cisimlerin fagosite edilmesi, spermatogenez için gerekli olan testosteronun üretimi için Androjen-bağlayıcı protein üretimi, AMH üretimi ve KTB yapısının oluşturulması yer almaktadır (49). Sertoli hücreleri, seminifer tübüllerin bazal membranı üzerine oturur ve apikal yüzeyi tübül lümenine kadar uzanmaktadır. Sitoplazmik çıkıntılarında ve kompleks üç-boyutlu yapısından dolayı hücre sınırları ışık mikroskopik düzeyde ayırt edilememektedir (50). Rutin histolojik boyamalarda çok koyu boyanan ökromatik nükleus ve nükleoluslarından ayırt edilmektedirler (51). Elektron mikroskopik incelemelerde gelişmiş düz endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş Golgi kompleksi, çok sayıda lizozom ve mitokondri içerdikleri görülmüştür.

4.5. Kan-Testis Bariyeri

Kan-doku bariyeri konsepti 20 yy.'ın başlarında, beyin ve testisin vital boyalarla tamamen boyanmadığı gözlemlendiği zaman ortaya atılan bir kavramdır (52). Aynı zamanda araştırmacılar testiküler lenf ve kan plazmasından elde edilen sıvının içeriği ile rete testis ve seminifer tübüllerin lümeninden elde edilen sıvı içeriğinin birbirinden farklı olduğunu görmüşlerdir (53, 54). Vücuttaki Kan-Beyin Bariyeri (KBB) ve Kan-Retina Bariyeri gibi diğer bariyer yapıları kapillerlerin endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar ve destekleyici olarak perisit ve perivasküler makrofajlardan oluşurken, Kan-Testis Bariyeri (KTB) sadece seminifer tübüllerde bazal membrana oturan Sertoli hücreleri arasındaki özelleşmiş bağlantılardan oluşmaktadır. KTB, vücuttaki en sıkı bariyer yapılarından biri olarak kabul edilmektedir (55, 56). KTB seminifer tübül epitelini bazal ve adluminal olmak üzere 2 kompartmana ayırmaktadır. KTB'nin birincil fonksiyonu Sertoli hücrelerinin arasından apikale doğru su, elektrolitler, iyonlar, hormonlar, parakrin faktörler ve biyolojik moleküller gibi bazı maddelerin geçişini kısıtlamaktır. İkincil görevi ise, savunma görevidir. Preleptoten evresinden itibaren adluminal kompartmana geçmiş olan spermatozoidlerin izole bir mikro çevrede spermatogenezi tamamlamasını sağlamaktadır (50). Bu fonksiyonlarının yanında, spermiyogenezis sırasında oluşabilecek anti-sperm antikorlarının (ASA) bu izole edilmiş ortama girmeleri engellenerek erkek infertilitesine neden olabilecek bir ortam ortadan kaldırılır (57). Yapılan çalışmalarda ASA oluşmasının temel nedeninin KTB yapısındaki geçirgenlikler olduğu ortaya konmuştur (58). Ancak bunun yanında konjenital anomaliler, vazektomi ya da tramvalar sonucu oluşabilecek mekanik tıkanıklıklarında ASA oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (59, 60). KTB geçirgenliğinin artması sonucunda ASA'lar seminifer tübül lümenine girer ve kanallar aracılığıyla epididimis ve vas deferense iletilirler. Bu antikorlar sperm hücrelerine bağlanırlar ve aglütinasyona neden olurlar (61). ASA, semende sperm aglütinasyonuna (62), sperm göçünün engellenmesine (63) ve lökositoya (64) neden olur. Ayrıca sperm başları antikor ile kaplandığından, zona pellusidaya bağlanamaz ve penetre olamazlar (65, 66).

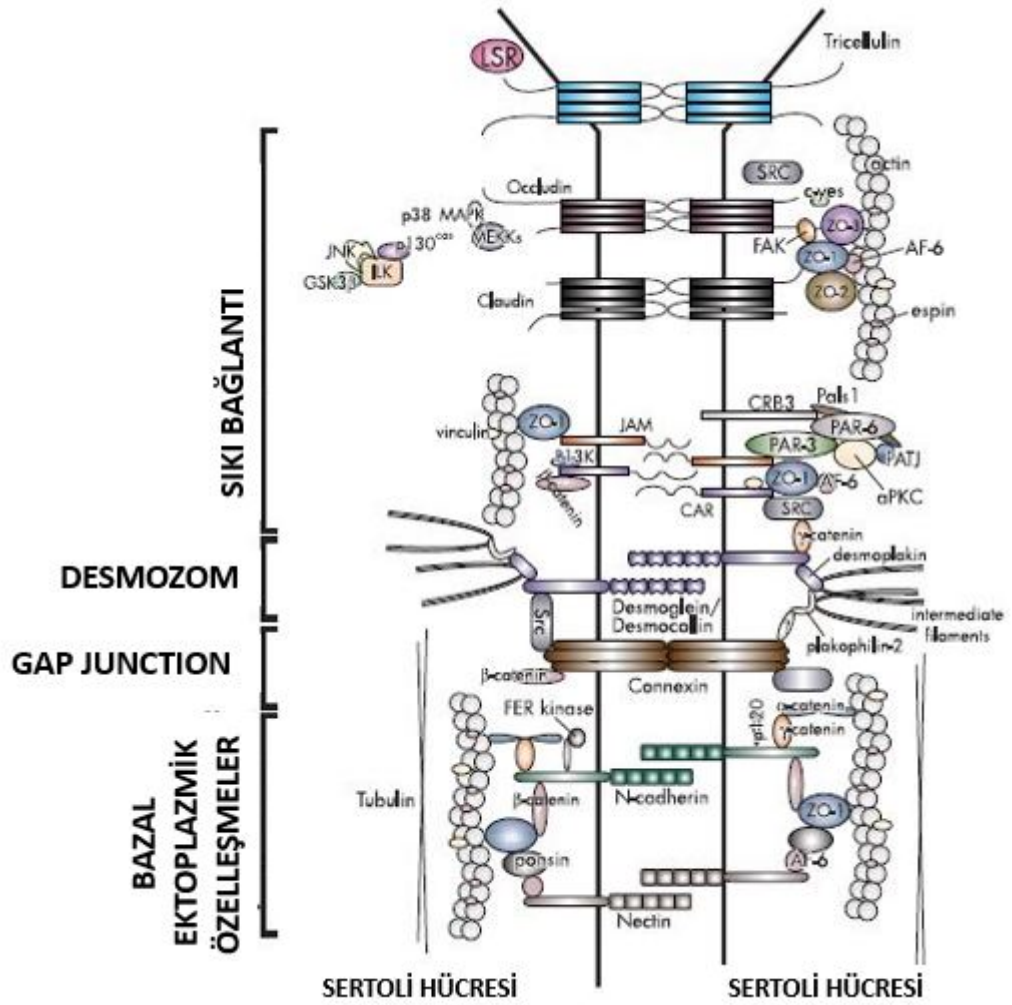


Şekil 4.5.1. KTB yapısında Sertoli hücresi ve bağlantı yapılarının şematize gösterimi. a.) KTB'yi oluşturan bağlantı yapıları, b.) Bağlantıların yapımı, c.) Bağlantıların yıkımı. Spermatogonyum (sg), mayotik (m), post-mayotik (p.m.), leptoten spermatosit (l.), preleptoten spermatosit (pl.) (67).

KTB sıkı bağlantılar, ektoplazmik özelleşmeler, desmozomlar ve gap junctionlar (oluklu bağlantı) olmak üzere 4 tip bağlantı tipi içermektedir (50) (Şekil 4.5.1. ve Şekil 4.5.2.). Desmozomlar, hücre-hücre ara filamentleri birbirine bağlayan bağlantı tipidir. İntegral membran proteinlerinden desmoglein-2 ve desmokollin-2'yi içermektedir. Yapılan son çalışmalarda, KTB yapısında yer alan desmozomların hücre-hücre ara filamentleri birbirine bağlamanın yanında N-kadherin ve okludin gibi diğer bağlantı proteinlerinin sıkı bağlantı ve bazal ektoplazmik özelleşmelerin görüldüğü bölgelerde fonksiyonlarını düzenlediği ortaya konmuştur (68, 69). Gap junctionlar, aktin tabanlı bir bağlantı tipidir ve hücrelerin birbiriyle iletişimde görevlidir. Konneksinlerin biraraya gelmesiyle oluşmuşlardır. Testiste özellikle bazal ve apikal ektoplazmik

özelleşmelerinin görüldüğü alanlarda görülmektedir. Konneksin-43 ve konneksin-46 testiste en çok çalışılan geçişli bağlantı tipidir (70, 71). Bu bağlantılar glikoz, polipeptid ve inorganik iyonlar gibi küçük molekülerin bir hücreden diğerine geçişi için yol oluşturmaktadır (72). Ektoplazmik özelleşmeler, endoplazmik retikulumun sisternası ile plazma membranı arasında hegzagonal olarak düzenlenmiş filamentöz aktin mikrofilyamentlerden oluşmuş testise spesifik adhezyon bağlantılarıdır. Sertoli-Sertoli arasında özelleşmelere bazal ektoplazmik özelleşmeler, Sertoli-uzayan/uzamış spermatid arasındakilere ise apikal ektoplazmik özelleşmeler denmektedir (71). Kadherin-katenin komplekslerinden oluşmaktadır. Genellikle ZO-1 proteinleriyle bağlantılı şekilde bulunurlar. Spermatogenez sırasında preleptoten spermatositlerin adluminal kompartmana geçişi sırasında bariyerin yıkılıp yeniden yapıma sürecinde görev alırlar (73, 74).

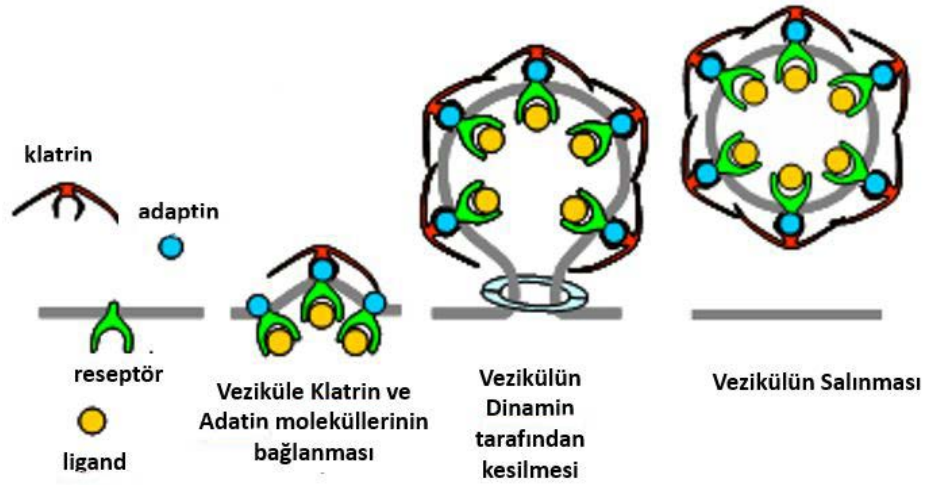
KTB yapısında bulunan sıkı bağlantılar integral membran proteinleri sınıfında yer almaktadır ve okludinler, klaudinler ve hücre adezyon molekülleri olmak üzere üç başlık altında toplanmaktadır (75). Okludinler, hücre polarizasyonu için gerekli olan proteinlerin lokalizasyonunu kontrol etmede, hücre polarizasyonunun kurulmasında ve hücre yönelmesinin kontrolünde görev almaktadırlar. Sahip olduğu bu görevlerden dolayı testislerde okludinin preleptoten/leptoten spermatositlerin KTB boyunca hareketinin düzenlenmesinde rol aldığı düşünülmektedir (76). KTB yapısında eksprese edilen klaudinler (klaudin 3,5,11) okludinlerle birlikte KTB yapısının bütünlüğünün korunmasına katkıda bulunurlar (77). Klaudin-11 knock out farelerde seminifer tübül lümeninin Sertoli hücre agregatlarıyla dolu olduğu görülmüştür. Ayrıca seminifer tübüllerde en gelişmiş olarak yuvarlak spermatidlerin bulunması ve apoptotik hücre sayısında artış görülmesi, klaudin-11'in spermatogenez için oluşturulması gereken mikro çevre açısından vazgeçilmez bir eleman olduğunu ortaya koymuştur (78). Zonula okludens-1 (ZO-1) periferal membran proteinidir ve sıkı bağlantı proteinlerinin sitoplazmik yüzleriyle bağlantılıdır. Okludin ve klaudinleri, aktin iskeletine bağlar. Konneksin-43 ile kolokalizdir ve gap junctionlar arasındaki iletişimi düzenler (79). Sıkı bağlantıların kurulması için gerekli olan klaudin polimerizasyonunu düzenlemektedir. ZO-1 ayrıca apikal ektoplazmik özelleşme bölgesinde, uzamış spermatidlerin etrafında bulunur ve seminifer tübüllerin IV. ve V. evrelerinde uzamış spermatidlerin baş kısmının konveks tarafında bulunur (76).



Şekil 4.5.2. KTB’de sıkı bağlantı, ektooplazmik özelleşmeler, gap junction ve desmozomların içerdiği ana proteinlerin şematize gösterimi (76).

Spermatogenez sürecinde preleptoten/leptoten spermatositlerin adluminal kompartmana geçişi esnasında, sıkı bağlantıların bir yandan yıkılırken bir yandan bazal kompartman tarafında yapımı söz konusudur. Bu süreçte yapısal, bağlayıcı ve sinyal proteinlerinin ekspresyon seviyelerinde değişim, lokalizasyon değişimi ve proteinlerin birbiriyle iletişimde modifikasyonlar olmaktadır (76). Bu değişimler altında temelde iki mekanizma yer almaktadır; fosforilasyon ve endositoz. Testislerde fosforilasyondan sorumlu olan ve en çok çalışılan kinazlar SRY, YES ve FYN ailelerine ait kinazlardır. Sertoli hücrelerinde bağlantı komplekslerine yakın lokalize olurlar ve integral membran proteinlerinin uygun fosforilasyon düzeyinde kalmasından ve hücrenin iç ve dış ortam arasındaki iletişiminden sorumludurlar (80).

Endositoz, hücre membranından geçemeyecek büyüklükteki moleküllerin, hücre parçalarının ya da tüm hücrenin enerji harcanarak hücre içine alındığı bir aktif transport tipidir. Endositoz, fagositoz, pinositoz ve reseptör aracılı endositoz olmak üzere 3'e ayrılmaktadır. Reseptör aracılı endositoz, klattrin ve kaveolin bağımlı olmak üzere 2'ye ayrılmaktadır. Klattrin bir ağır, bir hafif zincir olmak üzere üç kollu triskelien yapısında bir proteindir. Klattrin bağımlı endositozda plazma membranında spesifik yerlerde reseptörler bulunmaktadır (Şekil 4.5.3.). Klattrin, içeri alınacak olan moleküle özgü reseptörün bulunduğu bölgede adaptin proteini aracılığıyla plazma membranına bağlanır. Ligandın bağlanması ardından plazma membranı hücre içine doğru bir çukur oluşturur. Guanozin trifofataz (GTPaz) enzim ailesine ait olan dinamin proteini hücre içine doğru olan bu çukuru keserek klattrin kaplı çukuru plazma membranından ayırır (81). KTB yapısında bulunan proteinlerin hücre içine alınması klattrin-bağımlı endositoz mekanizmasıyla gerçekleşmektedir. Sıkı bağlantı yapılarının kapı ve savunma görevleri, diğer bir deyişle sıkı bağlantı proteinlerinin yapım ve yıkım mekanizması endositoz olayı aracılığıyla gerçekleşmektedir. Sertoli hücrelerinde okludin veziküllerinin hücre membranına taşınması testosteronun kontrolü altındadır. Su ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, kutuplaşma görülen Sertoli hücresinde preleptoten/leptoten evresindeki spermatozoidlerin KTB'ni geçmesi esnasında, transitozun ve kargo proteinlerinin transportunun kontrolünü testosteronun düzenlediğini göstermişlerdir (82). Yapılan çalışmalar testosteronun ve klattrin-bağımlı endositozun KTB sıkı bağlantı proteinlerinin yapım ve yıkım aşamasında ne kadar önemli bir role sahip olduklarını ortaya koymaktadır.

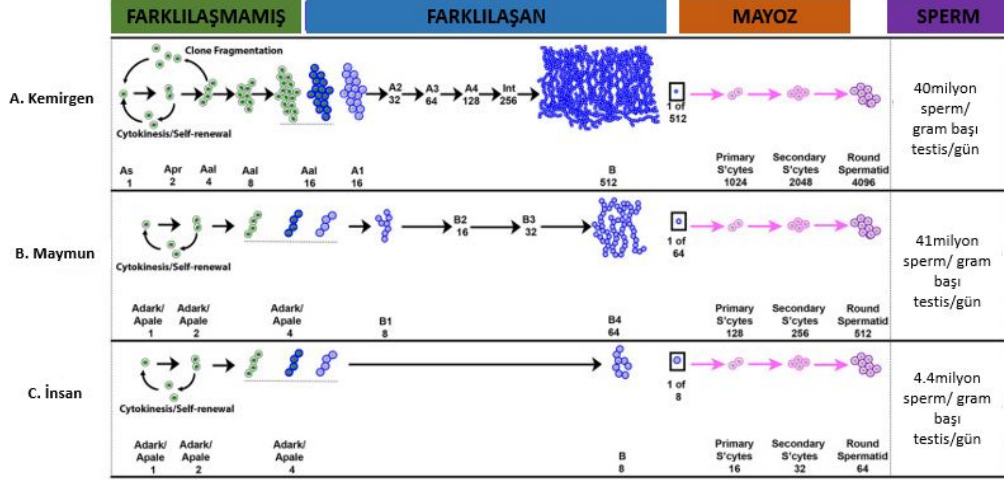


Şekil 4.5.3. Klatrin-bağımlı endositozda, vezikülün hücre içerisine alınmasının şematize gösterimi.

4.6. Spermatogenez

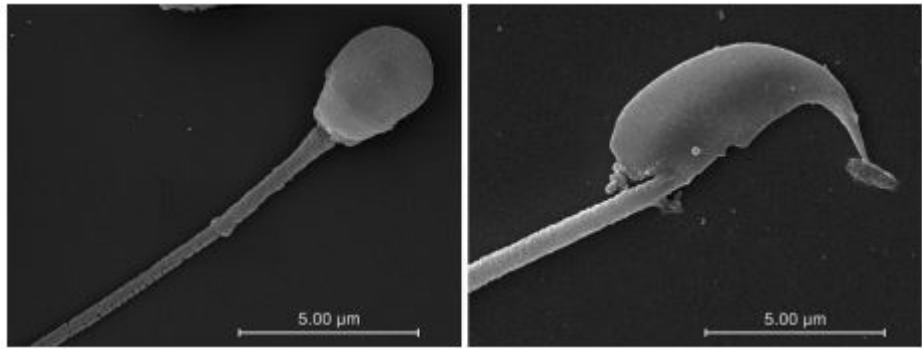
Spermatogenez, testislerde bulunun seminifer tübüllerde gerçekleşen kompleks ve iyi organize edilmiş bir süreçtir. İnsanda spermatogenez yaklaşık 72-74 gün sürerken, farede bu süre yaklaşık 35 gündür. 3 önemli evreye ayrılmaktadır; 1) spermatogonyal kök hücrelerin kendini yenilemesi, 2) mayoz bölünme ile diploid kromozom sayısının haploide indirgenmesi ve 3) spermiyogenezis'tir. Farede farklılaşmamış olan kök hücreler tip A, insanda ise tip A_{koyu} spermatogonya olarak adlandırılmaktadır. Farklılaşma evresine giren spermatogonyalar insanda $A_{açık}$, farede ise A1 olarak isimlendirilir. Farede farklılaşan spermatogonya 5 mitotik bölünme geçirdikten sonra preleptoten spermatosite dönüşmektedir. Bu bölünmeler ardından, spermatositler mayoz bölünmeye girerler (Şekil 4.6.1.). Bu aşamadan itibaren olan bölünmeler ve spermiyogenezis aşaması hem farede hem de insanda aynı yolla devam etmektedir (83). A_{pr} ve A_{al} spermatogonyal kök hücre progenetörü olan çok küçük embriyonik benzeri kök hücrelerin (VSEL'ler) insanda ve farede buldukları bilinmektedir (84, 85). Çok küçük embriyonik benzeri kök hücreler (VSEL'ler), soy işaretleyicileri için negatif olan ve farelerde Sca-1'i ve insanlarda CD133'ü eksprese eden oldukça küçük hematopoetik olmayan pluripotent hücrelerin bir popülasyonunu temsil eder. Embriyonik benzeri özellikleri, pluripotensin markörlerinin ekspresyonunu; her üç germ-katmanının hücresel türevlerine yol açma

kabiliyeti; ve embriyoid benzeri cisimler oluşturma yetenekleridir. Aslında, sakin VSEL'ler, yetişkin organlarında epiblast türevli hücre kalıntılarını temsil edebilir (86).



Şekil 4.6.1. Kemirgen, maymun ve insanda spermatogenez aşamalarının karşılaştırılması (87).

Kemirgen ve insan spermi arasında morfolojik olarak da farklılıklar bulunmaktadır. İnsan sperminde baş kısmındaki akrozom çekirdeğin üzerinde ve konik şekildedir, kemirgenlerde akrozom çekirdeğin yan ve üstünde çentik şeklindedir (Şekil 4.6.2.).



Şekil 4.6.2. İnsan (sol) ve kemirgen (sağ) sperminin taramalı elektron mikroskop görüntüsü (88).

5. MATERİYAL VE METOT

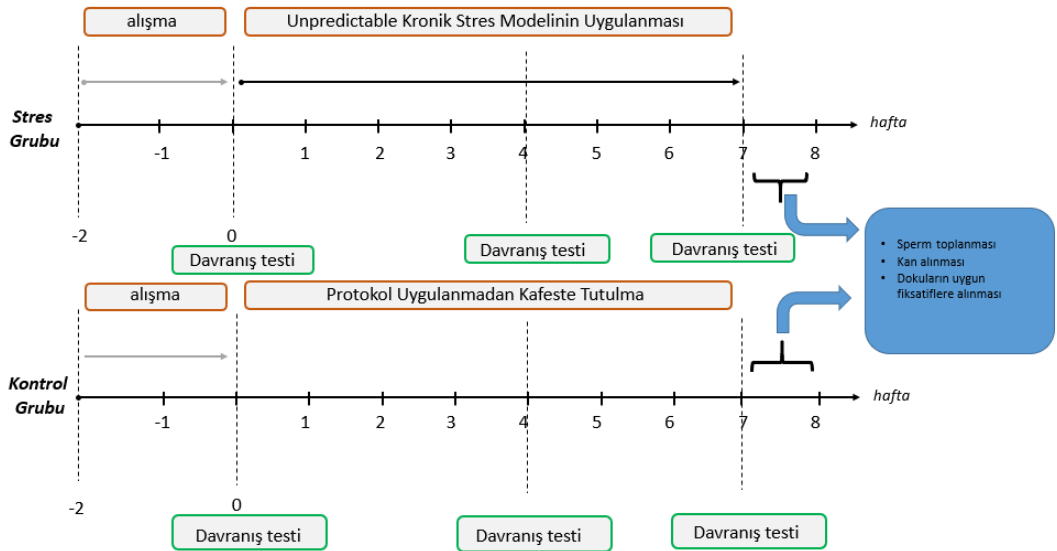
5.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmanın yapılabilmesi için İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'ndan onay alındı (38828770-604.01.01-E.42875). Çalışmamızda Medipol Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi MEDİTAM'da üretilen 3 aylık, ağırlıkları 25-30 gr arasında değişen 34 adet C57BL/6 cinsi erkek fare kullanıldı. Erkek fareler deney süresi boyunca, günlük su ile beraber %21 oranında protein içeren standart pelet yemlerle (Purina) *ad libitum* beslendi.

5.1.1. Deney Grupları

Kontrol Grubu (n=10): Fareler hiçbir stresöre maruz bırakılmadı. Deney süresi boyunca optimum laboratuvar koşulları altında, $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, standart 12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutuldu.

Stres Grubu (n=14): Farelere, Monteiro ve ark.'nın geliştirdiği unpredictable kronik stres protokolünün modifikasyonu 7 hafta boyunca uygulandı (89). Deney planı Şekil 5.1.1.1.'de özetlenmiştir.



Şekil 5.1.1.1. Deney planı

5.1.1.1. Unpredictable Kronik Stres (UKS) Modeli

Unpredictable Kronik Stres (UKS) modeline başlamadan 2 hafta önce deney hayvanlarının kiloları dikkate alınarak kontrol ve stres olmak üzere 2 gruba ayrıldı ve 2 hafta boyunca haftada 2 defa deney sahibine alışması için elle tutuldu. UKS modeli Monterio ve ark.'nın geliştirdiği model modifiye edilerek uygulandı (89). Kullanılan stresörler;

Hareketsizlik; 10 adet delik açılan 50 ml'lik falkon tüpüne yerleştirilen farelerin 1 saat boyunca hareket yeteneğinin kısıtlanması,

Sallama; farelerin 5'li gruplar halinde plastik kaba konup 150 rpm'de 1 saat boyunca sallanması,

Eğik kafes; kafeslerin 8 saat boyunca 45 derecelik açı ile eğik konumda tutulması,

Işık değişimi; 1 gün süreyle ışığın gündüz kapatılıp gece açılması,

24 saat aydınlık; ışık gece kapatılmadan 24 saat boyunca ışığa maruz bırakılması,

Sosyal yenilgi; deney hayvanının, plastik bölme ile ayrılmış bir kafese CD1 türü agresif fare ile beraber bırakılması,

Isı; farelerin 30 cm mesafeden 10 dakika boyunca sıcak ayarda çalısır saç kurutma makinasına maruz bırakılmasıdır.

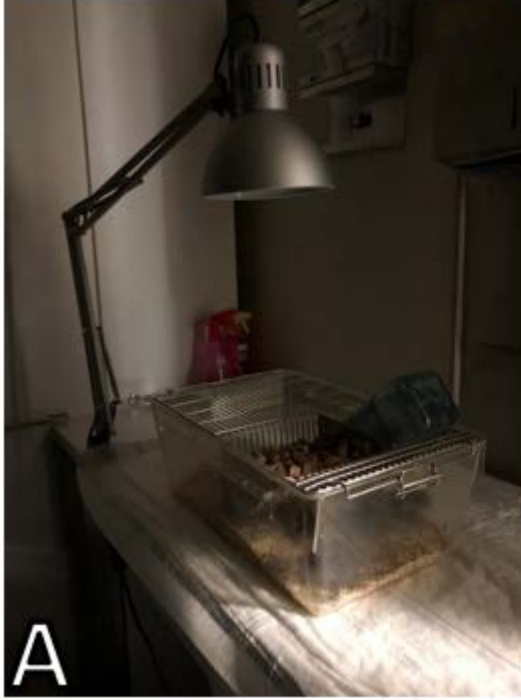
Deney hayvanları merkezinde CD1 tür fare bulunmamasından dolayı, bu stresör **nemli talaş** stresörü ile değiştirildi. Yapılan pilot çalışma ve literatürde kullanılan süreler göz önüne alınarak hareketsizliğin süresi 4 saate çıkartıldı. 200 mg talaşa 100 ml su konularak hazırlanan kafeslerde hayvanlar 8 saat bekletildi (90). Tüm stresörler Şekil 5.1.1.1.1.'de gösterildiği gibi randomize bir şekilde uygulandı. Stresörlerin uygulanma biçimi Resim 5.1.1.1.1.'de ve Resim 5.1.1.1.2.'de gösterilmiştir.

| Gün Hafta | Pazartesi | Salı | Çarşamba | Perşembe | Cuma | Cumartesi | Pazar |
|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|------------------|---------------|------------------|
| 1 | ISI | SALLAMA | HAREKETSİZLİK | NEMLİ TALAŞ | HAREKETSİZLİK | HAREKETSİZLİK | EĞİK KAFES |
| 2 | HAREKETSİZLİK | SALLAMA | NEMLİ TALAŞ | HAREKETSİZLİK | SALLAMA | NEMLİ TALAŞ | HAREKETSİZLİK |
| 3 | HAREKETSİZLİK | NEMLİ TALAŞ | HAREKETSİZLİK | EĞİK KAFES | NEMLİ TALAŞ | HAREKETSİZLİK | SALLAMA |
| 4 | NEMLİ TALAŞ | HAREKETSİZLİK | NEMLİ TALAŞ | SALLAMA | HAREKETSİZLİK | SALLAMA | ISI |
| 5 | HAREKETSİZLİK | EĞİK KAFES | ISI | HAREKETSİZLİK | NEMLİ TALAŞ | IŞIK DEĞİŞİMİ | IŞIK DEĞİŞİMİ |
| 6 | ISI | SALLAMA | HAREKETSİZLİK | IŞIK DEĞİŞİMİ | 24 SAAT AYDINLIK | HAREKETSİZLİK | ISI |
| 7 | HAREKETSİZLİK | NEMLİ TALAŞ | HAREKETSİZLİK | ISI | SALLAMA | HAREKETSİZLİK | 24 SAAT AYDINLIK |

Şekil 5.1.1.1.1. Kronik stres modeli uygulanma protokolü.



Resim 5.1.1.1.1. UKS modeli oluşturmak için kullanılan stresrler. A) Isı, B) Sallama, C) Hareketsizlik, D) 24 saat aydınlık.



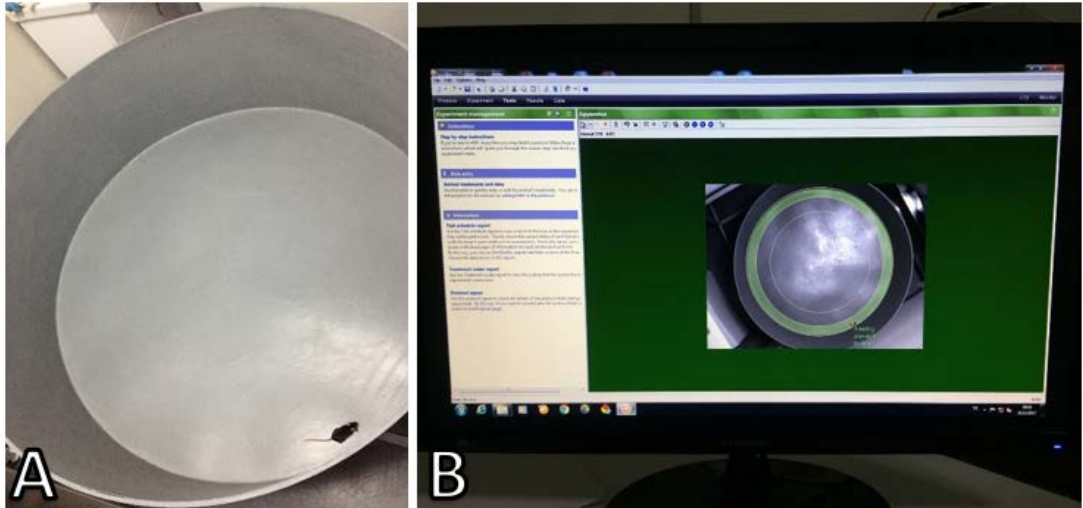
Resim 5.1.1.1.2. UKS modeli oluşturmak için kullanılan stresörler. A) Gündüz karanlık (Işık Değişimi), B) Nemli talaş, C) Eğik kafes, D) Gece aydınlık (Işık Değişimi).

5.2. Davranış Deneyleri

Referans değeri (baseline) oluşturmak için stres protokolüne başlamadan 1 gün önce her iki gruba da açık alan, yükseltilmiş-o-labirent ve kuyruktan asma testleri uygulandı. Stres protokolünün başlatılmasından sonra 4. haftada ve 7. haftanın sonunda davranış testleri tekrarlandı.

5.2.1. Açık Alan Testi

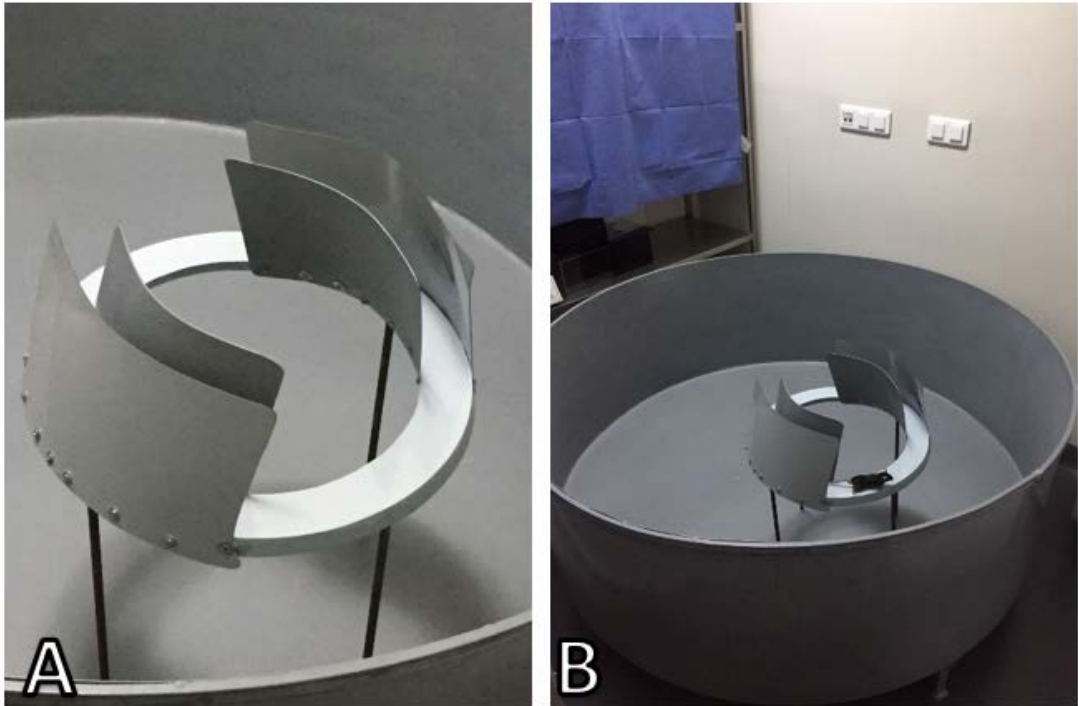
Farelerin keşif aktivitelerini test etmek için açık alan testi uygulandı. Bu test alanı, çapı 150 cm olan beyaz plastik zemin ile yüksekliği 35 cm olan beyaz polipropilen duvarla çevrelenmiş açık bir alandır. Bu alan 3 kısma ayrılmaktadır; en dış kenar zonu (çapın duvara yakın %17,7'lik kısmı), orta geçiş zonu (çapın %32,3'lük kısmı) ve en iç merkez zonudur (çapın %50'lik parçasını içeren merkez kısmı). Fareler davranış testine başlamadan önce testin yapılacağı odada 30 dakika tutularak alışmaları sağlandı ve daha sonra merkeze bırakılarak 600 saniye boyunca kamera ile gözlemlendi. Deney hayvanının adımları kamera ile kaydedildi ve Any-maze (Stoelting Co., Wood Dale, IL) yazılımı ile analiz edildi. Spontan lokomotor aktiviteyi belirlemek için total mesafe ölçüldü. Keşif aktivitesini değerlendirmek için "rearing aktivitesi" olarak adlandırılan, iki arka ayak üzerine kalkma hareketi sayıldı (90) (Resim 5.2.1.1.).



Resim 5.2.1.1 Açık alan testi deney düzeneği. A) Açık alan kazanı. B) Any-maze yazılımı.

5.2.2. Yükseltilmiş-O-Labirent Testi

Labirent testi anksiyeteyi analiz etmek amacıyla kullanılmaktadır. 5,5 cm çapında yuvarlak platform tabandan 40 cm yukarıya yerleştirildi. Daire şeklindeki yürüyüş alanı aydınlık açık ve karanlık kapalı alan içermektedir. Bu alanlarda geçirilen toplam süreler kamera ile kayıt edildi. Açık alandan düzeneğe bırakılan fareler 600 saniye boyunca gözlemlendi ve sonuçlar Any-maze (Stoelting Co., Wood Dale, IL) yazılımı ile analiz edildi (91, 92) (Resim 5.2.2.1.).



Resim 5.2.2.1 Yükseltilmiş-O-labirent testi deney düzeneği.

5.2.3. Kuyruktan Asma

Kuyruktan asma testi hayvanların depresyon seviyelerini ölçmek için uygulanan bir davranış testidir. Davranış kutularına teker teker yerleştirilen fareler yerden 60 cm yüksekliğindeki borulara kuyruklarından tıbbi bant ile asılarak 300 saniye boyunca asılı bırakıldı. İlk 1 dakika alışma süreci olarak kabul edildi ve geri kalan süre boyunca hareketli ve hareketsiz oldukları zamanlar zamanlayıcı tutularak kaydedildi. Pasif ve tepkisiz olarak kaldıkları zamanlar hareketsiz olarak kabul edildi (93) (Resim 5.2.3.1.).



Resim 5.2.3.1 Kuyruktan asma testi deney düzeneği.

5.3. Işık Mikroskobik Preparasyon ve Histolojik Skorlama

Dekapitasyonun ardından her iki deney grubuna ait tüm hayvanlardan alınan sağ testislerin yarısı ışık mikroskobik incelemeler için hazırlandı. Dokular Bouin Fiksatifinde 20 saat fikse edildi. Lityum karbonat ile doyurulmuş %70 alkol içeren solüsyonda sarı renk gidene kadar yaklaşık 2 gün boyunca bekletildikten sonra yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidrate edildi ve ksilen ile şeffaılaştırıldı. 60 °C'lik etüvde parafin içinde 1 gece boyunca bekletildikten

sonra oda ısısında parafin içine gömülerek bloklandı. Parafin bloklardan mikrotom (Thermo Scientific, HM340E) ile yaklaşık 5 µm kalınlığında alınan kesitler Hematoksilen-Eozin (H&E) (Empire Genomics, BPK 4088-2) ile boyandı. Her kesitte, preparat saat yönünde kaydırılarak rastgele seçilen 10 benzer alanda bulunan 50 seminifer tübül 20X büyütmede Johnsen Skorlaması'na göre değerlendirildi (94). Kesitler Nikon Eclipse (Nikon® Instruments Inc., Amerika Birleşik Devletleri) ile görüntüledi. Johnsen skorlaması aşağıda Tablo 5.3.1.'de belirtilen kriterlere göre yapılmıştır (94).

Tablo 5.3.1. Johnsen skorlama kriterleri

| Johnsen Skorlaması | |
|---------------------------|---|
| 10 | Tamamlanmış spermatogenezis: Çok sayıda olgun spermatid ve spermiyasyon zonları |
| 9 | Spermatogenezde disorganizasyon: Olgun spermatid sayısında ve spermiyasyon zon sayısında azalma |
| 8 | Az miktarda spermatozoa mevcut |
| 7 | Spermatozoa yok, bol spermatid var |
| 6 | Az miktarda spermatid var |
| 5 | Spermatozoa ve spermatid yok, bol miktarda spermatosit var |
| 4 | Az miktarda spermatosit var |
| 3 | Sadece spermatogonyum var |
| 2 | Hiç germ hücresi yok, sadece Sertoli hücresi var |
| 1 | Tübüllerde hiç hücre yok |

5.4. Biyokimyasal Analizler

5.4.1. Malondialdehit (MDA) Tayini

Dekapitasyon esnasında tüplere alınan kan, 10 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildikten sonra serumları başka tüplere konuldu. Çalışmada elde edilen serumlardan MDA tayini Lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA) ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyon sonucu oluşan pembemsi rengin absorbansının

spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi ile ölçüldü. Numune ve kör tüpü olmak üzere iki adet tüp hazırlandı. Numune tüpünün içerisine 50 µl serum ve 0,25 ml 1,22M trikloroasetik asit (TCA) ilave edilerek vorteks ile karıştırıldı ve 15 dakika oda ısısında bekletildi. 15 dakika sonunda 0,047 M 0,15 ml tiobarbitürik asit (TBA) eklendi, vorteks ile karıştırıldı ve 30 dakika su banyosu içinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 0,40 mL n-bütanol ilave edildi ve vorteks ile karıştırıldı. Elde edilen numune karışımı 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve 0,2 ml bütanol fazı 96 well plateki kuyucuk içine koyuldu. Kör olarak ise yine 0,2 ml n-bütanol kullanıldı. Örnek tüpünden alınan 0,2 ml bütanol fazının absorbansı 532 nm'de köre karşı okundu ve değerler kaydedildi. MDA için saptanmış ekstinksiyon kat sayısı ($1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak sonuçlar hesaplandı (95).

5.4.2. Hormon Ölçümleri

Testosteron ve kortikosteron seviyesi Medipol Mega Hastaneler Kompleksi Biyokimya Laboratuvarı'nda Elektrokemilüminesans İmmünolojik Testi (ACLIA) Yöntemi ile cobas e 411 otoanalizörü kullanılarak ölçüldü. Yarışma prensibine göre işleyen yöntemde numune testosterona ve kortikosterona özgü biotinlenmiş monoklonal antikor ile inkübe edildi. Streptavidin kaplı mikropartiküller ve rutenyum kompleksi ile işaretlenmiş testosteron türevi eklendikten sonra bu kompleks biotin ile streptavidin etkileşimi aracılığı ile katı fazı bağlanmış oldu. Bağlanmamış maddeler ProCell/ProCell M ile uzaklaştırıldı. Elektrot üzerine voltaj uygulanması kemilüminesans emisyonunu indükledi ve foto çoğaltıcı ile ölçüldü. Sonuçlar, 2 noktalı kalibrasyonla cihaza özgü bir şekilde oluşturulan kalibrasyon eğrisi ve reaktif barkodu veya bir ana eğri ile belirlendi.

5.5. Sperm Fonksiyon Testleri

Skrotuma kesi atılarak epididimis çıkartıldı. Diseke edilen her iki epididimis önceden ısıtılıp 37°C'ye getirilmiş 200 µl G- Gamete Solüsyonu (Vitrolife, İsveç) içerisine konuldu. Medium içerisinde ısıtıcı tablada muhafaza edilen epididimisler insulin enjektörü ile mekanik olarak parçalandı ve spermlerin medium içerisinde serbest olarak yüzmeleri için 10 dakika inkübe edildi.

5.5.1. Sperm Konsantrasyonu

Makler sperm sayma kamarasına 10 µl semen örneği koyuldu. Işık mikroskopunda 20X objektif altında 100 kare sayıldı ve sonuç milyon/ml olarak verildi.

5.5.2. Toplam Motilite ve Progresif Motilite

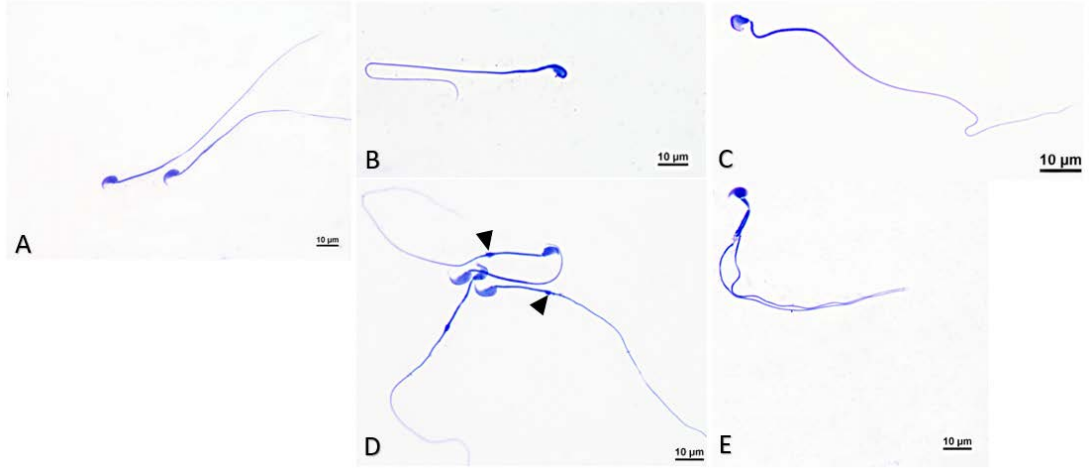
Elde edilen örneklerden 10 µl alınarak önceden ısıtılmış Makler sperm sayma kamarasına yerleştirildi. Işık mikroskopunda, 40X objektif altında 100 kare sayılarak spermelerin motiliteleri skorlandı. Motilite değerlendirilirken spermeler aşağıda ayrıntıları belirtilen 4 gruba (A, B, C, D) ayrıldı:

- A motilite*; progresif motil (ileri hızlı hareketli) spermeler,
- B motilite*; yavaş hareketli spermeler,
- C motilite*; yerinde hareketli spermeler ve
- D motilite*; hareketsiz spermeleri skorlamak için kullanıldı.

Sonuçlar yüzde (%) olarak hesaplandı. Toplam motilite A, B ve C motilite oranları (%) toplanarak elde edilirken, progresif motil sperm oranı A motilite oranı (%) olarak belirtildi.

5.5.3. Sperm Morfoloji Analizi

10 µl semen örneği smear yapacak şekilde lama yayıldı ve kurutulduktan sonra Diff-Quick ile boyandı. Sperm yayma preparatları, metanol içeren tri-metan boyası içerisinde 15 saniye boyunca fikse edildi. 10 saniye ksantin mavisi içinde bekletildikten sonra 15 saniye boyunca Azine A ve metil mavisi içerisinde bekletildi. Ardından Nikon Eclipse (Nikon® Instruments Inc., Amerika Birleşik Devletleri) 100X objektif ile immersiyon yağı kullanılarak skorlandı. En az 100 sperm hücresi morfolojik olarak normal spermeler ile anormal spermeler belirlenerek sayıldı. Spermeler anormal morfoloji kriterlerine göre bükülmüş boyun, kuyruk ve boyun kısmında sitoplazmik droplet birikimi, başsız kuyruk ve akrozom morfoloji bozukluğuna göre değerlendirildi (96). Sonuç % normal morfoloji oranı olarak verildi (Resim 5.3.3.1.).



Resim 5.3.3.1. Diff-Quick boyaması ile normal sperm ve sperm morfoloji anomalileri. A) Normal sperm. B) Akrozom anomalisi. C) Baş anomalisi. D) Kuyrukta sitoplazmik droplet. E) Çift kuyruk. (A-E:100X).

5.5.4. Kromatin Bütünlüğü Analizi

Sperm kromatin bütünlüğü analizi için toluidin mavisi boyaması yapıldı. Toluidin mavisi metakromazi gösteren bazik bir boyadır. Bazik özelliğinden dolayı çekirdekte bulunan fosfat gruplarına bağlanma eğilimi yüksektir. DNA'da hasar olması durumunda toluidin mavisi bu fosfat gruplarına bağlanarak çekirdeği koyu mavi boyamaktadır. Bu boyanma özelliğinden dolayı kromatin bütünlüğü olmayan spermeler koyu mavi boyanırken, normal kromatin bütünlüğü sergileyen spermeler açık mavi boyanmaktadır (97). Her 2 gruptan hazırlanan sperm yayma preparatları aseton: %96 alkol (1:1) solüsyonu içerisinde 1 saat boyunca bekletildi. Preparatlar 0.1 N HCl ile hidrolize edildi. Sonrasında %0.05 toluidine mavisi ile oda ısısında 5 dakika boyandı. Biomount (Bio-Optica, 1611) ile kapatıldı ve Nikon Eclipse (Nikon® Instruments Inc., Amerika Birleşik Devletleri) 100X yağlı objektif ile incelenerek skorlandı. En az 100 sperm hücresi sayıldı, koyu ve açık renkli sperm çekirdekleri sayılarak sonuç % normal kromatin bütünlüğü oranı olarak verildi.

5.5.5. Akrozomal Reaksiyon Analizleri

Her 2 gruba ait tüm sperm örnekleri önceden ısıtılmış kalsiyum iyonofor A23187 (C7522, Sigma Aldrich) içeren medium içerisinde akrozomal reaksiyona girmeleri için tetiklendi. 1 saat inkübasyonun ardından 500 g'de 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldıktan sonra PBS eklendi. Bu işlem 2 defa tekrar edildikten sonra, 10 µl'si lama yayıldı. FITC-PNA (Vector Lab, FL-1071) boyaması uygulandı ve akrozomal reaksiyona giren ve girmeyen spermier konfokal mikroskopta (LSM 780, Carl Zeiss, Almanya) 40X yağlı objektif ile görüntüledi. FITC- PNA boyaması için sperm yayma preparatları +4 °C'de PFA içerisinde 15 dakika boyunca fikse edildi. PBS ile yıkandıktan sonra %0.1 Triton X-100 ile 10 dakika boyunca permeabilize edildi. %5 BSA ile bloklanan yaymalar 2 saat boyunca oda sıcaklığında FITC-PNA'de (10µg/ml) inkübasyona bırakıldı. PBS ile yıkandıktan sonra DAPI ile çekirdek boyaması yapıldı ve mikroskop ile görüntüledi. Akrozomal reaksiyona girmeyen sperm başında bütün bir şekilde yeşil floresan görülürken, reaksiyona giren spermierin baş kısımlarında yeşil floresan “yok”, “parçalanmış” ya da “ekvatoryal kısımda” olarak değerlendirildi (98).

5.5.6. Akrozomal Bozukluk Analizi

Diff-Quick boyaması ile boyanan sperm yaymalar aynı zamanda akrozom bozukluk oranı için de değerlendirildi. Sperm yaymalar ilk öce metanol içeren trimetan boyası içerisinde 15 saniye boyunca fikse edildi. 10 saniye ksantin mavisi içinde bekletildikten sonra, 15 saniye Azine A ve metil mavisi içerisinde bekletildi. Ardından immersiyon yağı kullanılarak Nikon Eclipse (Nikon® Instruments Inc., Amerika Birleşik Devletleri) 100X objektif ile skorlandı. En az 100 sperm hücresi sayıldı ve morfolojik olarak normal akrozomlar ile anormal akrozomlar ayrıldı. Sonuç % anormal akrozomal indeks oranı olarak verildi.

5.6. Western- Blot Protein Analizleri

Testis dokusunun yarısından alınan taze doku örnekleri -80°C'de saklandı. Alınan dokular RIPA lizis tampon sistemi (sc-24948, Santa Cruz Biotechnology) ile homojenize edildi. Homojenat 4 °C'de 15 dakika 10.000 g'de santrifüj edilerek süpernatant toplandı. Protein miktar tayini Qubit 3.0 Fluorometer cihazı (Invitrogen

Life Technologies Corporation, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak hesaplandı. %1,25 2-merkaptoetanol, 4X laemmlili tampon solüsyonu (161-0747, Biorad LifeSciences Research) ve ddH₂O ilave edilmiş örnekler 90 °C’de 5 dakika denatüre edildi. İnkübasyon sonrasında örnekler jel elektroforez yapılıncaya kadar +4 °C’de buz üzerinde bekletildi. Dikey jel elektroforez tankı (1658004, Biorad LifeSciences Research) içerisine mini-Protean TGX Precast protein jeli (4569033, Biorad LifeSciences Research) yerleştirildi ve elektroforez için gerekli olan tampon çözelti (1610732, Biorad Life Sciences Research) eklendi. Jele ilk önce protein belirteci olan Precision Plus Protein-All blue standards (163-0393, Biorad LifeSciences) yüklendi. Her kuyucuğa 30 µg protein içerecek şekilde hesaplanan örnekler yüklendi. Jel 200 volt’ta yaklaşık 1 saat yürütüldü. Proteinler jelden PVDF membrana Trans-blot turbo transfer sistemi (1704155, Biorad Life Sciences Research) kullanılarak aktarıldı. Özgün olmayan bağlanmaları bloklamak için membranlar Tris-Buffered Saline (TBS-T) ile hazırlanan %5 yağsız süt tozu (sc-2325, Santa CruzBiotechnology) ile oda ısısında 1 saat inkübe edildi. Bloklanan membranlar 1 gece boyunca +4 °C’de, anti-klatrin X22 monoklonal (1:300) (MA1-065, Thermo Scientific), anti-ZO-1 poliklonal (1:200) (61-7300, Thermo Scientific) ve anti-Kludrin 11 poliklonal (1:300) (36-4500, Thermo Scientific) ile inkübe edildi. Membranlar TBS-T ile 3 kez 5’er dakika yıkandıktan sonra sekonder antikor (1:1000) (Goat anti Rabbit sc-2004 ve Goat anti Mouse sc-2005, Santa Cruz) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Membranlar TBS-T ile 3 kez 5’er dakika yıkandıktan sonra ECL Western görüntüleme solüsyonu (1705060, BioRad Life Sciences Research) ile 5 dakika inkübe edildi. Ardından Chemidoc MP görüntüleme sistemi (1708280, BioRad Life Sciences Research) ile görüntülendi. Protein miktarı kontrolü β-Aktin (sc-47778, Santa Cruz) kullanılarak yapıldı ve alınan görüntüler Image J programı ile analiz edildi.

5.7. İmmünfloresan Analizleri

Kriyomikrotom (CM1950, Leica, Almanya) ile pozitif şarjlı lamalar üzerine 7 µm kalınlığında alınan kesitler 15 dakika boyunca %4 ’lük PFA içerisinde fikse edildi. PBS ve distile su ile yıkanmalarının ardından, PAP pen ile etrafı çizilen kesitlerin üzerine bloklama solüsyonu (%3 BSA, %0,1 Sodyum azid, %1 goat serum, %1 Tween-20) damlatıldı ve çalkalayıcı üzerinde 80 RPM’de 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Yıkama yapılmadan +4 °C’de buzdolabında 1 gece boyunca anti-klatrin

X22 monoklonal (1:1000) (MA1-065, Thermo Scientific), anti-ZO-1 poliklonal (1:100) (61-7300, Thermo Scientific) ve anti-Klaudin 11 poliklonal (1:100) (36-4500, Thermo Scientific) ile inkübe edildi. Kesitler PBS ile yıkandıktan sonra sekonder antikör goat anti rabbit IgG H&L; (1:400) (ab150077) ve goat anti Mouse IgG H&L; (1:400) (ab175473) ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Tekrar PBS ile yıkanmasının ardından DAPI ile 5 dakika boyunca çekirdek boyaması yapılan kesitler aqueous flouro mount (Sigma, F4680) ile kapatıldıktan sonra konfokal mikroskop (LSM780, Carl Zeiss, Almanya) ile görüntülendi.

5.8. Elektron Mikroskop Analizleri

Elektron mikroskopik (EM) incelemeler için Hua ve ark.'larının geliştirdiği *en-bloc* boyama metodu kullanıldı (99). Bu protokolda PBS kullanılmamaktadır, tüm solüsyonlar kakodilat tampon içerisinde hazırlanmıştır. Her aşama arasında distile su ile yıkandı. Kullanılacak olan yaklaşık 1mm³'lük testis dokusu, %25 gluteraldehit, %25 PFA, 2,2 mg kalsiyum klorür ve 1X kakodilat tampon içeren solüsyon 37 °C 'ye ısıtıldıktan sonra dokular bu fiksatif içerisinde oda sıcaklığında 20 dakika boyunca fikse edildi. Distile su yıkanan dokular %2'lik osmiyum ile post fikse edildi. %2.5 ferrosiyaniid solüsyonunda 15 dakika bekletildikten sonra %1'lik tiyokarbohidrazidde 40 °C'de 10 dakika bekletildi. %2'lik osmiyum tetroksitte 15 dakika bekletildikten sonra %1'lik uranil asetatda 40 °C'de 20 dakika bekletildi. Ardından kurşun aspartat'ta 50 °C'de 20 dakika bekletildi. Yükselen aseton serilerinden (%30, %50, %70, %90, %100x2) geçirildikten sonra Epon 812 kit (Sigma Aldrich 45359) ile gömme işlemi uygulanarak bloklar hazırlandı. Bloklardan 1 µm kalınlığında yarı ince kesitler alındı (Leica EM UC7), toluidin mavisi ile boyandı. Belirlenen bölgeler için bloklardan 60 nm kalınlığında ince kesitler alınıp, bu kesitler elektron mikroskopunda (GeminiSEM 500, Carl Zeiss, Almanya) incelendi.

5.9. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler Graphpad Prism 7.0 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA) programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki verilerin karşılaştırılması için Student's t-test ve One Way Anova testleri kullanıldı. Anlamli olan değerlere post-hoc Benferroni Testi uygulandı. Sperm analizleri için Graphpad Prism yazılımında Mann-

Whitney U testi uygulandı ve p değerleri elde edildi. Microsoft Office Excel 2016'da yüzde değerler kullanılarak grafik oluşturuldu. Veriler ortalama \pm SEM olarak verildi.

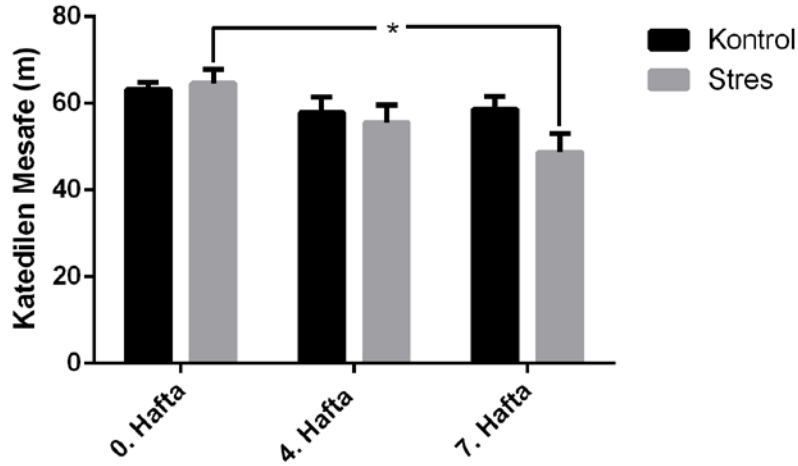


6. BULGULAR

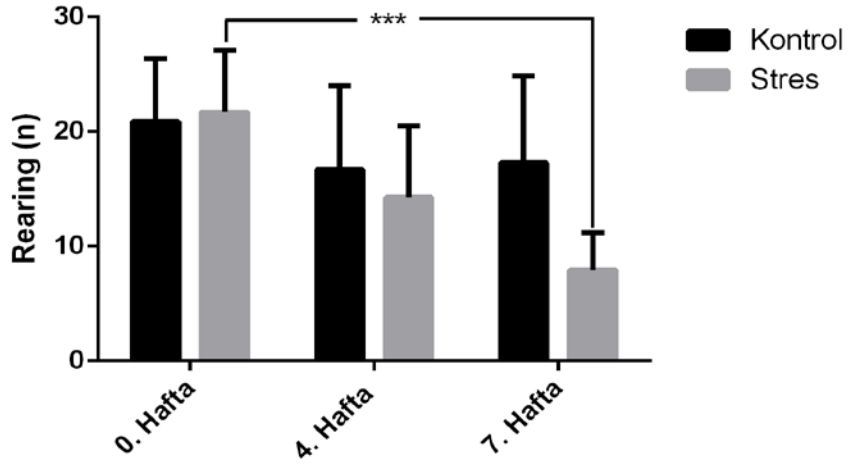
6.1. Davranış Testleri

6.1.1. Açık Alan Testi

Farelere stres modelini uygulamaya başlamadan önce baseline (taban değer) alınması için sıfıncı haftada açık alan testi uygulandı. Ayrıca aynı test 4. ve 7. haftada da uygulandı. Bu test için uygun platforma yerleştirilen fareler 600 saniye boyunca kamera ile izlendi. Katettikleri toplam mesafe ve rearing (n) aktiviteleri değerlendirildi. Haftalar karşılaştırıldığında, kontrol grubunda haftalar arasında istatistiki olarak bir fark görülmezken stres grubunda katedilen toplam mesafenin (m) 0. haftada 64.5 ± 2.9 ve 7. haftada 45.9 ± 4.1 olduğu görüldü (Şekil 6.1.1.1.). Rearing aktivitesinin (n) ise stres grubunda 0. haftada 21.7 ± 1.4 iken 7. haftada 8.1 ± 0.8 olduğu görüldü (Şekil 6.1.1.2.).



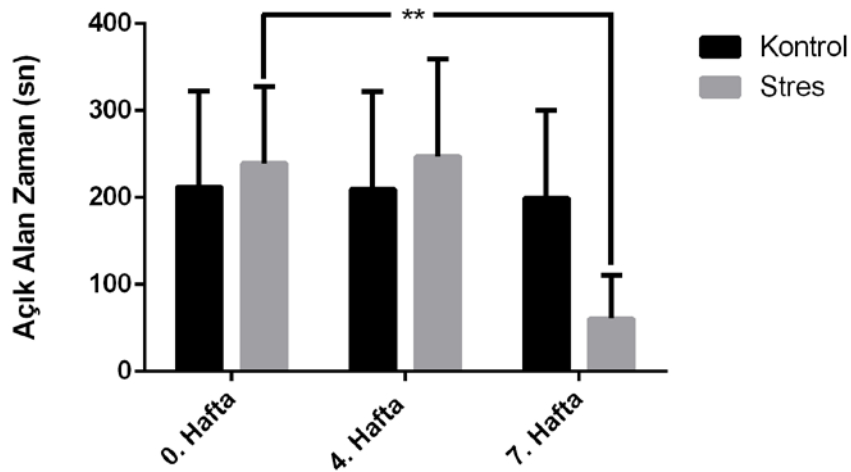
Şekil 6.1.1.1. Açık alan testinde hayvanların katettikleri toplam mesafenin (m) karşılaştırılması (* $p < 0.05$).



Şekil 6.1.1.2. Açık alan testinde rearing (n) aktivitesinin karşılaştırılması (***) $p<0.001$).

6.1.2. Yükseltilmiş-O-Labirent Testi

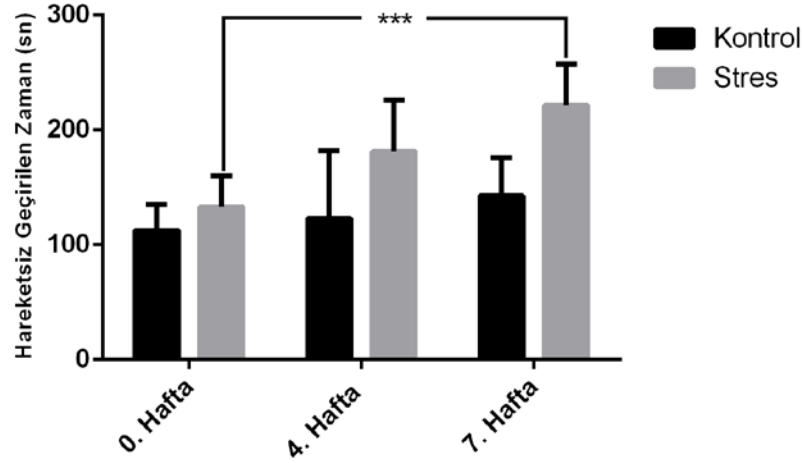
Kontrol grubundaki hayvanların açık alanda geçirdikleri zamanda (sn) bir farklılık görülmedi. Stres grubunda 0. haftada açık alanda geçirilen zaman 239.2 ± 22.7 iken 7. haftada bu süre 87 ± 20.7 olduğundan anlamlı bir düşüş görüldü (Şekil 6.1.2.1.) (** $p<0.01$).



Şekil 6.1.2.1 Yükseltilmiş-O-Labirent Testinde açık alanda geçirilen zamanın karşılaştırılması (sn) (** $p<0.01$).

6.1.3. Kuyruktan Asma

Kuyruktan asma testi analizleri sonucunda, kontrol grubunda haftalar karşılaştırıldığında hareketsiz kaldıkları zamanlar arasında bir fark görülmedi. Ancak stres grubunda hareketsiz kaldıkları süre (sn) 0. haftada 133.1 ± 6.9 iken, 7. haftada bu sürenin 221.6 ± 9.2 olup arttığı gözlemlendi (Şekil 6.1.3.1.) (***) ($p < 0.001$).



Şekil 6.1.3.1. Kuyruktan asma testinde hareketsiz kalma sürelerinin (sn) karşılaştırılması (***) ($p < 0.001$).

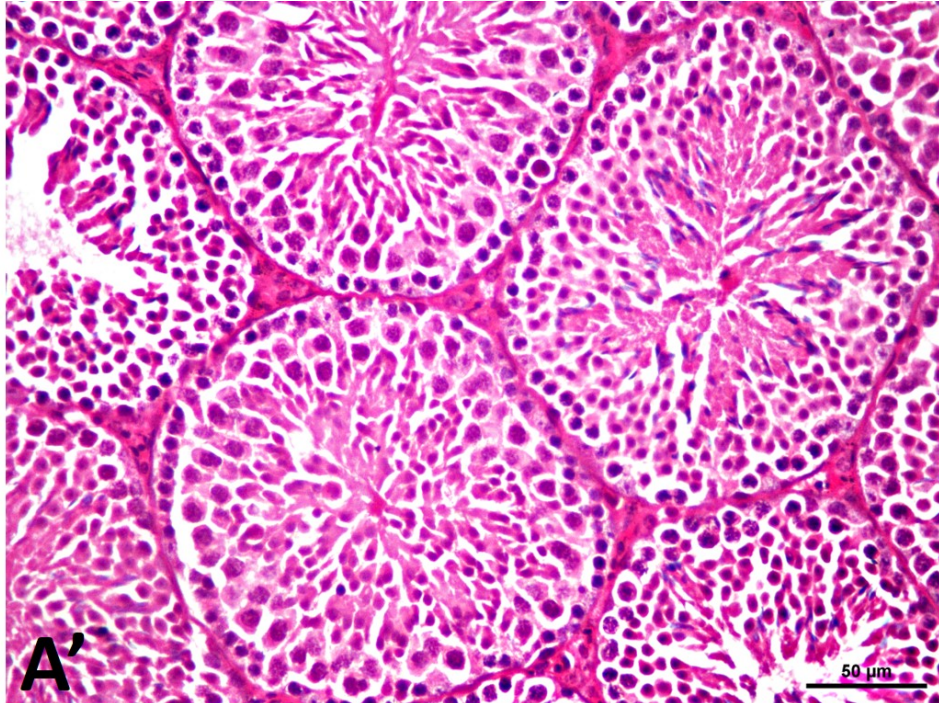
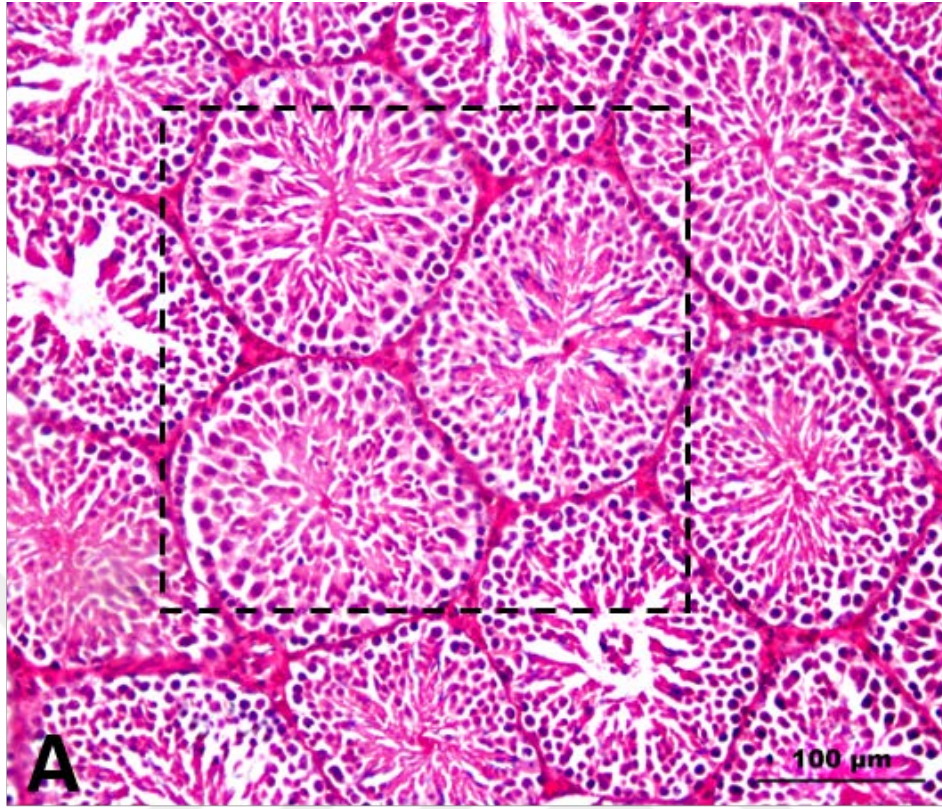
6.2. Histopatolojik Skorum

Histopatolojik skorum için ışık mikroskopik doku takibi yapıldı ve morfolojik değerlendirme için hematoxilen-eozin boyaması uygulandı. Histopatolojik olarak anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenmesi için yapılan Johnsen Skorumu sonucunda kontrol grubunda testis yapısında normal morfoloji gözlenirken, stres grubuna ait seminifer tübüllerde seminifer epitelde germ hücre dizisinin azalmasından dolayı, yapılan semikantitatif analiz sonucunda iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($*p < 0.05$) (Tablo 6.2.1.).

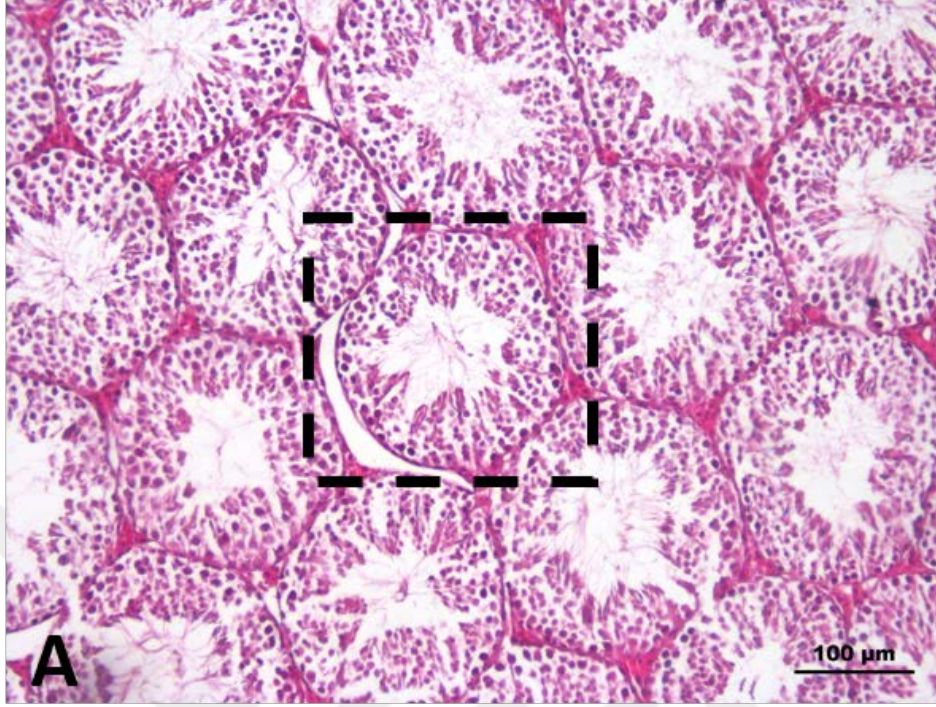
Tablo 6.2.1. Kontrol ve stres gruplarının Johnsen Skorlaması'na göre karşılaştırılması. Veri ortalama±SEM olarak verilmiştir (* $p<0.05$).

| Histopatolojik Analiz | KONTROL (n=10) | STRES (n=14) | p DEĞERİ |
|-----------------------|-------------------|-----------------|----------|
| Johnsen Skorlaması | 6.36±0.2 | 5.42±0.2 | 0.03* |

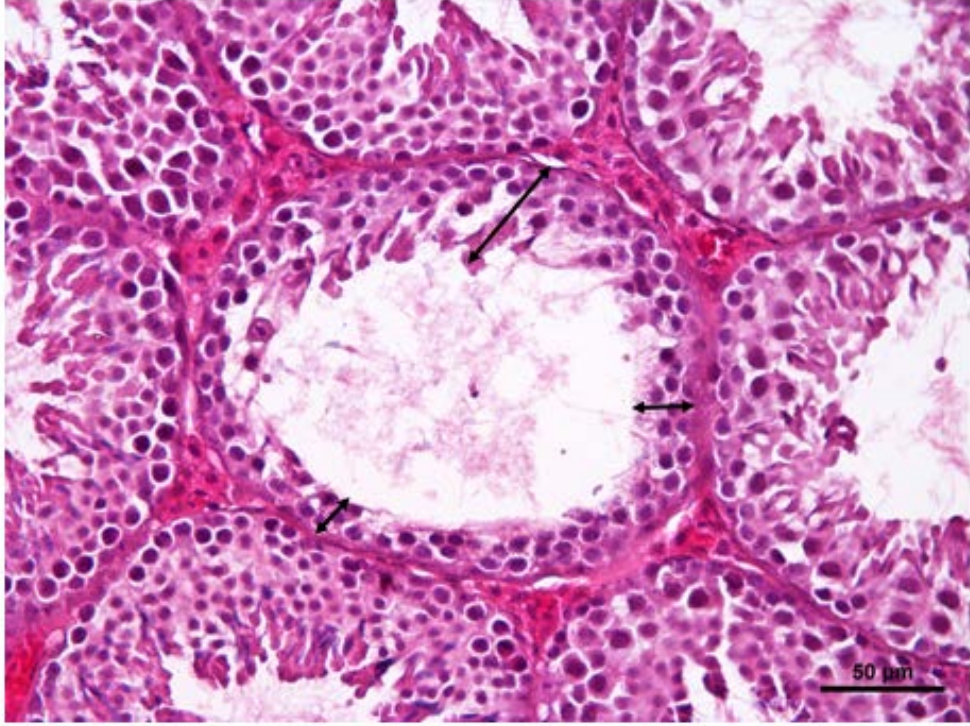
Morfolojik olarak yapılan histopatolojik değerlendirme sonucunda kontrol grubunda normal seminifer tübül yapısı gözlemlendi (Resim 6.2.1.). Stres grubunda ise seminifer tübül epitelinde açılmalar görüldü (Resim 6.2.2.). Ayrıca seminifer tübüllerdeki germ tabakasını oluşturan hücre tabakası sayısında azalma görüldü. Tübüllerin dejeneratif tübül morfolojisi sergilediği saptandı (Resim 6.2.3.). Stres grubunda belirli bölgelerde atrofik tübül yoğunluğunun arttığı görüldü (Resim 6.2.4.).



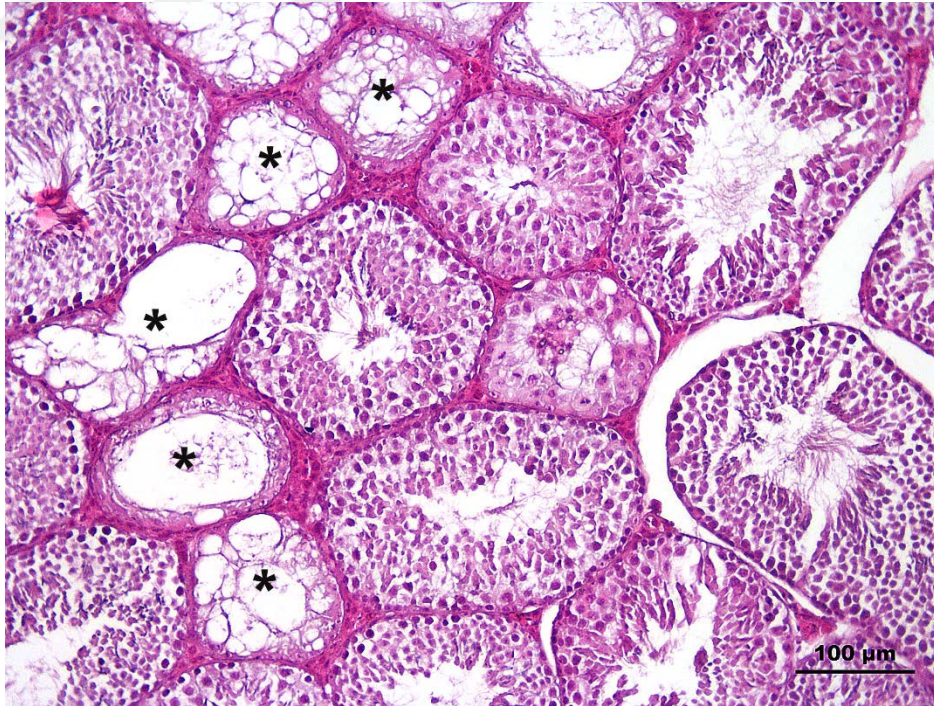
Resim 6.2.1. A) Kontrol grubunda normal seminifer tübül yapısı. A') A'daki görüntüde kesikli çizgilerle belirtilen alanın büyütülmüş hali. (A:20X, A': 40X)



Resim 6.2.2. A) Stres grubunda seminifer tübül epitelinde açılmalar. A') A'daki görüntüde kesikli çizgilerle belirtilen alanın büyütülmüş hali. (→) ile seminifer tübül epitelindeki açılmalar gösterildi. (A: 20X, A': 40X)



Resim 6.2.3. Stres grubunda seminifer tübül epitelinde germ hücre tabakası sayısında azalma görüldü (\longleftrightarrow) (40X).



Resim 6.2.4. Stres grubunda (*) atrofik tübüller (20X).

6.3. Biyokimyasal Analizler

6.3.1. MDA Tayini

Serumda ölçülen MDA miktarının kontrol grubunda 1.178 ± 0.11 $\mu\text{mol/L}$, stres grubunda 2.194 ± 0.13 $\mu\text{mol/L}$ olduğu görüldü (Tablo 6.3.1.1.).

Tablo 6.3.1.1. Kontrol ve stres grupları arasında MDA miktarının karşılaştırılması. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. (** $p < 0.01$)

| MDA ANALİZİ | KONTROL (n=10) | STRES (n=14) | p DEĞERİ |
|---------------------------|-------------------|-----------------|----------|
| MDA ($\mu\text{mol/L}$) | 1.17 ± 0.11 | 2.19 ± 0.13 | 0.002** |

6.3.2. Serum Hormon Ölçümleri

Serumda kortikosteron miktarı kontrol grubunda 0.29 ± 0.03 $\mu\text{g/dl}$, stres grubunda ise 0.64 ± 0.08 $\mu\text{g/dl}$ olarak ölçüldü. Testosteron analizi sonuçlarına göre, kontrol grubunda testosteron miktarı 3.56 ± 0.75 ng/ml iken, stres grubunda 1.17 ± 0.18 ng/ml olduğu görüldü (Tablo 6.3.2.1.).

Tablo 6.3.2.1. Kontrol ve stres gruplarının kortikosteron ve testosteron seviyelerinin karşılaştırılması. Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. (** $p < 0.01$)

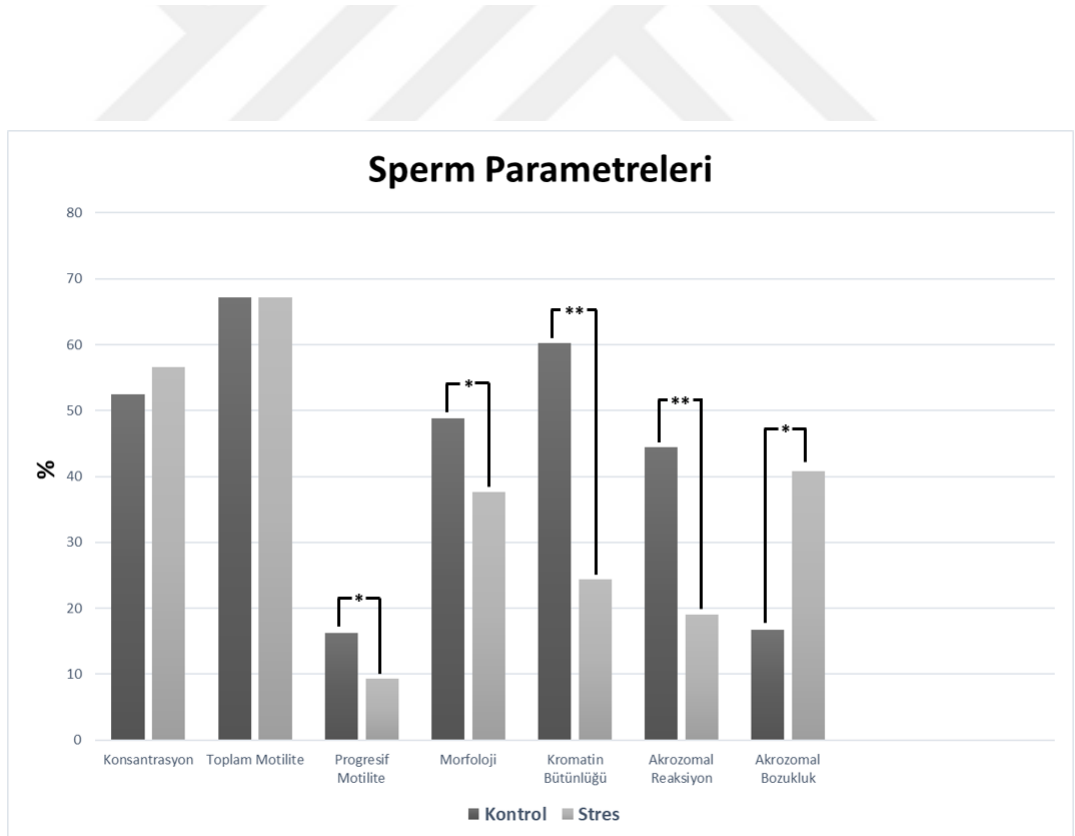
| Hormon Ölçümleri | KONTROL (n=10) | STRES (n=14) | p DEĞERİ |
|------------------------------------|-------------------|-----------------|----------|
| Kortikosteron ($\mu\text{g/dl}$) | 0.29 ± 0.03 | 0.64 ± 0.08 | 0.004** |
| Testosteron (ng/ml) | 3.65 ± 0.75 | 1.17 ± 0.18 | 0.005** |

6.4. Sperm Fonksiyon Testleri

Stres ve kontrol gruplarının sperm parametreleri (sperm konsantrasyon, progresif motilite, motilite, morfoloji, kromatin yapı analizi, akrozomal indeks ve akrozomal reaksiyon) değerlendirilip sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Sonuçlar Tablo 6.4.1.'de ve Şekil 6.4.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 6.4.1. Kontrol ve stres grupları arasında sperm parametrelerinin karşılaştırılması. Veriler ortalama±SEM olarak verildi. (* $p<0.05$, ** $p<0.001$).

| SPERM PARAMETRELERİ | KONTROL (n=10) | STRES (n=14) | p DEĞERİ |
|-------------------------------|-------------------|-----------------|----------|
| Konsantrasyon (mil/ml) | 52.5±5.33 | 56.6±7.03 | 0.08 |
| Toplam Motilite Oranı (%) | 67.2±6.06 | 67.2±5.30 | 0.07 |
| Progresif Motilite Oranı (%) | 16.3±2.98 | 9.3±1.34 | 0.03* |
| Normal Morfoloji Oranı (%) | 48.8±2.88 | 37.7±3.99 | 0.04* |
| Kromatin Bütünlüğü Oranı (%) | 60.2±5.10 | 24.4±4.17 | 0.002** |
| Akrozomal Reaksiyon Oranı (%) | 44.5±2.35 | 19.1±2.02 | 0.002** |
| Akrozomal Bozukluk Oranı (%) | 16.7±2.27 | 40.8±6.44 | 0.04* |



Şekil 6.4.1. Kontrol ve stres gruplarında sperm parametrelerinin karşılaştırılması. (* $p<0.05$, ** $p<0.001$)

6.4.1. Sperm Konsantrasyonu

Sperm konsantrasyonu incelendiğinde, kontrol ve stres grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p=0.08$). Kontrol grubunda sperm konsantrasyonu 52.5 ± 5.33 mil/ml iken, stres grubunda bu değerin 56.6 ± 7.03 mil/ml olduğu görüldü.

6.4.2. Toplam Motilite ve Progresif Motilite

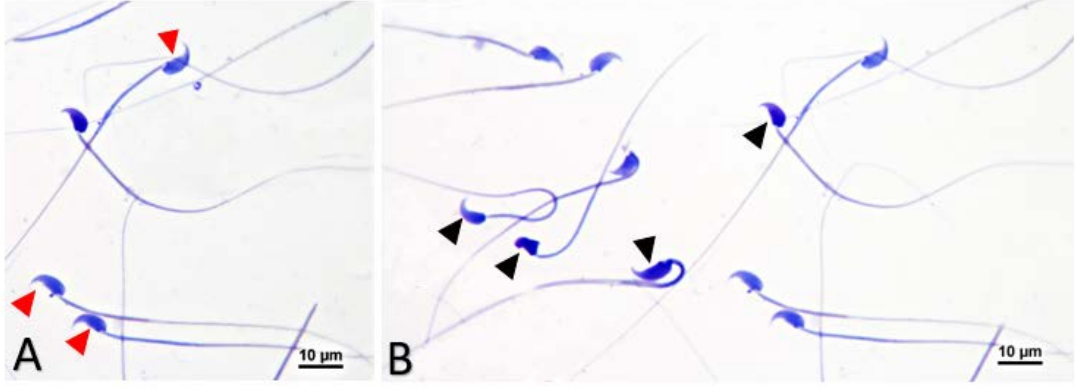
Motilite parametreleri incelendiğinde, toplam motilite parametresi açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmazken ($p=0.07$), progresif motilite parametresi açısından stres grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma belirlendi. ($p=0.03$). Toplam motilite oranının kontrol grubunda 52.9 ± 6.39 , stres grubunda ise 67.2 ± 4.65 olduğu, progresif motilitenin ise kontrol grubunda 16.3 ± 2.98 iken stres grubunda 9.31 ± 1.34 olduğu görüldü.

6.4.3. Sperm Morfoloji Analizi

Normal morfoloji oranı incelendiğinde, stres grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma belirlendi. Kontrol grubunda normal morfoloji oranı 48.8 ± 2.88 iken stres grubunda bu değerin 37.7 ± 3.99 olduğu görüldü ($p=0.04$).

6.4.4. Kromatin Bütünlüğü Analizi

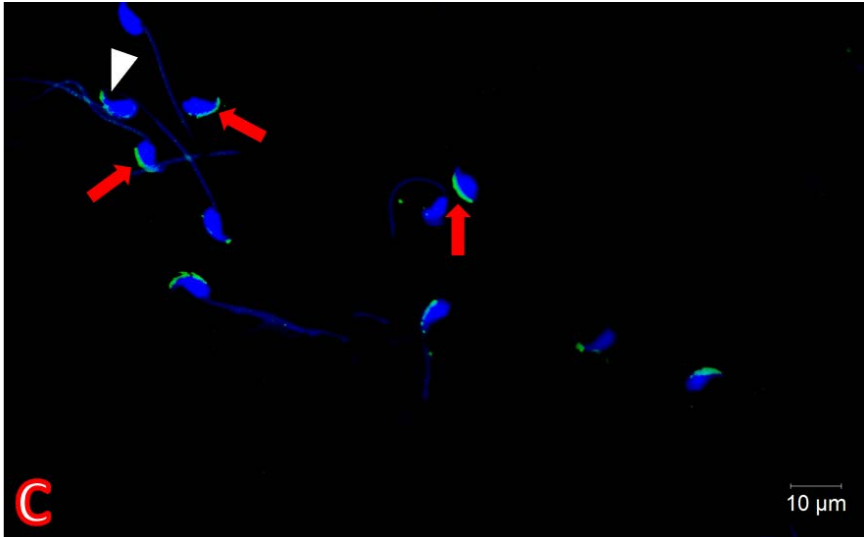
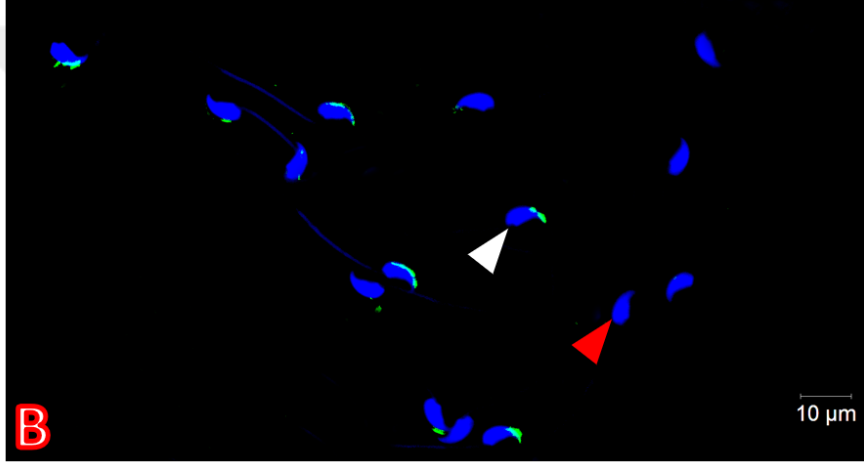
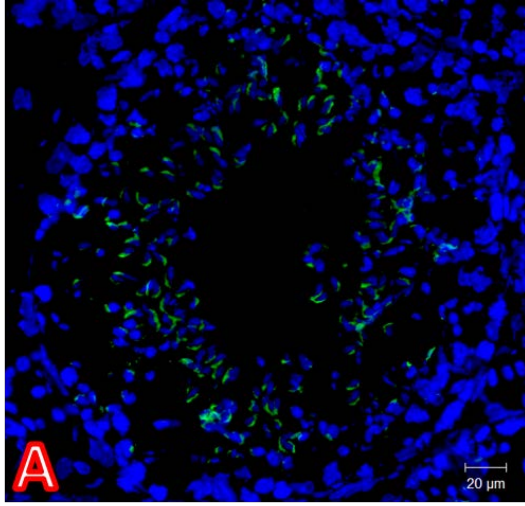
Sperm kromatin bütünlüğü incelendiğinde, kontrol grubuna göre stres grubunda kromatin bütünlüğünü kaybeden hücre sayısında artış olduğu görüldü. Kontrol grubunda oran 60.2 ± 5.10 iken, stress grubunda bu oranın 24 ± 4.17 'ye düştüğü görüldü ($p= 0.002$) (Resim 6.4.4.1.).



Resim 6.4.4.1. Toluidin mavisi boyaması. A) Kontrol grubunda soluk renkli (kromatin bütünlüğü bozulmamış) boyanan sperm çekirdekleri (kırmızı ok başı. B) Stres grubunda koyu renkli (kromatin bütünlüğü bozulmuş) boyanan sperm çekirdekleri (siyah ok başı). (A-B: 100X)

6.4.5. Akrozomal Reaksiyon Analizi

Akrozomal reaksiyon oranı incelendiğinde oranın stres grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görüldü. Akrozom reaksiyon oranı kontrol grubunda 44.5 ± 2.35 iken, stres grubunda bu oranın 19.1 ± 2.02 olduğu görüldü ($p= 0.002$) (Resim 6.4.5.1.).



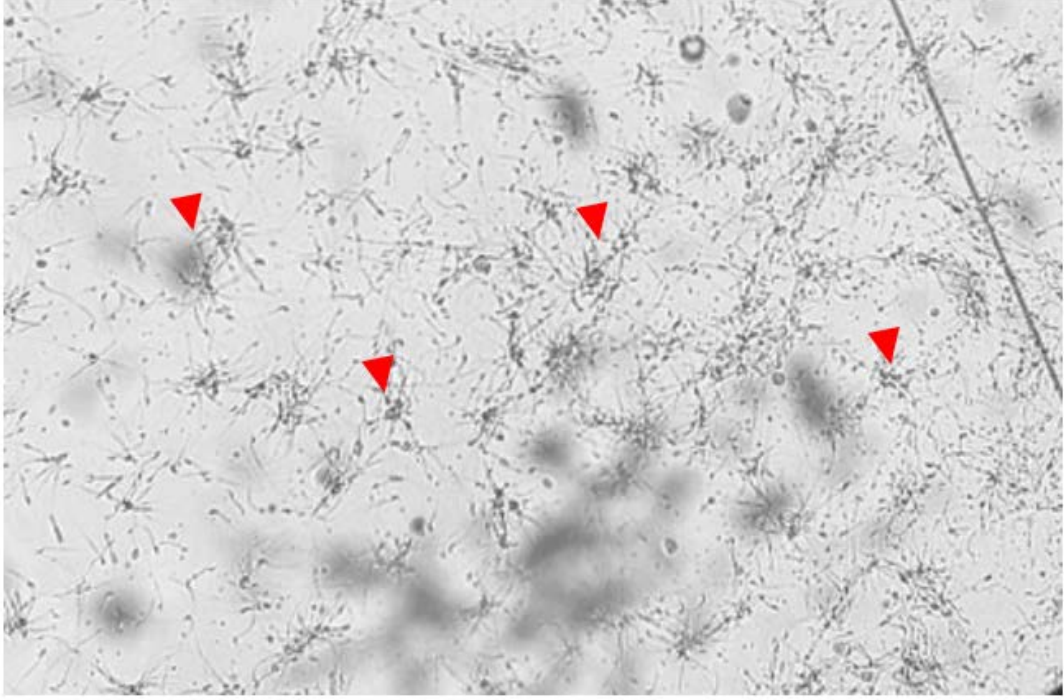
Resim 6.4.5.1. FITC-PNA boyaması. A) Pozitif kontrol (Testis dokusu). B) Kontrol grubunda parçalanmış (beyaz ok başı), ve tamamen kaybolmuş (kırmızı ok başı) spermiler. C) Stres grubunda intact kalmış olan spermiler (kırmızı ok). (A:20X, B-C:40X)

6.4.6. Akrozomal Bozukluk Analizi

Akrozomal bozukluk oranı incelendiğinde, stres grubunda anormal akrozoma sahip sperm sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi. Kontrol grubunda bu oran 16.7 ± 2.72 iken, stres grubunda oranın 40.8 ± 6.44 'e yükseldiği görüldü ($p=0.04$).

6.4.7. Diğer Sperm Parametreleri

Stres grubunda bulunan 14 örnekten 6'sında yoğun aglütinasyon göze çarpmıştır. Kontrol grubunda bulunan 10 örnekten hiç birinde aglütinasyona rastlanmamıştır (Resim 6.4.7.1).

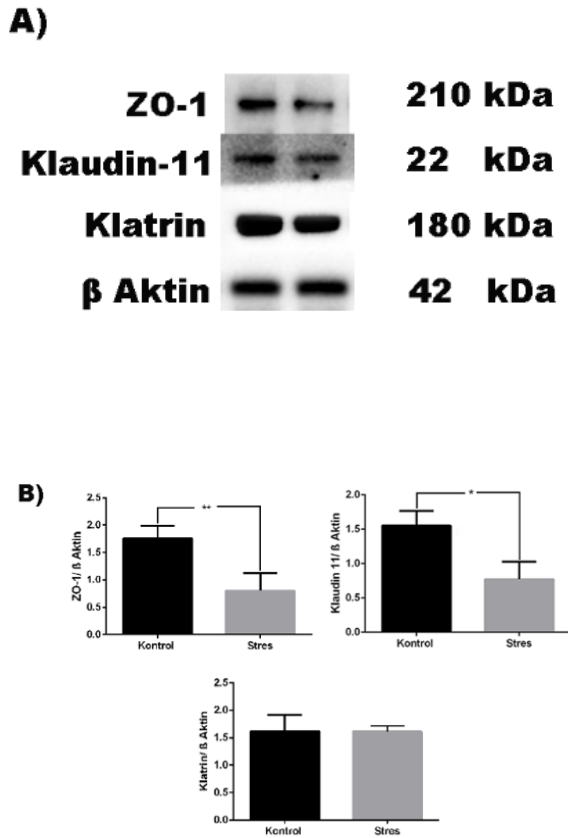


Resim 6.4.7.1. Makler kamerası incelemesinde stress grubunda görülen aglütinasyon alanları (Kırmızı ok başı).

6.5. Western Blot Analizi

6.5.1. ZO-1, Klaudin-11 ve Klatrin Proteinleri Analizi

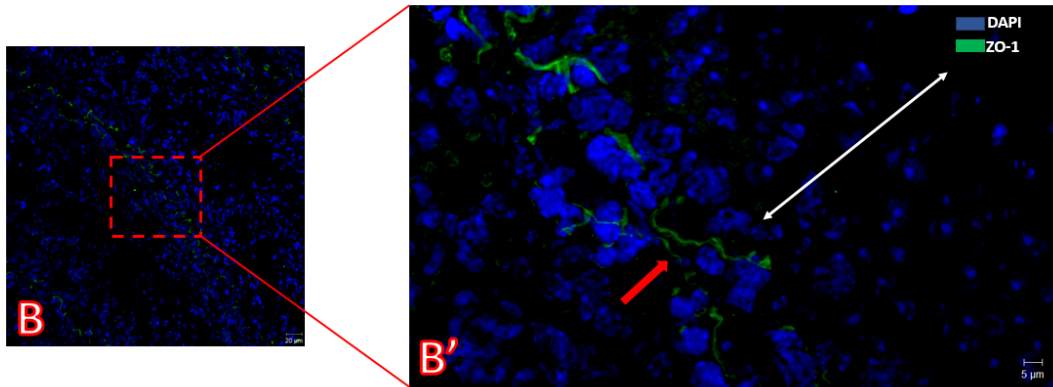
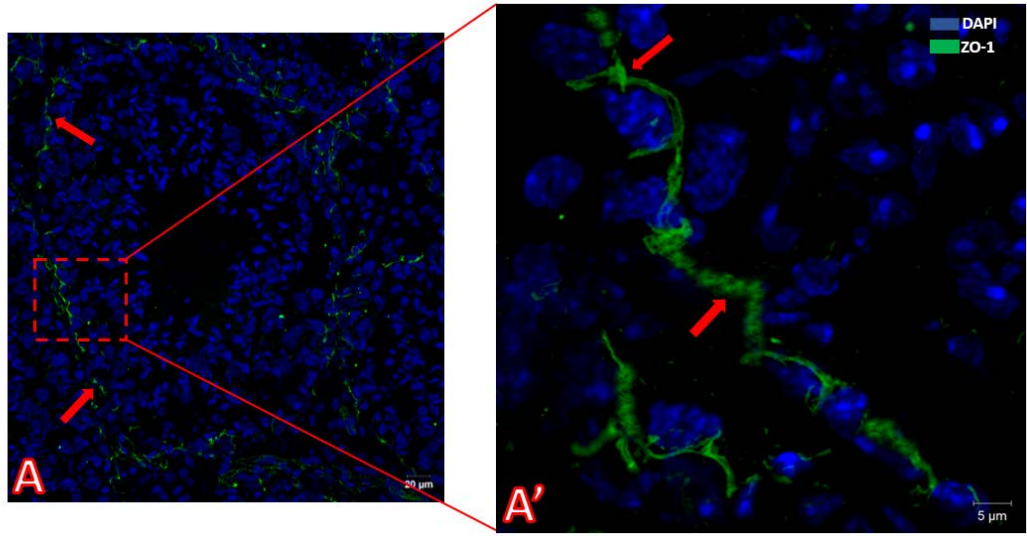
Kontrol ve stres grupları arasında molekül ağırlığı 210 kDa olan ZO-1 proteinin seviyesi kantitatif olarak western blot yöntemiyle belirlendi ve protein miktarı kontrolü için β -aktin protein kullanıldı. Oluşan bantlar Image J yazılımı ile dansitometrik olarak belirlendi. Kontrol ve stres grubu karşılaştırıldığında ZO-1 immünreaktivitesinin stres grubunda azaldığı görüldü (** $p < 0.001$). Klaudin 11 immünreaktivitesin de stres grubunda azaldığı görüldü (* $p < 0.05$). Kontrol ve stres grubu klatrin açısından karşılaştırıldığında ise iki grup arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı (Şekil 6.5.1.1.).

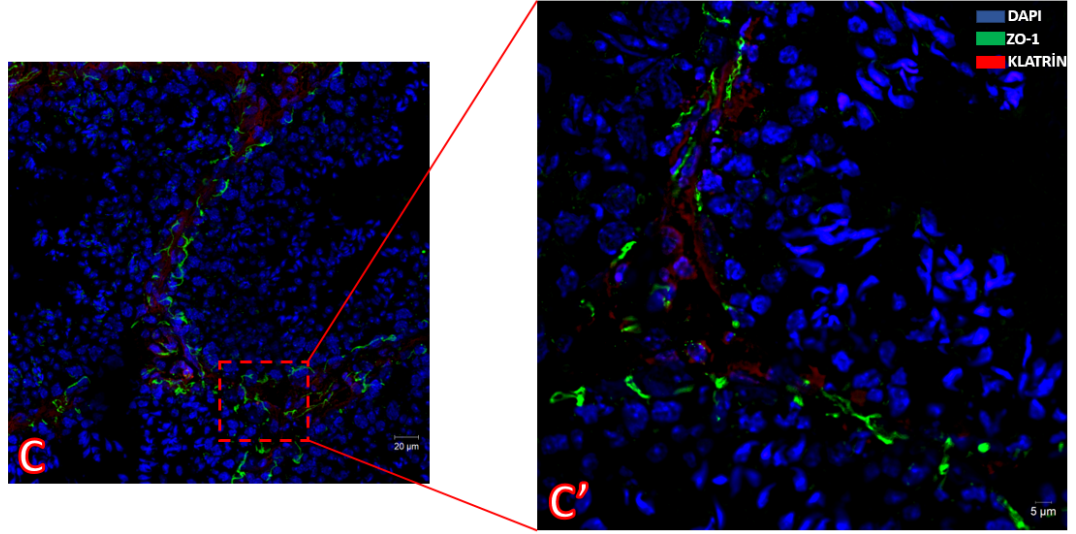


Şekil 6.5.1.1. A) Kontrol ve stres gruplarında ZO-1, Klaudin 11 ve Klatrin protein seviyelerinin western blot analiziyle ölçülmesi. B) Verilerin dansitometrik grafik analizi (** $p < 0.001$, * $p < 0.05$).

6.6. İmmü Floresan Analizler

İmmü floresan analizler sonucunda kontrol grubunda seminifer tübüllerin bazal kompartmanında ZO-1 ve Klaudin 11 ekspresyonunun devamlı bir şekilde olduğu ve KTB yapısının bütünlüğünü koruduğu konfokal mikroskop (LSM780, Carl Zeiss, Almanya) görüntüleriyle gösterildi. Klatrin ekspresyonunun ise hem kontrol hem de stres grubunda Sertoli hücrelerinin sitoplazmasında lokalize olduğu görüldü. Stres grubunda ise ZO-1 ve Klaudin 11 ekspresyonunun bazal kompartmanda görülmesine rağmen azaldığı ve KTB bütünlüğünün bozulduğu görüldü (Resim 6.6.1.).



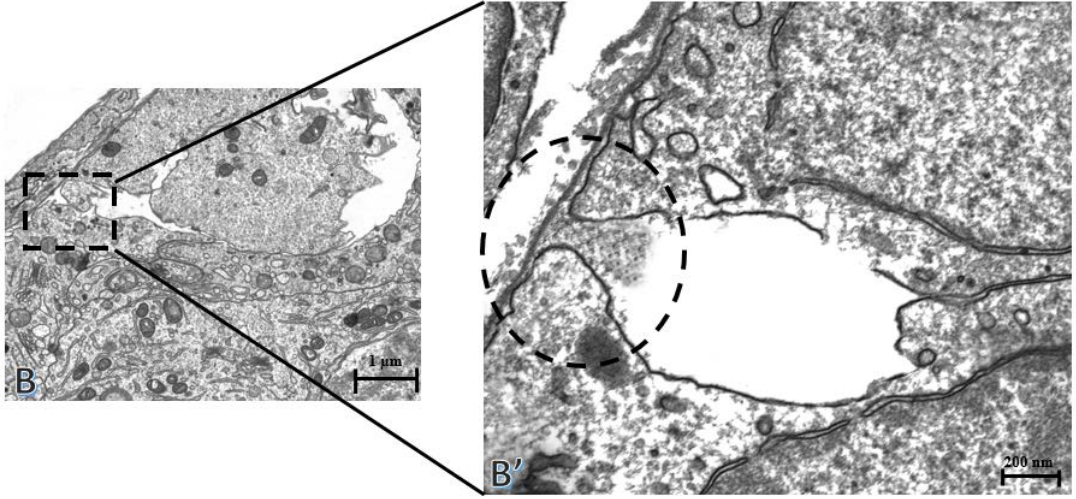
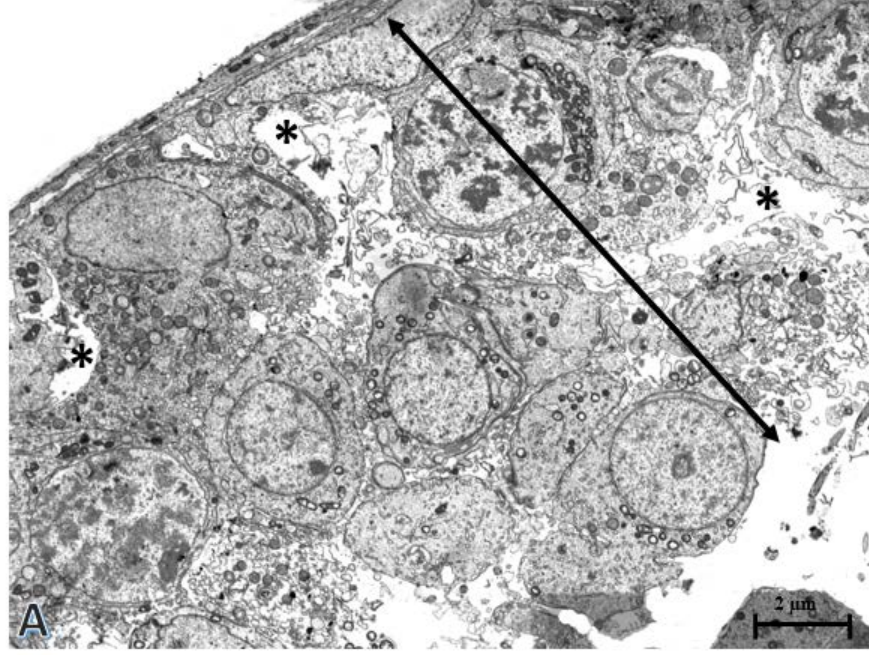


Resim 6.6.1. A) Kontrol grubunda ZO-1 ekspresyonu. A') A'daki görüntüde kesikli oklarla gösterilen alanın büyütülmüş şekli. Bazal kompartmanda ZO-1 ekspresyonu kırmızı oklarla gösterildi (→). B) Stres grubunda bazal kompartmanda görülen ZO-1 ekspresyonunda azalma. B') B'deki görüntüde kesikli oklarla gösterilen alanın büyütülmüş şekli. Kırmızı ok ile ZO-1 ekspresyonunda azalma olan bölgeler gösterildi (→). Çift taraflı ok ile seminifer epitel dökülmesi gösterildi. C) Klatrin ve ZO-1 ekspresyonunun ko-lokalize görüntüsü. C') C'deki görüntüde kesikli çizgiler ile belirtilen alanın büyütülmüş hali.

6.7. Elektron Mikroskop Analizleri

Ultrastrüktürel analiz sonucunda kontrol grubunda düzgün seminifer tübül morfolojisi görüldü. Sertoli hücrelerinin bazal membran üzerinde lokalize olduğu, germ hücre dizisinin lümene kadar ulaştığı gözlemlendi. Sertoli hücreleri arasındaki KTB yapısında bağlantılarda açılma olmadığı görüldü.

Stres grubunda seminifer tübül epitelinde dökülmeler olduğu ve bazal kompartmanda klaudin 11 ve ZO-1 proteinlerinin oluşturduğu sıkı bağlantı bölgelerinde açılmalar olduğu görüldü (Şekil 6.7.1.).



Resim 6.7.1. A) Stres grubunda seminifer tübül epitelinde açılmalar (*) ve germ hücre dizisinde dökülmeler (\longleftrightarrow). B) Stres grubunda bazal membranda KTB yapısında açılmalar. B') B'deki şekilde kesikli çizgilerle belirlenen alanın büyütülmüş hali. Kesikli çizgilerle belirlenen alanda seminifer tübül epitelinde bazal kompartmanda açılmalar. (A: 5.13K X, B: 21.52 K X, B': 51.02 K X).

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Stres, 21. yüzyılın salgın hastalığı olarak nitelendirilmektedir ve stresin duygusal ve fiziksel sağlığımız üzerindeki etkisi yıkıcı olabilmektedir. Çok sayıda epidemiyolojik çalışma sosyal yaşam, iş stresi ve yaşam tarzının, stres, sağlık ve refah düzeyi üzerindeki etkilerini tanımlamaya çalışmıştır. Bu araştırmalar iş stresinin Amerikalı yetişkinler arasında en büyük stres kaynağı olduğunu ortaya koymuştur (1).

Evrimsel sürece bakıldığında akut stres vücudu tetikte tutmaya yararken, kronikleşmiş ve sürekli devam eden stres fizyolojik olaylar üzerinde olumsuz etkilere sahiptir. Literatüre bakıldığında, stres çalışmaları akut ve kronik stres olarak iki başlık altında toplanmaktadır. Akut stres trafik sıkışıklığı, eşle kavga etme, işveren ile tartışma ya da evinizin soyulduğunu farketmeniz anında yaşadığımız kısa süreli stresi ifade etmektedir. Akut stresin metabolizmayı tetikte tutmak ve anlık olaylara verilebilecek tepkileri zinde tutmak için yararlı olduğu söylenmektedir. Ancak kronikleşmiş olan stresten doğan negatif durumlar insan ruhsal ve fiziksel sağlığı üzerinde olumsuz etkilere sahiptir. Bu yüzden çalışmalar kronik stres üzerine yoğunlaşmıştır. Hans Selye ile deney hayvanlarında başlayan çalışmalar günümüze geldiğinde insanın günlük maruz kaldığı stresörlere yoğunlaştığından, protokollerde ‘mild’ kelimesi kullanılmaya başlanmıştır. ‘Mild’ kelimesi kullanılmadan önce protokoller su ve yemek yoksunluğunu içermekteydi. Ancak insanların daha sık karşılaşılabilen stresörlerin protokollere eklenmesinin insanın günlük yaşamını daha yakın şekilde taklit edebileceğinden bu stresörler protokollerden çıkartılmaya başlanmıştır. Kullanılan protokole ‘unpredictable’ kelimesinin eklenmesi deney hayvanının stresöre alışmaması ve depresif belirtileri göstermesi için kurgulanmıştır. Bu şekilde insanların günlük karşılaştığı stresörler taklit edilmiş ve stres sonucunda oluşan depresif, anhedonik ve anksiyete gibi semptomların ortaya çıkması için oluşturulmuştur (33). Stres sonucunda oluşan bu semptomların tayini davranış testleri ile yapılmaktadır.

İnfertilite çağımızın en büyük sorunlarından biridir. Değişen çevre koşulları, yaşam şartlarının zorlaşması, dengesiz ve sağlıksız beslenme son 50 yıl içerisinde infertilite problemi yaşayan çiftlerin oranını artırmıştır (100). DSÖ verilerine göre erkeklerde sperm sayısının dramatik düşüşü araştırmacıları düşüş altında yatan

mekanizmaları araştırmaya yöneltmiştir. Genetik ve fizyolojik faktörlerin yanında, çevresel faktörler de bu dramatik düşüşte önemli rol oynamaktadır. Çevresel faktörlerden biri olan stres ise bu nedenler arasında en önemlilerindedir (101).

Stresin başta sinir sistemi olmak üzere kardiyovasküler sistem, üriner sistem ve endokrin sistem üzerine olan etkileri çalışılmaktadır. Bu çalışmaların yanında stresin erkek ve kadın üreme sistemi üzerine etkileri de son zamanlarda çok çalışılan alanlar içerisinde yer almaktadır. Yapılan çalışmalarda stresin kadınlarda over rezervinde azalmaya, küçük foliküllerin sayısında düşüşe ve hormon seviyelerinde değişikliğe neden olduğu gösterilmiştir (42).

Spermatogenez testislerde gerçekleşen uzun, kompleks ve çok iyi organize edilmesi gereken bir süreçtir (76, 102). Fertilizayona uygun sperm üretimi için seminifer tübüllerde bulunan KTB vazgeçilmez bir yapıdır. KTB yapısındaki proteinlerin ekspresyon seviyesindeki değişimler spermatogenez için oluşturulan mikroçevreyi bozmaktadır (76).

Yapılan çalışmalarda stresin serum serotonin ve testosteron seviyesini, sperm sayısını ve motilitesini, testiküler süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutasyon seviyesini, stereoidojenik akut-düzenleyici (StAR) proteinin gen ekspresyon seviyesini düşürdüğü, MDA ve kortikosteron seviyesini artırdığı gösterilmiştir (12). Başka bir çalışmada, stresin seminifer tübül boyutlarında azalmaya, bazal membranında incelmeye ve spermatogenik seri hücrelerini birbirinden ayırt etmede zorlanmaya neden olduğu ortaya konmuştur (43). Yapılan diğer çalışmalarda stresin, ss-DNA pozitif hücre sayısında artışa, seminifer tübül epitelinde incelme ve vakuolizasyona, çok nukleuslu büyük hücre sayısında artışa ve germ hücre sayısında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (11, 45).

Bu tez çalışmasında, stresin KTB yapısındaki proteinlerin ekspresyon seviyelerinde meydana getirdiği değişimin hem kantitatif hem de mikroskobik seviyede araştırılması, ayrıca sperm parametreleri üzerindeki etkisinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

C57BL/J türüne özgü geliştirilen stres protokolünde stresörler 7 hafta boyunca randomize bir şekilde uygulanmıştır. Stres modelinin oluştuğunu kanıtlamak için

uygulanan davranış deneyleri ile 7. haftanın sonunda stres grubunda keşif aktivitesinde ve anksiyete belirteci olarak açık alanda geçirilen zamanda azalma olduğu görülmüştür. Hareketsiz geçirilen zamanın artması hayvanların depresyona girdiğini ortaya koymuştur. Bu protokolün geliştirildiği makaledeki davranış deneyleri sonuçlarına bakıldığında bu çalışmadaki verilere paralel sonuçlar elde edilmiştir (89).

Vücudun strese verdiği cevapta birçok fizyolojik ve davranışsal tepki bulunmaktadır. Bu tepkilerden en çok çalışılmalardan biri HPA aksının aktivasyonudur. Hipotalamusta, paraventricüler nükleusta (PVN) bulunan nöronlardan hipofizer portal sisteme kortikotropin salgılatıcı faktör (KSF) ve arjinin vazopresin (AVP) olmak üzere iki nörohormon salgılanır. Her iki hormon da hipofizin anterior lobundan adrenokortikotropik hormon (ACTH) üretimi ve salınımını stimüle etmektedir. ACTH ise adrenal bezlerden glukokortikoid sentezini indüklemektedir (103). İnsanlardaki temel glukokortikoid kortizol iken kemirgenlerde kortikosterondur. Kortizol, vücudun temel stres hormonudur. Kortizolün, kortikosterondan farkı kortizolün bir fazla -OH (hidroksil) grubu içermesidir. Kortizol sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde, kan basıncının ayarlanmasında, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasının düzenlenmesinde rol almaktadır. Sağlıklı stres cevabı, stres anında kortizol seviyesinin artması ve stres durumu sonlandığı anda hızla düşüşüyle olmaktadır. Ancak organizma kronik strese maruz kaldığında kortizol birikimi artmaktadır. Bu durum sonucunda glukokortikoid, stres peptidleri ve proinflamatuvar sitokinlerin katabolik özelliklerinden dolayı organizmada anomaliler oluşmaktadır. Bu yüklenme sonucunda ayrıca nöropsikiyatrik ve metabolik bozulmalara da neden olmaktadır. Kanda yüksek miktarda kortizol aynı zamanda yüksek kan basıncına, kas zayıflığına, susuzluğa, ruhsal mod değişimlerine, osteoporoz, tip 2 diyabete ve beyin fonksiyonlarında hasara neden olmaktadır (104). Bizim çalışmamızda, kronik stres çalışmalarında elde edilen verilere paralel sonuçlar bulunmuş olup, 7. haftada stres grubundaki hayvanların kortikosteron miktarında kontrol grubuna göre artış olduğu saptanmıştır. Bu sonuç ile stres protokolünün oluşturulduğu bir kez daha desteklenmiştir (89).

Oksidatif stres, vücutta serbest radikaller ile antioksidanların oranlarının bozulması sonucu oluşan, hücre ve doku hasarına yol açan bir olaydır. Kronik stres sonucunda oksidatif stres indüklenmekte ve hücrede serbest oksijen radikallerinin miktarı artmaktadır (105). Serbest oksijen radikallerinin hücre membranındaki doymamış yağ asitlerine bağlanması sonucunda yağ asitleri yükseltgenir ve bu olay lipid peroksidasyonu olarak adlandırılmaktadır. Lipid peroksidasyonu hücre membranının H ve diğer iyonlara geçirgenliğinin artmasına, hücre membran ve organel bütünlüğünün bozulmasına neden olmaktadır (106). Lipid peroksidasyon seviyesinin in vivo ortamdaki belirteçlerinden biri olan MDA, oksidatif stres seviyesi ölçümü için kullanılan markırlardan bir tanesidir. UKS modeli uygulanan bazı çalışmalarda MDA seviyesinin stres uygulanan grupta arttığı gösterilmiş ve bazı antioksidan maddelerin MDA seviyesini normale düşürdüğü ortaya konmuştur (107-109). Bizim çalışmamızda da kronik stres uygulanan grupta, 7. haftada MDA seviyesinin kontrol grubuna kıyasla arttığı görülmüştür.

Literatürde stresin testis üzerindeki etkilerine bakıldığında stresin sperm sayısını azalttığı, testis morfolojisinde bozukluklar meydana getirdiği ve testosteron seviyesinde azalmaya neden olduğu önceki çalışmalarda gösterilmiştir (12, 45). Bizim çalışmamızda da benzer olarak stres grubunda testosteron seviyesinde anlamlı bir düşüş görülmüştür. Ayrıca Johnsen skorlamasına göre yapılan analizde, stres grubunda seminifer tübül epitelinde germ hücre sayısında azalma görülmüştür. Yapılan histopatolojik analiz sonucunda stres grubunda seminifer tübül epitelinde vakuolizasyona, atrofik ve dejeneratif tübüllere rastlanmıştır.

Literatürde, stres ve erkek infertilitesi arasındaki ilişkiyi inceleyen az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde günlük stres ile semen kalitesi arasında ilişki olmadığı bildirilmiş olsa da (110), yapılan başka bir çalışmada aile üyesini kaybeden erkeklerin semen kalitesinde düşüş olduğu ortaya konmuştur (111).

Sperm konsantrasyonu ile kronik stres arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar mevcuttur. 2019'da yapılan bir çalışmada Zou ve ark.'ları Sprague Dawley türü sıçanlara UKS modelini uygulamış ve uygulanan stres sonucunda sperm konsantrasyonunda azalma olduğunu bildirmişlerdir (112). Başka bir çalışmada ise yine Sprague Dawley türü sıçanlara hareketsizlik ve soğuk suda yüzdürme

stresörlerinden oluşan kronik stres modeli uygulanmış ve sperm konsantrasyonunun azaldığı görülmüştür (113). Biz ise çalışmamızda sperm konsantrasyonunun gruplar arasında değişmediğini gözlemledik. Diğer çalışmalar ile bizim çalışmamızın sonuçlarının paralellik göstermemesi, yapılan diğer çalışmalarda farklı tür hayvan kullanılması ve uygulanan kronik stres modelinin bizim protokolümüzden farklı olmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Sperm motilitesi ve progresif motilite oranları kıyaslandığında toplam motilitede gruplar arasında bir farklılık bulunmazken, progresif motilitenin stres grubunda kontrol grubuna göre azaldığı görüldü. Soğuk stresi ve kronik stres uygulanan bir çalışmada stresin progresif motilite oranını düşürdüğü gösterilmiştir (114). Başka bir çalışmada ise, kronik unpredictable mild stres modeli uygulanan sıçanlarda sperm motilitesinin azaldığı gösterilmiştir (12).

Bu çalışmada stres grubunda kontrol grubuna göre normal morfolojiye sahip sperm sayısında düşüş görüldü. Başka bir çalışmada, sıçanlarda oluşturulan kronik stres modelinde stres grubunda normal morfolojiye sahip sperm sayısında azalma olduğu ve özellikle baş anomalisi görülen spermelerin sayısında artış görüldüğü bildirilmiştir (113). İnfertilite hastası olmayan bireylerde yapılan bir çalışmada son 3 ay içerisinde stres olan hastalarda anormal morfolojiye sahip sperm sayısında artış görülmüş olup, stresin özellikle sitoplazmik droplet görülen sperm sayısında artışa neden olduğunu bildirmişlerdir (115).

Bu çalışmada, stres grubunda kontrol grubuna göre kromatin bütünlüğüne sahip sperm sayısında azalma görüldü. Kromatin bütünlüğü ve kronik stresi araştıran bir çalışma bulunmamaktadır.

Akrozomal reaksiyon oranına bakıldığında stres grubunda akrozomal reaksiyona giren spermelerinin sayısının stres grubunda kontrol grubuna göre azaldığı görüldü. Sıçanlarda yapılan kronik stres çalışmasında 42 gün boyunca hareketsizlik stresi uygulanmış ve Coomassie mavisi ile boyanarak akrozomal reaksiyon analizi yapılmıştır. Bu analiz sonucunda stres grubunda akrozomal reaksiyona giren hücre sayısında artış olduğu görülmüştür. Bunun stresin akrozom fonksiyonunda görev alan proteinlerden Golgi-associated PDZ ve coiled-coil motif containing (GOPC)'in ekspresyonunu etkilemesinden kaynaklanmış olabileceğini öne sürmüşlerdir. Ayrıca

başka bir neden olarak protein fosforilasyonunun hücre çoğalması, bölünmesi, büyümesi ve farklılaşması aşamalarında önemli olduğunu ve bu aşamaların Sertoli hücrelerinde, yuvarlak spermatidlerde ve akrozomal reaksiyon sürecinde de görüldüğünü söylemişlerdir (116).

Bu çalışmada, stres grubunda kontrol grubuna göre akrozomal bozukluğa sahip sperm sayısında artış görülmüştür. İnfertilite hastası olmayan 1001 erkek ile yapılan bir çalışmada bireylerin medikal durumları, hayat tarzları ve meslekleri göz önüne alındığında özellikle çalışma saati fazla olan bireylerde akrozomal bozukluk görülen sperm sayısında artış görülmüştür (115).

Antisperm antikorlar (ASA), immünolojik infertilite etmenleri olarak rol alırlar. Erkeklerde ASA oluşumu nedenleri arasında lokal inflamasyondan kaynaklanan KTB hasarı (117), tümörler (118), toksik maddeler (119, 120), testiküler sperm ekstraksiyon prosedürleri (121), seminal plazmadaki hücresel ve humoral bağışıklığı regüle eden immün modülatör faktörlerde azalma (122) ve mikroorganizmalar ile spermatozoa (123) arasındaki antijenik reaksiyon yer almaktadır.

ASA oluşumu ayrıca erkek genital sistemdeki kanalların enflamasyon ve infeksiyöz ajanlardan dolayı tıkanmasından (124), varikoselden (125, 126), genital sistem yaralanmalarından (127), vas deferensin tıkanmasından (128) ve epididimis enflamasyonundan da (129) kaynaklanabilmektedir.

Semende ASA varlığının temel bulgusu sperm hücreleri arasında aglütinasyon gözlenmesidir. Çalışmamızda stres grubunda yoğun olarak gözlemlediğimiz aglütinasyon bize KTB'nin yıkılması nedeniyle immün hücrelerin bölgeye geçtiğini ve antisperm antikor oluştuğunu düşündürmektedir.

Sonuçların IgM ve IgG düzeyinde konfirmasyonu gerekmesine rağmen, durumun KTB'nin bozulmasına kanıt teşkil ettiği düşünülebilir. Konunun ileri araştırılmasının immünolojik infertilite vakalarının çözülmesine önemli katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Spermatogenez, memeli testislerinde bulunan seminifer tübül epitelinde germ hücrelerinin birçok hücre bölünmesi ve morfolojik değişiklik geçirmesi ve spermiyasyon sonucunda tübül lümeninden salınması olayıdır (130). Spermatogenez

süreci boyunca germ hücreleri Sertoli hücreleri tarafından desteklenmektedir. Sertoli hücrelerinin en önemli görevlerinden bir tanesi KTB yapısını oluşturmaktır. KTB yapısı sıkı bağlantılar, bazal ektoplazmik özelleşmeler, desmozomlar ve gap junctionları içermektedir. (50, 131). KTB post-mayotik germ hücrelerini sistemik dolaşımdan korurken, aynı zamanda periyodik olarak yıkılıp, yapılarak preleptoten/leptoten spermatozoidlerin adluminal kompartmana geçişine izin verir (132). Sıkı bağlantı protein ailesinden en çok bilinenler bağlantı adhezyon molekülleri kludininler ve okludininlerdir. Kludin protein ailesine bakıldığında kludin-3, -4, -5, -7, -8 eksprese edilmesinin yanında daha çok kludin-1 ve kludin-11 eksprese edilmektedir (133). Kludin-11 upregülasyonu androjenler ile sağlanırken, down regülasyonu TGF- β 3 ile sağlanmaktadır (134). Flutamid gibi anti-androjenlerin sıçan prepubertal testisinde kludin-11 ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (135). Bütünlüğün korunmasında önemli olan diğer bir olay ise testosteron hormon seviyesidir. Okludininler epitelde bilinen ilk sıkı bağlantı integral membran protein yapısındırlar (136). Okludininlerin düzenlenmesinde sitokinler (TGF- β 2, TGF β 3) rol almaktadır (137). Okludin ve kludininlerin aktine bağlanmasında rol alan en önemli adaptör proteinler ZO-1, ZO-2 ve ZO-3 proteinleridir. ZO-1 proteini konneksin-43 ile ko-lokalizedir ve gap junction proteinlerinin iletişiminden sorumludur (79). Bu çalışmada western blot analizleri sonucunda sıkı bağlantı proteinlerinden kludin-11 ve ZO-1 proteinin stres grubunda ekspresyonunda azalma görülmüştür. Bunun nedeninin testosteron seviyesindeki azalma olabileceği öngörülmektedir. Yapılan benzer kronik stres çalışmalarında testis histopatolojisinde hasarlar ve sperm konsantrasyonunda azalma görülmüş olup, bu anomalilerin altında yatan mekanizma halen aydınlatılamamıştır. Bu çalışma kronik stres modelinin testis üzerindeki etkisini KTB protein düzeyinde incelemesiyle diğer çalışmalardan ayrılmaktadır. Endositoz, KTB protein yapılarının yapım yıkım aşamalarında görev alan önemli bir mekanizmadır. Testosteron sertoli hücrelerinde okludinin plazma membranına geri dönüşünü düzenlemektedir. Ayrıca endositozu androjenlerin düzenlediği dikkate alınarak ve testosteron miktarının artmasının kltrin ve kaveolin-1 miktarını da arttırdığı düşünülmektedir (74, 82). Günümüze kadar kronik stres modelinde testisteki kltrin miktarının değişimini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada western blot analizleri sonucunda kltrin proteinin seviyesinde kontrol ve stres

grupları arasında bir farklılık bulunamamıştır. Klatrin seviyesindeki değişme olmamasının nedeni, ZO-1 ve kladin-11 gibi sıkı bağlantı proteinlerindeki ekspresyon seviyesinin azalması ya da artmasındaki tek mekanizmanın endositoz mekanizması olmaması, testosteron miktarı, sitokinler ve p38/MAPK yolağı başta olmak üzere birçok yolak ve mekanizmayı içeren kompleks bir olay olmasından kaynaklanabilir. Yapılacak diğer çalışmalarda, sitokinlerin ve p38/MAPK yolağındaki proteinlerin ekspresyon seviyelerinde değişim olup olmadığı kantitatif olarak araştırılmalıdır.

İmmünfloresan analizler sonucunda kontrol grubunda kladin-11 ve ZO-1 ekspresyonunun bazal kompartmanda devamlılığını koruduğu ve Sertoli hücrelerinden eksprese edilen klatrin ile ko-lokalize olduğu görüldü. Stres grubunda ZO-1 ve kladin-11 ekspresyonunun western blot yöntemi ile gösterilen analizlerine paralel olarak ekspresyonda azalma ve bağlantı yapısında kesintiler olduğu konfokal mikroskop analizleri ile gösterildi. Hareketsizlik stresinin KBB üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, stresin ZO-1 ekspresyon seviyesinde azalmaya neden olduğu ve bunun sonucu olarak beyindeki mikrovasküler damarların endotel hücreleri arasındaki bağlantının zayıfladığı ve KBB geçirgenliğinin arttığını söylemektedirler (138).

Ultrastrüktürel incelemeler sonucunda kontrol grubunda seminifer tübül epitelinde ve Sertoli hücreleri arasındaki KTB yapısında bir bozulma görülmezken, stres grubunda seminifer tübül epitelinde dökülmeler ve KTB yapısında açılmalar olduğu görülmüştür. Hou ve ark.'ları tarafından yapılan bir çalışmada kronik stresin seminifer tübül bazal membranında incelmeye neden olduğunu ortaya koymuşlardır (43).

Sonuç olarak, stres hayatımızın her döneminde baş etmeye çalıştığımız bir durumdur. Akut stres vücudu zinde tutmaya yararken, kronikleşmiş stres mental, fiziksel ve ruhsal birçok anomaliye neden olmaktadır. Buna paralel olarak her geçen yıl artan infertilite oranları araştırmacıları ikisi arasındaki ilişkiyi araştırmaya yöneltmiştir. Kronik stresin sperm sayısını ve testosteron seviyesini azalttığı bilinmektedir. Ancak bunun altında yatan mekanizma halen aydınlatılamamıştır. Düzenli morfolojiye sahip sperm üretimi için seminifer tübüllerde KTB yapısı

tarafından oluşturulan mikroçevre vazgeçilmezdir. KTB yapısındaki bozulmalar, yaratılan mikro çevrenin bozulmasına neden olmaktadır. Günümüze kadar testis histopatolojisi, testosteron seviyesi ve sperm konsantrasyonu üzerine yapılan birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışma, UKS'in etkilediği KTB yapısındaki proteinleri kantitatif olarak ve ultrastrüktürel düzeyde incelemesi, aynı zamanda sperm parametrelerini detaylı olarak incelemesiyle diğer çalışmalardan ayrılmaktadır.

İnfertilitenin ve stresin çağımızın büyük sorunları olmasından dolayı sperm sayısının azalmasında stresin rolü moleküler düzeyde araştırılmaya devam edilmeli ve uygun tedavilerin geliştirilebilmesi için bu sisteme dahil olan tüm mekanizma ve yollar detaylı olarak incelenmelidir. Farelerde yapılan bir çalışmada, kronik unpredictable mild stres protokolü ile hayvanlarda stres modeli oluşturulmuş ve antidepresan ilaçların etkisine sahip olan sodyum bütiratın etkisi araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda, stresin hipokampüste KBB'de ZO-1 ve okludin ekspresyonunu azalttığı, sodyum bütiratın ise azalan ekspresyon seviyesini normale döndürdüğü gösterilmiştir (139). İleriki çalışmalarda stres sonucunda oluşan depresyon ve anksiyete belirtilerinin ortadan kaldırılması ve KTB yapısının normal morfolojisine sahip olabilmesi için antidepresan ilaçların etkilerinin çalışılması stres kaynaklı infertilite vakalarının azalmasına yardımcı olabileceğini düşündürmektedir.

8. KAYNAKLAR

1. Fink G. Stress: Concepts, Definition and History. 2017.
2. Cannon WB. The Wisdom of the Body: W. W. Norton & Company; Rev. and Enl. Ed edition; 1932. 340 p.
3. Pandarakalam JP. Challenges of Treatment-resistant Depression. *Psychiatr Danub.* 2018;30(3):273-84.
4. Chockalingam R, Gott BM, Conway CR. Tricyclic Antidepressants and Monoamine Oxidase Inhibitors: Are They Too Old for a New Look? *Handb Exp Pharmacol.* 2019;250:37-48.
5. Li Y, Peng Y, Ma P, Wang M, Peng C, Tu P, et al. In vitro and in vivo metabolism of Cistanche tubulosa extract in normal and chronic unpredictable stress-induced depressive rats. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2019;1125:121728.
6. Banasr M, Lepack A, Fee C, Duric V, Maldonado-Aviles J, DiLeone R, et al. Characterization of GABAergic marker expression in the chronic unpredictable stress model of depression. *Chronic Stress (Thousand Oaks).* 2017;1.
7. Nirupama M, Devaki M, Nirupama R, Yajurvedi HN. Chronic intermittent stress-induced alterations in the spermatogenesis and antioxidant status of the testis are irreversible in albino rat. *J Physiol Biochem.* 2013;69(1):59-68.
8. www.tuik.gov.tr, Erişim tarihi 7 Eylül 2019.
9. <http://www.indoreinfertilityclinic.com/causes-of-infertility>, Erişim Tarihi 9 Eylül 2019.
10. <http://www.ivf-clinic-india.com/Male-infertility>, Erişim Tarihi: 9 Eylül 2019.
11. Hirano T, Yanai S, Omotehara T, Hashimoto R, Umemura Y, Kubota N, et al. The combined effect of clostrianidin and environmental stress on the behavioral and reproductive function in male mice. *J Vet Med Sci.* 2015;77(10):1207-15.
12. Sakr HF, Abbas AM, Elsamanoudy AZ, Ghoneim FM. Effect of fluoxetine and resveratrol on testicular functions and oxidative stress in a rat model of chronic mild stress-induced depression. *J Physiol Pharmacol.* 2015;66(4):515-27.
13. Baratta A. C, T. . A Roman viaduct-bridge in Campania: History, structure and maintenance. Sinopoli IA, editor. Rotterdam, The Netherlands:Balkema1998.

14. Stress (n.d.) In Oxford Dictionary Online. http://www.oxforddictionaries.com/us/definition/american_english/stress Erişim Tarihi: 10 Eylül 2019.
15. Strictus. (n.d.) In Latin-dictionary online. <http://www.latin-dictionary.org/strictus> Erişim Tarihi:10 Eylül 2019.
16. Bernard C. Lectures on the phenomena common to all animals and plants. 1 ed: Charles C Thomas Pub Ltd (June 1, 1974); 1974.
17. Osler SW. Project Gutenberg's the evolution of modern medicine: A series of lectures delivered at Yale University on the Silliman Foundation in April.: New Haven, Yale university press; 1913.
18. Cannon WB. The James-Lange theory of emotions: a critical examination and an alternative theory. *The American Journal of Psychology*. 1927;39:106-24.
19. Robinson AM. Let's Talk about Stress: History of Stress Research. *Review of General Psychology*. 2018;22(3):334-42.
20. Hinkle LE, Jr. The concept of "stress" in the biological and social sciences. *Int J Psychiatry Med*. 1974;5(4):335-57.
21. Selye H. *The Stress of life*. 1950.
22. Selye H. A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature*. 1936;138(3479):32-.
23. *The Physiology and Pathology of Exposure to Stress. A Treatise Based on the Concept of the General Adaptation Syndrome and the Diseases of Adaptation: Ind Med Gaz*. 1952 Sep;87(9):431.
24. Zhu LJ, Liu MY, Li H, Liu X, Chen C, Han Z, et al. The different roles of glucocorticoids in the hippocampus and hypothalamus in chronic stress-induced HPA axis hyperactivity. *PLoS One*. 2014;9(5):e97689.
25. Rollins SZ, Garrison MEB, Pierce SH. The Family Daily Hassles Inventory: A Preliminary Investigation of Reliability and Validity. *Family and Consumer Sciences Research Journal*. 2002;31(2):135-54.
26. Borteyrou X, Truchot D, Rascle N. Development and validation of the Work Stressor Inventory for Nurses in Oncology: preliminary findings. *J Adv Nurs*. 2014;70(2):443-53.

27. Lee SJ, Gopalan G, Harrington D. Validation of the Parenting Stress Index-Short Form With Minority Caregivers. *Res Soc Work Pract.* 2016;26(4):429-40.
28. Torres L, Skidmore S, Gross N. Assessment of post-traumatic stress disorder: Differences in standards and practice between licensed and board-certified psychologists. *Psychological Injury and Law.* 2012;5(1):1-11.
29. Gould SJ. The structure of evolutionary theory. 2002. 1433 p.
30. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. 1992. *Int J Epidemiol.* 2013;42(5):1215-22.
31. Younis MS. Gallup 2018 Global Emotions Report. 2018.
32. Katz RJ. Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. *Pharmacol Biochem Behav.* 1982;16(6):965-8.
33. Willner P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiol Stress.* 2017;6:78-93.
34. Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology.* 1997;134(4):319-29.
35. Muscat R, Papp M, Willner P. Reversal of stress-induced anhedonia by the atypical antidepressants, fluoxetine and maprotiline. *Psychopharmacology.* 1992;109(4):433-8.
36. Xing B, Liu P, Jiang WH, Liu F, Zhang H, Cao GF, et al. Effects of immobilization stress on emotional behaviors in dopamine D3 receptor knockout mice. *Behav Brain Res.* 2013;243:261-6.
37. Muscat R, Towell A, Willner P. Changes in dopamine autoreceptor sensitivity in an animal model of depression. *Psychopharmacology.* 1988;94(4):545-50.
38. Qiao H, Li MX, Xu C, Chen HB, An SC, Ma XM. Dendritic Spines in Depression: What We Learned from Animal Models. *Neural Plast.* 2016;2016:8056370.
39. Magarinos AM, Deslandes A, McEwen BS. Effects of antidepressants and benzodiazepine treatments on the dendritic structure of CA3 pyramidal neurons after chronic stress. *Eur J Pharmacol.* 1999;371(2-3):113-22.

40. Golbidi S, Frisbee JC, Laher I. Chronic stress impacts the cardiovascular system: animal models and clinical outcomes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015;308(12):H1476-98.
41. Mann EA, Alam Z, Hufgard JR, Mogle M, Williams MT, Vorhees CV, et al. Chronic social defeat, but not restraint stress, alters bladder function in mice. *Physiol Behav.* 2015;150:83-92.
42. Fu XY, Chen HH, Zhang N, Ding MX, Qiu YE, Pan XM, et al. Effects of chronic unpredictable mild stress on ovarian reserve in female rats: Feasibility analysis of a rat model of premature ovarian failure. *Mol Med Rep.* 2018;18(1):532-40.
43. Hou G, Xiong W, Wang M, Chen X, Yuan TF. Chronic stress influences sexual motivation and causes damage to testicular cells in male rats. *J Sex Med.* 2014;11(3):653-63.
44. Hirano T, Kobayashi Y, Omotehara T, Tatsumi A, Hashimoto R, Umemura Y, et al. Unpredictable chronic stress-induced reproductive suppression associated with the decrease of kisspeptin immunoreactivity in male mice. *J Vet Med Sci.* 2014;76(9):1201-8.
45. Retana-Marquez S, Viguera-Villasenor RM, Juarez-Rojas L, Aragon-Martinez A, Torres GR. Sexual behavior attenuates the effects of chronic stress in body weight, testes, sexual accessory glands, and plasma testosterone in male rats. *Hormones and behavior.* 2014;66(5):766-78.
46. Juarez-Rojas L, Viguera-Villasenor RM, Casillas F, Retana-Marquez S. Gradual decrease in spermatogenesis caused by chronic stress. *Acta Histochem.* 2017;119(3):284-91.
47. Ross PhD MH, Pawlina MD, Wojciech. *Histology: A Text and Atlas, with Correlated Cell and Molecular Biology*, 6th Edition: LWW; 6th edition 2010. 789-91 p.
48. Marieb EN. *Human Anatomy and Physiology*, 5th edition, Benjamin Cummings, San Francisco.2001.
49. Junqueira L. C. CJ. *Temel Histoloji* 11th Edition ed2009.
50. Mruk DD, Cheng CY. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev.* 2004;25(5):747-806.

51. Hess RA, França LR. Sertoli cell biology. Chapter. 2005;3:19-40.
52. Goldmann EE. Die äussere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der "vitalen Färbung": H. Laupp; 1909.
53. Setchell BP. Blood-Testis Barrier, Junctional and Transport Proteins and Spermatogenesis. In: Cheng CY, editor. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. New York, NY: Springer New York; 2008. p. 212-33.
54. Setchell BP, Waites GM. Changes in the permeability of the testicular capillaries and of the 'blood-testis barrier' after injection of cadmium chloride in the rat. *J Endocrinol*. 1970;47(1):81-6.
55. Siu MK, Cheng CY. Dynamic cross-talk between cells and the extracellular matrix in the testis. *Bioessays*. 2004;26(9):978-92.
56. Siu MK, Cheng CY. Extracellular matrix and its role in spermatogenesis. *Adv Exp Med Biol*. 2008;636:74-91.
57. Francavilla F, Santucci R, Barbonetti A, Francavilla S. Naturally-occurring antisperm antibodies in men: interference with fertility and clinical implications. An update. *Front Biosci*. 2007;12:2890-911.
58. Mazumdar S, Levine AS. Antisperm antibodies: etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Fertility and sterility*. 1998;70(5):799-810.
59. Alexander NJ, Anderson DJ. Vasectomy: consequences of autoimmunity to sperm antigens. *Fertility and sterility*. 1979;32(3):253-60.
60. Mandelbaum SL, Diamond MP, DeCherney AH. The impact of antisperm antibodies on human infertility. *The Journal of urology*. 1987;138(1):1-8.
61. Arora P, Sudhan MD, Sharma RK. INCIDENCE OF ANTI-SPERM ANTIBODIES IN INFERTILE MALE POPULATION. *Medical journal, Armed Forces India*. 1999;55(3):206-8.
62. ADEGHE J-HA. Male Subfertility due to Sperm Antibodies: A Clinical Overview. *Obstetrical & Gynecological Survey*. 1993;48(1):1-8.
63. Jager S, Kremer J, van Slochteren-Draaisma T. A simple method of screening for antisperm antibodies in the human male. Detection of spermatozoal surface IgG with the direct mixed antiglobulin reaction carried out on untreated fresh human semen. *International journal of fertility*. 1978;23(1):12-21.

64. Adeghe AJH BC, Cohen J. *Advances in Clinical Andrology*. Cooke CLRBD, editor 1988.
65. Aitken RJ, Rudak EA, Richardson DW, Dor J, Djahanbakhch O, Templeton AA. The influence of anti-zona and anti-sperm antibodies on sperm-egg interactions. *Journal of reproduction and fertility*. 1981;62(2):597-606.
66. Junk SM, Matson PL, Yovich JM, Bootsma B, Yovich JL. The fertilization of human oocytes by spermatozoa from men with antispermatozoal antibodies in semen. *Journal of in vitro fertilization and embryo transfer : IVF*. 1986;3(6):350-2.
67. Stanton PG. Regulation of the blood-testis barrier. *Seminars in cell & developmental biology*. 2016;59:166-73.
68. Lie PP, Cheng CY, Mruk DD. The biology of the desmosome-like junction a versatile anchoring junction and signal transducer in the seminiferous epithelium. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2011;286:223-69.
69. Mruk DD, Cheng CY. Desmosomes in the testis: Moving into an uncharted territory. *Spermatogenesis*. 2011;1(1):47-51.
70. Mruk DD, Su L, Cheng CY. Emerging role for drug transporters at the blood-testis barrier. *Trends Pharmacol Sci*. 2011;32(2):99-106.
71. Mruk DD, Cheng CY. The myotubularin family of lipid phosphatases in disease and in spermatogenesis. *Biochem J*. 2011;433(2):253-62.
72. Harris AL. Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Prog Biophys Mol Biol*. 2007;94(1-2):120-43.
73. Yan HHN, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. Cross-talk between tight and anchoring junctions-lesson from the testis. *Advances in experimental medicine and biology*. 2008;636:234-54.
74. Yan HH, Cheng CY. Blood-testis barrier dynamics are regulated by an engagement/disengagement mechanism between tight and adherens junctions via peripheral adaptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(33):11722-7.
75. Marcelino Cerejido JMA. *Tight Junctions 2nd Edition*: CRC Press; June 26, 2001.
76. Mruk DD, Cheng CY. The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation. *Endocr Rev*. 2015;36(5):564-91.

77. Chung NP, Cheng CY. Is cadmium chloride-induced inter-sertoli tight junction permeability barrier disruption a suitable in vitro model to study the events of junction disassembly during spermatogenesis in the rat testis? *Endocrinology*. 2001;142(5):1878-88.
78. Mazaud-Guittot S, Meugnier E, Pesenti S, Wu X, Vidal H, Gow A, et al. Claudin 11 deficiency in mice results in loss of the Sertoli cell epithelial phenotype in the testis. *Biol Reprod*. 2010;82(1):202-13.
79. Segretain D, Fiorini C, Decrouy X, Defamie N, Prat JR, Pointis G. A proposed role for ZO-1 in targeting connexin 43 gap junctions to the endocytic pathway. *Biochimie*. 2004;86(4-5):241-4.
80. Xiao X, Mruk DD, Cheng FL, Cheng CY. C-Src and c-Yes are two unlikely partners of spermatogenesis and their roles in blood-testis barrier dynamics. *Adv Exp Med Biol*. 2012;763:295-317.
81. Vogl AW, Du M, Wang XY, Young JS. Novel clathrin/actin-based endocytic machinery associated with junction turnover in the seminiferous epithelium. *Seminars in cell & developmental biology*. 2014;30:55-64.
82. Su L, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. Differential effects of testosterone and TGF-beta3 on endocytic vesicle-mediated protein trafficking events at the blood-testis barrier. *Exp Cell Res*. 2010;316(17):2945-60.
83. Hogarth CA, Griswold MD. The key role of vitamin A in spermatogenesis. *J Clin Invest*. 2010;120(4):956-62.
84. Bhartiya D, Kasiviswanathan S, Unni SK, Pethe P, Dhabalia JV, Patwardhan S, et al. Newer insights into premeiotic development of germ cells in adult human testis using Oct-4 as a stem cell marker. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2010;58(12):1093-106.
85. Bhartiya D, Kasiviswanathan S, Shaikh A. Cellular origin of testis-derived pluripotent stem cells: a case for very small embryonic-like stem cells. *Stem cells and development*. 2012;21(5):670-4.
86. Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Wysoczynski M, Ratajczak J, Kucia M. Very small embryonic-like stem cells: characterization, developmental origin, and biological significance. *Experimental hematology*. 2008;36(6):742-51.

87. Fayomi AP, Orwig KE. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem Cell Res.* 2018;29:207-14.
88. Darszon A, Hernández-Cruz A. T-type Ca²⁺ channels in spermatogenic cells and sperm. *Pflugers Archiv : European journal of physiology.* 2014;466.
89. Monteiro S, Roque S, de Sá-Calçada D, Sousa N, Correia-Neves M, Cerqueira JJ. An Efficient Chronic Unpredictable Stress Protocol to Induce Stress-Related Responses in C57BL/6 Mice. *Frontiers in Psychiatry.* 2015;6:6.
90. Kilic E, Reitmeir R, Kilic Ü, Caglayan AB, Beker MC, Kelestemur T, et al. HMG-CoA Reductase Inhibition Promotes Neurological Recovery, Peri-Lesional Tissue Remodeling, and Contralesional Pyramidal Tract Plasticity after Focal Cerebral Ischemia. *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2014;8(422).
91. Kilic E, Kilic U, Bacigaluppi M, Guo Z, Abdallah NB, Wolfer DP, et al. Delayed melatonin administration promotes neuronal survival, neurogenesis and motor recovery, and attenuates hyperactivity and anxiety after mild focal cerebral ischemia in mice. *J Pineal Res.* 2008;45(2):142-8.
92. Reitmeir R, Kilic E, Kilic U, Bacigaluppi M, ElAli A, Salani G, et al. Post-acute delivery of erythropoietin induces stroke recovery by promoting perilesional tissue remodelling and contralesional pyramidal tract plasticity. *Brain.* 2011;134(Pt 1):84-99.
93. Chatterjee M, Jaiswal M, Palit G. Comparative evaluation of forced swim test and tail suspension test as models of negative symptom of schizophrenia in rodents. *ISRN Psychiatry.* 2012;2012:595141.
94. Johnsen SG. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones.* 1970;1(1):2-25.
95. Ledwozyw A, Michalak J, Stepien A, Kadziolka A. The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *Clin Chim Acta.* 1986;155(3):275-83.
96. Adamkovicova M, Toman R, Martiniakova M, Omelka R, Babosova R, Krajcovicova V, et al. Sperm motility and morphology changes in rats exposed to cadmium and diazinon. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E.* 2016;14(1):42.

97. Pourmasumi S, Khoradmehr A, Rahiminia T, Sabeti P, Talebi AR, Ghasemzadeh J. Evaluation of Sperm Chromatin Integrity Using Aniline Blue and Toluidine Blue Staining in Infertile and Normozoospermic Men. *Journal of reproduction & infertility*. 2019;20(2):95-101.
98. Esteves SC, Sharma RK, Thomas Jr AJ, Agarwal A. Evaluation of acrosomal status and sperm viability in fresh and cryopreserved specimens by the use of fluorescent peanut agglutinin lectin in conjunction with hypo-osmotic swelling test. *International braz j urol*. 2007;33:364-76.
99. Hua Y, Laserstein P, Helmstaedter M. Large-volume en-bloc staining for electron microscopy-based connectomics. *Nature Communications*. 2015;6(1):7923.
100. Ahmad MK, Mahdi AA, Shukla KK, Islam N, Jaiswar SP, Ahmad S. Effect of *Mucuna pruriens* on semen profile and biochemical parameters in seminal plasma of infertile men. *Fertility and sterility*. 2008;90(3):627-35.
101. Sheiner EK, Sheiner E, Hammel RD, Potashnik G, Carel R. Effect of occupational exposures on male fertility: literature review. *Industrial health*. 2003;41(2):55-62.
102. Cordelli E, Fresegna AM, Leter G, Eleuteri P, Spano M, Villani P. Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation. *Radiation research*. 2003;160(4):443-51.
103. Nicolaides NC, Kyratzi E, Lamprokostopoulou A, Chrousos GP, Charmandari E. Stress, the stress system and the role of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation*. 2015;22(1-2):6-19.
104. Stephens MAC, Wand G. Stress and the HPA axis: role of glucocorticoids in alcohol dependence. *Alcohol research : current reviews*. 2012;34(4):468-83.
105. Belviranlı M, Gökbel H. ACUTE EXERCISE INDUCED OXIDATIVE STRESS AND ANTIOXIDANT CHANGES. *European Journal of General Medicine*. 2006;3(3):126-31.
106. Niki E. Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. *BioFactors* (Oxford, England). 2008;34(2):171-80.
107. Shehu A, Magaji MG, Yau J, Ahmed A. Methanol stem bark extract of *Adansonia digitata* ameliorates chronic unpredictable mild stress-induced depression-

like behavior: Involvement of the HPA axis, BDNF, and stress biomarkers pathways. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*. 2019;30(3).

108. Fahim AT, Abd El-Fattah AA, Sadik NAH, Ali BM. Resveratrol and dimethyl fumarate ameliorate testicular dysfunction caused by chronic unpredictable mild stress-induced depression in rats. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2019;665:152-65.

109. Fu S, Wang J, Hao C, Dang H, Jiang S. Tetramethylpyrazine ameliorates depression by inhibiting TLR4-NLRP3 inflammasome signal pathway in mice. *Psychopharmacology*. 2019;236(7):2173-85.

110. Hjollund NH, Bonde JP, Henriksen TB, Giwercman A, Olsen J. Reproductive effects of male psychologic stress. *Epidemiology (Cambridge, Mass)*. 2004;15(1):21-7.

111. Niederberger C. Re: Effects of work and life stress on semen quality. *The Journal of urology*. 2015;193(2):626-7.

112. Zou P, Wang X, Yang W, Liu C, Chen Q, Yang H, et al. Mechanisms of Stress-Induced Spermatogenesis Impairment in Male Rats Following Unpredictable Chronic Mild Stress (uCMS). *International journal of molecular sciences*. 2019;20(18).

113. Arun S, Burawat J, Yannasithinon S, Sukhorum W, Limpongsa A, Iamsaard S. *Phyllanthus emblica* leaf extract ameliorates testicular damage in rats with chronic stress. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2018;19(12):948-59.

114. Juarez-Rojas AL, Garcia-Lorenzana M, Aragon-Martinez A, Gomez-Quiroz LE, Retana-Marquez Mdel S. Intrinsic and extrinsic apoptotic pathways are involved in rat testis by cold water immersion-induced acute and chronic stress. *Systems biology in reproductive medicine*. 2015;61(4):211-21.

115. Auger J, Eustache F, Andersen AG, Irvine DS, Jørgensen N, Skakkebaek NE, et al. Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Human Reproduction*. 2001;16(12):2710-7.

116. Arun S, Burawat J, Sukhorum W, Sampanang A, Maneenin C, Iamsaard S. Chronic restraint stress induces sperm acrosome reaction and changes in testicular tyrosine phosphorylated proteins in rats. *International journal of reproductive biomedicine (Yazd, Iran)*. 2016;14(7):443-52.

117. Marconi M, Pilatz A, Wagenlehner F, Diemer T, Weidner W. Are antisperm antibodies really associated with proven chronic inflammatory and infectious diseases of the male reproductive tract? *European urology*. 2009;56(4):708-15.
118. Bronson RA, O'Connor WJ, Wilson TA, Bronson SK, Chasalow FI, Droesch K. Correlation between puberty and the development of autoimmunity to spermatozoa in men with cystic fibrosis. *Fertility and sterility*. 1992;58(6):1199-204.
119. Guvvala PR, Ravindra JP, Rajani CV, Sivaram M, Selvaraju S. Protective role of epigallocatechin-3-gallate on arsenic induced testicular toxicity in Swiss albino mice. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2017;96:685-94.
120. Guvvala PR, Sellappan S, Parameswaraiyah RJ. Impact of arsenic(V) on testicular oxidative stress and sperm functional attributes in Swiss albino mice. *Environmental science and pollution research international*. 2016;23(18):18200-10.
121. Attia KA, Zaki AA, Eilts BE, Paccamonti DL, Hosgood G, Dietrich MA, et al. Anti-sperm antibodies and seminal characteristics after testicular biopsy or epididymal aspiration in dogs. *Theriogenology*. 2000;53(6):1355-63.
122. Cooley LF, El Shikh ME, Li W, Keim RC, Zhang Z, Strauss JF, et al. Impaired immunological synapse in sperm associated antigen 6 (SPAG6) deficient mice. *Scientific reports*. 2016;6:25840.
123. Shi J, Yang Z, Wang M, Cheng G, Li D, Wang Y, et al. Screening of an antigen target for immunocontraceptives from cross-reactive antigens between human sperm and *Ureaplasma urealyticum*. *Infection and immunity*. 2007;75(4):2004-11.
124. Schuppe H-C, Meinhardt A. Immunology of the Testis and Excurrent Ducts. In: Schill W-B, Comhaire F, Hargreave TB, editors. *Andrology for the Clinician*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2006. p. 292-300.
125. Bonyadi MR, Madaen SK, Saghafi M. Effects of Varicocelectomy on Anti-sperm Antibody in Patients with Varicocele. *Journal of reproduction & infertility*. 2013;14(2):73-8.
126. Marconi M, Weidner W. Site and Risk Factors of Antisperm Antibodies Production in the Male Population. In: Krause WKH, Naz RK, editors. *Immune Infertility: Impact of Immune Reactions on Human Fertility*. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 133-47.

127. Pellati D, Mylonakis I, Bertoloni G, Fiore C, Andrisani A, Ambrosini G, et al. Genital tract infections and infertility. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2008;140(1):3-11.
128. Mazumdar S, Levine AS. Antisperm antibodies: etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Fertility and sterility*. 1998;70(5):799-810.
129. Lotti F, Baldi E, Corona G, Lombardo F, Maseroli E, Degl'Innocenti S, et al. Epididymal more than testicular abnormalities are associated with the occurrence of antisperm antibodies as evaluated by the MAR test. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2018.
130. O'Donnell L, Nicholls PK, O'Bryan MK, McLachlan RI, Stanton PG. Spermiation: The process of sperm release. *Spermatogenesis*. 2011;1(1):14-35.
131. Cheng CY, Mruk DD. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiological reviews*. 2002;82(4):825-74.
132. Lie PP, Cheng CY, Mruk DD. Signalling pathways regulating the blood-testis barrier. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2013;45(3):621-5.
133. Heiskala M, Peterson PA, Yang Y. The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 2001;2(2):93-8.
134. Lui WY, Lee WM, Cheng CY. Transforming growth factor-beta3 perturbs the inter-Sertoli tight junction permeability barrier in vitro possibly mediated via its effects on occludin, zonula occludens-1, and claudin-11. *Endocrinology*. 2001;142(5):1865-77.
135. Florin A, Maire M, Bozec A, Hellani A, Chater S, Bars R, et al. Androgens and postmeiotic germ cells regulate claudin-11 expression in rat Sertoli cells. *Endocrinology*. 2005;146(3):1532-40.
136. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, et al. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *The Journal of cell biology*. 1993;123(6 Pt 2):1777-88.
137. Wong CH, Mruk DD, Lui WY, Cheng CY. Regulation of blood-testis barrier dynamics: an in vivo study. *Journal of cell science*. 2004;117(Pt 5):783-98.

138. Xu G, Li Y, Ma C, Wang C, Sun Z, Shen Y, et al. Restraint Stress Induced Hyperpermeability and Damage of the Blood-Brain Barrier in the Amygdala of Adult Rats. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2019;12:32.
139. Sun J, Wang F, Hong G, Pang M, Xu H, Li H, et al. Antidepressant-like effects of sodium butyrate and its possible mechanisms of action in mice exposed to chronic unpredictable mild stress. *Neuroscience letters*. 2016;618:159-66.



9. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.42875
Konu : Etik Kurulu Kararı

13/11/2017

Sayın Araş. Gör. Bircan KOLBAŞI

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Kronik Stresin Fare Kan-Testis Bariyer Protein ve Geçirgenliği Üzerine Etkisinin Araştırılması” isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

EK:
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 13.11.2017 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağımızı <https://cbys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 7C5ABD0CX7 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacık Mah. Ekinçiler Cad.No:19 Kavacık Kavşağı 34810
Beykoz/İSTANBUL

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

| Toplantı Tarihi | Karar No | İlgi | Proje Yürütücüsü |
|-----------------|----------|------|---------------------------|
| 10/11/2017 | 67 | | Araş. Gör. Bircan KOLBAŞI |

“Kronik Stresin Fare Kan-Testis Bariyer Protein ve Geçirgenliği Üzerine Etkisinin Araştırılması” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “Oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 24 ay

| GÖREVİ | ADI SOYADI | İMZA |
|--------|----------------------------------|------|
| Başkan | Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK | |
| Üye | Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK | |
| Üye | Yrd. Doç. Dr. Turan DEMİRCAN | |
| Üye | Yrd. Doç. Dr. Sultan Sibel ERDEM | |
| Üye | Yrd. Doç. Dr. Mehmet OZANSOY | |
| Üye | Öğr. Gör. Dr. Taha KELEŞTEMUR | |
| Üye | Uzm.Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR | |
| Üye | Özge Şeyda DURGUT | |
| Üye | Fahriye ŞENBAHÇE | |



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.59776
Konu : Etik Kurulu Kararı

01/11/2019

Sayın Bircan KOLBAŞI

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 13/11/2017 tarihli 38828770- 604. 01 .0 I -E.42875 sayı ile onay verilen "Kronik Stresin Fare Kan-Testis Bariyer Protein ve Geçirgenliği Üzerine Etkisinin Araştırılması" isimli araştırma başvurunuzun "Kronik Stresin Fare Kan-Testis Bariyeri Protein Yapısı ve Geçirgenliği Üzerine Etkisinin Araştırılması" olarak değiştirilmesi isteğiniz uygun bulunmuş olup kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 01.11.2019 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağımıza <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 96A7E3EAXC kodu ile doğrulayabilirsiniz.

10. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

| | | | |
|------------|-------------------------|--------------|------------|
| Adı | Bircan | Soyadı | Kolbaşı |
| Doğum Yeri | Bursa | Doğum Tarihi | 19/08/1988 |
| Uyruğu | T.C. | TC Kimlik No | |
| E-mail | bkolbasi@medipol.edu.tr | Tel | |

Eğitim Düzeyi

| | Mezun Olduğu Kurumun Adı | Mezuniyet |
|------------------|-------------------------------|-----------|
| Doktora/Uzmanlık | İstanbul Medipol Üniversitesi | - |
| Yüksek Lisans | Marmara Üniversitesi | 2014 |
| Lisans | Hacettepe Üniversitesi | 2011 |
| Lise | Şükrü Şankaya Anadolu Lisesi | 2005 |

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

| | Görevi | Kurum | Süre (Yıl - |
|----|---------------------|-------------------------------|-------------|
| 1. | Araştırma Görevlisi | İstanbul Medipol Üniversitesi | 2014- |
| 2. | | | - |
| 3. | | | - |

| Yabancı Dilleri | Okuduğunu Anlama* | Konuşma* | Yazma* |
|-----------------|-------------------|----------|--------|
| İngilizce | Çok iyi | İyi | İyi |

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

| Yabancı Dil Sınav Notu [□] | | | | | | | |
|-------------------------------------|-----|-------|-----------|-----------|-----------|-----|-----|
| YÖKDİL | YDS | IELTS | TOEFL IBT | TOEFL PBT | TOEFL CBT | FCE | CAE |
| 96.5 | 78 | | | | | | |

^{□□□}Başarılımış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

^{□□}KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; YDS: Yabancı Dil Bilgisi Seviye Tespit Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

| | Sayısal | Eşit Ağırlık | Sözel |
|---------------|---------|--------------|-------|
| ALES Puanı | 78 | | |
| (Diğer) Puanı | | | |

Bilgisayar Bilgisi

| Program | Kullanma becerisi |
|-----------------------------------|-------------------|
| Microsoft Word, Excel, Powerpoint | İyi |
| Adobe Photoshop | Orta |
| Image J | İyi |
| Graphpad | Orta |

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifika/Ödülleri/Diğer

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayımlanan makaleler

1. Leptin in Sperm Analysis Can Be a New Indicator. Önel T., Ayla S., Keskin İ., Parlayan C., Yigitbasi T., Kolbasi B., Yelke TV., Ustabas TS. Acta Histochem. 2019 Jan;121(1):43-49. doi: 10.1016/j.acthis.2018.10.006.
2. A Comparative Study of Fixatives for Axolotl Blastema Tissue. Keskin I., Yıldırım B., Kolbasi B., Ozturk G., Demircan T. . Int. J. Morphol., 35(1):47-51, 2017. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022017000100009>.
3. Possible Relationship Between Bilateral Elastofibroma Dorsi and Hypermastia. Keskin İ., Kolbasi B., Akhan A., Çelik H., Hancı M., Keskin M. Turkish Journal of Plastic Surgery. 2017, Vol. 25 Issue 3, p154-158. 5p.
4. Effects of Foeniculum vulgare Essential Oil Compounds, Fenchone and Limonene, on Experimental Wound Healing. Keskin I., Gunal Y, Ayla S., Kolbasi B., Sakul A., Kilic U., Gok O., Koroglu K., Ozbek H. Biotech Histochem. 2017;92(4):274-282. doi: 10.1080/10520295.2017.1306882.
5. Axolotl Cells and Tissues Enhances Cutaneous Wound Healing in Mice. Demircan T., Keskin İ., Günal Y., İlhan A., Kolbaşı B., Öztürk G. J. Exp. Clin. Med., 2016; 33(4): 229-237
6. Histological Investigation in Peripheral Nerve Studies: Morphometric Analysis and Nerve Fiber Teasing Method. Akakin D., Kolbasi B. Turkiye Klinikleri J Neurol-Special Topics 2014;7(2):49-55
7. Minced Nerve Tissue in Vein Grafts Used as Conduits in Rat Tibial Nerves. Sahin C1, Karagoz H, Kulahci Y, Sever C, Akakin D, Kolbasi B., Ulkur E, Peker F. Ann Plast Surg. 2014 Nov;73(5):540-6. doi: 10.1097/SAP.0000000000000060.

Sözlü Sunumlar

- Karabulut S., Kolbaşı B., Korkmaz O., Sağıroğlu Y., Keskin İ. *The Effect Of The Number Of Test Cases On Pregnancy Prediction In IVF.* (14th National Congress of Histology and Embryology, Antalya, Turkey, May 10-13, 2018).

Posterler

- Keskin İ., Günal M. Y., Aytürk N., Kolbaşı B., Keskin M., Kılıç E. *Comparing The Effects Of Three Different Erythropoiesis Stimulating Agent (Erythropoietin, Methoxy Polyethylene Glycol-Epoetin Beta and Darbepoetin Alpha) On Wound Healing.* (15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Antalya, Turkey, May 18-21, 2017).
- Keskin İ., Günal M. Y., Ayla Ş., Kolbaşı B., Şakul A., Kılıç Ü., Gök Ö., Köroğlu K., Özbek H. *Efficiency Of Foeniculum Vulgare Esssential Oil Compounds Fenchone and Limonene In Experimental Wound Healing.* (13th National Congress of Histology and Embryology, Çeşme, Turkey, April 30- May 3, 2016).
- Kolgazi M., Kolbaşı B., Güleken Z., Atsız A., Başıbüyük C S., Boz İB., Küçükali B., Ercan F., Yeğen B. *The Anti-Inflammatory Effects Of The Cholinergic Pathway on Pancreaticobiliary Duct Ligation-Induced Acute Pancreatitis in Rats.* (18th International Microscopy Congress, Prague, September 7-12, 2014).

- Kolbaşı B., Kervancıoğlu G., etinel Ő. *Demonstration of the Development of Tight-Junctions Between Sertoli Cells in Post-Natal Rat Testis in Days 4-12: Immunohistochemistry and Ultrastructural Observation.* (18th International Microscopy Congress, Prague, September 7-12, 2014).
- Kolbaşı B., Kervancıoğlu G., etinel Ő. *Observation of tight junctions among Sertoli cells in testis using the tracer ruthenium red in neonatal 4-8 rats.* (21st International Electron Microscopy Congress, Mersin, Turkey, May 28-31 2013).

