TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİPPO SİNYAL YOLAĞININ SPERMATOGENEZİS SÜRECİNDEKİ VARLIĞININ BELİRLENMESİ

İrem İNANÇ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Esra ERDEMLİ

ANKARA
2023

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİPPO SİNYAL YOLAĞININ SPERMATOGENEZİS SÜRECİNDEKİ VARLIĞININ BELİRLENMESİ

İrem İNANÇ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Esra ERDEMLİ

ANKARA
2023

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Hippo Sinyal Yolağının Spermatogenezis Sürecindeki Varlığının Belirlenmesi" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

İrem İnanç
10/10/2023

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında

İrem İNANÇ tarafından hazırlanan "Hippo Sinyal Yolağının Spermatogenezis Sürecindeki Varlığının Belirlenmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 10/10/2023

Prof. Dr. Esra ERDEMLİ
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Alp CAN
Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Sevda MÜFTÜOĞLU
Hacettepe Üniversitesi

Prof. Dr. Belgin CAN
Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Sibel SERİN KILIÇOĞLU
Başkent Üniversitesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Hippo Sinyal Yolağının Spermatogenezis Sürecindeki Varlığının Belirlenmesi

Testis seminifer tübülüsleri adı verilen Sertoli ve çeşitli gelişim aşamalarında bulunan germ hücrelerinden oluşmaktadır. Bu epitelde mitoz ve mayoz bölünmeler, proliferasyon ve farklılaşmalar meydana gelmektedir. Sertoli hücreleri kendi aralarında ve germ hücreleriyle benzersiz bağlantı birimleriyle tutunmaktadır. Özellikle ektoplazma özelleşmeleri adı verilen bu bağlantı birimleri testise özgüdür. Sperm salınımı sırasında hücre iskeleti, aktin içerikli proteinler ve ektoplazma özelleşmelerinin etkin olduğu bilinmektedir. Fakat bu salınım mekanizması tam anlamıyla aydınlatılamamıştır. İlk kez *Drosophila*' da keşfedilmiş ve memelilerde de korunduğu belirlenen Hippo sinyal yolağı; hücrelerin bölünmesi, ölümü ya da proliferasyonu gibi hücrelerin kaderinin belirlendiği birçok aşamada oldukça önemlidir. Yapılan araştırmalarda aktin proteinleri ve hücre iskeletinden oldukça etkilenen bir sinyal yolağı olarak ortaya konmuştur fakat bu sinyal yolağının testis üzerindeki etkisi tam olarak bilinmemektedir. Bu sebeple çalışmamızda *Wistar albino* erişkin erkek sıçanlarda Hippo sinyal yolağının etkinliğini belirlenmeye çalışılmıştır. Bunun için aktin hücre iskeletinin ve aktin ilişkili proteinlerin etkilendiği adjudinin verildiği bir deney modeli oluşturulmuştur (n:10). Bu deney modelini karşılaştırmak için herhangi bir madde verilmeyen kontrol (n:10) ve adjudinin çözüldüğü madde olan metilselüloz grubu (n:10) da yapılandırılmıştır. Literatürle uyumlu olması açısından her gruptan 0., 6., 12., 24. ve 96. Saatlerde ikişer hayvan sakrifiye edilip testisler toplanmıştır. Çalışmamız immünohistokimyasal, immünfloresan, Western blotlama ve QRT-PCR yöntemleriyle Hippo sinyal yolağı açısından değerlendirilmiştir. Kontrol ve metilselüloz grupları her saatte birbirlerine benzer özellikler göstermiştir böylelikle adjudinin etkisini kanıtlanmış ve deney grubu oluşturulmuştur. Deney grubu 0.saat ise kontrol ve metilselüloz gruplarına benzer özellikler göstermiştir. Deney grupları kontrol ve metilselüloz gruplarıyla karşılaştırıldığında 6.saat itibariyle aktin ilişkili proteinlerden Arp3 ve EPS8'in ve F-aktinin dağılımının bozulmaya başladığı immünfloresan işaretlemelerle belirgindir. 96. saatte ise bu dağılımın bozulduğu oldukça nettir. Deney gruplarında özellikle 96. Saatte YAP ve p-YAP'ın immünohistokimyasal, immünfloresan ve Western blot analizlerinde ifadesinin azaldığı belirlenmiştir. QRT-PCR deneylerimiz de bu sonuçlarımıza paralel bir özellik göstermektedir. Bu sonuçlar bizlere özellikle ektoplazma özelleşmelerinde ve sperm salınımı sırasında Hippo sinyal yolağının testiste etkin olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: testis, sperm salınımı, ektoplazma özelleşmeleri, Hippo sinyal yolağı, YAP

SUMMARY

Determination of the Presence of the Hippo Signaling Pathway in the Spermatogenesis Process

In the seminiferous tubule of mammalian testis consists of germ cells at various stages of development and Sertoli cells. Mitosis and meiosis, proliferation and differentiation occur in this epithelium. Sertoli cells are attached to both each other and to germ cells by unique junctional units. Especially, these connecting junctions, called ectoplasmic specializations, are specific to the testis. It is known that cytoskeleton, actin-containing proteins and ectoplasmic are effective during sperm secretion. However, the mechanism of this secretion has not been fully elucidated. The Hippo signaling pathway, which was discovered for the first time in *Drosophila* and also preserved in mammals, has been demonstrated that it is very important in many stages where the fate of cells is determined, such as cell division, death or proliferation. Studies have shown that it is a signaling pathway that is highly influenced by actin proteins and cytoskeleton. However, the effect of this signaling pathway on the testis is not fully known. For this reason, we tried to determine the effectiveness of the Hippo signaling pathway in adult *Wistar albino* male rats in our study. Therefore, we created an experimental model in which the actin cytoskeleton and actin-associated proteins are affected by adjudine (n=10). In order to compare this experimental model, the control group that without any substance administration (n=10) and the methylcellulose group, which is dissolved in the adjudine, were formed (n=10).

In order to be compatible with the literature, two animals from each group were sacrificed at 0th, 6th, 12th, 24th and 96th hours, and the testicles were collected. Our study was evaluated in terms of Hippo signaling pathway by immunohistochemistry, immunofluorescence, Western blotting and QRT-PCR methods. Control and methylcellulose groups showed similar characteristics at each hour, thus proving the effect of adjudin and achieving success in creating an experimental group. The experimental group showed similar properties to the control and methylcellulose groups at the 0th hour. When the experimental groups are compared with the control and methylcellulose groups, it is evident that the distribution of actin-related proteins Arp3 and EPS 8 and F-actin begin to deteriorate as of the 6th hour with immunofluorescent techniques. At the 96th hour, it is quite clear that this distribution has declined. In the experimental groups, especially at the 96th hour, the expression of YAP and p-YAP was decreased in immunohistochemical, immunofluorescent and Western blot analyzes. The QRT-PCR experiments also show a parallel features to these results. In conclusion these data show us that the Hippo signaling pathway may be effective in the testis, especially in ectoplasmic specialization and sperm secretion.

Key Words: testis, sperm secretion, ectoplasmic specialization, Hippo signaling pathway, YAP

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan ii
Kabul ve Onay iii
Özet iv
Summary v
İçindekiler vi
Önsöz viii
Simgeler ve Kısaltmalar x
Şekiller xiii
Çizelgeler xviii

1. GİRİŞ 1
1.1. Testisin Embriyolojik Gelişimi 3
1.2. Testisin Histolojik Yapısı 5
1.3. Sertoli Hücreleri 8
1.4. Leydig Hücreleri 9
1.5. Spermatogenez 10
1.6. Hippo Sinyal Yolağı 12
1.7. Adjudin 15

2. GEREÇ ve YÖNTEM 17
2.1. Işık Mikroskop İncelemesi için Yapılan Çalışmalar 18
2.2. Hematoksilin – Eozin Boyama Protokolü: 19
2.3. Mallory Azan Boyama Protokolü: 20
2.4. İmmünohistokimyasal Yöntem İçin Kesitlerinin Alınıp Boyanması 20
2.4.1. İmmünohistokimyasal İşaretlemeler 20
2.4.2. Dokuların İmmünfloresan Yöntem İçin Kriyokesitlerinin Alınıp İşaretlemelerin Yapılması 22
2.4.3. İmmünfloresan Yöntem 22
2.4.4. FITC-Phalloidin Boyaması 22
2.5. Western Blot Uygulaması 23
2.5.1. Protein İzolasyonu 23
2.5.2. Protein Miktar Tayini 24
2.5.3. Proteinlerin SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforez) ile Ayrılması 24
2.5.4. Proteinlerin Membrana Transferi 25
2.5.5. Bloklama 25
2.5.6. Primer Antikor ile İşaretleme 26
2.5.7. Sekonder Antikor ile İşaretleme ve Görüntüleme 26
2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Analizi 27
2.6.1. RNA (Ribonükleik asit) İzolasyonu 27
2.6.2. Total RNA'lardan cDNA sentezi 29
2.6.3. Kantitatif Real Time PCR (QRT-PCR) için Primerler ve Sulandırma Protokolü 29

2.6.4. REAL-TIME PCR 30
2.7. Agaroz Jel Elektroforezi 31
2.8. Elde Edilen Sonuçların İstatiksel Değerlendirmelerle Birlikte Yorumlanması 32

3. BULGULAR 33
3.1. Hematoksilin – Eozin Boyama Sonuçları 33
3.2. Mallory-Azan Boyama Sonuçları 49
3.3. İmmunohistokimyasal Yöntem Sonuçları 52
3.3.1. YAP İmmunohistokimyasal Yöntem Sonuçları 52
3.3.2. p-YAP İmmünohistokimyasal Yöntemlerinin Sonuçları 57
3.3.3. Arp3 İmmunohistokimyasal Yöntem Sonuçları 62
3.3.4. EPS8 İmmunohistokimyasal Yöntem Sonuçları 64
3.4. İmmünfloresan Yöntem Sonuçları 66
3.4.1. FITC-Phalloidin Boyaması 66
3.4.2. YAP ve p-YAP immünfloresans boyama sonuçları 74
3.4.3. Arp3 ve EPS8 immünfloresans boyama sonuçları 79
3.5. Western Blot Uygulama Sonuçları 82
3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Analizi 84
3.7. Agaroz jel elektroforezi sonuçları 87

4. TARTIŞMA 88
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 94
KAYNAKLAR 96
EKLER 104
Ek 1. Etik Kurul Kararı 104
ÖZGEÇMİŞ 106

ÖNSÖZ

Memelilerde testis seminifer tübülüs epiteli; Sertoli hücresi ve çeşitli gelişim aşamalarında bulunan germ hücrelerinden oluşmaktadır. Bu epitelde mitoz, mayoz, farklılaşma gibi aşamaları içeren spermatogenez ve spermiyasyon (sperm salınımı) meydana gelir. Seminifer tübülüs epitelinde hücreler arasında bağlantı birimleri ve aktin ilişkili proteinler bulunmaktadır. Spermiyasyon sırasında bu yapıların etkin görev aldığı düşünülse de bu sürecin altında yatan mekanizmalar halen gizemini korumaktadır. Özellikle sperm gelişimi ve salınımdaki mekanizmaların aydınlatılması literatüre önemli katkılar sağlayabilir çünkü bu süreçteki hataların infertiliteye neden olabileceği düşünülmektedir. Desteklenen bu projemizde kontrol ve metiselüloz gruplarında tübülüs epitelinde Hippo sinyal yolağı ana bileşenlerinden YAP ve p-YAP'ın etkin bir biçimde görev aldığı izlenirken tübülüs epitelinde adjudinle oluşturulan modelde bu bileşenlerin sinyallerinin azaldığı immünohistokimyasal, immünblotlama ve QRT-PCR gibi tekniklerle gösterilmiştir. Spermatogenez ve özellikle spermiyasyon sırasında meydana gelen değişimlerde Hippo sinyal yolağının etkili olabileceğini düşündüğümüz bu çalışma infertilite nedenlerinin araştırılmasında önemli olup tedavi yaklaşımlarına yeni bir bakış açısı getirebilir. Bu değerli araştırmaya 20L0230010 numarasıyla projemize katkı veren Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine teşekkür ederiz.

Bu proje kapsamında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalında görev yapan ve danışmanım olan Sayın Prof. Dr. Esra Erdemli hocama, aynı Anabilim Dalında görev alan ve tez izleme komitesi jüri üyelerinden olan Sayın Prof. Dr. Alp Can hocama süreç içindeki katkılarından dolayı , Anabilim dalı başkanımız Sayın Prof.Dr. Belgin Can, Sayın Prof. Dr. Bizden Sabuncuoğlu, Sayın Prof. Dr. Sevim Aydın, Sayın Prof. Dr. Oya Evirgen, Sayın Prof. Dr. Özgür Çınar, Sayın Doç. Dr. Deniz Billur, Sayın Doç. Dr. Sinan Özkavukçu ve Sayın Doç. Dr. Ferda Topal Çelikkan hocalarıma teşekkürlerimi sunmak isterim.

Hacettepe Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında görev yapan ve tez izleme komitesinde görev yapan Sayın Prof. Dr. Sevda Müftüoğlu hocama katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunuyorum. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji

Enstütüsünde görev yapan Sayın Doç. Dr. Arzu Atalay hocama laboratuarlarını deneylerimiz için açtığı ve sunduğu katkılar için teşekkür ediyorum. Bu deneyler sırasında vermiş olduğu emek için Sayın Dr. Onur Bender hocama teşekkürlerimi sunuyorum. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji enstitüsünde doktora öğrencisi olan Ecz. Rümeysa Doğan'a da katkılarından dolayı teşekkür ediyorum.

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında görev yapan teknisyen Sayın Remzi Ata'ya, sekreterimiz Sayın Serap Batı'ya, teknisyenlerimizden Sayın Erdoğan Çalışkan'a ve Sayın Kerim Dilbaz'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Doktora sürecimde yanımda olan arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Şule Kızıl'a, Dr. Öğr.Üyesi Pınar Bayram'a, Dr. Öğr. Üyesi Nazlı Hayırlı Özyol'a, Dr. Masoud Afshani'ye, Uzm. Dr. Derya Taş Özdemir'e, Araş. Gör. Rukiye Karabacak'a, Araş.Gör. Dr. Ekin Baysal'a, Araş. Gör. Dr. Ayşe Hande Yozgat'a, Araş. Gör. Dr. Bilge Serdaroğlu'na, Araş. Gör. Dr. İbrahim Alptekin'e, Araş. Gör. Dr. Fatma Mert'e, Araş. Gör. Gökçen Gökçe'ye ve Yüksek Lisans Öğrencisi Ezel Erkan'a teşekkürlerimi sunarım.

Aynı zamanda Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesinde bulunan tüm asistan arkadaşlarıma, Sayın Sonay Yeter'e, Deney Hayvanları Laboratuarında bulunan Veteriner hekim Dr. Atilla İşgören ve Nazlı Aydın'a da teşekkürlerimi sunmak isterim.

Zor bir süreçte hayata tutunmamı ve bilimle olan yolculuğumu devam etmemi sağlayan Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Beyin ve Sinir Cerrahisinden Sayın Prof. Dr. Deniz Belen hocama ve tüm çalışma ekibine saygılarımı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Beni bu süreçte destekleyen tüm arkadaşlarıma ve canım ailem Zeki, Hülya ve İnci Deniz İnanç'a sonsuz teşekkürlerimle…

İrem İnanç

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Adjudin
AF-2364	Adjudin
Akt	Protein Kinaz B
AMPK	AMP-Aktive Edici Protein Kinaz
Arp3	Aktin ilişkili protein 3
β-Tubulin	Beta Tubulin
BCA	Bisinkoninik Asit
BSA	Sığır Serum Albumini
cAMP	Siklik Adenin Monofosfat
cDNA	Tamamlayıcı DNA
Cdc42	Hücre bölünme kontrol protein 42
DAB	3,3-diaminobenzidine
ddH_2O	Çift kez distile edilmiş su
EMT	Epitel Mezenşim Geçişi
ERK1/2	Hücredışı sinyal düzenleyici kinaz 1/2
EPS8	Epidermal büyüme faktörü yolağı reseptörü 8
EtBr	Etidyum bromür
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
F-aktin	Fibröz aktin
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
K	Kontrol
LATS1/2	Büyük tümör baskılayıcı homolog kinaz 1 ve 2
M	Metilselüloz
MAPK	Mitojen aktive edici protein kinaz
MEF2	Miyosit Güçlendirici Faktör-2
µ	Mikro
mTOR	Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
mTORC1	Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi 1
MST1/2	Memeli STE20-benzeri protein kinaz 1 ve 2

MOB1	Mps-1 bağlayıcı
mL	mililitre
NUR77	Çekirdek Reseptörü 4A1
PALS	LIN7 1, MAGUK P55 Aile Üyesi ilişkili Protein
PAR3	Proteinaz aktive edici reseptör 3
PAR6	Proteinaz aktive edici reseptör 6
PATJ	InaD benzeri protein
PBS	Fosfat tamponlu tuz
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyon
PDGF	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PDZ-bağlı motif	Post sinaptik yoğunluk proteini, *Drosophila* disk büyük tümör baskılayıcı (Dlg1) ve zonula okludens protein-1.
PFA	Paraformaldehit
PGC	Primordiyal Germ Hücreleri
PKA	Protein Kinaz A
PI3K	Fosfoinositid-3 Kinaz
p70SK6	p70 S6 Kinaz 1
p-YAP	Fosfo- Yes ilişkili Protein
RNA	Ribonükleik asid
RNaseZAP	RNaz Dekontaminasyon Solüsyonu
Sav1	Salvador 1
Scribble/LGL1/2	Scribble Hücre Kutuplaşma Kompleks Bileşeni 1/2
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforez
SOX9	SRY-Box Transkripsiyon Faktörü 9
SRY	Cinsiyet Belirleyici Bölge Y
TAZ	Tafazzin Protein
TBE	Tris Borik asit EDTA
TDF	Testis Belirleyici Faktör
TGF-β	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta
TBS-T	Tris Tamponlu Tuz
µg	mikrogram
µl	mikrolitre

3-beta HSD	3-Beta Hidroksisteroid Dehidrogenaz
YAP	Yes-ilişkili protein
Q-PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
WWTR1	WW bölgesi-içeren transkripsiyon düzenleyici protein 1

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Seminifer tübülüs epitelinin şematik görünümü	6
Şekil 1.2.	Memelide Hippo Sinyal Yolağı aktif olduğunda fosforillenen YAP, 14-3-3 ile etkileşiminde sitoplazmada kalır. Aksi takdirde proteozomda parçalanır.	13
Şekil 1.3.	YAP fosforillenmediğinde çekirdeğe girip çeşitli genlerin transkripsiyonunda etkin rol alır.	13
Şekil 2.1.	Deney düzeneği ve yapılan analizler.	18
Şekil 3.1.	Kontrol gruplarına ait 0. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler.	34
Şekil 3.2.	Kontrol gruplarına ait 0. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler.	34
Şekil 3.3.	Kontrol gruplarına ait 6. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler.	35
Şekil 3.4.	Kontrol gruplarına ait 12. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler.	35
Şekil 3.5.	Kontrol gruplarına ait 24. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler.	36
Şekil 3.6.	Kontrol gruplarına ait 96. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler.	36
Şekil 3.7.	Metilselüloz gruplarına ait 0. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler.	37
Şekil 3.8.	Metilselüloz gruplarına ait 0. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler.	37
Şekil 3.9.	Metilselüloz gruplarına ait 6. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler.	38
Şekil 3.10.	Metilselüloz gruplarına ait 12. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler.	38
Şekil 3.11.	Metilselüloz gruplarına ait 24. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler.	39

Şekil 3.12. Metilselüloz gruplarına ait 96. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler. 39
Şekil 3.13. Metilselüloz+ Adjudin verilen gruplara ait 0. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler. 40
Şekil 3.14. Metilselüloz+ Adjudin verilen gruplara ait 0. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler. 40
Şekil 3.15. Metilselüloz+ Adjudin verilen gruplara ait 6. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler. 41
Şekil 3.16. Metilselüloz+ Adjudin verilen gruplara ait 12. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler. 41
Şekil 3.17. Metilselüloz+ Adjudin verilen gruplara ait 24. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler. 42
Şekil 3.18. Metilselüloz+ Adjudin verilen gruplara ait 96. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler. 42
Şekil 3.19. Kontrol Gruplarına ait H&E boyamasıyla testis seminifer tübülüs yapısını gösteren kesitler. 43
Şekil 3.20. Metilselüloz ve Metilselüloz+Adjudin verilen grupların 0. saatlerine ait H&E boyamasıyla testis seminifer tübülüs kesitleri. 44
Şekil 3.21. Metilselüloz ve Metilselüloz+Adjudin verilen grupların 6.saatlerine ait H&E boyamasıyla testis seminifer tübülüs kesitleri. 45
Şekil 3.22. Metilselüloz ve Metilselüloz+Adjudin verilen grupların 12. saatlerine ait H&E boyamasıyla testis seminifer tübülüs kesitleri. 46
Şekil 3.23. Metilselüloz ve Metilselüloz+Adjudin verilen grupların 24. saatlerine ait H&E boyamasıyla testis seminifer tübülüs kesitleri. 47
Şekil 3.24. Metilselüloz ve Metilselüloz+Adjudin verilen grupların 96. saatlerine ait H&E boyamasıyla testis seminifer tübülüs kesitleri. 48
Şekil 3.25. Tüm grupların Hematoksilin-Eozin boyamalarına ait kesitler. 49
Şekil 3.26. 0.saat Kontrol (A) ve Metilselüloz Grupları(B). 50
Şekil 3.27. 0.saat kontrol gruplarda seminifer tübülüs epitel yapıları izlenmektedir. 50
Şekil 3.28. Metilselüloz verilen gruplarda testis kesitleri. 51
Şekil 3.29. Metilselüloz ve Adjudin verilen gruplara ait testis kesitleri. 51

Şekil 3.30. Kontrol gruplarına ait testis seminifer tübülüslerinin YAP ile immunohistokimyasal olarak işaretlenmesi. 53
Şekil 3.31. Kontrol gruplarına ait 96.saatte testis seminifer tübülüslerinin YAP ile immunohistokimyasal olarak işaretlenmesi. 53
Şekil 3.32. Metilselüloz verilen gruplarda testis seminifer tübülüslerinin YAP ile immunohistokimyasal olarak işaretlenmesi. 54
Şekil 3.33. Metilselüloz verilen gruplarda 96. saatlerde testis seminifer tübülüslerinin YAP ile immunohistokimyasal olarak işaretlenmesi. 54
Şekil 3.34. Metilselüloz ve Adjudin verilen gruplarda testis seminifer tübülüslerinin YAP ile immunohistokimyasal olarak işaretlenmesi. 55
Şekil 3.35. Metilselüloz ve Adjudin verilen gruplarda 96.saatte testis seminifer tübülüslerinin YAP ile immunohistokimyasal olarak işaretlenmesi. 55
Şekil 3.36. YAP İmmümohistokimyasal yöntemlerin tüm gruplardaki sonuçları. 56
Şekil 3.37. Kontrol gruplarına ait testis seminifer tübülüslerinin p-YAP ile immunohistokimyasal olarak işaretlenmesi. 57
Şekil 3.38. Kontrol gruplarına ait 96.saatte testis seminifer tübülüslerinin p-YAP ile immunohistokimyasal olarak işaretlenmesi. 58
Şekil 3.39. Metilselüloz verilen gruplarda testis seminifer tübülüslerinin p-YAP ile immunohistokimyasal olarak işaretlenmesi. 58
Şekil 3.40. Metiselüloz verilen gruplarına ait 96.saatte testis seminifer tübülüslerinin p-YAP ile immunohistokimyasal olarak işaretlenmesi. 59
Şekil 3.41. Metilselüloz ve Adjudin verilen gruplarda testis seminifer tübülüslerin p-YAP ile immunohistokimyasal olarak işaretlenmesi 59
Şekil 3.42. Metilselüloz ve Adjudin verilen gruplarda 96.saatte testis seminifer tübülüslerinin p-YAP ile immunohistokimyasal olarak işaretlenmesi. 60
Şekil 3.43. p-YAP İmmümohistokimyasal yöntemlerin tüm gruplardaki sonuçları. 61
Şekil 3.44. Arp3'ün İmmünohistokimyasal yöntemlerde tüm gruplardaki sonuçları. 63

Şekil 3.45. EPS8'in İmmünohistokimyasal yöntemlerde tüm gruplardaki sonuçları. 65
Şekil 3.46. Kontrol gruplarında 0. saatte FITC-Phalloidin boyamasıyla aktin hücre isketi yapısı izlenmektedir. 66
Şekil 3.47. Kontrol gruplarında 0. saatte Hoechst boyamasıyla çekirdek yapısı izlenmektedir. 67
Şekil 3.48. Kontrol gruplarında 0. saatte FITC-Phalloidin ve Hoechst boyamasıyla aktin hücre isketi ve çekirdek yapısı izlenmektedir. 67
Şekil 3.49. Metiselüloz verilen gruplarda 0. saatte FITC-Phalloidin boyamasıyla aktin hücre isketi yapısı izlenmektedir. 68
Şekil 3.50. Metiselüloz verilen gruplarda 0. saatte Hoechst boyamasıyla çekirdek yapısı izlenmektedir. 68
Şekil 3.51. Metilselüloz verilen gruplarda 0. saatte FITC-Phalloidin ve Hoechst boyamasıyla aktin hücre isketi ve çekirdek yapısı izlenmektedir. 69
Şekil 3.52. Metiselüloz ve Adjudin verilen gruplarda 24. saatte FITC-Phalloidin boyamasıyla aktin hücre isketi yapısı izlenmektedir. 69
Şekil 3.53. Metiselüloz ve Adjudin verilen gruplarda 24. saatte Hoechst boyamasıyla çekirdek yapısı izlenmektedir. 70
Şekil 3.54. Metiselüloz ve Adjudin verilen gruplarda 24. saatte FITC-Phalloidin ve Hoechst boyamasıyla aktin hücre iskeleti ve çekirdek yapısı izlenmektedir. 70
Şekil 3.55. Metiselüloz ve Adjudin verilen gruplarda 96. saatte FITC-Phalloidin boyamasıyla aktin hücre isketi yapısı izlenmektedir. 71
Şekil 3.56. Metilselüloz ve Adjudin verilen gruplarda 96. saatte Hoechst boyamasıyla çekirdek yapısı izlenmektedir. 71
Şekil 3.57. Metiselüloz ve Adjudin verilen gruplarda 96. saatte FITC-Phalloidin ve Hoechst boyamasıyla aktin hücre iskeleti ve çekirdek yapısı izlenmektedir. 72
Şekil 3.58. Tüm gruplarda FITC-Phalloidin ve Hoechst boyaması izlenmektedir. 73
Şekil 3.59. Kontrol grubu 96.saatte testis seminifer tübülüslerinin YAP immünfloresan ile boyanması. 74

Şekil 3.60. Metilselüloz verilen grupta 96.saatte testis seminifer tübülüslerinin YAP immünfloresan ile boyanması. 75
Şekil 3.61. Metilselüloz ve Adjudin verilen grupta 96.saatte testis seminifer tübülüslerinin YAP immünfloresan ile boyanması. 75
Şekil 3.62. Kontrol grubu 96.saatte testis seminifer tübülüslerinin p-YAP immünfloresan ile boyanması. 76
Şekil 3.63. Metilselüloz verilen grupta 96.saatte testis seminifer tübülüslerinin p-YAP immünfloresan ile boyanması. 76
Şekil 3.64. Metilselüloz ve Adjudin verilen grupta 96.saatte testis seminifer tübülüslerinin p-YAP immünfloresan ile boyanması. 77
Şekil 3.65. Tüm gruplara ait YAP immunfloresans boyama özellikleri. 78
Şekil 3.66. Tüm gruplara ait Arp3 immunfloresans boyama özellikleri. 80
Şekil 3.67. EPS8'e ait immunfloresans boyama özellikleri. 81
Şekil 3.68. YAP ve p-YAP antikorlarına ait Western blot ile işaretlenme sonuçları ve yoğunluk ölçüm sonuçlarının grafikleri 83
Şekil 3.69. EPS8 ve Arp3 antikorlarına ait Western blot ile işaretlenme sonuçları. 84
Şekil 3.70. YAP' ın gen analiz sonuçları. 85
Şekil 3.71. Arp3'ün gen analiz sonuçları.. 85
Şekil 3.72. EPS8'in gen analiz sonuçları.. 86
Şekil 3.73. YAP, Arp3 ve EPS8'in tüm gen analiz sonuçlarını göstermektedir. 86
Şekil 3.74. Tüm gruplardaki agoroz jel analiz sonuçları. 87

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1.	Testis örneklerinin RNA miktarları.	28
Çizelge 2.2.	Testis örneklerinden cDNA reaksiyon karışımı için kullanılan maddeler.	29
Çizelge 2.3.	Testis örneklerinden PCR reaksiyon karışımı için kullanılan maddeler.	31

1. GİRİŞ

Erkek üreme sisteminde yer alan testisler, erkek gametleri olarak adlandırılan spermin üretimi (spermatogenez) ve seks hormonları olarak da adlandırılan androjenlerin sentezlenmesinden (steroidogenez) sorumludur. Testislerin yapısını oluşturan seminifer tübülüsde iki temel hücre popülasyonu bulunur; bunlar: Sertoli hücreleri ve düzenli olarak çoğalan ve olgun sperme farklılaşan spermatogenik (üreme) hücrelerdir. Sertoli hücreleri birbirleriyle sıkı bağlantı kompleksleriyle bağlıdır. Bu yapı yalnız kan-testis bariyerini oluşturmakla kalmaz aynı zamanda seminifer tübülüs epitelini bazal ve apikal (adluminal) bölgelere ayırır. Mitoz bölünmeler bazal bölgede gerçekleşirken; mayoz I ve II, spermiyogenez (spermatidlerin olgun sperm hücrelerine farklaşması) ve spermiyasyon (sperm hücrelerinin salınımı) apikal bölgede gerçekleşir (Pawlina W, 2016).

Seminifer tübülüsün bir diğer önemli yapısal özelliği de aktin filamanlarının oldukça etkin olduğu "ektoplazmik özelleşme"lerdir (Toyama ve Maekawa, 2003) Bu yapılar, hem kan-testis bariyerinde hem de Sertoli-spermatid hücreleri arasında yer alır (Cheng ve Mruk, 2011). Erişkin erkek üreme hücrelerinin seminifer tübülüsden atılma (spermiyasyon) sürecinde de bu özelleşmelerin önemli olduğu yapılan çalışmalarla belirtilmesine rağmen bu sürecin altında yatan mekanizma halen tam olarak aydınlatılamamıştır (Li vd., 2017).

AF-2364 olarak da bilinen ve anti-kanser ajanı olarak görev yapan Adjudin, 1-(2,4-diklorobenzil)-1H-indazol-3-karbo-hidrazid olarak formüle edilip lonidamin'in analoğudur (Cheng vd., 2001). Adjudin'in özellikle apikal ektoplazma özelleşmelerindeki aktin filaman demetlerine zarar verdiği (Lee vd., 2004, Wong vd., 2008) ve germ hücrelerinin seminifer tübülüs epitelinden yeterli maturasyona uğramadan erken atılmasına neden olduğu belirlenmiştir (Lobl 1979, Lobl vd., 1981).

Organ gelişimi sırasında organın nihai boyutları almasında etkili olduğu ortaya konulan Hippo sinyal yolağının son yıllarda yapılan çalışmalarda hücrelerin bölünmesi, proliferasyonu, programlı hücre ölümü gibi birçok olaya katıldığı belirlenmiştir (Cherrett vd., 2012, Piccolo vd., 2014). Hücrelerin kaderinin belirlendiği bu süreçlere katılmasından ötürü Hippo Sinyal yolağı aynı zamanda tedaviye yönelik yaklaşımların geliştirilmesinde önemli bir aracıdır (Kawamura vd., 2013, Gomez vd., 2014)Yapılan çalışmalarla Hippo sinyal yolağının hücre bağlantı birimlerinden, hücre iskeletinden, hücrelerin kutuplaşma proteinlerinden ve aktin ilişkili protein gibi yapılardan etkilendiği gösterilmiştir (Fulford vd., 2018); ancak halen erkek infertilitesinde ya da spermiyasyon süreçlerinde etkili olup olmadığı kesin olarak belirtilmemiştir.

Bu çalışmadaki araştırma sorularımız şu şekildedir:

- Proliferasyonun, Farklanmanın, Aktin-Bağlantı Birimlerinin yoğun olduğu testiste, Hippo Sinyal Yolağının Etkinliği var mıdır?

- Erişkin erkek üreme hücresinin gelişmesi sırasında Hippo Sinyal Yolağı etkin midir?

- Ektoplazma özelleşmeleriyle Hippo Sinyal Yolağı ilişkilendirilebilir mi?

- Erkek infertilitesi-Hippo Sinyal Yolağı ilişkisi var mıdır?

Bu çalışmamızdaki hipotezimiz şu şekildedir:

- Hücreler arası bağlantı birimleri ve aktin hücre iskeletiyle etkileşimi olan Hippo Sinyal yolağının spermatogenezis sürecinde etkinliği vardır.

- Aktin hücre iskeleti veya hücreler arası bağlantıda meydana gelebilecek hasar Hippo sinyal yolağını ve erişkin erkek üreme hücrelerinin gelişimini etkileyebilir.

Bu çalışmada *in vivo* koşullarda Adjudin'in uygulandığı ve spermiyasyonun bozulacağı bir deney düzeneği oluşturulup testiste Hippo sinyal yolağının aktif olup olmadığının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu çalışmanın; hem spermiyasyon sırasında meydana gelen değişimlerde etkili olabilecek sinyal yolaklarını hem de infertilitenin sebeplerini aydınlatmada tanımlayıcı olacağı düşünmekteyiz.

1.1. Testisin Embriyolojik Gelişimi

Testisin gelişiminin ara mezodermden köken alan genital kabartının belirgin hale gelmesiyle başlar. Bu bölgedeki ara mezoderm hücrelerinin yoğunlaşması ve bu esnada sölöm epiteli hücrelerindeki proliferasyon dikkat çeker. 4. Haftada vertabra sütunun iki yanında intermedial mezoderm içinde s şeklinde gelişen nefrik tübülüsler mezonefrozu oluşturur ve lateralde bu tübülüsler mezonefrik kanala açılır. Mezonefrik kanal 24. Günde bir çift solid kordon şeklinde kraniladen kaudale longitidunal olarak uzanır ve erkekte kalıcıdır (Sadler TW, 2019). Mezonefrozun yüzeyinde bulunan sölom epiteli hücrelerinde meydana gelen proliferasyon, genital çıkıntının oluşumunu başlatır. Mezonefroz, s şeklinde salgı tüpçükleri ve mezonefroz borusu ya da diğer ismiyle Wolffian borusunu içerir. Bu kanal; epididimisin, seminal veziküllerin ve duktus deferensin oluşumuna da katkıda bulunur (Yang vd., 2018, Avellar vd., 2019). Mezonefroz ve genital, ürogenital sırtı meydana getirir (Acien 1992).

Mezonefrozun ventromedial bölgesinde bulunan sölom epitelinin hücrelerinin proliferasyonu ile yalancı çok katlı epitel hücre tabakası meydana gelir. Bazal membranın parçalanması sayesinde epitel hücreleri mezonefroza doğru göç etmeye başlar (Gropp ve Ohno 1966). Bu hücreler epitel tipten mezenkimal tip hücrelere (EMT) geçiş yapıp sölom epiteli ve mezonefroz arasındaki bölgeye dağılmaya başlar.

Primordial germ hücreleri (PGC), vitellüs kesesinin allantois kesesine komşu hipoblast hücreleri arasında ilk kez görülür ve bunlar epiblast kaynaklıdır. PGC'ler, gebeliğin yaklaşık beşinci haftasında gonadal kabartıya gelerek gonad gelişimini indükler. Bu esnada sölom epitelinden çoğalan primitif cinsiyet kordonları intermedial mezoderm içerisine invaze olur. PGC'in primitif cinsiyet kordonlarına yerleşmesigonad gelişimini indükler (Sadler TW, 2019).

Erkek embriyonlar XY kromozom kompleksine sahiptir. Y kromozomunun kısa kolunda (Yp11) bulunan SRY adı verilen cinsiyete özgü gen bulunur ve testis belirleyici faktör (TDF) olarak bilinmektedir (Hoare ve Khan 2023). SRY geni, testis gelişimi için gereklidir (Gubbay, Collignon ve ark., 1990, Sinclair, Berta ve ark., 1990). Bu gen olmadığı taktirde dişi embriyonun gelişimi indüklenir.

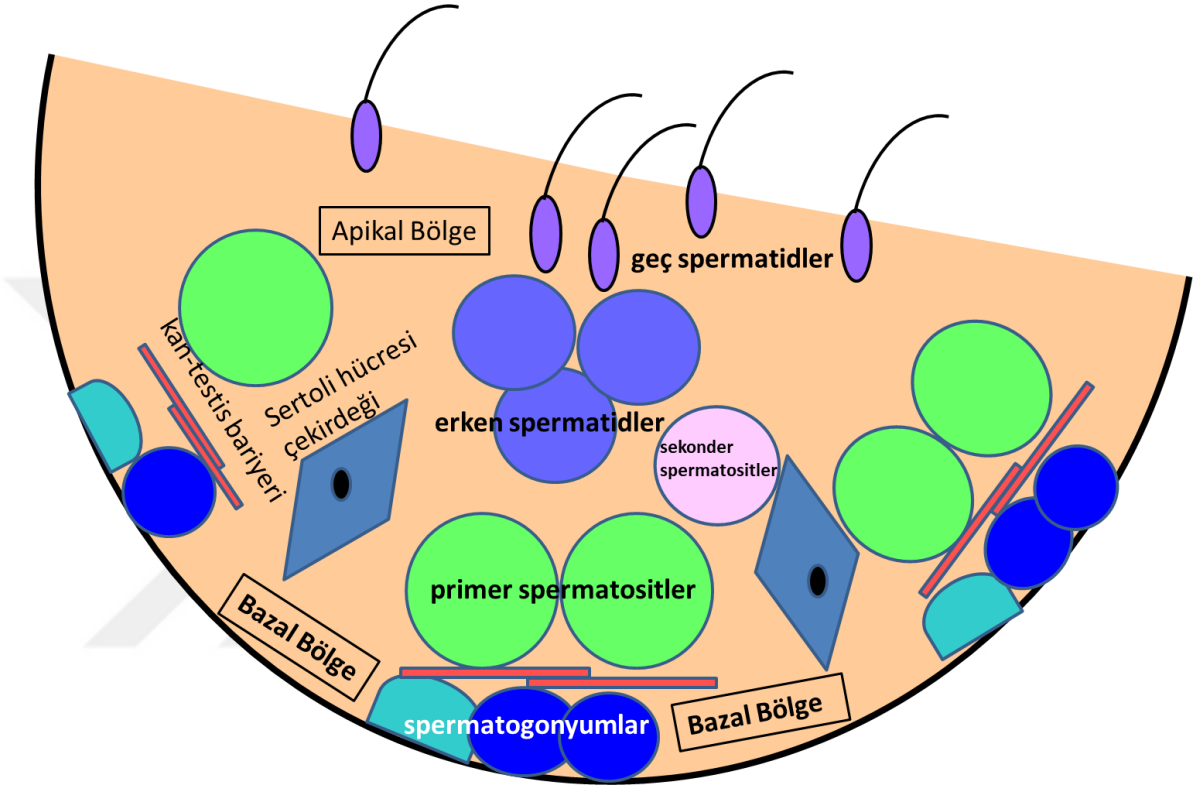
SRY geni, SOX9'u (SRY-Box Transkripsiyon Faktörü 9) aktive eden bir transkripsiyon faktörünü kodlar. SOX9 geni, özellikle Sertoli hücrelerinin farklılaşması için oldukça önemlidir (Albrecht ve Eicher 2001). Gonadlarda yeterince SOX9 gen ifadelenmesi olduğunda, testislerin oluşumu başlar (Warr ve Greenfield 2012). SRY geninin varlığında primitif cinsiyet kordonları rete testisi oluşturur. Proliferasyonuna devam eden kordonlar gelişerek testis ve medullar kordonları oluşturmak üzere derine doğru ilerler ve tubuli seminiferileri yaparlar (Sadler TW, 2019). Peritübüler miyoid hücreler ve Leydig hücrelerinin kaynağı yöre mezodermidir. Tubulüs seminiferileri içerisinde Sertoli hücreleri ve mitozlar gösteren germ hücreleri gonad yapısını oluşumunu sağlar (Larney vd., 2014).

1.2. Testisin Histolojik Yapısı

Testisler vücut boşluğu dışında skrotumun içerisinde bulunan bir çift organdır. Bu organları sıkı bağ dokusu yapısında olan "tunika albuginea" adı verilen bir kapsül sarar. Bu kapsülün iç kısmında damardan zengin tunika vasküloza bulunur. Kapsüldeki bağ dokusu organın içine girerek testisi septumlar vasıtasıyla yaklaşık 250 adet lobüle ayırır. Her bir lobül 1-4 seminifer tübülüs ve bu tübülüslerin arasında yer alan Leydig (interstisiyel) hücrelerini içeren bağ dokusu yapısındaki stromadan meydana gelir (Pawlina W, 2016).

Spermatogenezis ve steroidogenezisden sorumlu testislerin yapısını oluşturan seminifer tübülüs çok katlı sıra dışı bir epiteldir. Bu epitelde iki temel hücre popülasyonu bulunur. Bunlar; Sertoli hücreleri ve düzenli olarak çoğalan ve olgun sperme farklılaşan spermatogenez (germ hücreleri) hücrelerdir (Pawlina W, 2016). Sertoli hücreleri birbirleriyle bağlantı kompleksleriyle bağlıdır. Kan- testis bariyerini oluşturan bu bağlantı kompleksleri sıkı, adherens, oluklu tip bağlantıları ve dezmozomları içerir (Miyoshi ve Takai 2005, Yan vd., 2007). Bu yapı aynı zamanda seminifer tübülüs epitelini bazal ve apikal (adluminal) bölgelere ayırır (Yan vd., 2007). Mitoz bölünmeler bazal bölgede gerçekleşirken mayoz I ve II, spermiyogenez (spermatidlerin olgun sperm hücrelerine farklaşması) ve spermiyasyon (sperm hücrelerinin salınımı) apikal bölgede gerçekleşir (Pawlina W, 2016). (Şekil 1.1). Kan–testis bariyerindeki bağlantı birimleri özellikle de sıkı bağlantılar, mayoz bölünme sırasındaki germ hücrelerinin koruması için gerekli olan immünolojik ve biyokimyasal bir çevre oluşturur (Dym ve Cavicchia 1977). Seminifer tübülüs epitelinde tek katlı bir yapı gösteren, bazalden apikale kadar uzanan Sertoli hücrelerinin her biri, gelişimlerinin farklı aşamasındaki yaklaşık 30-50 erkek üreme hücresini (germ hücreleri) destekler ve spermatogenezis sürecinde bu germ hücrelerinin apikale seyahatinde önemli hücresel olaylara katılır (Cheng ve Mruk 2010). Bu olaylar; preleptoten aşamasındaki spermatositlerin bazalden apikal bölgeye göç etmesi, bu bölgede mayoz bölünmelerini tamamlayıp erişkin hücreler olarak adlandırılan spermatidlerin oluşturulması ve salınımı olarak özetlenebilir. Bu süreçte kan-testis bariyeri yeniden yapılanma göstererek hücrelerin bazalden apikale geçişinde yardımcı

olmaktadır (Hess ve Renato de Franca 2008). Bu geçişte, mikrotübüller, aktin filamanları ve bu yapılarla ilişkili proteinlerin görev aldığı bilinse de (Wen vd., 2018) bu sürecin altında yatan moleküler mekanizmalar halen gizemini korumaktadır (Wong vd., 2008).



Şekil 1.1. Seminifer tübülüs epitelinin şematik görünümü.

Seminifer tübülüs epitelinde dört nesil hücre aynı anda ve birbirleriyle uyumlu şekilde gelişir. Her nesil gelişimini tamamlanıp olgun sperm salımına kadar germ hücreleri epitel boyunca lümene yani yukarıya doğru hareket eder. Dört nesil hücrenin birlikte uyumlu gelişimi "seminifer tübülüs epitel döngüsü" olarak adlandırılır. Sıçanlarda bu döngüde 14 aşama belirtilmektedir. Döngünün ilk yarısı (I-VIII. aşamalar) ve ikinci yarısı (IX-XIV. aşamalar) olarak adlandırılmaktadır ve seminifer tübülüslerde morfolojik görünüm birbirinden oldukça farklıdır. Döngünün ilk yarısındaki dönemde tübülüslerde yuvarlak spermatidler ve olgunlaşmaya başlayan uzayan spermatidler bulunur. Döngünün ikinci yarısında ise uzama erken evresinde

olan spermatidler bulunur. I. ve VIII evreler arasında yuvarlak spermatidler aşamalı olarak akrozom başlığı oluşur. VIII. evrede tamamen olgunlaşmış (adım 19) uzamış spermatidler lümene doğru salınır. Bu arada yeni oluşan Tip A spermatogonumlar bölünmeye başlar ve aynı zamanda yeni oluşan preleptoten spermatositler bazal bölgeden adluminal bölgeye doğru geçer. IX. aşamada yuvarlak spermatidler uzamaya başlamıştır. Aşama XI.'de uzamış spermatidler vardır. Pakiten spermatositleri büyümüş ve geç pakitene girer. Preleptoten spermatositler ise leptoten aşamasına geçer. Evre XIV. aşamasında ise birincil ve ikincil mayotik bölünmeler gerçekleşir. (Leblond ve Clermont 1952, Creasy 1997).

Testise özgü önemli yapılardan biri de ektoplazma özelleşmeleridir (Yan vd., 2007). Bu özelleşmeler bazal ve apikal bölgelerde bulunur. Bazal bölgede ektoplazma özelleşmeleri Sertoli hücrelerinin oluşturduğu kan-testis bariyerinde; apikal bölgede ise Sertoli hücresi ve uzamış spermatidler arasında bulunmaktadır. Bu özelleşmelerin en tipik özelliği aktin filaman demetleri, endoplazma retikulumu sarnıçları ve Sertoli hücresinin zarını içermesidir (Wong vd., 2008, Cheng ve Mruk 2009, Cheng ve Mruk 2010). Aktin içerikli bu filaman demetleri özellikle apikal bölgede adeziv güç sağlamaktadır (Cheng ve Mruk 2012). Spermlerin seminifer tübülüsden atılma sürecinde bu özelleşmeler açılıp germ hücrelerinin salınımına katkıda bulunur (Wong vd., 2008).

Bağlantı birimlerinin yeniden düzenlenme süreçlerinde meydana gelebilecek hatalar, üreme hücrelerinin doğru yönlenip göç etmesinde problemlere neden olabilir. Bunun sonucunda epitelden germ hücrelerinin erken salınması gerçekleşir ki ve bu da infertilite nedenidir. Bu nedenlerden dolayı Sertoli hücrelerinin hem kendi arasında hem de germ hücreleri arasında olan ilişkilerini açıklayan faktörleri bilmek erkek üreme fizyolojisi için kaçınılmazdır (Yan vd., 2007).

1.3. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri seminifer tübülüsde bulunan ve spermatogenezisi düzenleyen somatik hücrelerdir. Henüz kan-testis bariyerinin oluşmadığı puberte öncesi dönemde Sertoli hücreleri proliferasyon göstermektedir. Sertoli hücre proliferasyonunu bazı faktörler düzenlemektedir. Bunlar arasında FSH, insülin ailesi büyüme faktörleri, aktivin, sitokinler yer aldığı gibi cAMP/PKA (Siklik Adenin Monofosfat/ Protein Kinaz A), ERK1/2 (Hücredışı sinyal düzenleyici kinaz 1/2), PI3K/Akt (Fosfoinositid-3 Kinaz/ Protein Kinaz B) ve mTORC1/p70SK6 (Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi 1/ p70 S6 Kinaz 1) yolaklarının etkin olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konumuştur. Erişkinlik döneminde ise Sertoli hücrelerinde proliferasyon özelliği görülmemektedir. Sertoli hücrelerinde proliferasyon özelliğinin baskılanmasında AMPK (AMP-Aktive Edici Protein Kinaz) ve Sirtuin 1 gibi yapıların etkinliği belirtilmektedir (Meroni vd., 2019).

Sertoli hücreleri seminifer tübülüsün bazal laminası üzerinde yerleşen prizmatik hücrelerdir. Oldukça belirgin büyük bir ökromatik çekirdeği bulunmaktadır. Sitoplazmasında düz ve granüllü endoplazma retikulumu, Golgi kompleksi, lizozom, lipid damlacıkları ve mikrotübülüslerle aktin mikrofilamanları ve aktin ilişkili proteinler bulunmaktadır (Franca vd., 2016); Pawlina W, 2016).

Çekirdek zarının etrafında vimentin ara filamanları bulunur ve bu filamanlar çekirdeği diğer organellerden ayırır. Spermatogenez sürecinde çekirdek zarı derin girinti-çıkıntılar gösterir. Çekirdekçik büyük, yoğun bir şekilde boyanan üç parçalı yapıda bulunmaktadır (Schulze vd., 1976, Franca vd., 2016).

Sertoli hücreleri temel olarak farklı gelişim aşamalarındaki germ hücrelerini destekler, besler ve korur. Fagositoz yetenekleri bulunur. Kan-testis bariyerini oluşturarak adluminal bölgede gerçekleşecek olan mayoz bölünmeler için immünolojik bir bariyer meydana getirir. Androjen bağlayıcı protein, inhibin, transferrin, seruloplazmin sentezlemektedir (Franca vd., 2016, Ni vd., 2019).

Spermatogenez sırasında Sertoli hücrelerinde TGF-β/Smad (Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta), AMPK, and MAPK (Mitojen aktive edici protein kinaz) sinyal yolaklarının etkin olduğu belirlenmiştir (Ni vd., 2019).

Sertoli hücresi için belirteçleri arasında androjen reseptör (Sar vd., 1990), SOX9 (Frojdman, Harley ve ark., 2000), Wilms-tümör proteini-1 (Wang vd., 2013), GATA bağlayıcı protein1 (Chen vd., 2005), GATA 4 (McClusky vd., 2009) ile siklin-bağımlı kinaz inhibitör 1B bulunmaktadır (Sharpe vd., 2003).

1.4. Leydig Hücreleri

Leydig hücreleri ya da bir diğer adıyla interstisiyel hücreler seminifer tübülüslerin arasında lamina propriyada yer alan büyük, poligonal ve eozinofilik boyanan hücrelerdir. En tipik özelliği testosteron salgılamasıdır. Granülsüz endoplazma retikulumu ve mitokondriyonları gelişmiştir (Pawlina W, 2016).

Leydig hücrelerinde androjenler kolesterolden sentezlenir. Kolesterol; de novo sentezden, lipoproteinlerden, lipit damlacıklarından veya hücre zarından gelmektedir. Kolesterol; mitokondriyona taşınır ve pregnenolon'a metabolize edilir. Pregnenolon 3-beta HSD (3-Beta Hidroksisteroid Dehidrogenaz) ile progesterona dönüştürülür. Ardından 17-alfa hidroprogesteron, androstenediona dönüşür ve testosteron üretilir (Zirkin ve Papadopoulos 2018).

Leydig hücrelerinde bu üretim aşamalarında PDGF (Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü), MAPK ve AMPK gibi kinazlar ve NUR77 (Çekirdek Reseptörü 4A1) , MEF2 (Miyosit Güçlendirici Faktör-2) ve GATA4 gibi transkripsyon faktörlerinin etkinliği ve protein fosfatazlarlarında düzenlenmesinin önemi belirlenmiştir (Zirkin ve Papadopoulos 2018).

1.5. Spermatogenez

Seminifer tübülüslerin bazal bölgesinde Tip A spermatogonyumlar bulunmaktadır. Bu hücreler mitoz bölünmeler geçirerek Tip B spermatogonyumlara farklanır. Tip B spermatogonyumlar da mitoz bölünmelerle primer spermatositlere farklanmaktadır. Apikal bölgede primer spermatositler, 1.mayoz bölünmelerini tamamlayıp sekonder spermatositlere farklanır. Sekonder spermatositler 2. mayoz bölünmelerini tamamlayıp yuvarlak spermatidleri oluşturmaktadır. Haploid kromozomlu olan yuvarlak spermatidler Golgi, kep, akrozom ve olgunlaşma fazlarını geçerek baş, boyun ve kuyruk bölgelerinin geliştiği erişkin erkek üreme hücresi olan uzamış spermatidlere dönüşürler (Pawlina W, 2016).

Sertoli hücreleri ve uzamış spermatidlerin arasında integrinler, laminin ve Arp3 (Aktin ilişkili protein 3) ve EPS8 (Epidermal büyüme faktörü yolağı reseptörü 8) gibi aktin ilişkili proteinler bulunmaktadır. Aynı zamanda ektoplazma özelleşmeleri de bu bölgede bulunarak uzamış spermatidlerin Sertoli hücre zarına tutunmasını sağlamaktadır (Cheng ve Mruk 2011).

Sertoli hücreleri ile uzayan spermatidler arasında bulunan apikal ektoplazma özelleşmeleri benzersiz bir bağlantı birimi oluşturmaktadır (Yan vd., 2007, Vogl vd., 2008, Cheng ve Mruk 2010). Apikal ektoplazma özelleşmelerinin seminifer tübülüs epiteli içinde spermatidlerin kutuplaşmasını ve yönelimini koruduğu da bilinmektedir. Bu şekilde tüm uzayan/uzamış spermatidlerin baş bölgeleri bazal membranı işaret eder (Mruk ve Cheng 2004, Yan vd., 2007, Wong ve Cheng 2009). Apikal ektoplazma özelleşmelerinin bu tip işlevleri yıllarca tartışma konusu olmuştur (Russell ve Clermont 1976, Russell ve Peterson 1985). Kutuplaşma işlevi, apikal ektoplazma özelleşmesinde birkaç kutuplaşma protein kompleksinin bulunmasıyla aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bunlar PAR3 (Proteinaz aktive edici reseptör 3), PAR6 (Proteinaz aktive edici reseptör 6), Cdc42 (Hücre bölünme kontrol protein 42), PALS1 (LIN7 1, MAGUK P55 Aile Üyesi ilişkili Protein), PATJ (InaD benzeri protein), Crumbs ve Scribble/LGL1/2 (Scribble Hücre Kutuplaşma Kompleks Bileşeni 1/2) gibi protein

kompleksleridir (Wong ve Cheng 2009, Cheng ve Mruk 2010, Golachowska vd., 2010). Bu kutuplaşma proteinleri başlangıçta *Caenorhabditis elegans*'ta tanımlanmış olmasına rağmen, memelilerde bu proteinlerin her biri için bir homolog bulunmuştur (Assemat vd., 2008, Iden ve Collard 2008, Wong ve Cheng 2009). İlginç bir şekilde, bu proteinlerin birçoğunun apikal ektoplazma bileşenleri olduğu ve spermatid kutuplaşmasını sağlamadaki rolleri gösterilmiştir (Wong vd., 2008, Wong vd., 2009).

Sperm salımının hemen öncesinde apikal ektoplazma özelleşmeleri ve adezyon proteinleri dejenere olur ve tübülobulbar kompleksi olarak tanımlanan ince yapıya yol açar (Young vd., 2009, O'Donnell vd., 2011). Tübülobulbar kompleksi, dev bir klatrin kaplı endositoz vezikülü (Young vd., 2009, O'Donnell vd., 2011) yapısına benzemektedir ve Sertoli hücresi membran yapılarının (Russell 1979, Young vd., 2009) invajinasyonu ile tipiktir. Yapılan çalışmalar bu süreçte Eps8'in varlığının tespit edilemeyecek bir seviyeye düştüğünü gösterir (Lie vd., 2009). Ayrıca, bir aktin çekirdeklenme/dallanma proteini F-aktin ile de birlikte lokalize olan Arp3'ün tubulobulbar kompleksler oluştuğunda olduğu gibi neredeyse saptanamaz hale geldiği belirtilmiştir (Cheng ve Mruk 2011).

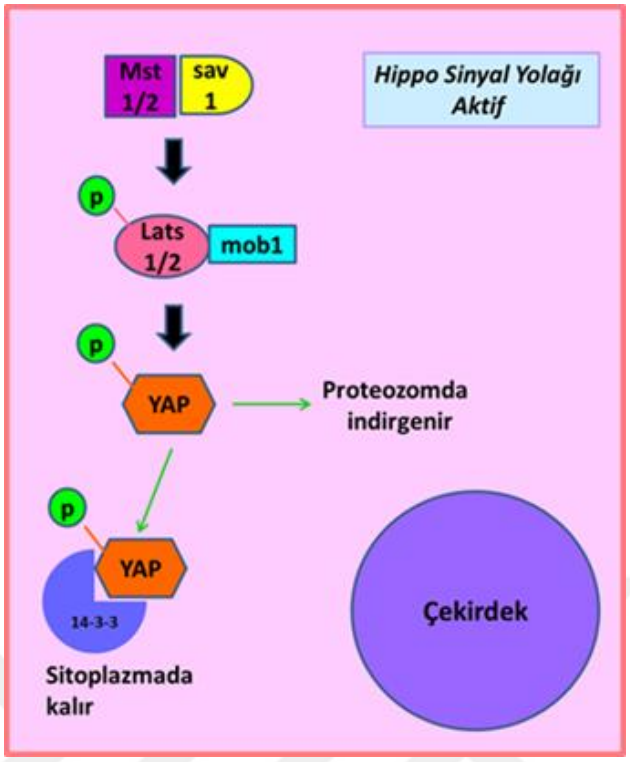
Bu çalışmalar, apikal ektoplazma özelleşmelerinin yeniden yapılandırılmasına, aktin demetleme/dikenli uç kapatma proteini EPS8 (Disanza vd., 2004, Disanza vd., 2006, Hertzog vd., 2010) ve aktin çekirdeklenme/dallanma Arp2/3'ün etkinliğinin önemli olduğunu göstermektedir (Cheng ve Mruk 2011).

Özellikle sperm salınımı sırasında aktin ilişkili yapının fokal adhezyon kinaz gibi enzimlerle bozulduğu ve bu sayede spermatidlerle Sertoli hücresi zarındaki bağlantının koptuğu belirtilmektedir. Böylece spermiyasyon süreci denilen erişkin erkek üreme hücrelerinin seminifer tübülüs lümenine salınması gerçekleşir (Bu vd., 2022).

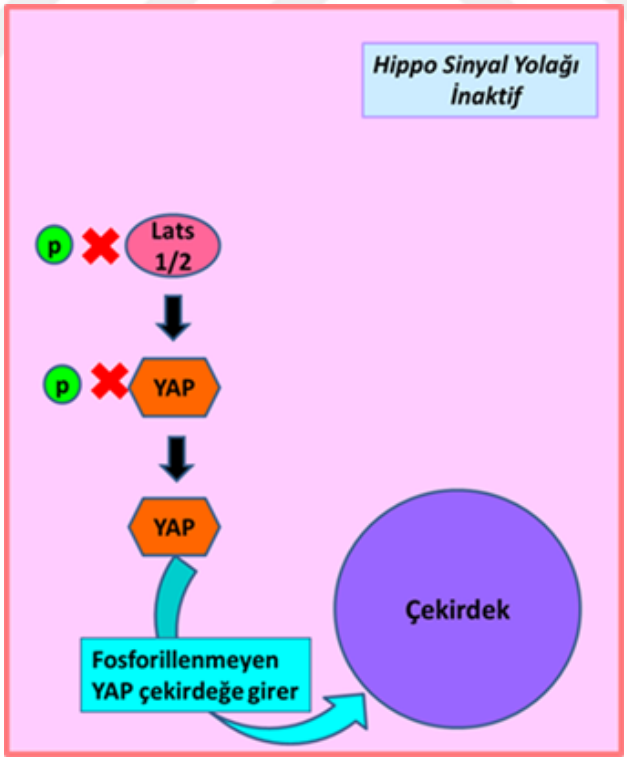
1.6. Hippo Sinyal Yolağı

1990'ların başında ilk kez *Drosophila*'da keşfedilen Hippo sinyal yolağı birçok farklı türde korunmaktadır. Bu sinyal yolağı hücrelerin bölünmesi, proliferasyonu ya da hücre ölümüne gitmesi gibi hücrelerin kaderinin belirlendiği yolaklarda ve organ boyutlarının korunmasında oldukça önemlidir (Varelas 2014). Memelilerde Hippo sinyal yolağı bir kinaz kaskadı olarak çalışmaktadır. Bu sinyal yolağının akış etkileyicileri MST1/2 (memeli STE20-benzeri protein kinaz 1 ve 2) ve LATS1/2 (büyük tümör baskılayıcı homolog kinaz 1 ve 2) iken transkripsyonel koaktivatörleri YAP (Yes-ilişkili protein) ve TAZ; YAP'ın paralogudur; PDZ (Post sinaptik yoğunluk proteini)-bağlı motif içeren transkripsyonel koaktivatörü, aynı zamanda WWTR1 (WW bölgesi-içeren transkripsiyon düzenleyici protein 1 olarak da bilinir)'dır.

Hippo sinyal yolağı aktif iken, hücre sitoplazmasında MST1/2, LATS1/2 fosforillenir. Bu fosforillenme sonucunda YAP/TAZ fosforillenir. Fosforillenmeye bağlı olarak YAP/ TAZ; 14-3-3 proteiniyle ilişkisine bağlı olarak ya sitoplazmada kalır ya da proteozomda indirgenir (Şekil 1.2). Hippo sinyal yolağı inaktif iken, YAP fosforillenmez. Fosforillenmeyen YAP; çekirdekte kümelenir ve hücre büyümesine - sağ kalımına ve proliferasyonuna katılan çeşitli transkripsyonel genleri, düzenler (Lobl 1979, Gomez, Gomez ve ark., 2014, Piccolo, Dupont ve ark., 2014, Varelas 2014). Hippo sinyal yolağını oluşturan bu bileşenlerin yanında MST1/2'ye bağlanan Sav1 (Salvador) ve LATS1/2 kinazlarına bağlanan MOB1 (Mps-1 bağlayıcı) koaktivatörleri de bulunmaktadır (Cherrett vd., 2012) (Şekil 1.3).



Şekil 1.2. Memelide Hippo Sinyal Yolağı aktif olduğunda fosforillenen YAP, 14-3-3 ile etkileşiminde sitoplazmada kalır. Aksi takdirde proteozomda parçalanır.



Şekil 1.3. YAP fosforillenmediğinde çekirdeğe girip çeşitli genlerin transkripsiyonunda etkin rol alır.

Hippo sinyal yolağının aktif/inaktif olmasını belirleyen süreçlerin hem iç hem de dış faktörler olduğu belirlenmiştir. Örneğin, mekanik kuvvet, hücre-hücre bağlantı birimleri, kutuplaşma, enerji durumu, stres, G protein bağlı reseptörler aracılığıyla işlev gören birçok hormonal faktör bunlar arasındadır (Ma vd., 2019). Yapılan çalışmalarla anormal YAP ifadelenmesi/lokalizasyonun birçok kanser türünde karakteristik olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda Hippo sinyal yolağının deregülasyonunun, hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda hücre homeostazında olumsuz etkisi oluğu ortaya konulmuştur (Avruch vd., 2012, Mori vd., 2014, Wang vd., 2014).

Son yıllarda yapılan çalışmalar memeli hücrelerinde aktin hücre iskeletindeki değişimlerin YAP aktivitesini düzenlediğini göstermektedir. Fibröz aktin (F-aktin) oluşumu indüklendiğinde Hippo sinyalinin anahtar molekülü olan YAP'ın fosforilasyonunun azaldığı ve aktive olan YAP'ın hücre çekirdeğine girip çeşitli büyüme faktörlerinin ifadelenmesinin artışına neden olduğu gösterilmiştir (Reddy vd., 2013). Klinikle bağlantılı ve tedaviye yönelik yaklaşımların geliştirilmesi açısından 2013 yılında Kawamura ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışma oldukça ilgi çekicidir (Kawamura vd., 2013). Bu çalışmada kemirgen ovaryumlarının parçalara ayrılmasıyla aktin polimerizasyonu gelişmiş, bunun sonucunda Hippo sinyal yolağı baskılanarak folikül gelişimi ve erişkin ovosit gelişimi indüklenmiştir. Buradan yola çıkan araştırmacılar çalışmanın devamında prematür ovaryan yetmezlik hastalarının ovaryum dokusunu parçalara ayırarak Hippo sinyalini baskılamış ve Akt (protein kinaz B) uyarıcı tedaviyle folikül gelişimini sağlayıp başarılı bir gebelik elde etmişlerdir (Kawamura vd., 2013).

Hippo sinyal yolağıyla ilgili kadın genital sistem üzerine tedavi yönünde bir yaklaşım ortaya konulmuş olsa da yapmış olduğumuz literatür taramasına göre erkek üreme sistemi üzerinde bu sinyal yolağıyla ilgili ayrıntılı bilgi bulunmamaktadır.

2017 yılında yapılan bir çalışmada YAP'ın parologu olan TAZ'ın baskılanmasıyla oluşturulan 2 aylık ve 12 aylık transgenik erkek farelerde üreme

sisteminde yapısal anormalliklere neden olduğu; seminifer tübülüslerin atrofiye gittiği, Leydig hücrelerinin anormal büyüdüğü, sperm sayısının azaldığı ortaya konulmuştur. 12 aylık farelerde 2 aylık farelere göre apoptotik hücre sayısının daha fazla arttığı, özellikle spermatogenik hücrelerde ve Leydig hücrelerinde senesensin arttığı belirlenmiştir (Jeong vd., 2017). 2017 yılında yapılan başka bir çalışmada da YAP'ın Sertoli hücresinde koşullu olarak silindiğinde dört günlük immatür farelerin seminifer tübülüslerinde apopitozis ve testis ağırlıklarında azalış gözlemlenmiş ayrıca erişkin farelerde Sertoli hücre sayısında düşüş izlenmiştir (Levasseur vd., 2017). Bu çalışmalar moleküler seviyede Hippo sinyal yolağının erkek üreme sistemi için önemini ve vazgeçilmez olduğunu ortaya koymaktadır. 2017 yılında yapılan başka bir çalışma da ise sıçanlardan Sertoli hücreleri puberte öncesi ve puberte sonrası dönemlerde izole edilip, kültüre edilmiştir. Bu çalışmada Sertoli hücrelerinde özellikle maturasyon sürecinde YAP'ın ifadelenmesinin artışı oldukça dikkat çekicidir (Sen Sharma ve Majumdar 2017).Yine 2018 yılında koyunlar üzerine yapılan bir çalışmada bir önceki çalışmaya benzer şekilde Hippo sinyal yolağı bileşenlerinin testiste matürasyon sürecinde arttığını ortaya koymuştur (Zhang vd., 2018). Bu çalışmalar özellikle matürasyon sürecinde bu sinyal yolağının etkin olabileceğini gösterse de bunların altında yatan mekanizmalar henüz aydınlatılamamıştır.

1.7. Adjudin

Adjudin, 1-(2,4-dichlorobenzil)-*1-H*-indazol-3-karbohidrazid, lonidamin'in analoğudur (Cheng vd., 2005). Lonidamin bir anti-kanser ilacı olup esas olarak kanser hücrelerinde hekzokinaz aktivitesini baskılayarak biyokimyasal etkinliğini sürdürür (Silvestrini vd., 1984). 1970'li yıllarda lonidamin'in anti-kanser ilacı olarak geliştirilmesi araştırmalarında (Silvestrini vd., 1984) kemirgenler üzerinde anti-spermatogenik etki yaptığı ve germ hücrelerinin seminifer tübülüs epitelinden erken dönemde lümene atılmasına neden olduğu belirlenmiştir (Lobl 1979, Lobl vd.,. Yapılan çalışmalarla adjudin'in apikal ektoplazma özelleşmelerindeki aktin filaman demetlerine zarar verdiği ortaya konulmuştur (Lee vd., 2004, Wong vd., 2008). Adjudin'in özellikle seminifer tübülüs epitelinin apikal bölgesindeki F-aktin

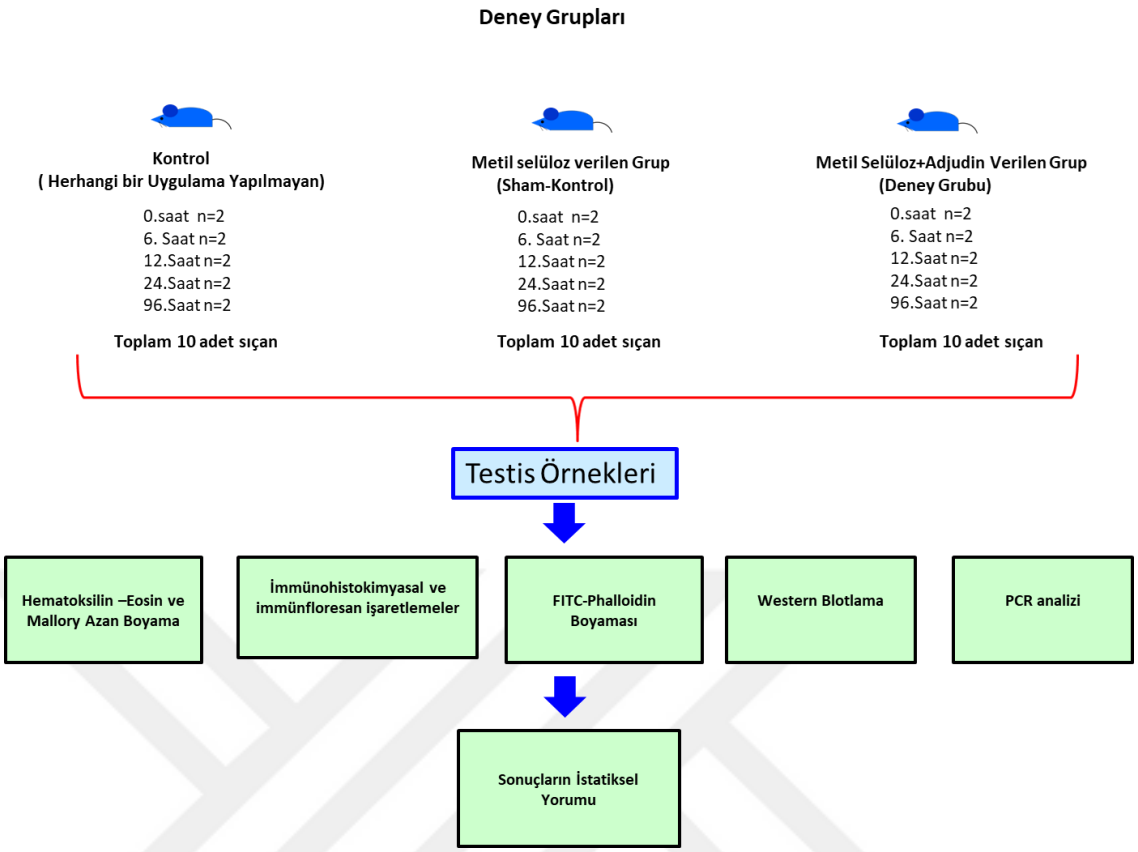
organizasyonunu bozduğu, yine bu bölgede Arp3 (Aktin ilişkili protein3) ve EPS8 (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör Yolağı Substratı 8) gibi aktin ilişkili proteinlerin ifadelenmesinin azalmasına sebep olduğu gösterilmiştir (Li vd., 2017). Bu durumun da erken spermiyasyona, spermatogonyum/spermatogonyal kök hücreler dışındaki neredeyse tüm germ hücrelerinin seminifer tübülüs epitelinden erken dönemde atılmasına neden olduğu belirlenmiştir (Mok vd., 2012). Spermatogonnyal kök hücrelerin epitelde tekrar üreme hücreleri popülasyonunu oluşturabilmesi sayesinde adjudin'in oluşturduğu etki geri dönüşümlüdür (Cheng vd., 2005). Bu bilgilerin ışığında, adjudin seminifer epiteldeki bağlantı komplekslerinin düzenlenmesinde rol oynayan sinyal yolaklarını çalışmak için in vivo model olarak kullanılmaktadır (Lee vd., 2003, Siu vd., 2003, Lee ve Cheng 2005, Lee vd., 2005, Siu vd., 2005, Siu vd., 2011).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada deney hayvanları Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları ve Araştırma Laboratuvarından temin edilip bakımları da bu birimde yapılmıştır. Çalışmamız Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan Karar no:2019-22-188 ile onaylanmış ve Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projesi 20L0230010 numarasıyla desteklenmiştir.

Çalışmamızda 250-300 gram ağırlığında erişkin *Wistar Albino* türü erkek sıçanlar kullanılmıştır. Spermiyasyon sürecini modellemek için sıçanlara tek doz 50 mg/kg Adjudin (Medchem,18996) gavaj yoluyla verilmiştir. Adjudin %0,005 metilselüloz (Sigma, M0512) içinde süspansiyon halinde, son konsantrasyonu 20 mg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Deney gruplarımız: herhangi bir uygulama yapılmayan (kontrol) sadece metilselüloz verilen (şam-kontrol), metilselüloz ve Adjudin verilen gruplar olmak üzere 3 ana başlık altında toplanmıştır (Şekil 2.1). Tüm gruplardaki hayvanlar 0., 6., 12., 24. ve 96. saatlerde sakrifiye edilmiştir. Bu saat aralıklarının seçilmesinde 2017 yılında Li ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma temel alınmıştır (Li vd., 2017).

Yine aynı çalışmada metilselüloz ve Adjudin verilen 3 adet sıçanda aktin ilişkili 3 proteinin miktarlarının 12. saatte pik yaptığı 7,7±3,5 olarak bildirildiğinden, biz de kontrol ve sham-kontrol gruplarında 0. saate göre 12. saatte maksimum 1 birimlik değişim olabileceğinin ön görüsüyle %90 testin gücü ve 0,05 yanılma ile alınması gereken minumum sıçan sayısı hesaplanmış ve her grup için 8 olarak belirlenmiştir (R 3.0.1 açıkkaynakprogram). Bu bağlamda her bir grubumuzda 5 zaman aralığına uyumlu olması açısından her bir grup için 10 hayvan alınması planlanmıştır.



Şekil 2.1. Deney düzeneği ve yapılan analizler.

2.1. Işık Mikroskop İncelemesi için Yapılan Çalışmalar

Yukarıdaki belirtilen prosedür sonunda deney hayvanları sakrifiye edilmiştir. Her bir hayvanın çift taraflı olan testis dokusunun soldakilerden bir tanesi rutin histoloji boyamaları ve immünohistokimyasal işaretlemeler için %10 tamponlu formaline, diğeri ise immunfloresan yöntem için paraformaldehite alınmıştır. Sağdaki dokular ise western blotlama analizi için -80°C de muhafaza edilmiştir.

1. Histolojik inceleme için alınan dokular %10'luk tamponlu formalin solüsyonu içerisinde 48-72 saat tespit edildi
2. Tespit işlemi tamamlandıktan sonra alınan örnekler çeşme suyu ile yıkandı.
3. Dehidratasyon amacı ile 2 kez 5'er dakika olmak üzere sırasıyla dereceli ve artan yoğunlukta etil alkol serilerinden geçirildi.

4. Örnekleri şeffaflandırılmak için ksilen (Sigma Aldrich, 108298) ile işleme tabi tutuldu.
5. Şeffaflandırılan örnekler sıvı parafinle 60ºC'lik etüv içerisinde 3 saat inkübe edilip parafin bloklar içerisine gömüldü.
6. Parafin bloklardan Leica RM 2125RT model mikrotom ile 4 µm kalınlığında kesitler sıcak su banyosundan lam üzerine toplandı.
7. İmmunohistokimyasal boyamaların değerlendirmeleri için ise kesitler poli-L-lisinli (Patolab, 165014) camlara alındı.

Dokudan elde edilen kesitler doku bütünlüğü morfolojisini değerlendirmek üzere Hematoksilin-Eosin ve bağ dokusunu değerlendirmek için Mallory Azan ile boyandı.

2.2. Hematoksilin – Eozin Boyama Protokolü:

1. Kesitler 60°C' lik etüvde 1 saat bekletildikten sonra deparafinizasyon amacıyla 2 kez 30'ar dakika ksilene tabi tutuldu.
2. Rehidratasyon için sırasıyla %100, %96 ve %75 etanol (Isolab, 920.026) serilerinden geçirilen kesitler çeşme suyuna alındı.
3. Hematoksilen solüsyonu ile 1 dakika boyamanın ardından çeşme suyundan geçirilen örnekler 3 dakika Eozin solüsyonu ile boyandıktan sonra tekrar çeşme suyunda yıkandı.
4. Dehidratasyon işlemi için %75, %96 ve %100 etanol serilerinden geçirildi.
5. Şeffaflaştırma amacı ile 30' ar dakika iki kez ksilende tutulan kesitler entellan (Merck, 107961) kullanılarak lamelle kapatıldı.
6. Boyanan preparatlar Zeiss Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) marka ışık mikroskobuyla incelendi ve fotoğrafları çekildi.

2.3. Mallory Azan Boyama Protokolü:

1. Ksilen ile deparafinize edilen kesitler azalan etanol serilerinden geçirilip yıkama aşamasından sonra 1 saat 60°C'lik etüvde Azokarmin G (Sigma Aldrich, A1091) solüsyonunda bekletildi.
2. Kesitler suda yıkanıp %1'lik anilin alkol ve %1'lik asetik alkolden geçirilip %5'lik fosfotungustik asitle (Sigma Aldrich, P4006) muamele edildi.
3. Suda yıkanan kesitler %0,25 anilin mavisi (Sigma Aldrich, B8563) - %1 Orange G (Sigma Aldrich, 861286) solüsyonunda yaklaşık 1 saat kadar tutulup yıkama sonrası alkol serilerinde dehidrate edildi.
4. Ksilen ile şeffaflandırma sonrası entallan kullanılarak lamelle kapatıldı.
5. Boyanan preparatlar Zeiss Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) marka ışık mikroskobuyla incelendi ve fotoğrafları çekildi.

2.4. İmmünohistokimyasal Yöntem İçin Kesitlerinin Alınıp Boyanması

2.4.1. İmmünohistokimyasal İşaretlemeler

İmmünohistokimyasal çalışma için parafin bloklara gömülen doku örneklerinden elde edilecek kesitler üzerinde Hippo sinyal yolağı bileşenlerinden YAP (Cell Signaling Technology, 14074) ve p-YAP (Cell Signaling Technology, 13008) ve testiste etkin olarak görev yapan aktin ilişkili proteinlerden Arp3 (Aktin ilişkili protein3) (Abcam, EPR10429) ve EPS8 (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör Yolağı Substratı 8) (Bioss, bs-3848R) primer antikoru ile işaratlemeler yapıldı.

1. Parafin bloklardan poli-L- lisin kaplı lamlar üzerine 4 µm kalınlığında kesitler alındı.
2. Ksilen (Sigma Aldrich, 108298) ile deparafinize edildikten sonra sırasıyla %100, %90, %80 ve %70 dereceli alkol serilerinden geçirilerek hidrate edildi.

3. Sitrat buffer (Ph 6) (Sigma Aldrich, W302600) ile antijenik maskelenmenin engellenmesinin ardından PBS (phosphate buffered saline) ile kesitler yıkandı.
4. Endojen peroksidaz aktivitesinin önlenmesi için kesitler %0.3'lük H_2O_2 (Thermo Scientific, TA-060-HP) ile işlem gördü.
5. PBS (Fosfat tamponlu tuz) ile yıkanan kesitler 5 dakika, oda ısısında bloklama solüsyonu (Thermo Scientific, TA-060-UB) ile inkube edildi.
6. Primer antikorlar uygun dilüsyonda hazırlanıp kesitler üzerine uygulandı ve kesitler 37 ºC de bir gece +4°C' de primer antikorla işleme tabi tutuldu. Primer antikorla inkübasyon sonrası dokular PBS ile yıkanmış ve oda ısısında 10 dakika biyotinlenmiş sekonder antikor (Thermo Scientific, TL-060-PB) ile inkübe edildi.
7. PBS ile yıkanan kesitler 10 dakika Streptavidin-peroksidaz (Thermo Scientific TL-060-PH) kompleksi ile oda ısında inkübe edildi.
8. PBS ile yıkanan kesitler kromojen olarak kesitlerin üzerine DAB (3,3-diaminobenzidine) solüsyonu uygulandı ve yaklaşık 2 dakika bekletildi. DAB solüsyonu hazırlamak için 2 mL DAB substratı (Thermo Scientific, TA-060-HSX) içerisine 40 µL DAB kromojeni (Thermo Scientific ,TA-002-HCX) eklendi.
9. Harris Hematoksilin (Sigma Aldrich, HHS16) ile ters boyama yapılarak kesitler %70, %80, %90 ve %100 alkollerden geçirilip dehidrate edildi.
10. 30'ar dakika iki kez ksilende tutulan kesitler sonrasında Entellan® (Merck, 13073-00) ile kapatıldı.
11. Boyanan preparatlar Zeiss Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) marka ışık mikroskobuyla incelenmiş ve fotoğrafları çekildi. İmmunohistokimyasal olarak dokulardaki immunreaktivite gösteren hücreler ışık mikroskobu ile incelendi ve ImageJ (ImageJ1,51j8, National Institutes of Health, USA) programı kullanılarak değerlendirildi.

2.4.2. Dokuların İmmünfloresan Yöntem İçin Kriyokesitlerinin Alınıp İşaretlemelerin Yapılması

2.4.3. İmmünfloresan Yöntem

1. Tespit için paraformaldehit (%4 PFA) içerisine alınan dokular, rutin takip işlemlerinden geçirilerek kriyomikrotomda (SHANDON, Cryotome SME) poly-L-lisin kaplı lamlar üzerine 10 µm kalınlıkta kesitler alındı.
2. Kesitlerin oda sıcaklığına kadar ısınması sağlandı ve PAP-Pen® ile çevrilerek etrafında havuz oluşturulan dokular PBS-Tween 20 (BioShop, TWN508.500) (%0,2-%0,5) ile yıkanarak kriyomatriks uzaklaştırıldı.
3. Spesifik olmayan bağlanmaları ve fon boyanmasını önlemek için 30 dakika oda ısısında bloklama yapıldı.
4. Dokular dilüe edilmiş ve immünohistokimyasal yöntemde kullanılan primer antikorlarla +4°C'de bir gece ve ilaveten 2 saat 37°C de inkübe edildi. Ardından PBS-Tween 20 (%0,2-%0,5) ile 15 dakika yıkama yapıldı.
5. Primer antikora uyumlu sekonder antikor uygulanarak 37°C'de 2 saat süreyle inkübe edildi. PBS-Tween 20 (%0,2-%0,5) ile 15 dakika yıkanarak Hoechst (Santa Cruz, SC-394039) içeren kapatma mediumu ile kapatıldı ve hazırlanan preparatlar Zeiss Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) marka floresan mikroskopta incelenip ve fotoğrafları çekildi.
6. Görüntüler ImageJ (ImageJ1,51j8, National Institutes of Health, USA) programı kullanılarak sayısal olarak değerlendirildi.

2.4.4. FITC-Phalloidin Boyaması

Bu boyama F-aktin incelenmesi için yapıldı.

1. Poly-L-lisin kaplı camlara alınan doku kesitleri PBS ile yıkandı.
2. FITC-Phalloidin (Sigma Aldrich, P5280) ile 30 dk boyunca 37˚C inkübe edildi.

3. Kesitler 15 dakika PBS ile yıkanarak Hoechst içeren kapatma mediumu ile kapatıldı ve hazırlanan preparatlar Zeiss Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) floresan mikroskopta incelenip ve fotoğrafları çekildi.
4. Görüntüler ImageJ (ImageJ1,51j8, National Institutes of Health, USA) programı kullanılarak sayısal olarak değerlendirildi.

2.5. Western Blot Uygulaması

Testiste Hippo sinyal yolağı ilişkili proteinlerinden YAP, p-YAP; aktin ilişkili proteinlerden Arp3 ve EPS8 ifade seviyelerini göstermek hedeflendi. Anti-alpha-tubulin (Cell Signaling Technology, 15115S) antikoru yükleme kontrolü olarak kullanıldı. Protein ifade seviyelerini belirlemek amacıyla üç gruptan tüm saatler için proteinler elde edilmiş ve dansite ölçümleri Image J yazılımı ile belirlendi.

2.5.1. Protein İzolasyonu

1. Protein izolasyon solüsyonu hazırlandı. Bunun için 500 µL lizis tamponu (T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific, 78510) içerisine 5 µl fosfataz (Cell Signaling Technology, 5870S) ve 5 µL proteaz (Sigma Aldrich, P8849) inhibitörleri eklendi.
2. Her doku örneği için bir 2 mL Safe-Lock tüpe 5 mm paslanmaz çelik boncuk (Qiagen, Stainless Steel Beads, 5mm Cat. No: 69989) kondu.
3. Tüplerin içerisine 200 µL protein izolasyon solüsyonu konuldu. 5 dakika buz üzerinde inkübe edildi.
4. Tüpler TissueLyser LT (Qiagen) setine yerleştirildi. Numuneler 25-50 Hz'de 3 dakika homojenize edildi.
5. Numuneler +4°C' de 10.000 g' de 6 dakika santrifüj edildi. Supernatantlar yeni 1,5 ml' lik Eppendorf® tüplerine alındı. Bu ürünler -80°C' de saklandı.

2.5.2. Protein Miktar Tayini

1. Protein miktarını ölçebilmek için Takara BCA (Bisinkoninik Asit) Protein Assay Kit (Cat No: T9300A) kullanıldı.
2. Bu kitin standartları ve testis protein örnekleri 25µL olacak şekilde kuyulara uygun bir şekilde dağıtıldı.
3. Kit içerisinden çıkan Reagent A' dan ve Reagent B' den 200/1 oranında bir tüp içerisinde karıştırıldı. Bu dilüsyondan plaka örnek ve standartlar üzerine 200'er µL dağıtıldı.
4. 37°C' de yarım saat inkübe edildikten sonra spektrofotometri cihazında (Plate reader Infinite 200 PRO, Tecan Life Sciences) 562 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.

2.5.3. Proteinlerin SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforez) ile Ayrılması

1. 100 µL 4X Laemmli Buffer (Biorad, Cat No:1610747) ve 5 µL 2-mercaptoethanol (Biorad Cat No:1610710) içeren solüsyon hazırlandı. Protein miktarı ölçülen örnekler bu solüsyon içinde uygun oranda eklenerek 95°C'de 5 dakika denatüre edildi.
2. İmmün blotlama çalışmalarında 10-200 kDa arasında ayrıştırma sağlayan hazır Any kD Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Protein Gels (BioRad, 4568123) kullanıldı.
3. Jel koşturma için ise Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad, 1658005) sistemi kullanıldı.
4. Kuyular da yıkanarak üstüne 1X koşturma tamponu eklenir. 1X yürütme tamponu 100 ml 10X Tris-Glycine-SDS (Biorad, Cat No: 1610732) üzerine 900 mL steril milliQ su eklenerek hazırlandı.
5. Ardından belirteç (Biorad, Cat No:1610374) ve örnekler jel kuyularına 10 µg miktarda yüklendi. Yüklemeden sonra jel 90 V' da 75 dk yürütüldü.

2.5.4. Proteinlerin Membrana Transferi

1. Islak transfer işlemleri için Mini Trans-Blot Module (Bio-Rad, 1703935) kullanıldı.
2. 1X Transfer Tamponu hazırlandı. Bunun için 200 mL 10X Tris Gly-SDS-B, 400 mL methanol (Merck, 106009) ve 1400 ml soğuk steril milliQ su karıştırıldı.
3. SDS-PAGE sonrası jel bulunduğu kasetten dikkatlice ayrılıp kurumaması için 1X ıslak transfer tamponu içerisine bırakıldı.
4. Membran jel boyutlarında kesilip %100 methanol (Merck, 106012) içerisinde 5 dk inkübe edilip 1X ıslak transfer tamponundan geçirildi.
5. Transfer sandviçi; sünger-filtre kağıdı-jel-membran-filtre kağıdı-sünger şeklinde oluşturuldu. Sandviç üzerinden merdane ile geçilerek olası hava kabarcıkları giderildi. Ardından sandviç aparatı kapatılarak transfer sistemine oturtuldu.
6. Transfer tankı soğuk 1X ıslak transfer tamponu ile doldurulduve -20 °C buz aküsü tank içine yerleştirildi. Sonrasında sistem 100 V' da 1 saat çalıştırıldı.

2.5.5. Bloklama

1. 1X TBS-T (Tris Tamponlu Tuz) tamponu hazırlandı. Bunun için 100 mL 10X TBS üzerine 900 mL steril milliQ su ve 2,5 mL Tween 20 (Bioshop, Cat No: TWN510.100) eklendi.
2. Transfer işlemi sonrasında membran boş cam kaba alındı. Üzerine bloklama solüsyonu olarak 30 mL 1X TBS-T içerisinde hazırlanan %5 BSA (Cell Signaling technology, 9998S) solüsyonu eklendi.
3. Kap oda ısısında orbital çalkalayıcı üzerinde yavaş devirde bir saat inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonrası bloklama solüsyonu membran üzerinden uzaklaştırıldı.

2.5.6. Primer Antikor ile İşaretleme

1. Tüm primer antikorlar 10 mL hacimde %5'lik BSA (Sığır Serum Albumini) içerisinde uygun dilüsyonlarda hazırlandı.

2. Bloklama sonrası membran üzerine primer antikor uygulaması yapıldı. Membran bulunduğu kabın içerisinde ağzı kapalı bir biçimde +4°C' de bir gece orbital çalkalayıcıda düşük devirde inkübe edildi.

2.5.7. Sekonder Antikor ile İşaretleme ve Görüntüleme

1. Gece boyu primer antikor ile işaretleme sonrası ertesi gün primer antikor membran üzerinden uzaklaştırıldı.
2. Membran 3 kez 10' ar dakika 1X TBS-T solüsyonu ile orbital çalkalayıcı üzerinde orta devirde çalkalanarak yıkandı.
3. Sekonder antikor (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, Cell Signaling Technology, 7074) %5 BSA içeren 1X TBS-T solüsyonu içerisinde 1:5000 dilüsyonda ve toplam 10 ml hacimde hazırlandı.
4. Membranlar oda ısısında ve karanlıkta orbital çalkalayıcıda düşük devirde bir saat sekonder antikor ile inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrası membran 3 kez 10' ar dk 1X TBS-T solüsyonu ile orbital çalkalayıcı üzerinde orta devirde çalkalanarak yıkandı.
6. Yıkama sonrası membran kemiluminesans solüsyon (Biorad, Cat No: 1705061) ile kaplandı ve Odyssey Fc Imaging System (LI-COR Biosciences) sisteminde Chemi 200 kanalında kemiluminesans görüntüleme yapıldı. Referans marker görüntülemeleri için 700 kanalı kullanıldı.

2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Analizi

Hippo Sinyal Yolağı ilişkili proteinlerinden YAP, aktin ilişkili proteinlerden Arp3 ve EPS8e karşı primerler tasarlandı. Normalizasyon için β-tubulin primeri tasarlanarak kullanıldı.

2.6.1. RNA (Ribonükleik asit) İzolasyonu

1. Buz üzerinde –80°C'den testis dokuları getirildi.
2. Orta büyüklükte testis parçaları kesilerek buz üzerinde 2mL (mililitre) lik Safelock tüpe yerleştirilir. Eller, RNaseZAP' (RNaz Dekontaminasyon Solüsyonu) kullanarak 5 mm'lik boncuk, tüplere eklendi. Tüpün içine 500µL NucleoZOL (Macherey-Nagel) konulup vortekslenir. Tüpler 10 dakika buz üzerinde bekletildi.
3. Testis örnekleri 50 Hz'da 2 dakika süreyle TissueLyser LT (Qiagen) sisteminde homojenize edildi.
4. Tüplere spin yaptırıldı.
5. 1,5 ml'lik Eppendorf® tüplerine doku lizatı alındı.
6. 500µL NucleoZOL içeren tüplere 200µL RNAz içermeyen su eklendi. 15 saniye kuvvetlice çalkalandı. 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.
7. Örnekler 12000g'de oda ısısında (18°C) 15 dakika santrifüj edildi.
8. 1,5 mL'lik tüpler alındı. Bu tüplere santrifüjden çıkan süpernatant eklendi ve yaklaşık 500µL süpernatant eklendi
9. Tüplerin üzerine 500µL izopropanol eklenip tüpler alt-üst yapılıp oda ısısında 10 dakika bekletildi.
10. Örnekler 12000g'de oda ısısında (18°C) 10 dakika santrifüj edildi.
11. Süpernatant atıldı. Tübün dibindeki beyaz yapı RNA'dır.
12. Tübün üzerine 500µL %75'lik alkol konulup 8000g'de 3 dakika santrifüj yapıldı.
13. Süpernatant atıldı. Üzerine tekrar 500µL %75'lik alkol eklenip 8000g'de 3 dakika santrifüj yapıldı.

14. Süpernatant atıldı.
15. Pellet 50µL RNAz içermeyen su ile çözülerek RNA elde edildi.
16. Buz üstüne alınan örnekler ve RNAz içermeyen su ile nanodropta ölçüm yapılmak üzere alındı. Nanodrop üzerinde alınan sonuçlar Çizelge 2.1'de belirtildi.

Çizelge 2.1. Testis örneklerinin RNA miktarları.

	Miktar	Kalite (260/280)	Kirlilik (260/230)
K5 0.h 1.H	1700,5	2,04	1,93
K6 0.h 2.H	813	2,05	2,22
K3 6.h 1.H	1721,3	2,10	2,17
K1 6.h 2.H	1235	2,10	2,18
K2 12.h 1.H	1148,2	2,09	2,22
K8 12.h 2.H	1694,2	2,11	2,23
K4 24.h 1.H	1009,3	2,08	2,15
K9 24.h 2.H	927,6	2,08	2,16
K7 96.h 1.H	827,3	2,11	2,00
K10 96.h 2.H	898,5	2,08	2,24
MS 0.h 1.H	1008,1	2,11	2,12
MS 0.h 3.H	973,9	2,10	2,23
MS 6.h 1.H	797,8	2,11	2,04
MS 6.h 2.H	1189	2,12	2,17
MS 12.h 1.H	1188,6	2,11	2,22
MS 12.h 2.H	677,9	2,09	2,12
MS 24.h 1.H	1143,6	2,11	2,04
MS 24.h 2.H	1102,5	2,12	2,07
MS 96.h 1.H	1078,4	2,10	2,23
MS 96.h 2.H	877,9	2,08	2,18
MS+Adj 0.h 1.H	858,2	2,07	2,11
MS+Adj 0.h 2.H	701,8	2,06	2,17
MS+Adj 6.h 1.H	1017	2,09	2,20
MS+Adj 6.h 2.H	727,1	2,09	2,19
MS+Adj 12.h 1.H	1056,2	2,09	2,21
MS+Adj 12.h 2.H	1117,8	2,12	2,10
MS+Adj 24.h 1.H	1553,8	2,12	1,98
MS+Adj 24.h 2.H	1397,7	2,12	2,22
MS+Adj 96.h 1.H 1.parça	974,6	2,08	2,12
MS+Adj 96.h 1.H 2.parça	1003	2,10	1,99
MS+Adj 96.h 2.H	1179	2,09	2,24

2.6.2. Total RNA'lardan cDNA sentezi

iScript cDNA (Tamamlayıcı DNA) sentez kiti (BIO-RAD, Cat No: 1708891), gerçek zamanlı Q-PCR (Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) kullanarak gen ekspresyonu analizi için bir cDNA sentez kitidir.

cDNA reaksiyon karışımı aşağıdaki tabloya göre 0.2'lik PCR tüplerinde hazırlandı. cDNA'lar genellikle 1 ug (mikrogram) konsantrasyona eşitlendi.

Çizelge 2.2. Testis örneklerinden cDNA reaksiyon karışımı için kullanılan maddeler.

Bileşen	**Miktar**
5X iScript Reaction Mix	4 µl
iScript Reverse Transcriptase	1 µl
Nuclease-free Water	Değişken
RNA template	1 µg
Total	**20 µl**

Hazırlanan karışım bir termal döngüleyicide reaksiyona aşağıdaki koşullarda sokuldu.

25 C'de 5 dk
46 C'de 20 dk
95 C'de 1 dk
4 C'de sonsuz.
Sentezlenen cDNA'lar -20 C'de saklandı.

2.6.3. Kantitatif Real Time PCR (QRT-PCR) için Primerler ve Sulandırma Protokolü

1. Primerler forward ve reverse olarak tasarlandı.
2. Tasarlanan primerlere uygun oranda 100 µM stok sulandırması yapıldı. Sulandırmadan önce liyofilize olarak gelen primer tüplerine spin attırıldı.

Ardından kapakları dikkatlice açılarak uygun miktarda nükleaz içermeyen su eklendi. Bu ürünler ana stok olarak -20° C'ye kaldırıldı.

3. Real Time PCR için ana stoklardan nükleaz içermeyen suyla tekrar sulandırma yapıldı. Bu ürünler 10 µM'lık ara stoklardır ve -20°C' de saklandı.

2.6.4. REAL-TIME PCR

Real Time PCR çalışması Lightcycler 480 (Roche) cihazı ile iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (BIO-RAD, Cat No: 1725121) kullanılarak gerçekleştirildi.

cDNA'lar PCR çalışması için dilüe edilir. qPCR'da 1-5 ng/ul konsantrasyon idealdir. Bunun için sentezlenen 20 ul cDNA üzerine 180 ul Nuclease-free Su eklendi. PCR aşamasına da bu örnekten 4 ul eklendi. Primerler qPCR'da 500 nM final konsantrasyonda kullanılması idealdir. Primerler 100 uM stok olacak şekilde sulandırıldı. Sonrasında 10 uM ara stoklar hazırlandı. Bu hazırlanan primerlerden her bir reaksiyonda 500 nM olacak şekilde kullanıldı.

PCR reaksiyon ana karışımı aşağıdaki tabloya göre örnek sayısı ile çarpılarak bir tüpte hazırlandı. Hazırlanan reaksiyon karışımı her kuyuya 16 ul olacak şekilde dağıtıldı. Arından üzerine 4'er ul (2 ng/ul) örnek eklenir ve plaka üzeri yapışkan kağıt ile kapatıldı. Plaka spin attırıldı. Ardından plaka Lightcycler 480 (Roche) cihazına yüklenerek qPCR reaksiyonu başlatıldı.

Termal döngü şu şekilde gerçekleştirildi.

Polimeraz aktivasyonu ve DNA denatürasyonu: 95 C'de 30 saniye

Denatürasyon: 95 C'de 15 saniye ┐ 40 döngü

Tavlama: 60 C'de 60 saniye ┘

Çizelge 2.3. Testis örneklerinden PCR reaksiyon karışımı için kullanılan maddeler.

Bileşen	**Miktar**	**Final Konsantrasyon**
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (BIO-RAD, Cat No: 1725121)	10 ul	1X
Forward Primer	1 ul	500 nM
Reverse Primer	1 ul	500 nM
Water	4 ul	
Total	**16 ul**	

2.7. Agaroz Jel Elektroforezi

Bu deneydeki amacımız QRT-PCR sonuçlarımızın güvenirliliğini tespit etmektir.

DNA fragmentleri, yatay jel elektroforez sistemi kullanılarak ayrıştırıldı. %2 Agaroz jel; 3 g Agaroz, 150 ml 1X TBE (Tris Borik asit EDTA), 5 µl EtBr (Etidyum bromür) kullanılarak hazırlandı.

Büyük elektroforez tankı için 3 gr agaroz tartılıp 150 ml 1X TBE içinde tamamen çözüldü. Jelin bir miktar soğuması beklenip konsantrasyonu 10 mg/ml olan ethidyum bromür'den 5 µl jel içerisine eklendi. Elektroforez tank aparatına uygun tarak yerleştirildi ve jel döküldü. Jelin polimerleşmesinin ardından tarak çıkarıldı, jel üzerine 1X TBE eklendi. 10X TBE**:** 700 ml ddH2O (Çift kez distile edilmiş su) bir beher içerisine aktarıldı, 108 gr Tris, 55 gr Borik Asit, 40 ml 0.5 M EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) tartılarak üzerine eklendi. Manyetik karıştırıcı üzerinde çözünene kadar karıştırıldı ve 1 litreye tamamlandı. 100mL 10X TBE , 900 mL ddH2O eklenerek 1XTBE hazırlandı. Örnekler; 10uL örnek+2uL 6X örnek yükleme tamponu olacak şekilde karıştırılarak, her kuyuya eşit miktarda yüklendi. 100 Voltta 85 dakika yürütüldü. PCR ürünü DNA fragmentlerinin moleküler ağırlığını belirlemek için New England Biolabs 1 kilobayt DNA Ladder ve Thermo Scientific 100 baz çifti içeren DNA Ladder kullanıldı.

Yürütme işleminin ardından, agaroz jel Gene Genius Bio Imaging System ile ultraviyole ışığı altında görüntülendi.

2.8. Elde Edilen Sonuçların İstatiksel Değerlendirmelerle Birlikte Yorumlanması

Elde edilecek verilerin istatiksel değerlendirilmesi SPSS 11.5 paket programında yapıldı. Değerlendirmelerde her bir zaman birimi için 3 grubun karşılaştırılmasında tek yönlü ve çift yönlü varyans analizi ve Bonferroni testleri yapıldı ; her zaman birimi hem grupların beraber etkilerini incelemek amacıyla iki yönlü varyans analizi kullanıldı. İstatiksel anlamlılık sınırı; 0,05 olarak kabul edildi.

Kontrol ve Metilselüloz grupları birbirleriyle benzer özellikler gösterdi. YAP ve p-YAP immünohistokimyasal olarak yapılan incelemede Adjudin verilen grupla Kontrol ve Metilselüloz verilen gruplara göre belirgin fark vardı ($p< 0,05$). İmmünohistokimyasal olarak Arp3 ve EPS8 immünohistokimyasal (IHC) boyamalarında gruplar arasında fark yoktu. FITCH-Palloidin boyamasında Kontrol ve Metilselüloz gruplarıyla karşılaştırıldığında Adjudin verilen gruplarda 6. Saat itibariyle düşüş izlenmiş ve en belirgin fark 96. Saatte gözlemlendi ($p<0,05$). YAP, p-YAP, Arp3 ve EPS8 immünfloresan (IF) boyamalarda Kontrol ve Metilselüloz verilen gruplarla karşılaştırıldığında Adjudin verilen grupların 96. Saatinde belirgin fark izlendi ($p<0,05$).

3. BULGULAR

3.1. Hematoksilin – Eozin Boyama Sonuçları

Hematoksilin-Eozin (H&E) boyamasıyla yapılan incelemede kontrol gruplarına (Şekil 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6), Metilselüloz verilen gruplara (Şekil 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12) ve Metilselüloz + adjudin verilen gruplara (Şekil 3.13, 3.14, 3.15, 3.16, 3.17, 3.18) ait görüntüler verilmiştir.

Kontrol gruplarında 0., 6., 12., 24. ve 96. saatlerde bir fark izlenmemiştir. Testis tübülüs yapısı normal görünümde olup Sertoli hücrelerini, spermatogonyumları, spermatositleri, yuvarlak ve uzamış spermatidleri içermektedir (Şekil 3.19).

Aynı saatlerde Metilselüloz verilen gruplar ise kontrol gruplarına benzer özellikler gösterip testis tübülüs yapısı normal görünümdedir (Şekil 3.20, 3.21, 3.22, 3.23, 3.24, 3.25).

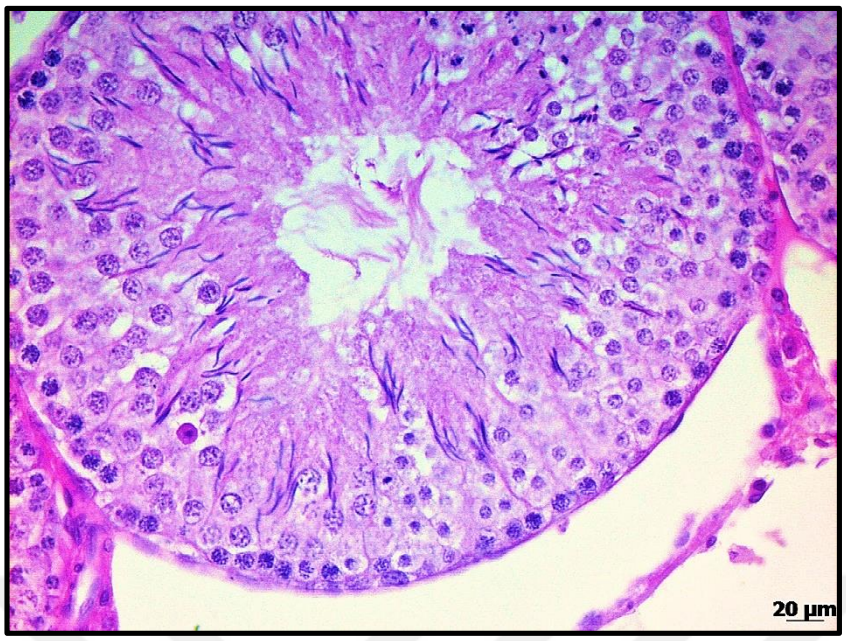
Testis tübülüs yapısı, Metilselüloz + adjudin verilen gruplarda 0.saat; kontrol ve metilselüloz verilen grupların 0.saatine benzer özellikler göstermektedir (Şekil 3.20). Metilselüloz ve adjudin verilen grupların 6.saatinden itibaren testis tübülüs yapısında yapı değişikliği izlenmektedir (Şekil 3.21). Özellikle 12. saat itibariyle testis tübülüs yapısının bozulduğu belirlenmiştir (Şekil 3.22). 24.saatte germ hücrelerinin tübülüs lümeninde birikmeye başlaması oldukça belirgindir (Şekil 3.23). 96.saatte ise testis tübülüs yapısının bozulduğu ve germ hücrelerinin seminifer tübülüs lümeninde kümeler oluşturduğu izlenmektedir (Şekil 3.24). Şekil 3.25'de tüm gruplara ait örnekler verilmiştir.



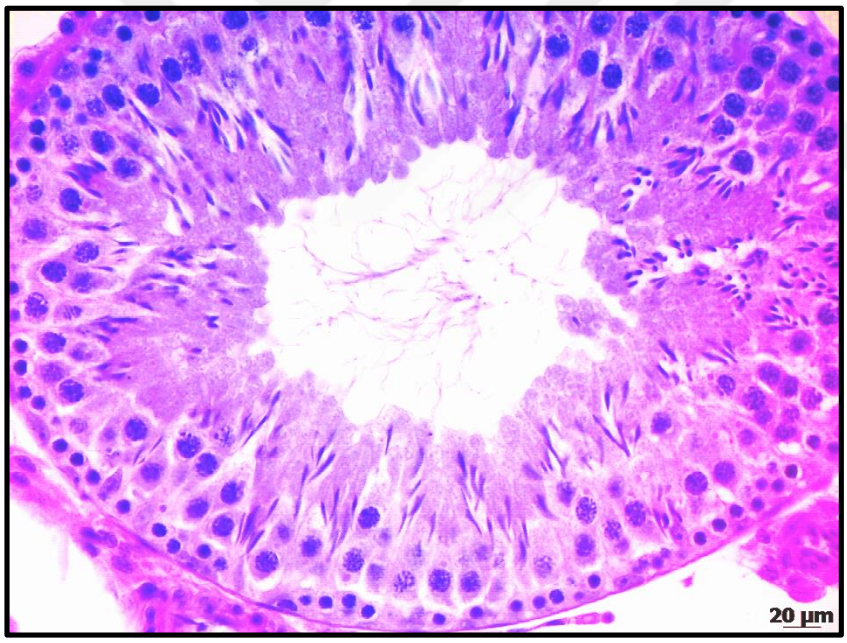
Şekil 3.1. Kontrol gruplarına ait 0. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler.



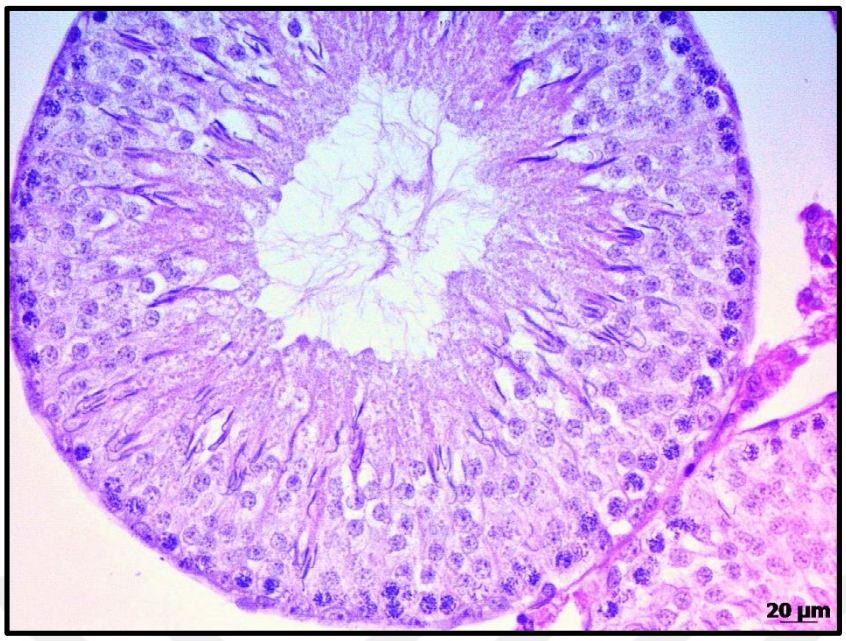
Şekil 3.2. Kontrol gruplarına ait 0. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler. ⬆ uzamış spermatidleri, ↑ Sertoli hücrelerini, p primer spermatositleri, s spermatidleri, d damar yapısını gösterir.



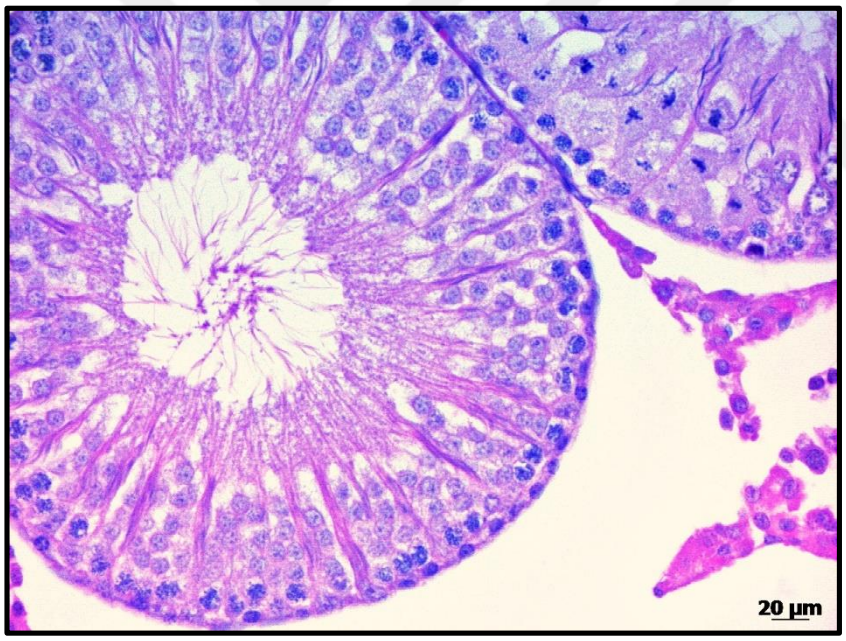
Şekil 3.3. Kontrol gruplarına ait 6. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler.



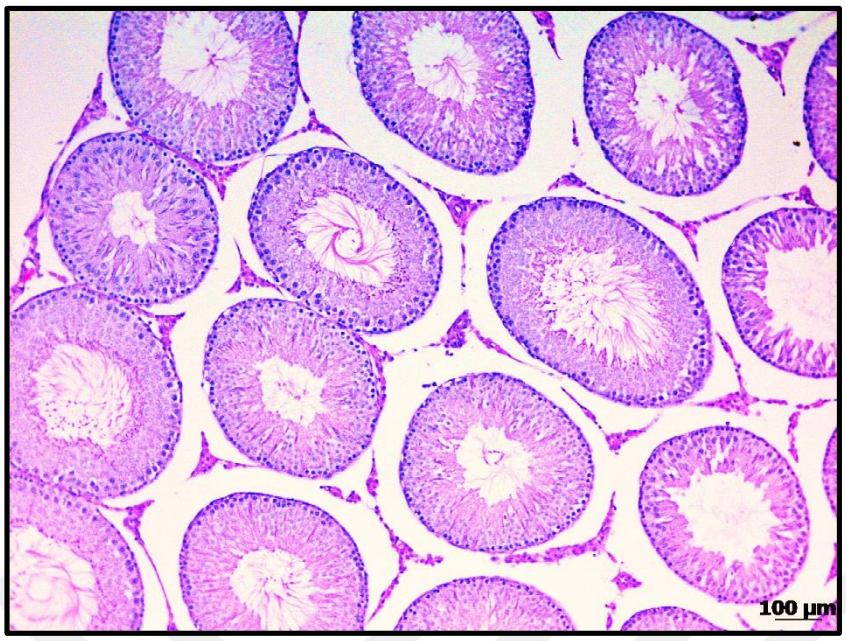
Şekil 3.4. Kontrol gruplarına ait 12. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler.



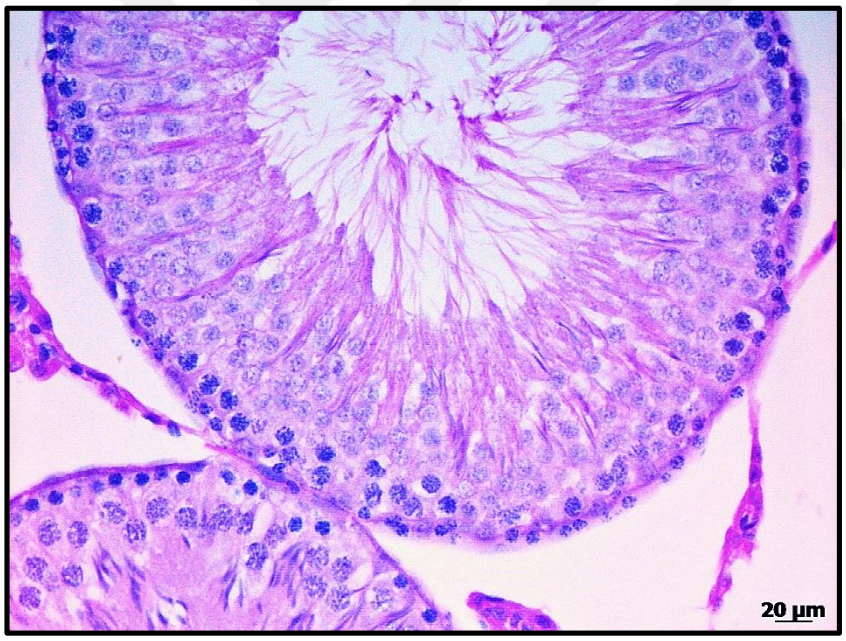
Şekil 3.5. Kontrol gruplarına ait 24. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler.



Şekil 3.6. Kontrol gruplarına ait 96. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler.



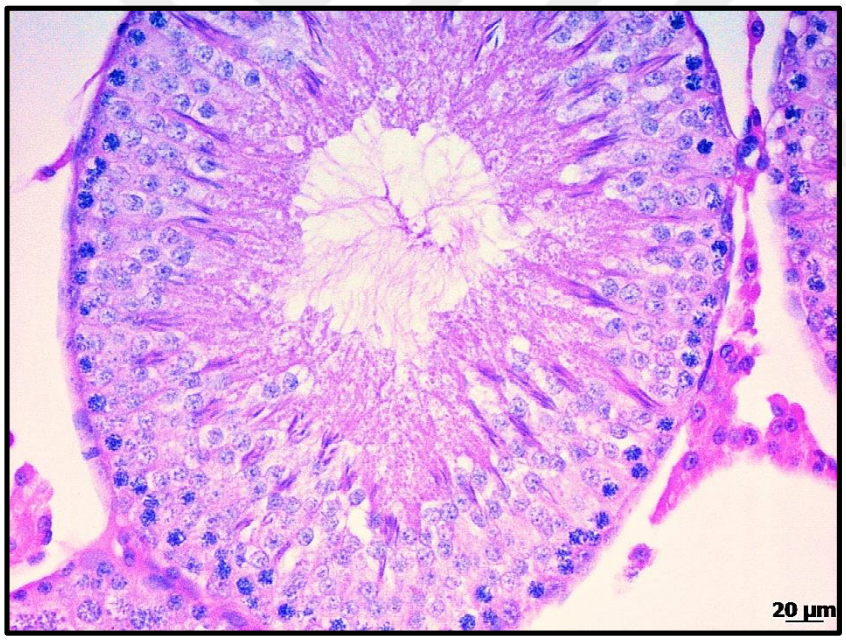
Şekil 3.7. Metilselüloz gruplarına ait 0. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler.



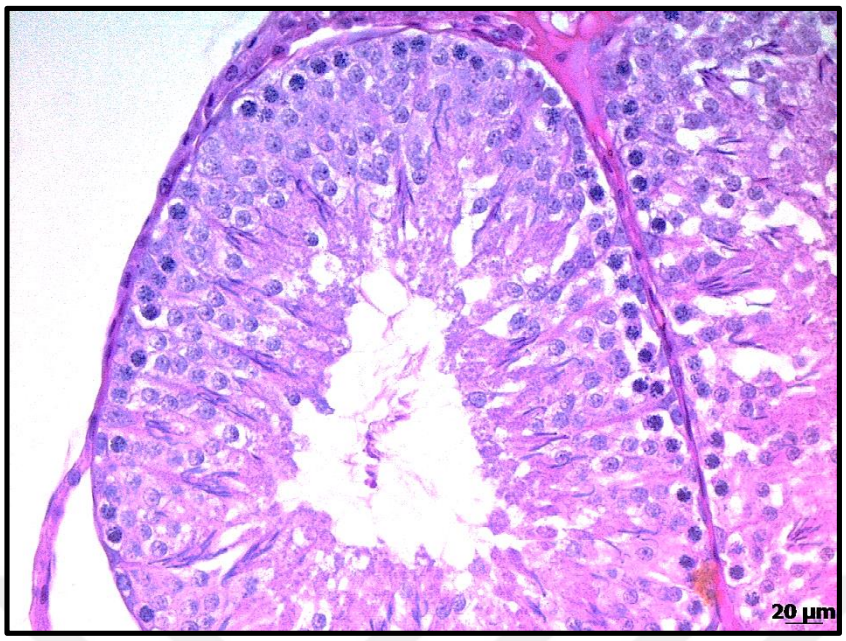
Şekil 3.8. Metilselüloz gruplarına ait 0. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler.



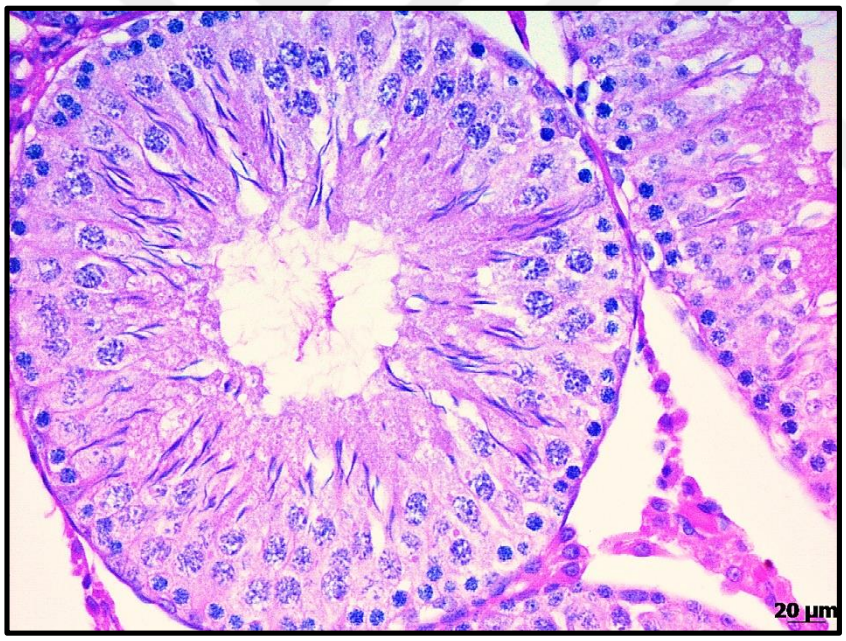
Şekil 3.9. Metilselüloz gruplarına ait 6. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler.



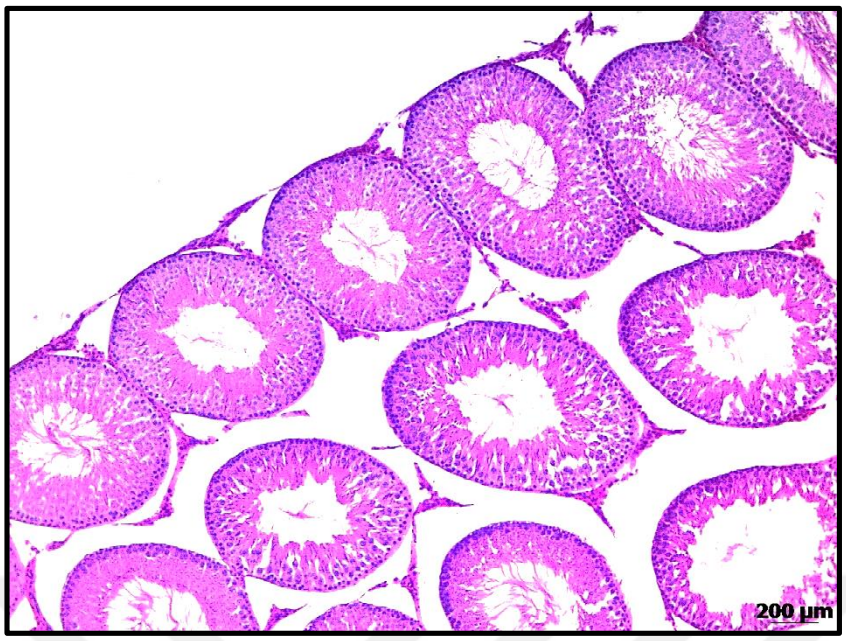
Şekil 3.10. Metilselüloz gruplarına ait 12. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler.



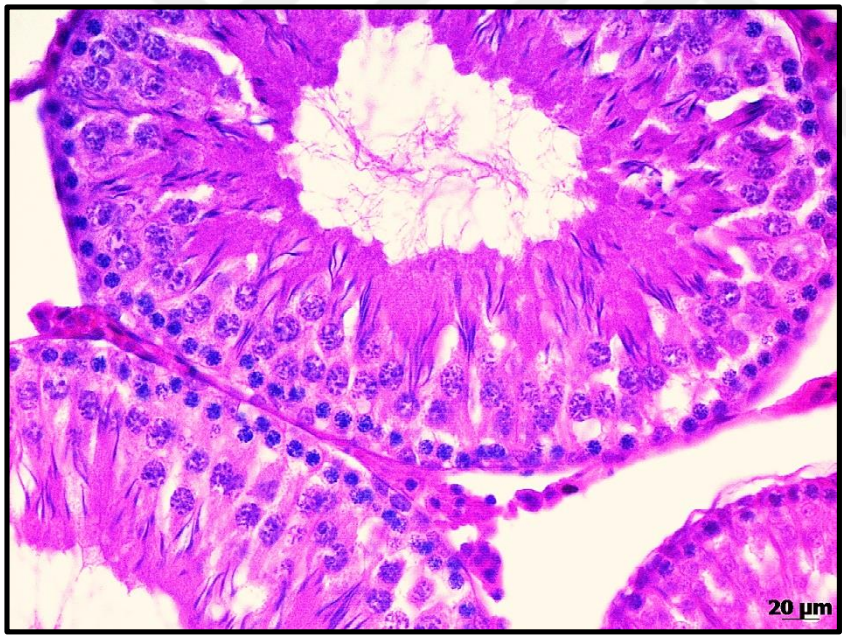
Şekil 3.11. Metilselüloz gruplarına ait 24. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler.



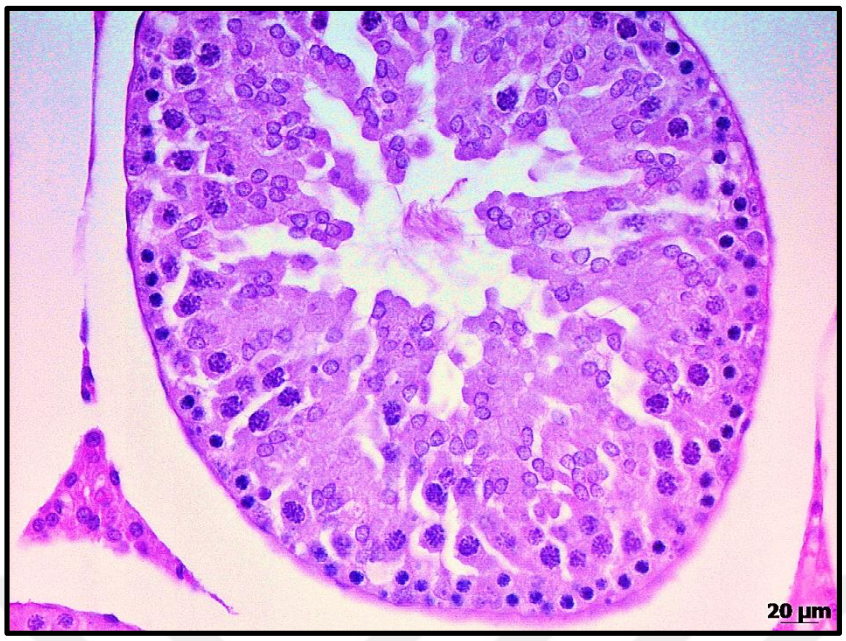
Şekil 3.12. Metilselüloz gruplarına ait 96. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler.



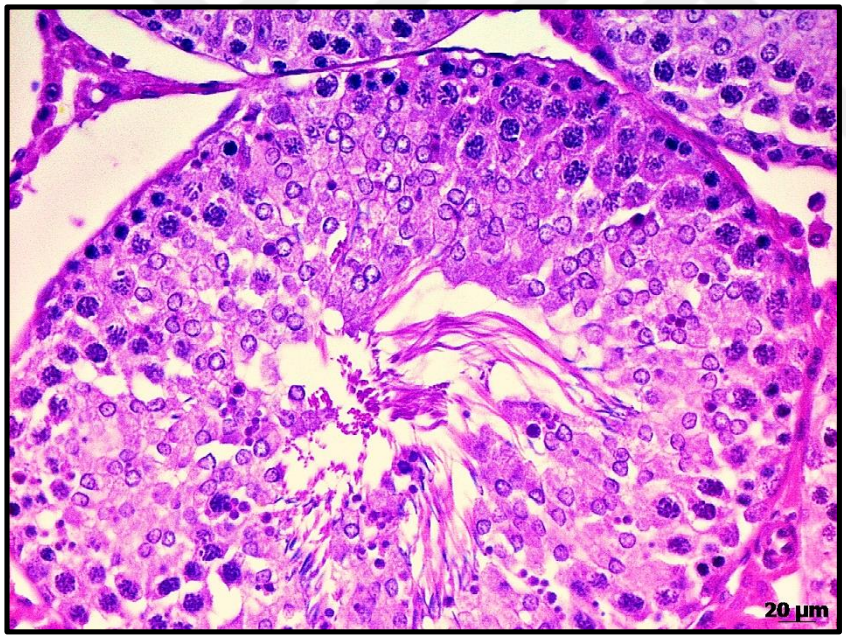
Şekil 3.13. Metilselüloz+ Adjudin verilen gruplara ait 0. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler.



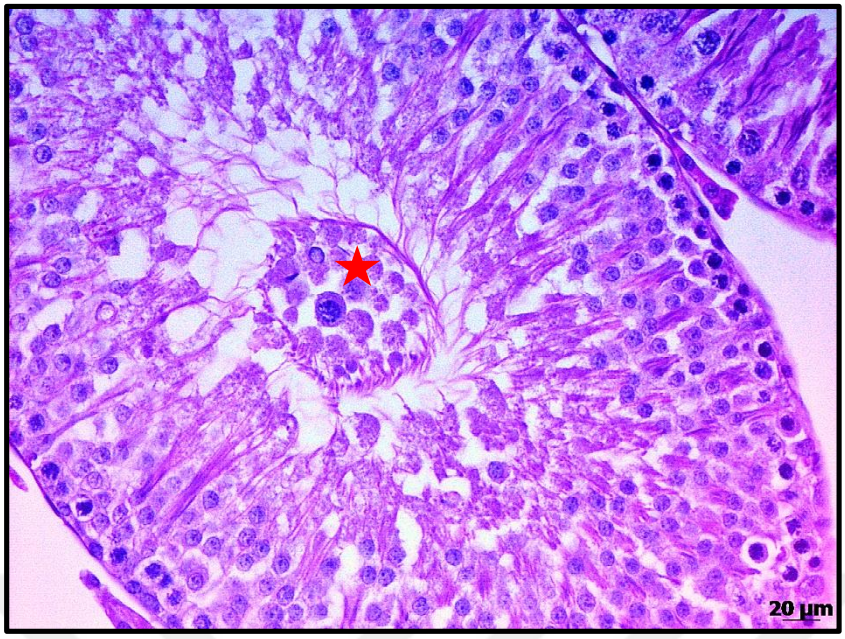
Şekil 3.14. Metilselüloz+ Adjudin verilen gruplara ait 0. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler.



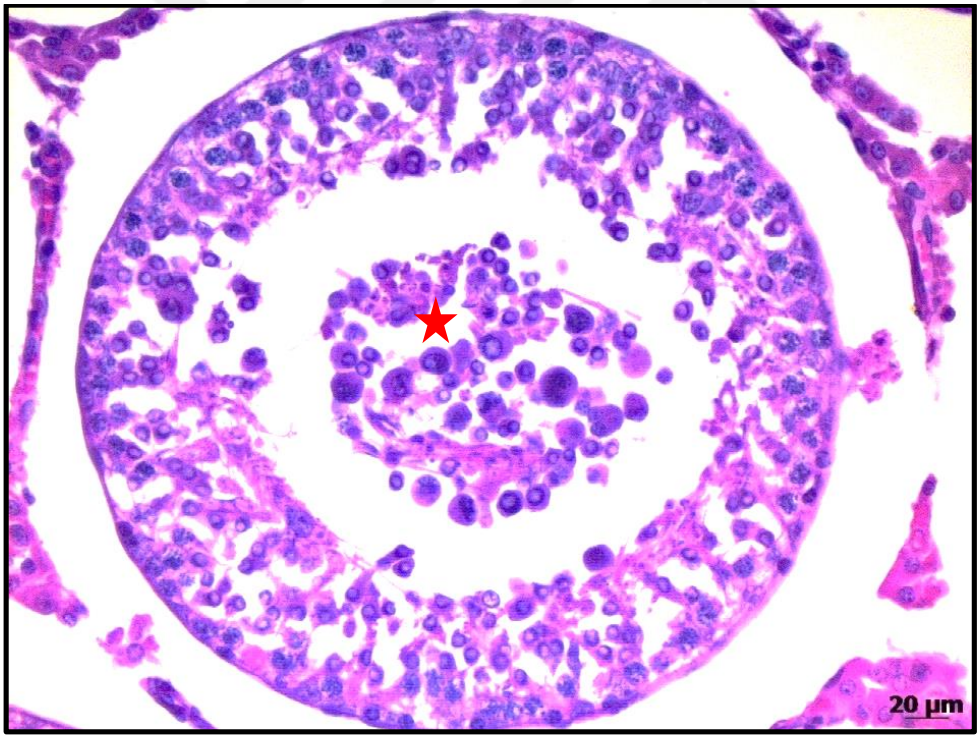
Şekil 3.15. Metilselüloz+ Adjudin verilen gruplara ait 6. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler.



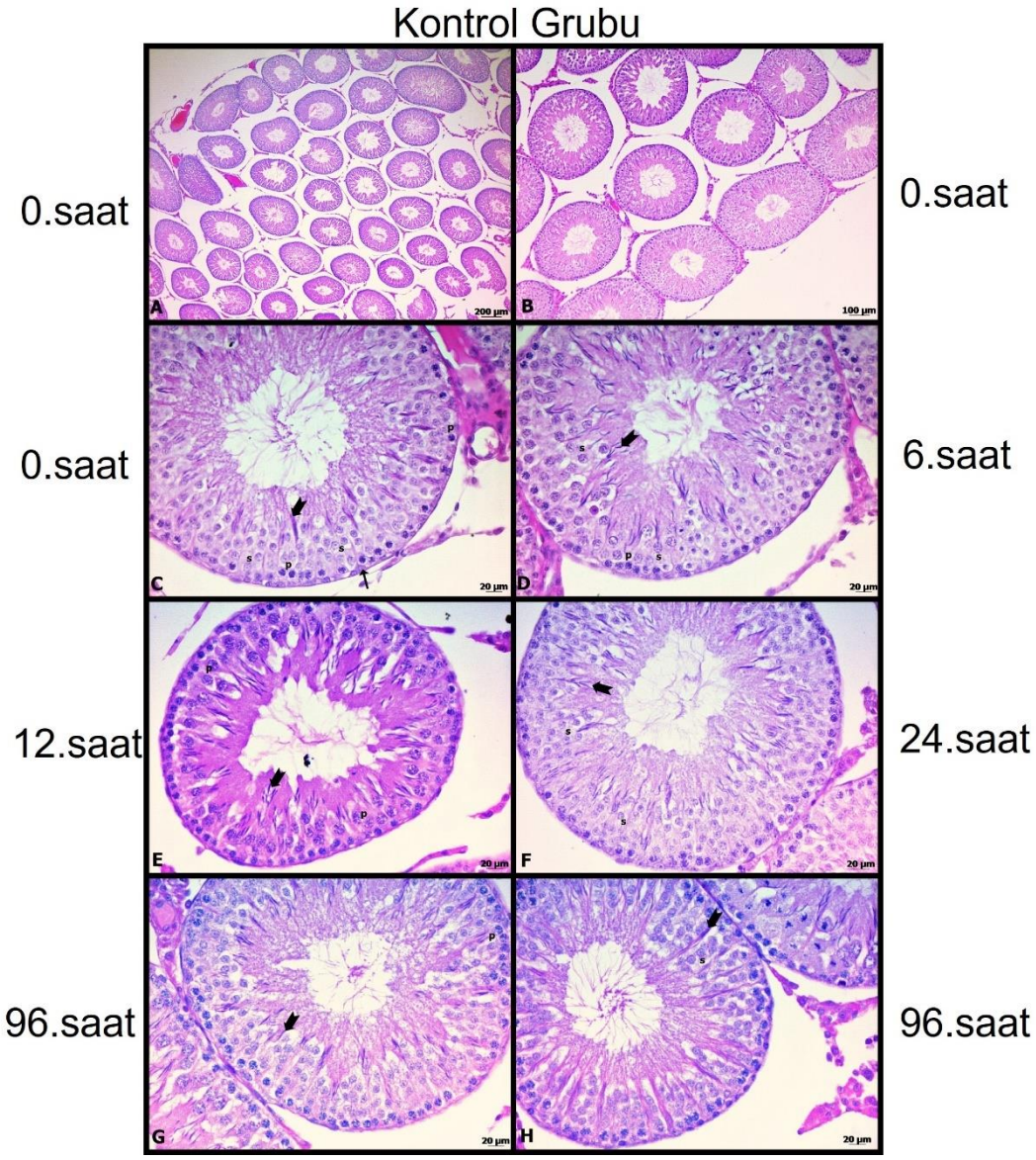
Şekil 3.16. Metilselüloz+ Adjudin verilen gruplara ait 12. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler.



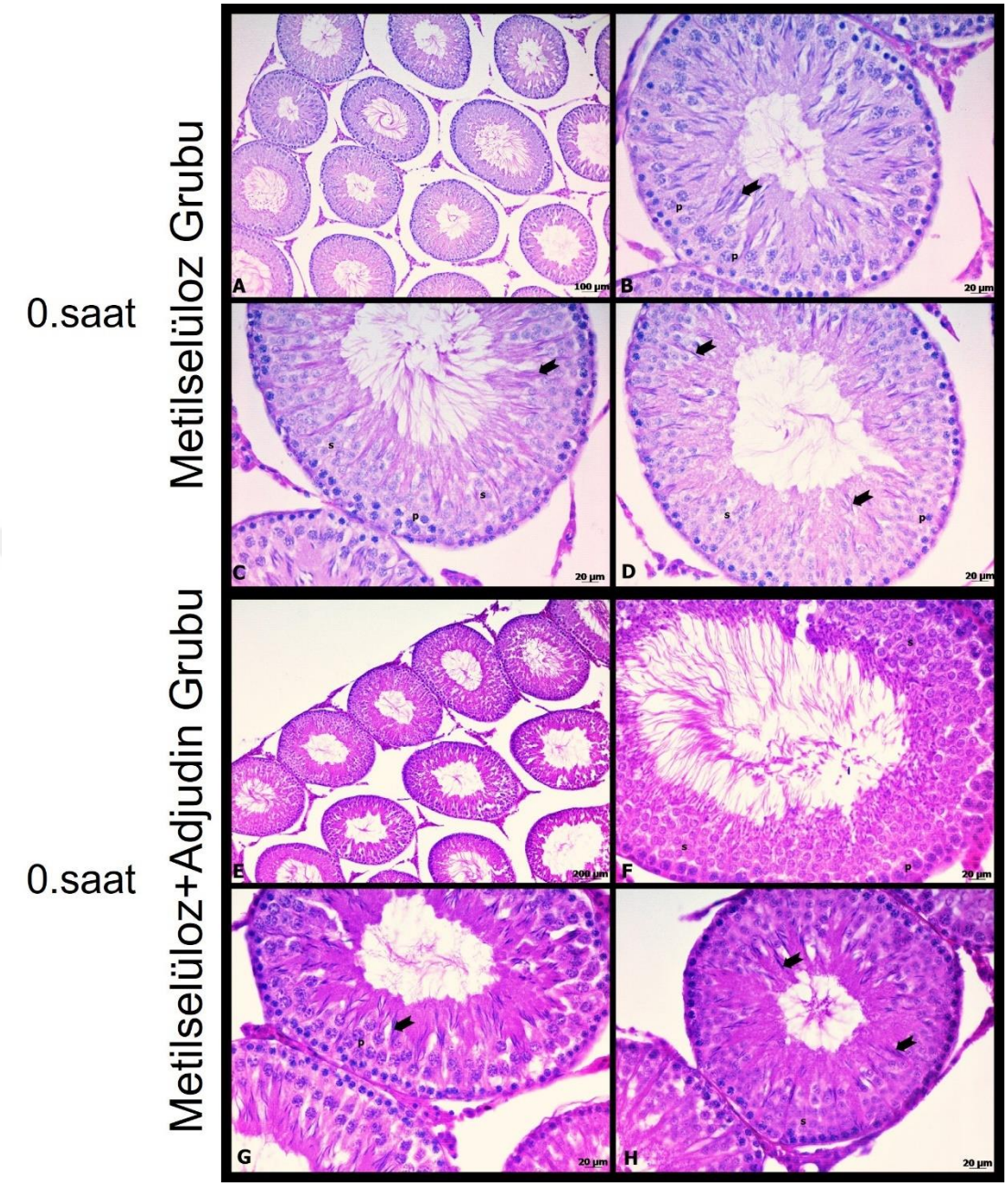
Şekil 3.17. Metilselüloz+ Adjudin verilen gruplara ait 24. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler. ★ dökülen germ hücrelerini göstermektedir.



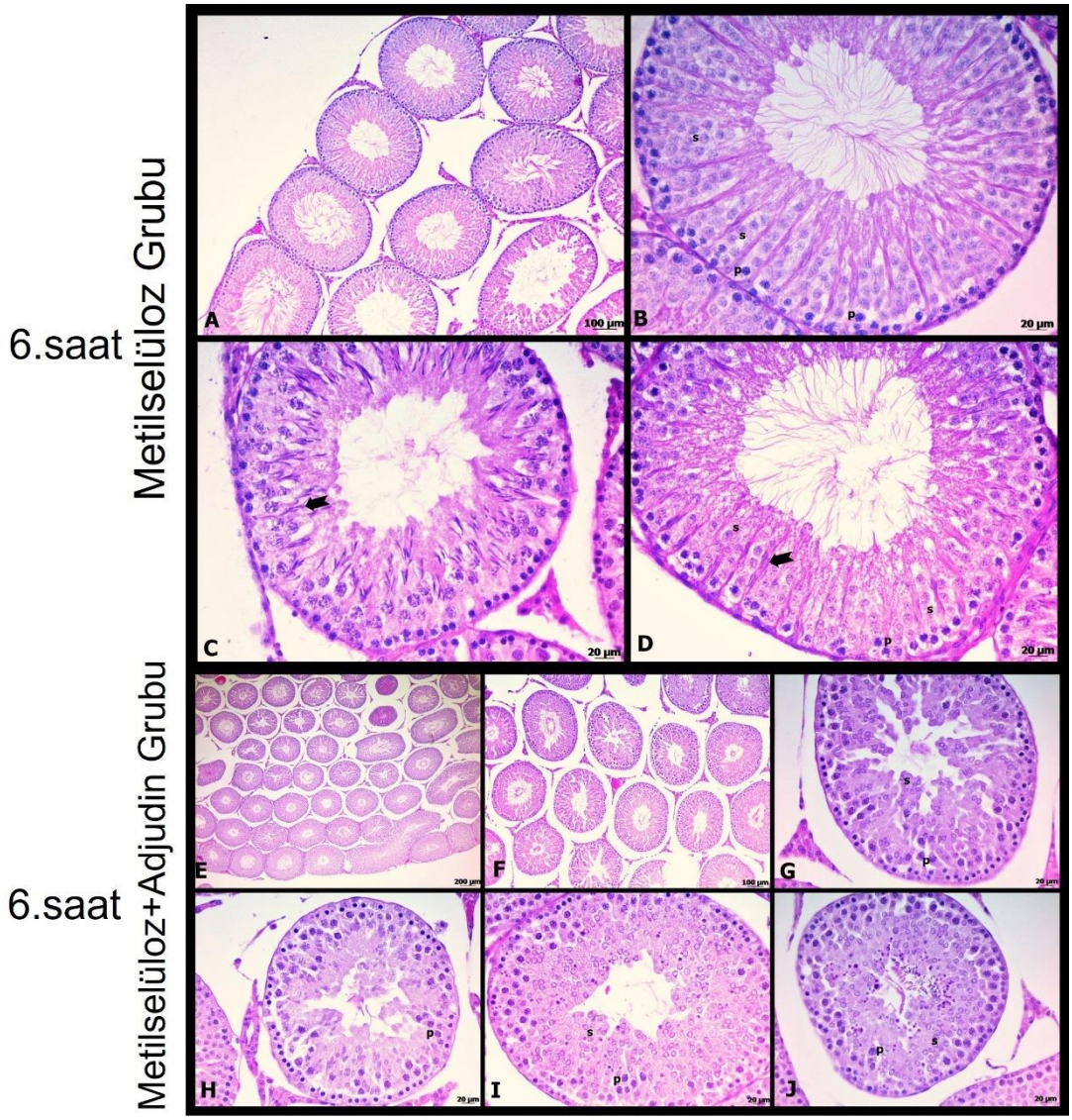
Şekil 3.18. Metilselüloz+ Adjudin verilen gruplara ait 96. saatte testis seminifer tübülüslerini gösteren kesitler. ★ dökülen germ hücrelerini göstermektedir.



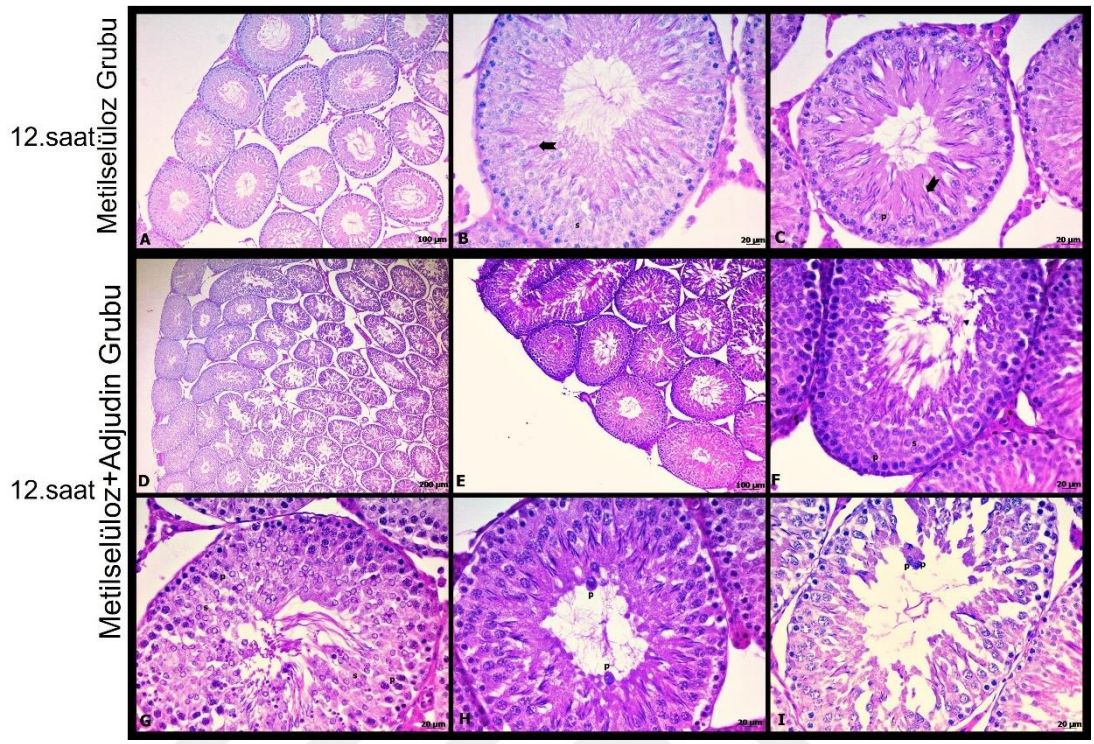
Şekil 3.19. Kontrol Gruplarına ait H&E boyamasıyla testis seminifer tübülüs yapısını gösteren kesitler. ⬆ uzamış spermatidleri göstermektedir.



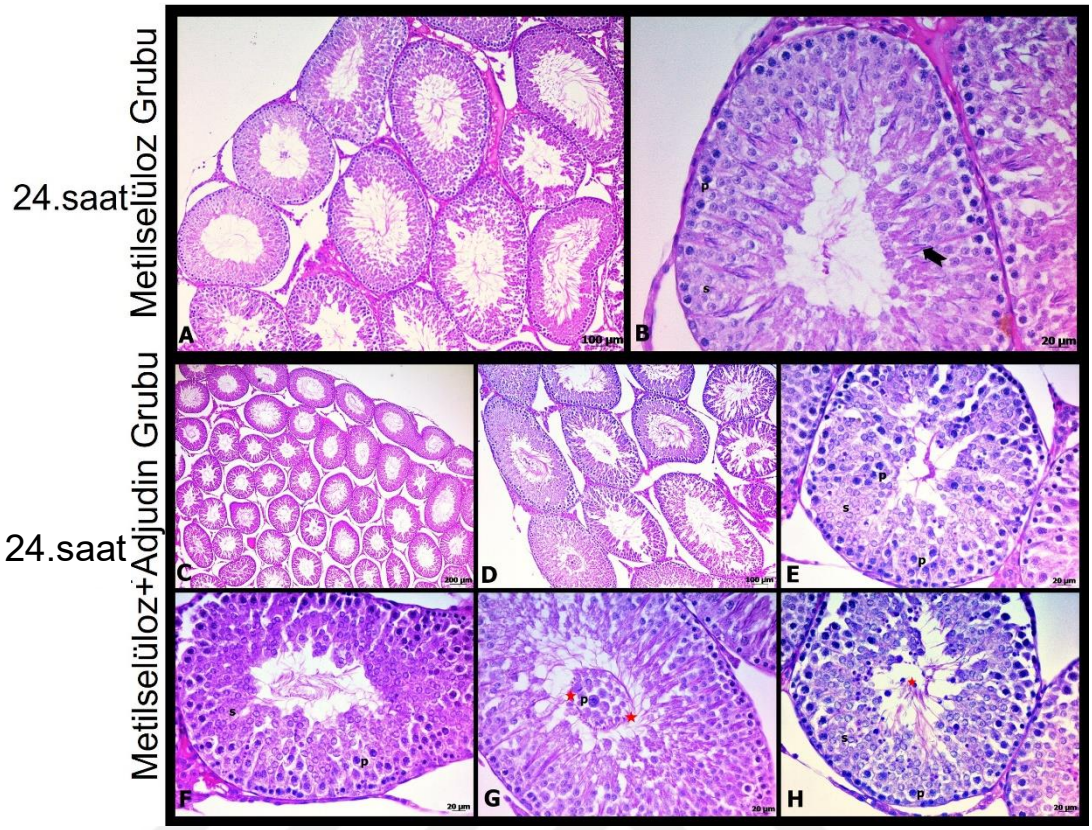
Şekil 3.20. Metilselüloz ve Metilselüloz+Adjudin verilen grupların 0. saatlerine ait H&E boyamasıyla testis seminifer tübülüs kesitleri. ⬆ uzamış spermatidleri göstermektedir.



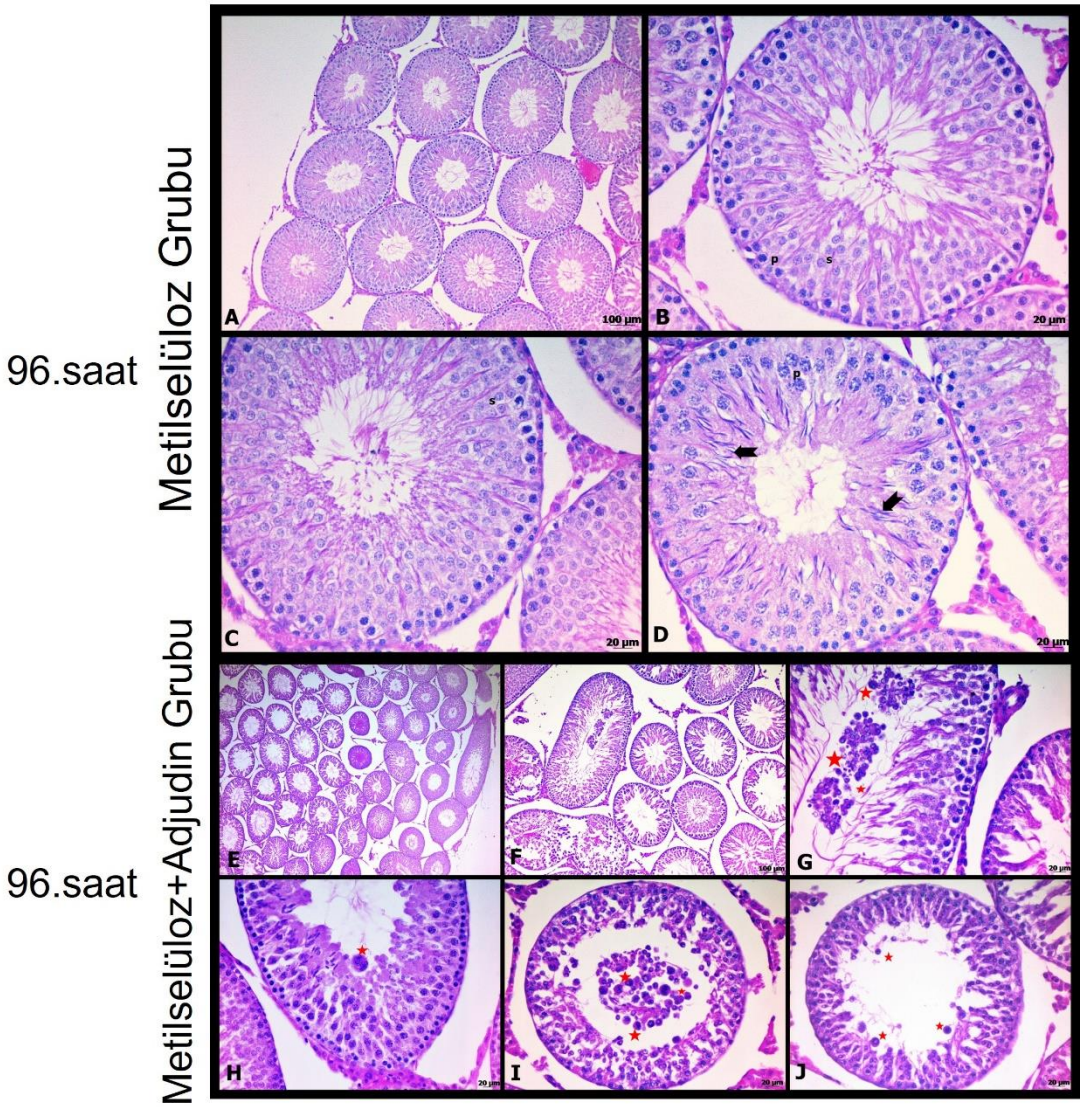
Şekil 3.21 Metilselüloz ve Metilselüloz+Adjudin verilen grupların 6. saatlerine ait H&E boyamasıyla testis seminifer tübülüs kesitleri. ⬆ uzamış spermatidleri göstermektedir.



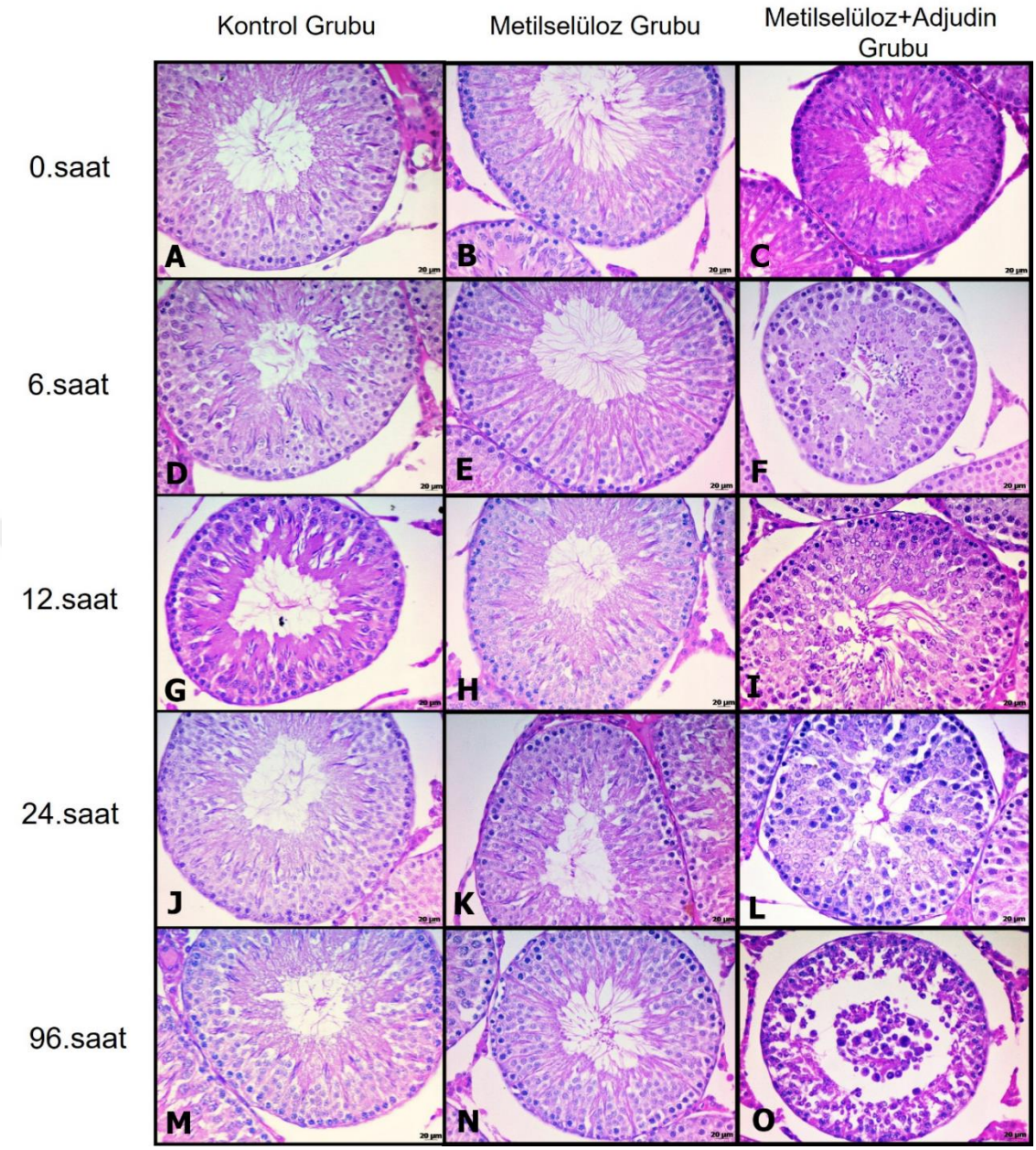
Şekil 3.22. Metilselüloz ve Metilselüloz+Adjudin verilen grupların 12. saatlerine ait H&E boyamasıyla testis seminifer tübülüs kesitleri. ⬆ uzamış spermatidleri, p primer spermatositleri göstermektedir.



Şekil 3.23. Metilselüloz ve Metilselüloz+Adjudin verilen grupların 24. saatlerine ait H&E boyamasıyla testis seminifer tübülüs kesitleri.⬆ uzamış spermatidleri, s spermatidleri, p primer spermatositleri, ★seminifer tübülüs lümenine dökülen germ hücrelerini göstermektedir.



Şekil 3.24. Metilselüloz ve Metilselüloz+Adjudin verilen grupların 96. saatlerine ait H&E boyamasıyla testis seminifer tübülüs kesitleri. ⬆ uzamış spermatidleri, ★ seminifer tübülüs lümenine dökülen germ hücrelerini göstermektedir.

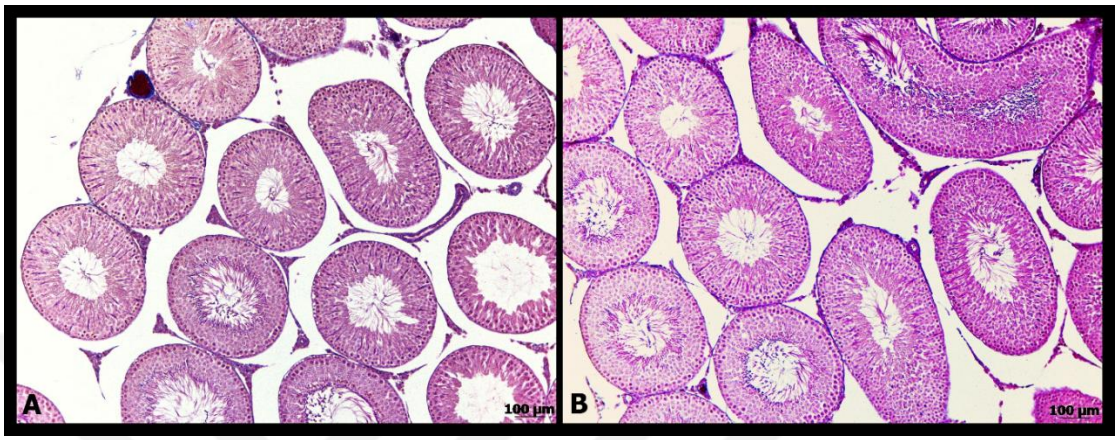


Şekil 3.25. Tüm grupların Hematoksilin-Eozin boyamalarına ait kesitler.

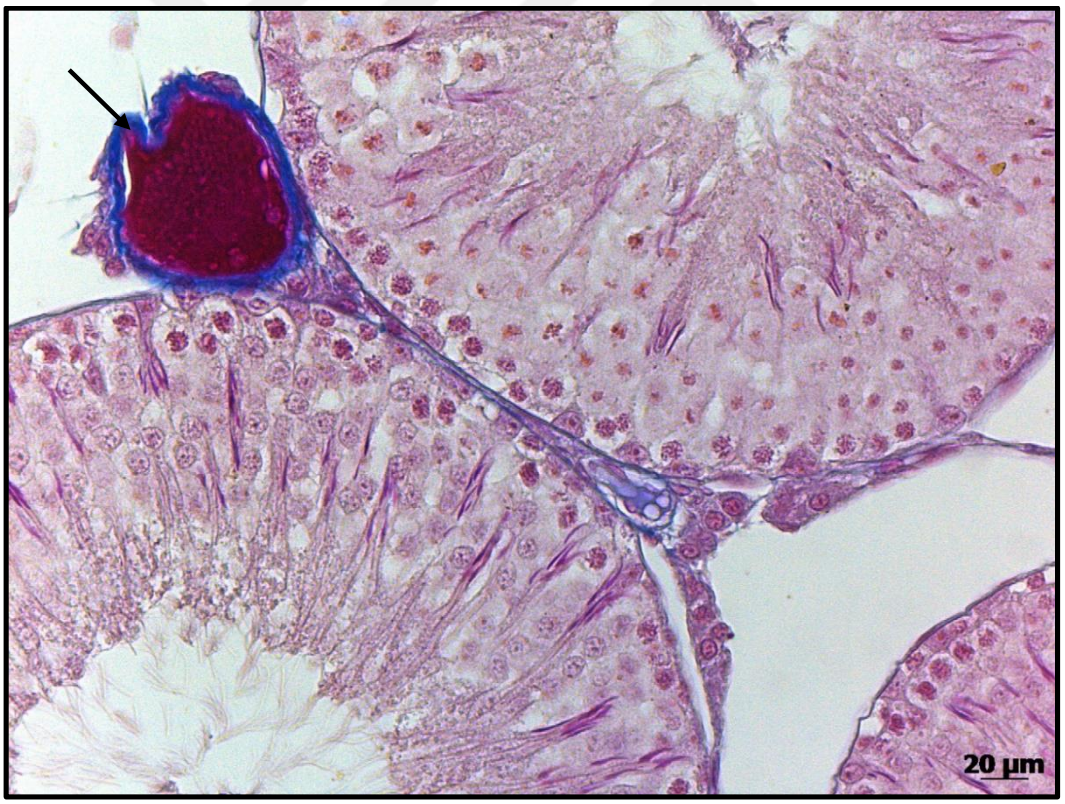
3.2. Mallory-Azan Boyama Sonuçları

Mallory-Azan boyama sonucuna göre kontrol ve metilselüloz verilen gruplar benzer özellikler göstermektedir (Şekil 3.26). Bağ dokusu yapısını morfolojik olarak detaylı gösteren bu boyamada çoğunlukla damar çevresinde bu boyama izlenmiştir (Şekil 3.27).Metilselüloz ve Adjudin verilen gruplarda anilin mavisiyle boyanan bağ dokusunda diğer gruplara göre bir farklılık izlenmemiştir (Şekil 3.28, 3.29). Fakat

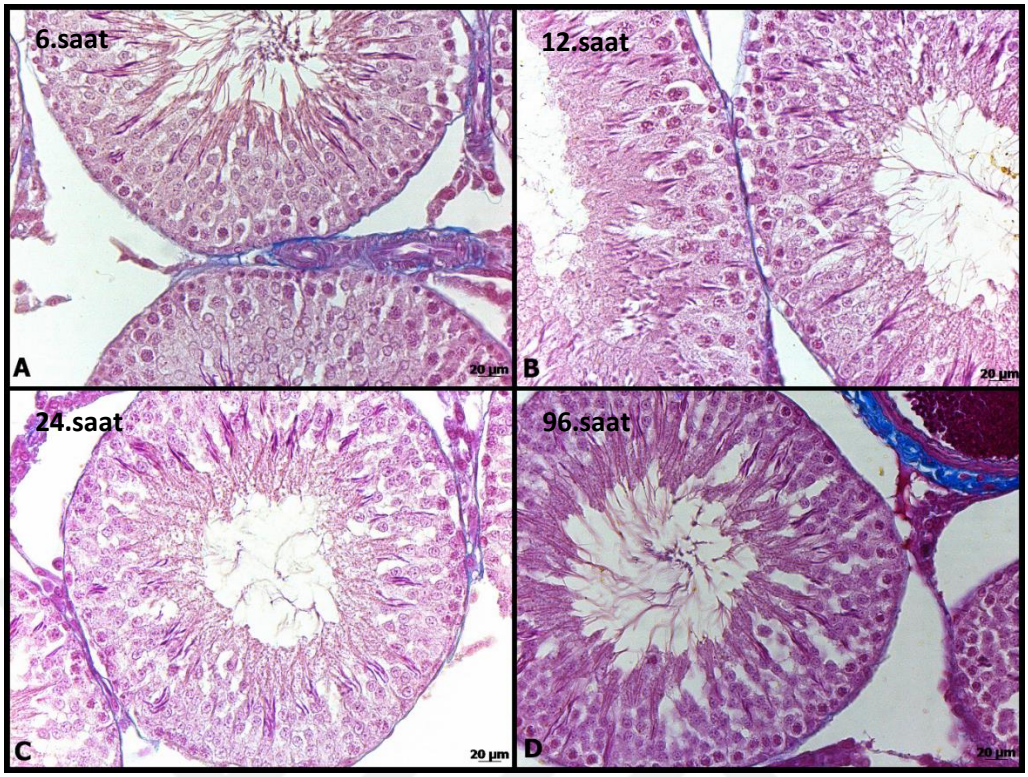
Hematoksilin-Eozin boyamasında incelenen seminifer tübülüs epitel yapısının bozulduğu burada da görülmüş 96.saatte germ hücre kümelerinin seminifer tübülüs tübülüs lümeninde toplanması dikkat çekmiştir (Şekil 3.29).



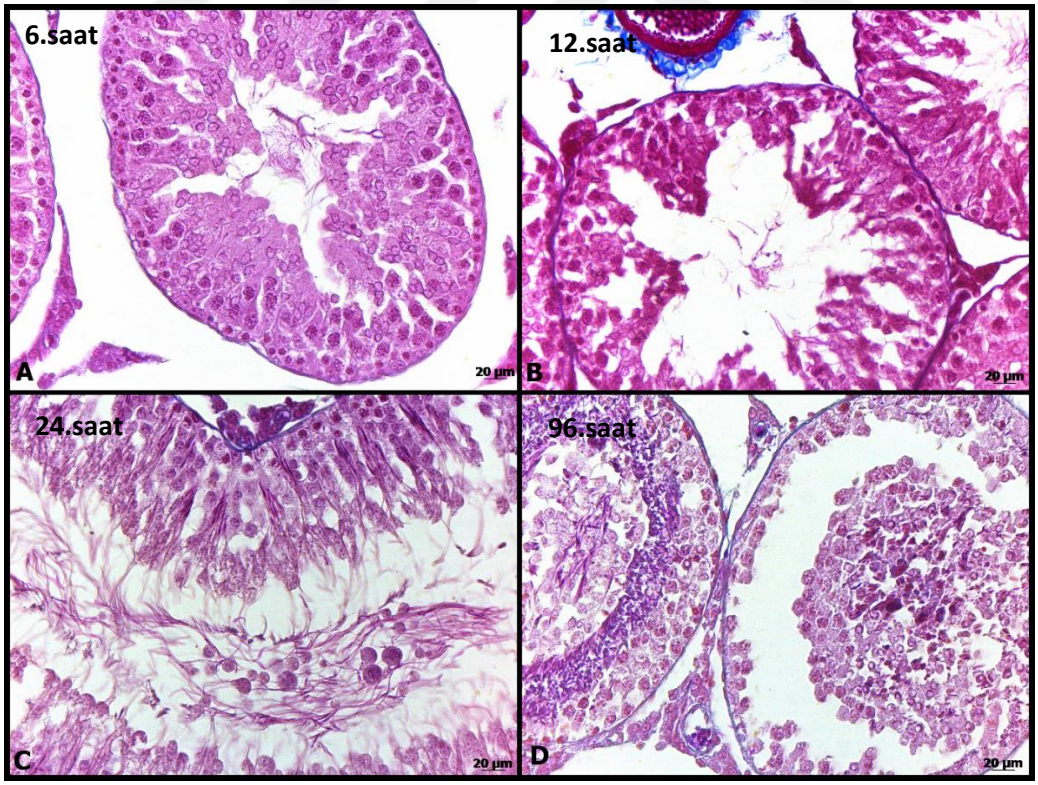
Şekil 3.26. 0.saat Kontrol (A) ve Metilselüloz Grupları(B).



Şekil 3.27. 0.saat kontrol gruplarda seminifer tübülüs epitel yapıları izlenmektedir. ↓ Damara ait bağ dokusunu göstermektedir.



Şekil 3.28. Metilselüloz verilen gruplarda testis kesitleri.



Şekil 3.29. Metilselüloz ve Adjudin verilen gruplara ait testis kesitleri.

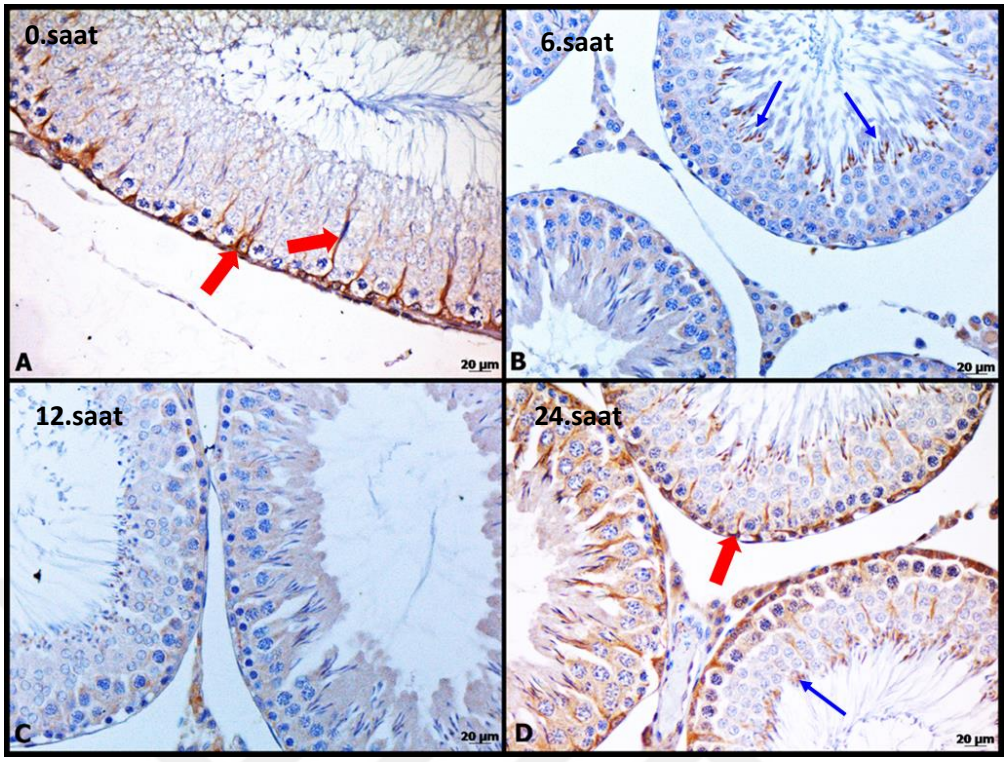
3.3. İmmunohistokimyasal Yöntem Sonuçları

İmmünohistokimyasal çalışma için parafin bloklara gömülen doku örneklerinden elde edilen kesitler üzerinde Hippo sinyal yolağı bileşenlerinden YAP ve p-YAP ve testiste etkin olarak görev yapan aktin ilişkili proteinlerden Arp3 (Aktin ilişkili protein3) ve EPS8 (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör Yolağı Substratı 8) primer antikoru ile işaratlemeler yapılmıştır.

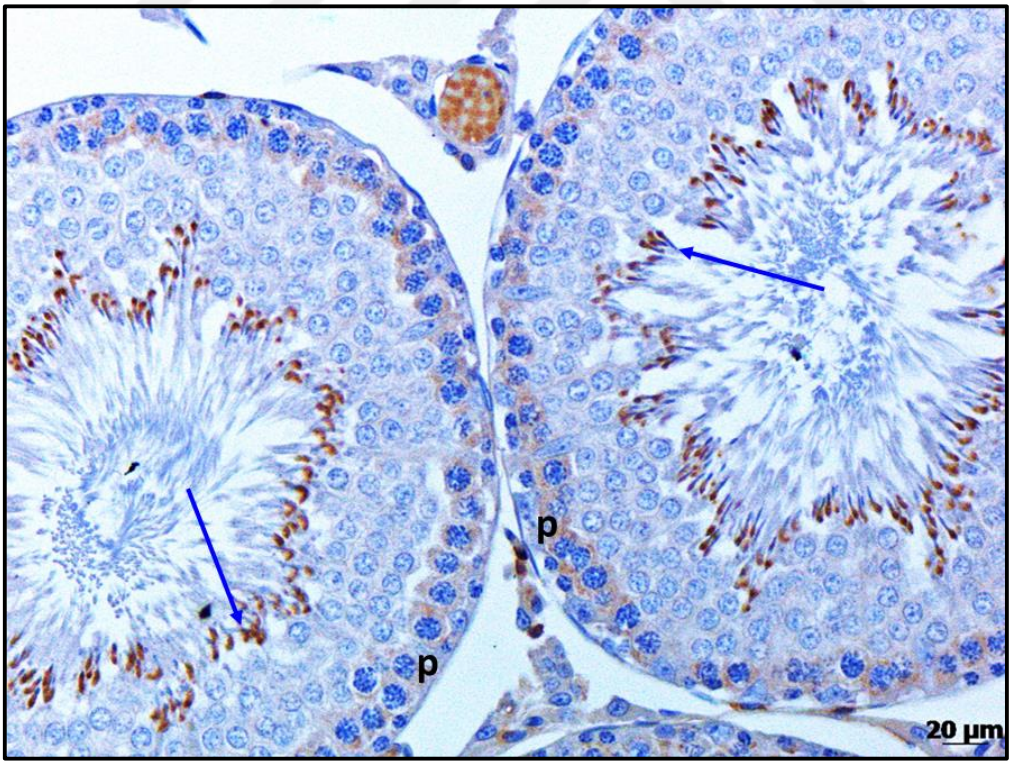
3.3.1. YAP İmmunohistokimyasal Yöntem Sonuçları

YAP immünohistokimyasal yöntem sonuçları kontrol (Şekil 3.30 ve 3.31) ve metilselüloz verilen gruplarda (Şekil 3.32 ve 3.33) tüm saat aralıklarında birbirleriyle benzer boyanma özellikleri göstermiştir. Özellikle Sertoli hücrelerinde, primer spermatositlerde ve uzamış spermatidlerde belirgin boyanma dikkat çekmektedir.

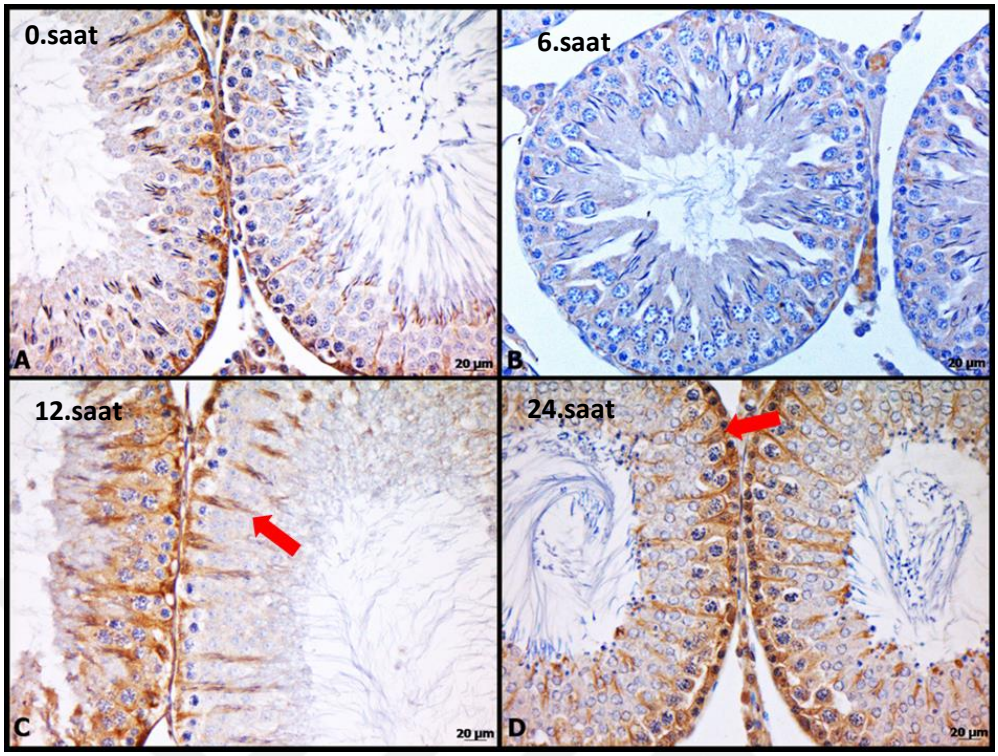
Metilsellüloz ve Adjudin verilen gruplarda 0.saat, kontrol ve metilselüloz verilen gruplara benzer özellikler vermektedir. Bu grupta 6.saat itibariyle seminifer epitelde hasar izlenmeye başlanmıştır (Şekil 3.34). Özellikle YAP immünohistokimyasal boyanmasında 96.saatte diğer saatlere göre daha az boyanma özelliği izlenmiştir (Şekil 3.35). Tüm gruplara ait YAP immünohistokimyasal boyanması Şekil 3.36'da özetlenmiştir.



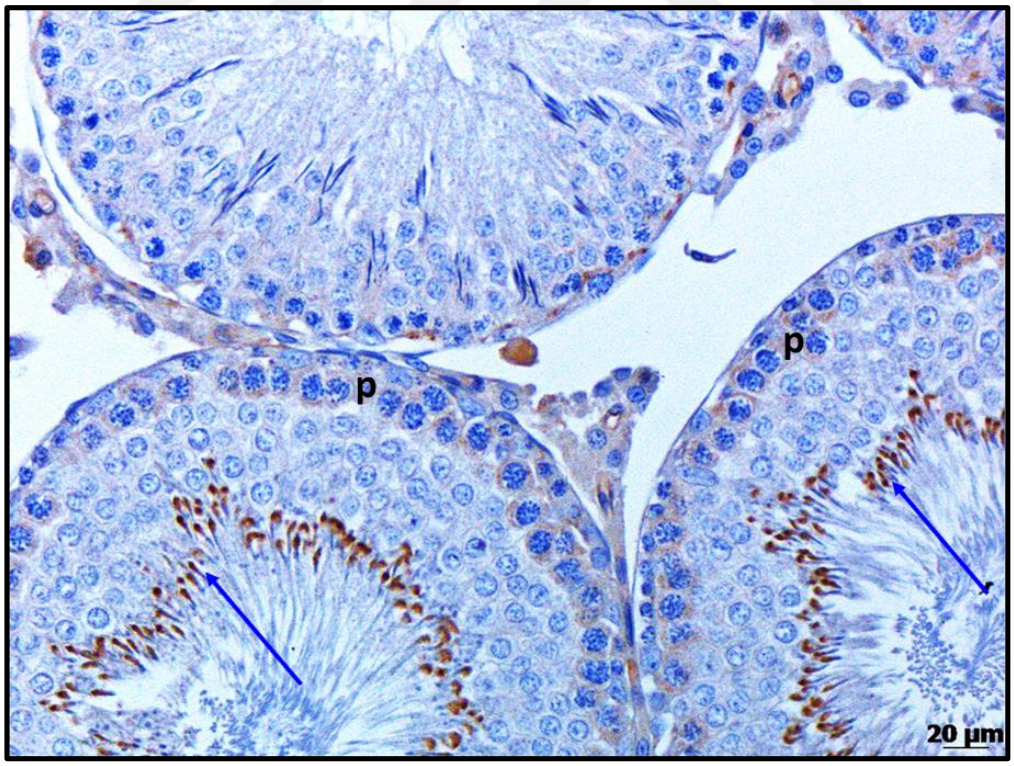
Şekil 3.30. Kontrol gruplarına ait testis seminifer tübülüslerinin YAP ile immunohistokimyasal olarak işaretlenmesi. ➡ Sertoli hücrelerini, ↑ uzamış spermatidleri göstermektedir.



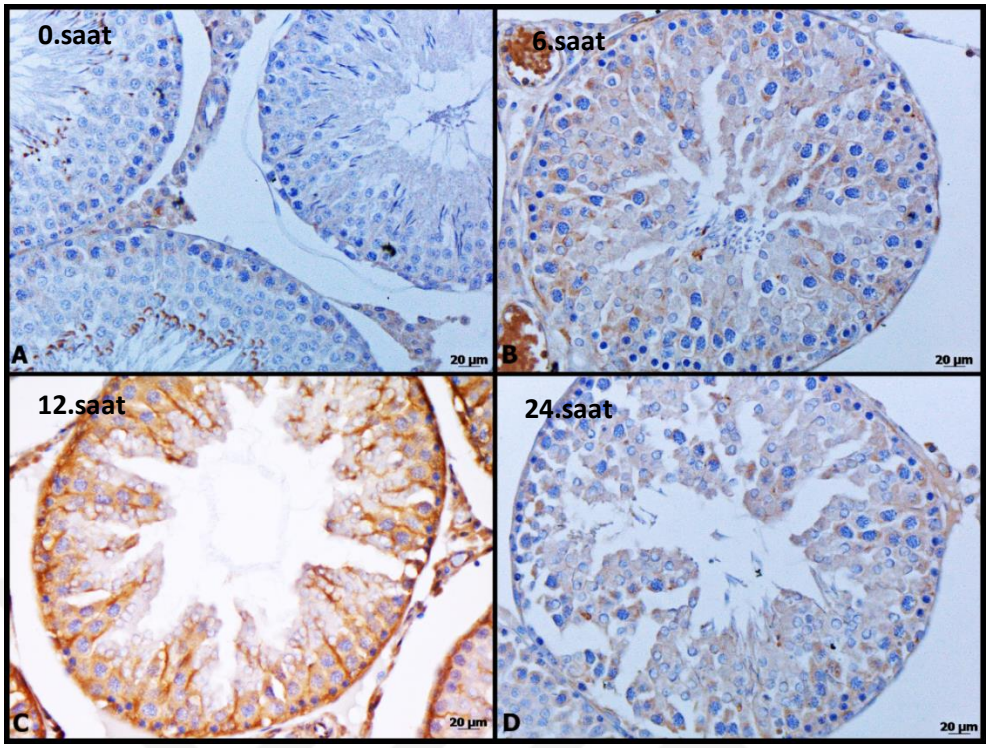
Şekil 3.31. Kontrol gruplarına ait 96.saatte testis seminifer tübülüslerinin YAP ile immunohistokimyasal olarak işaretlenmesi. ↑ uzamış spermatidleri, p primer spermatositleri göstermektedir.



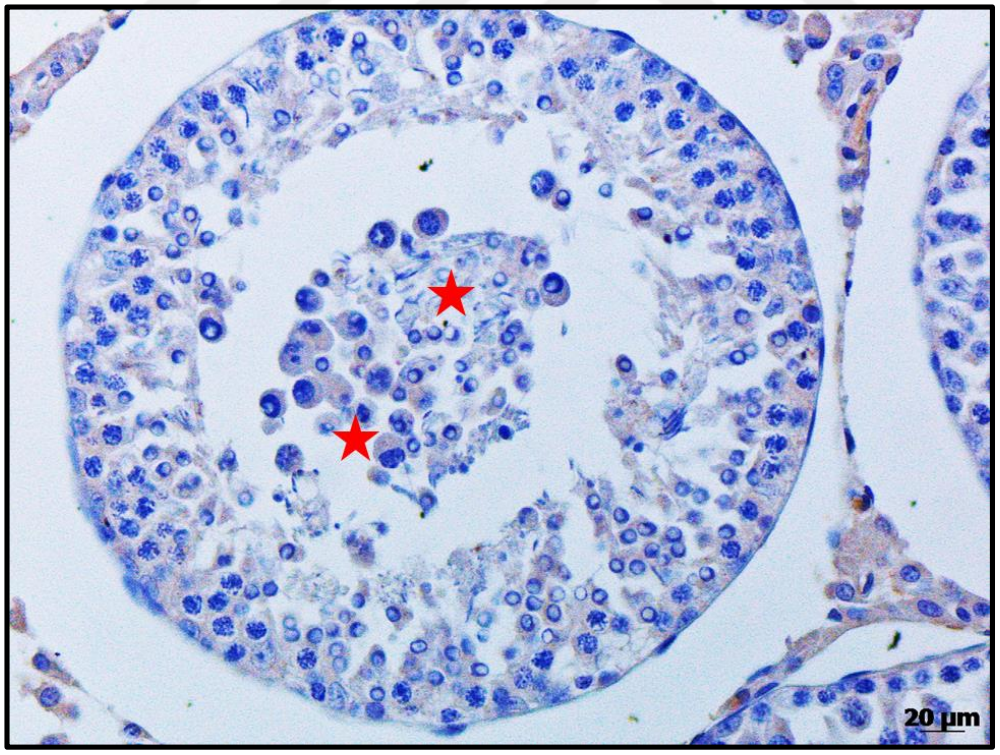
Şekil 3.32. Metilselüloz verilen gruplarda testis seminifer tübülüslerinin YAP ile immunohistokimyasal olarak işaretlenmesi. ➡ Sertoli hücrelerini göstermektedir.



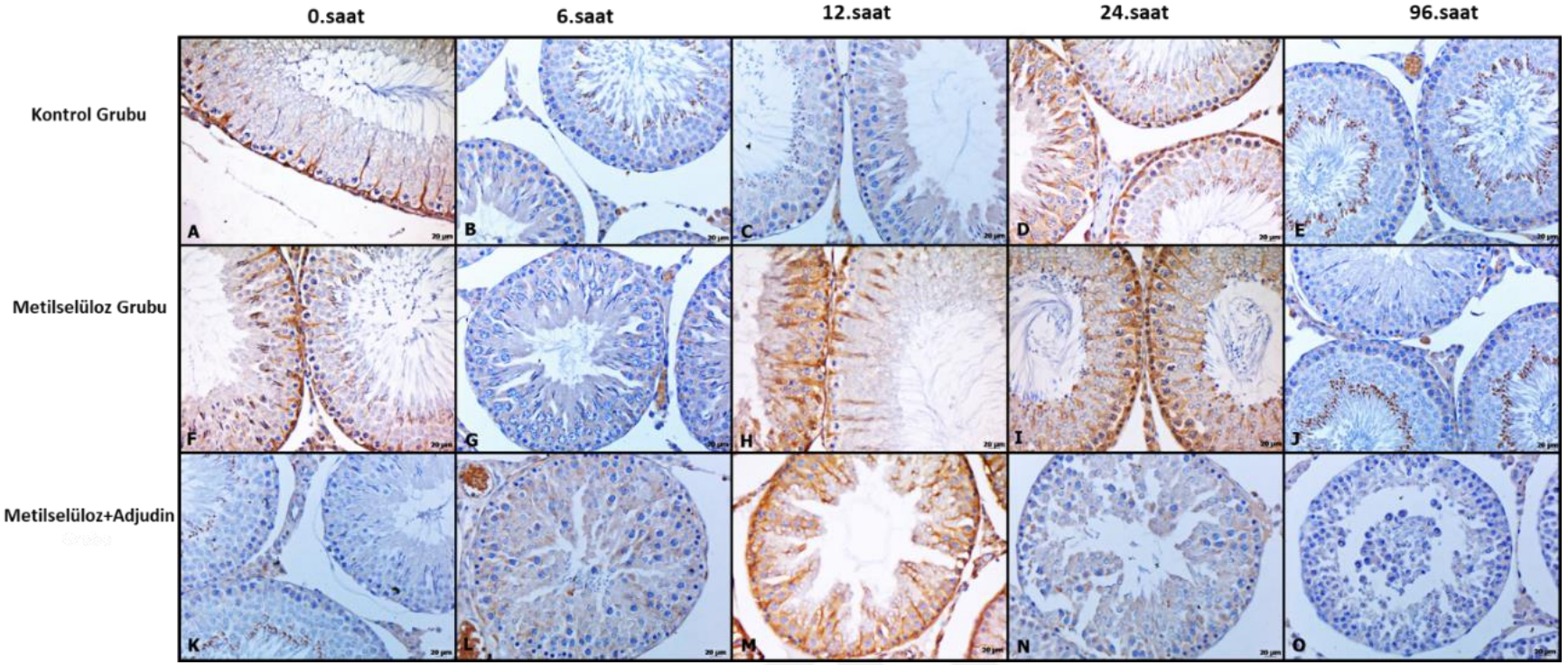
Şekil 3.33. Metilselüloz verilen gruplarda 96. saatlerde testis seminifer tübülüslerinin YAP ile immunohistokimyasal olarak işaretlenmesi. ↑ uzamış spermatidleri, p primer spermatositleri göstermektedir.



Şekil 3.34. Metilselüloz ve Adjudin verilen gruplarda testis seminifer tübülüslerinin YAP ile immunohistokimyasal olarak işaretlenmesi.



Şekil 3.35. Metilselüloz ve Adjudin verilen gruplarda 96.saatte testis seminifer tübülüslerinin YAP ile immunohistokimyasal olarak işaretlenmesi. ★seminifer tübülüs lümenine dökülen germ hücrelerini göstermektedir.

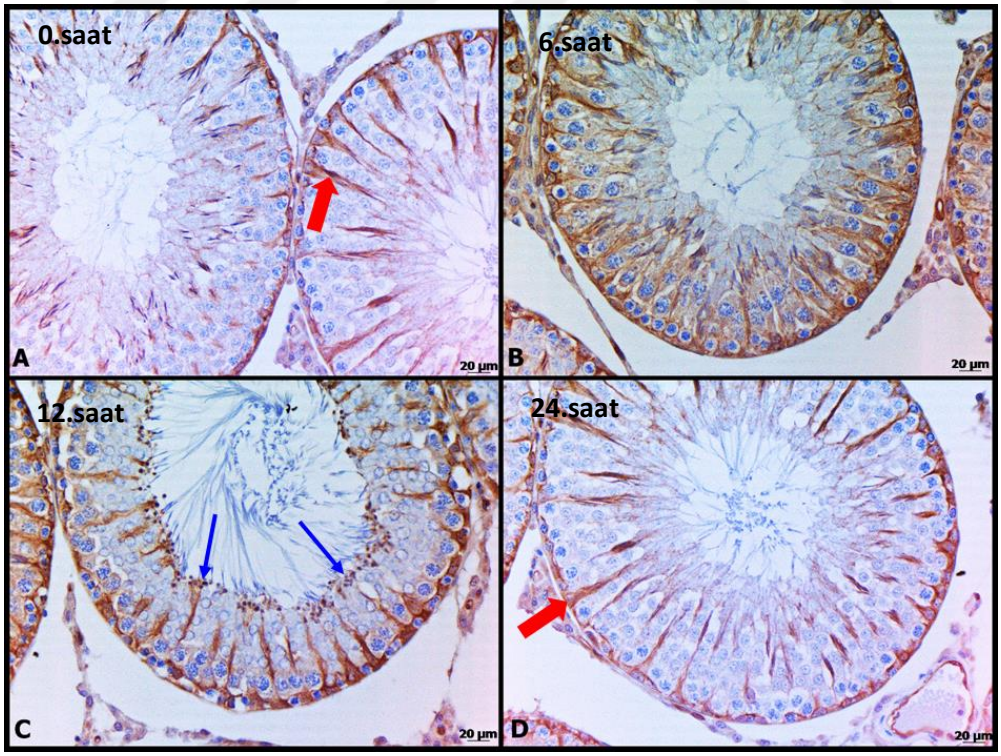


Şekil 3.36. YAP İmmümohistokimyasal yöntemlerin tüm gruplardaki sonuçları.

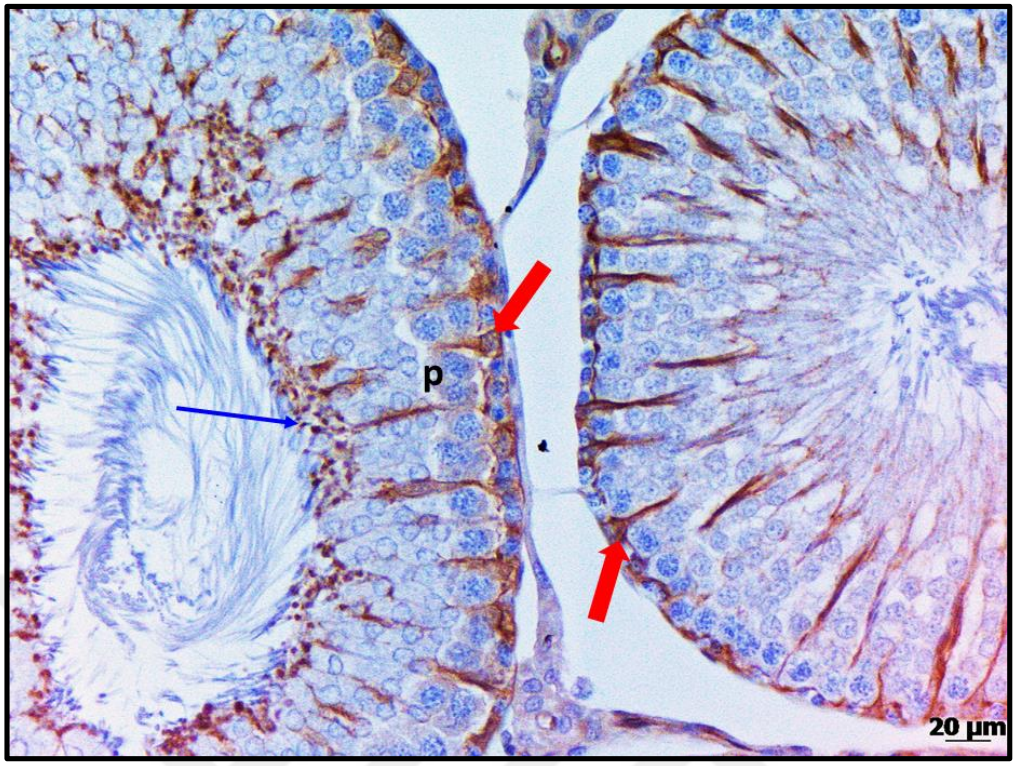
3.3.2. p-YAP İmmünohistokimyasal Yöntemlerinin Sonuçları

p-YAP immünohistokimyasal yöntem sonuçları, YAP boyanma sonuçlarına oldukça benzer özellikler göstermektedir. Kontrol (Şekil 3.37ve 3.38) ve metilselüloz verilen gruplarda (Şekil 3.39 ve Şekil 3.40) tüm saat aralıklarında birbirleriyle benzer boyanma özellikleri göstermiştir. Özellikle Sertoli hücrelerinde, uzamış spermatidlerde ve primer spermatositlerde belirgin boyanma dikkat çekmektedir.

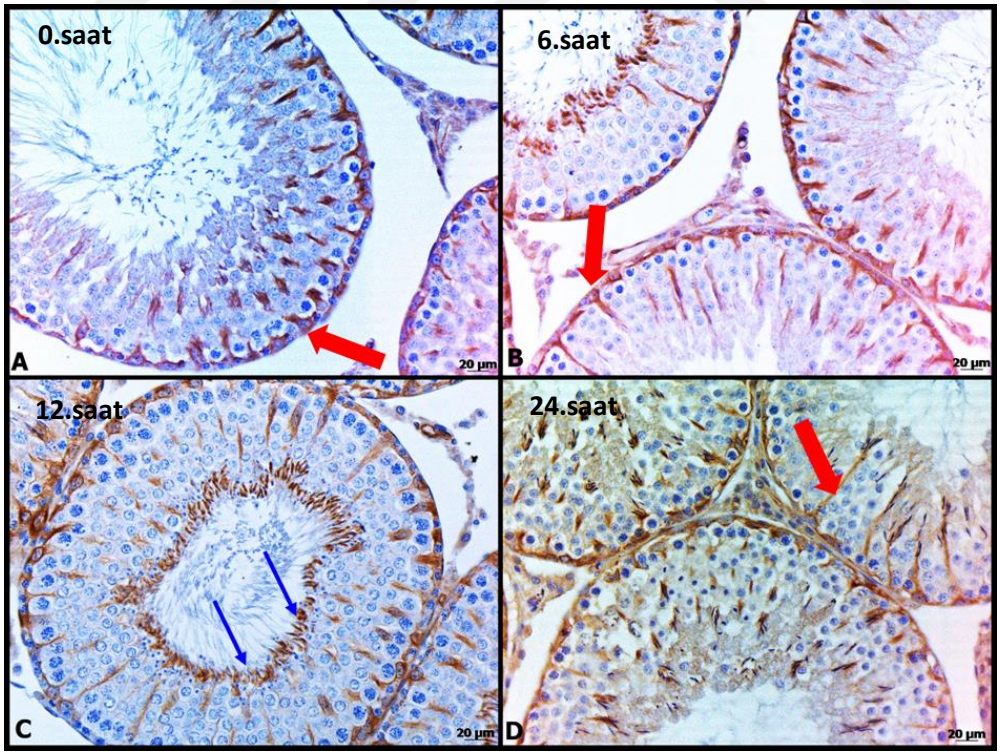
Metilsellüloz ve Adjudin verilen gruplarda 0.saat, kontrol ve metilselüloz verilen gruplara benzer özellikler vermektedir. Bu grupta 6.saat itibariyle seminifer epitelde hasar izlenmeye başlanmıştır (Şekil 3.41). p-YAP immünohistokimyasal boyanma özelliği olarak 96.saatte diğer saatlere göre daha az boyanma özelliği izlenmiştir (Şekil 3.42). Tüm gruplara ait p-YAP immünohistokimyasal boyanma özellikleri Şekil 3.43'da özetlenmiştir.



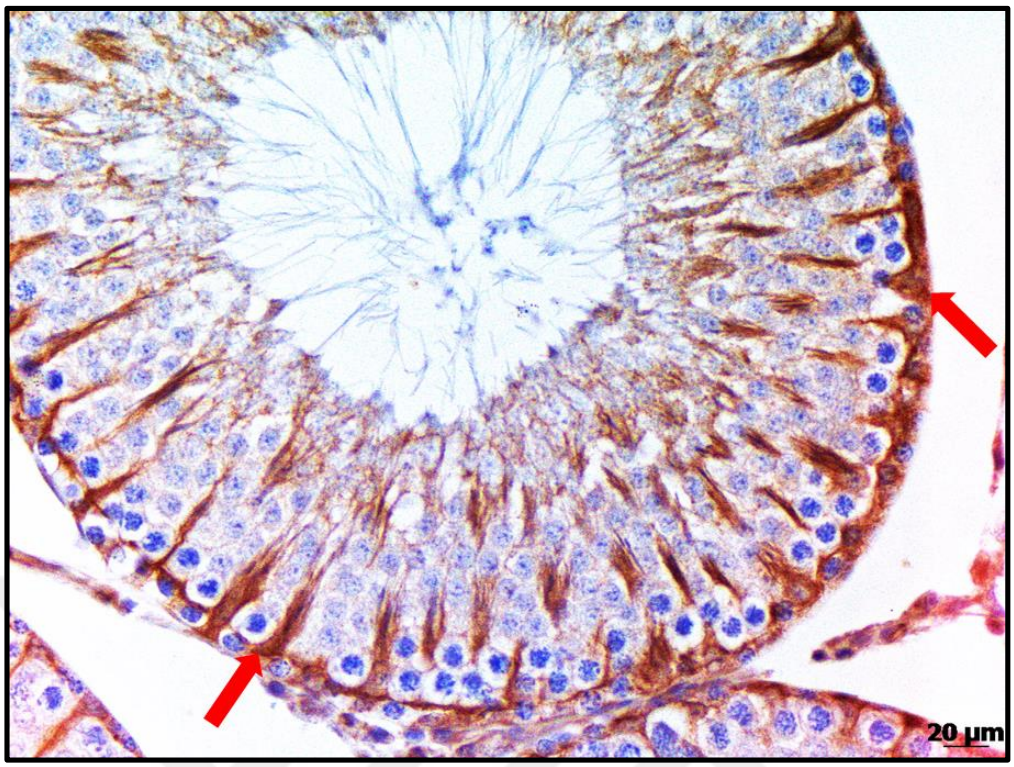
Şekil 3.37. Kontrol gruplarına ait testis seminifer tübülüslerinin p-YAP ile immunohistokimyasal olarak işaretlenmesi. ➡ Sertoli hücrelerini, ↑ uzamış spermatidleri göstermektedir.



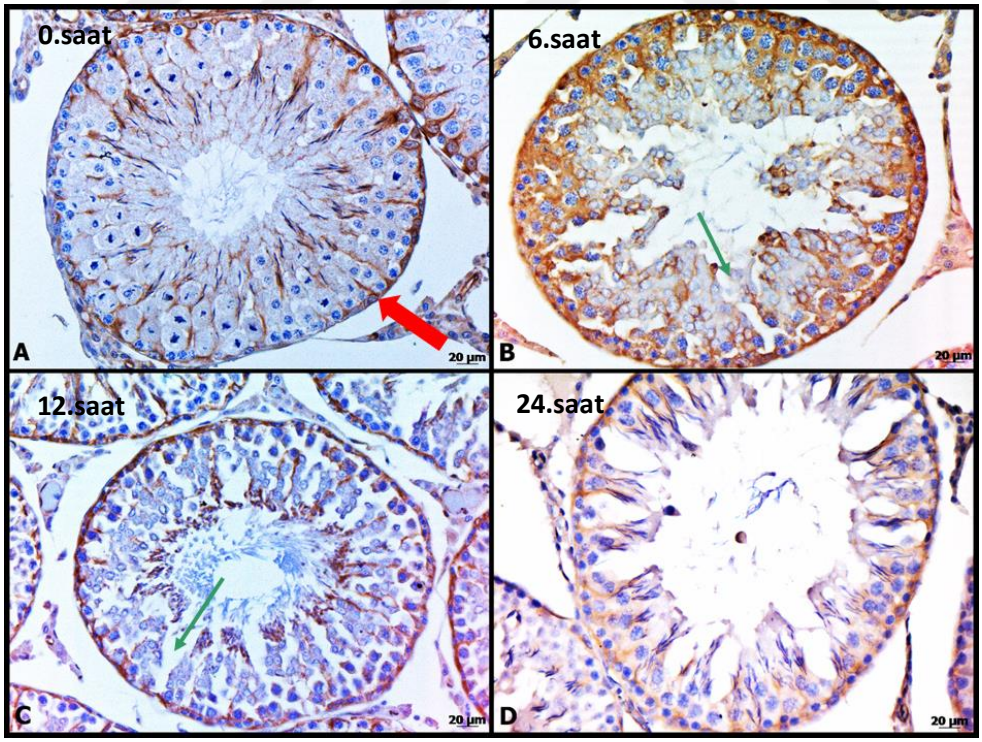
Şekil 3.38. Kontrol gruplarına ait 96.saatte testis seminifer tübülüslerinin p-YAP ile immunohistokimyasal olarak işaretlenmesi. ➡ Sertoli hücrelerini, ↑ uzamış spermatidleri, p primer spermatositleri göstermektedir.



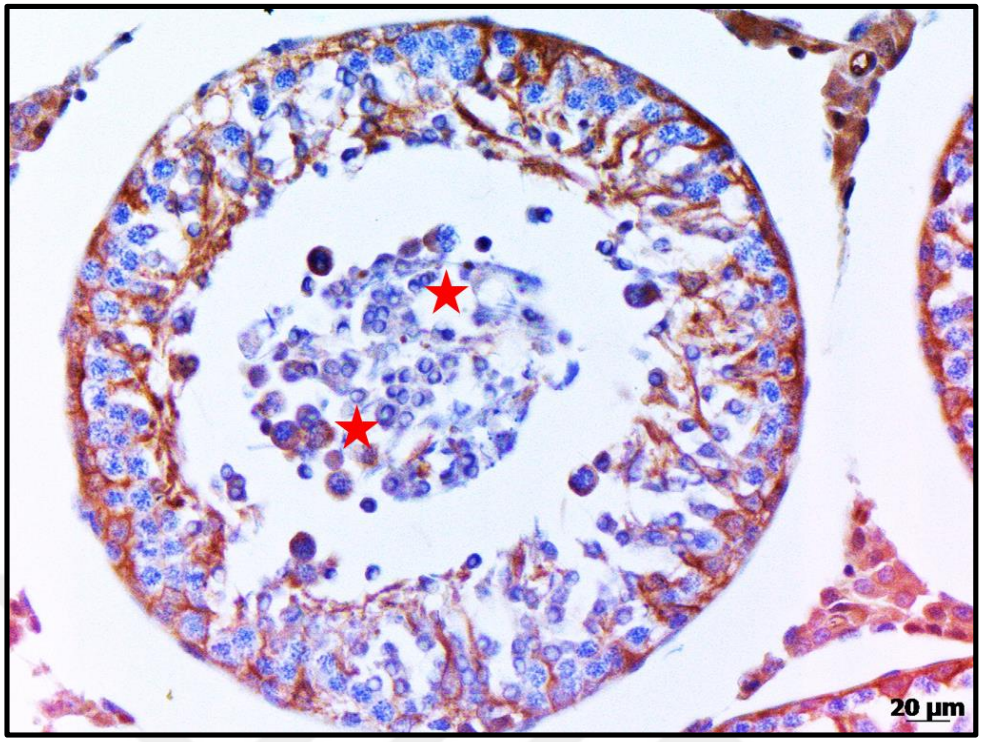
Şekil 3.39. Metilselüloz verilen gruplarda testis seminifer tübülüslerinin p-YAP ile immunohistokimyasal olarak işaretlenmesi. ➡ Sertoli hücrelerini, ↑ uzamış spermatidleri göstermektedir.



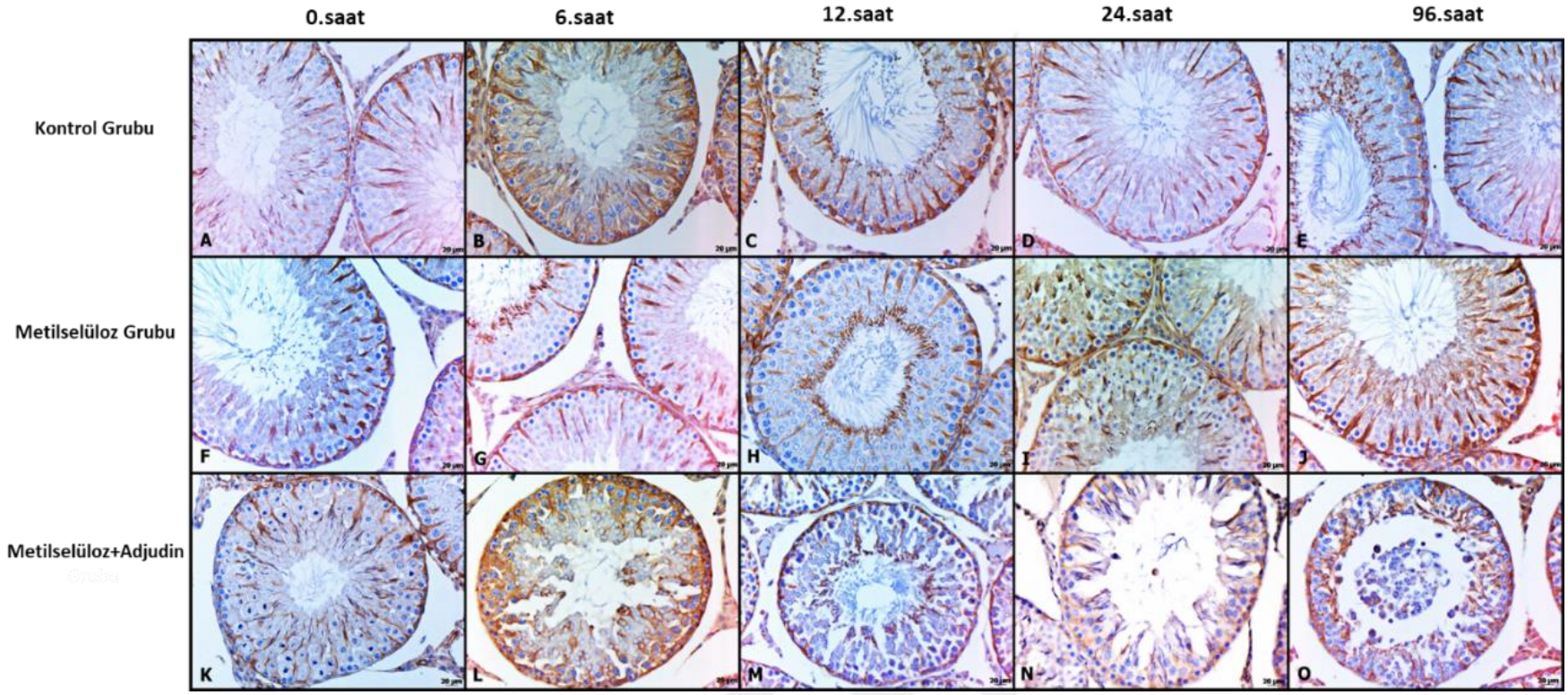
Şekil 3.40. Metiselüloz verilen gruplarına ait 96.saatte testis seminifer tübülüslerinin p-YAP ile immunohistokimyasal olarak işaretlenmesi. ➡ Sertoli hücrelerini göstermektedir.



Şekil 3.41. Metilselüloz ve Adjudin verilen gruplarda testis seminifer tübülüslerin p-YAP ile immunohistokimyasal olarak işaretlenmesi. ➡ Sertoli hücrelerini, ↑ bozulmaya başlayan seminifer tübülüs epitelini göstermektedir.



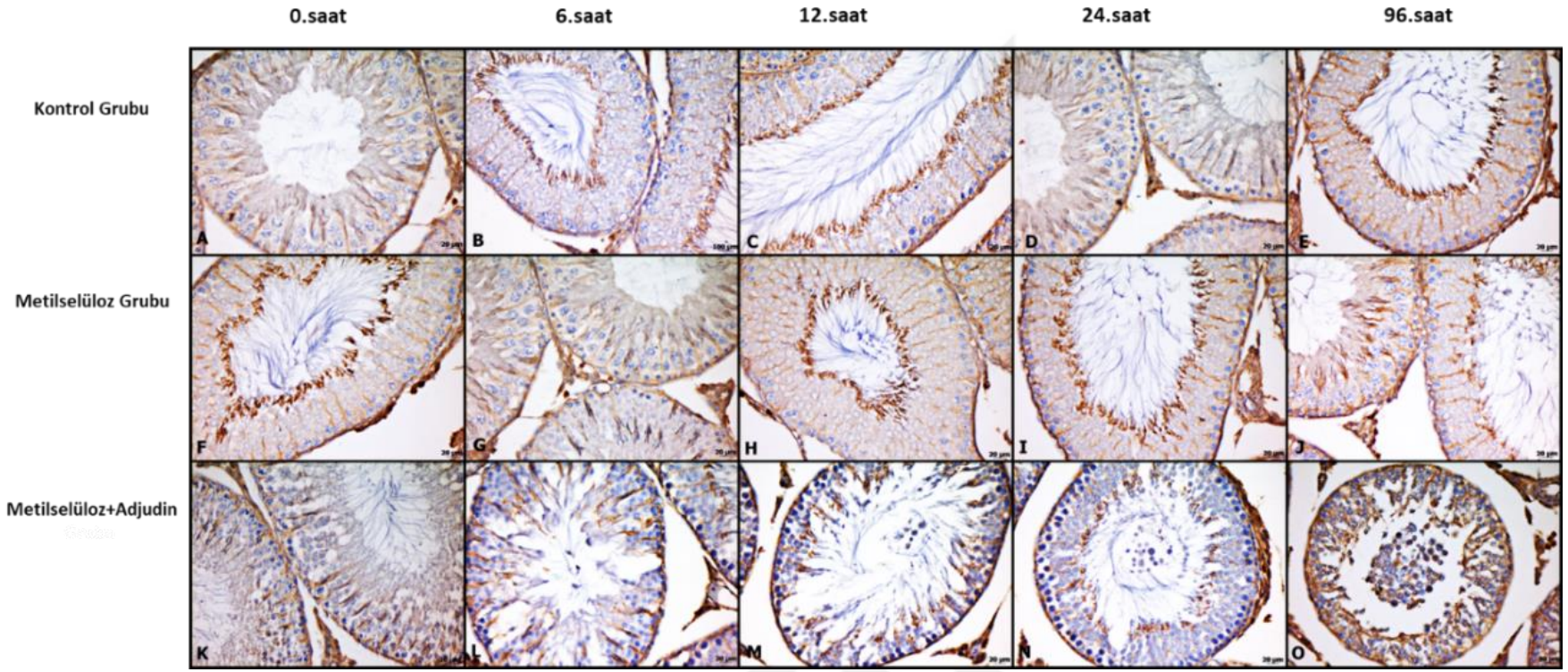
Şekil 3.42. Metilselüloz ve Adjudin verilen gruplarda 96.saatte testis seminifer tübülüslerinin p-YAP ile immunohistokimyasal olarak işaretlenmesi. ★ seminifer tübülüs lümenine dökülen germ hücrelerini göstermektedir.



Şekil 3.43. p-YAP İmmümohistokimyasal yöntemlerin tüm gruplardaki sonuçları.

3.3.3. Arp3 İmmunohistokimyasal Yöntem Sonuçları

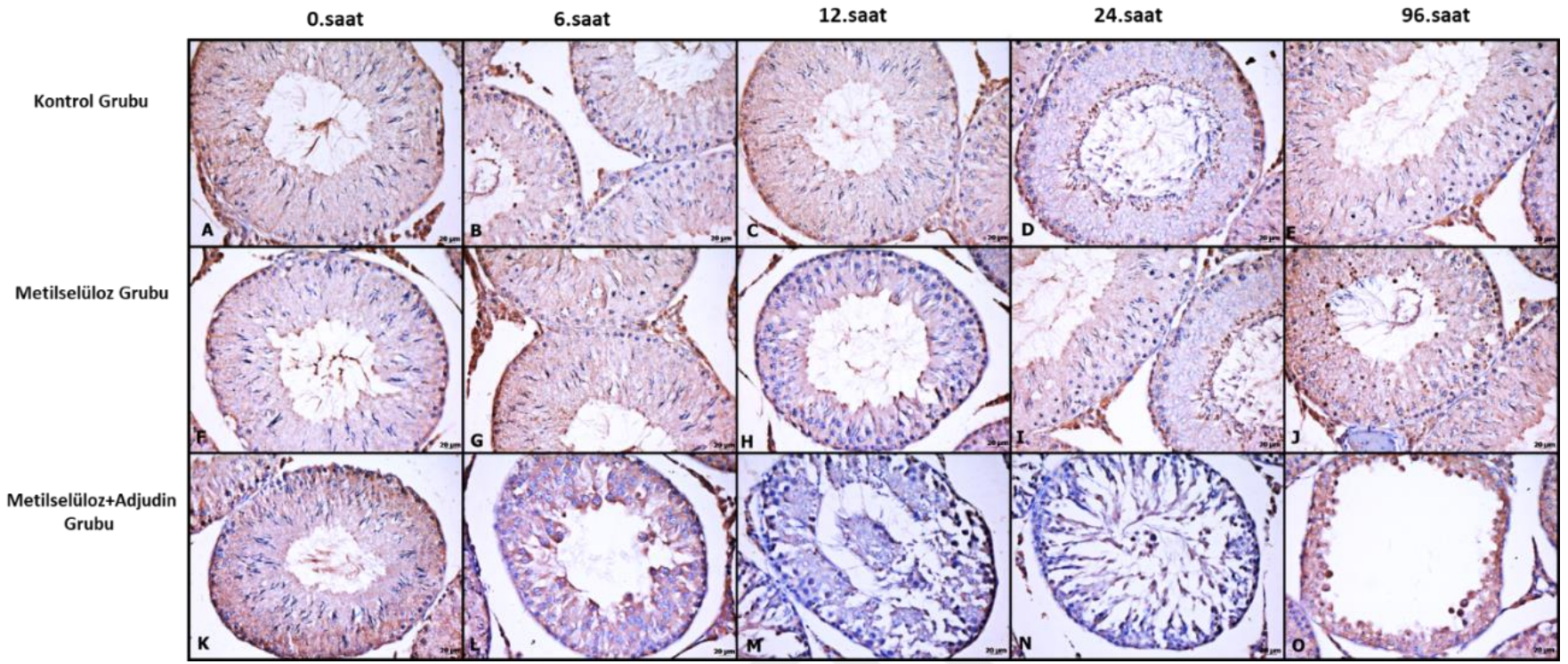
Aktin ilişkili bir protein olan Arp3 immünohistokimyasal yöntemlerde Kontrol ve Metilselüloz gruplarında benzer özellikler gösterdi. Metilselüloz ve Adjudin verilen gruplarda ise boyanma özelliği yaygın olmasından dolayı belirgin bir fark izlenmedi. Fakat morfolojik seviyede deney grubunda 6.saat itibariyle seminifer tübülüs epitelinin bozulduğu önceki analizlere benzer bir şekilde izlendi. Arp3 boyanmasına ait tüm gruplara ait görüntüler Şekil 3.44'de verildi.



Şekil 3.44. Arp3'ün İmmünohistokimyasal yöntemlerde tüm gruplardaki sonuçları.

3.3.4. EPS8 İmmunohistokimyasal Yöntem Sonuçları

EPS8 immünohistokimyasal yöntemlerde Kontrol ve Metilselüloz gruplarında benzer özellikler göstermiştir. Metiselüloz ve Adjudin verilen gruplarda ise boyanma özelliği Arp3 boyanmasında olduğu gibi yaygın dağılımından dolayı belirgin bir fark izlenmedi. 6.saat itibariyle seminifer tübülüs epitelinin bozulduğu, önceki analizlere benzer bir şekilde izlendi. EPS8 boyanmasına ait tüm gruplara ait görüntüler Şekil 3.45'de verildi.

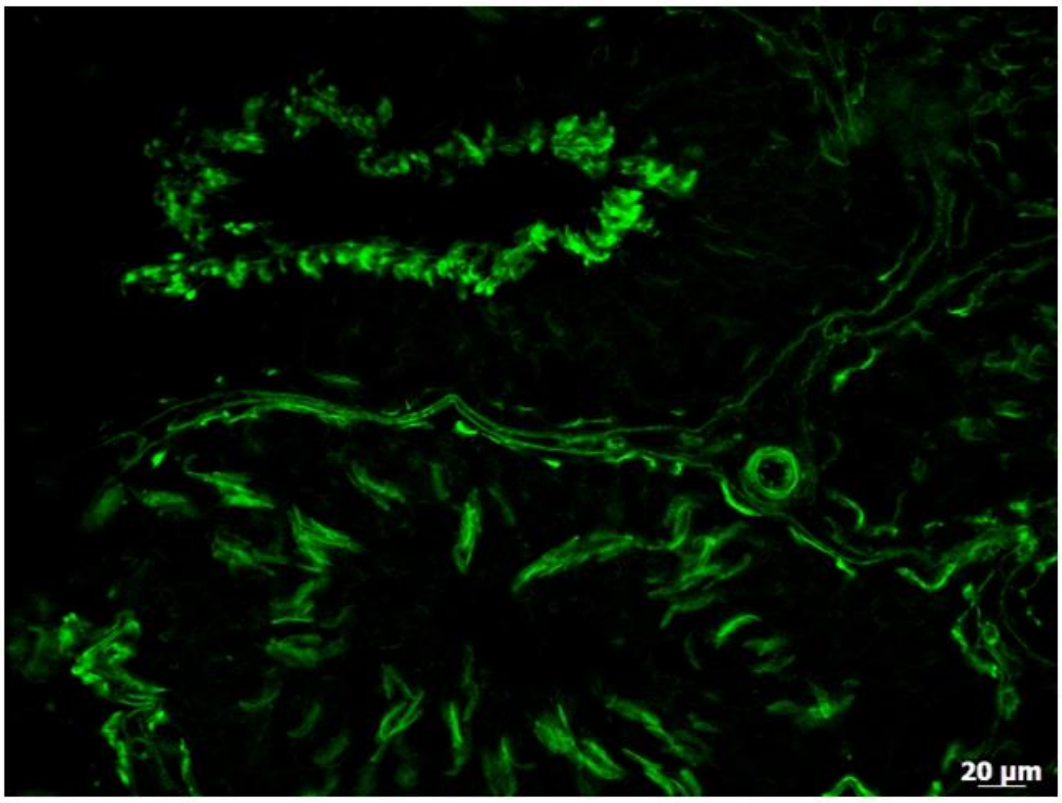


Şekil 3.45. EPS8'in İmmünohistokimyasal yöntemlerde tüm gruplardaki sonuçları.

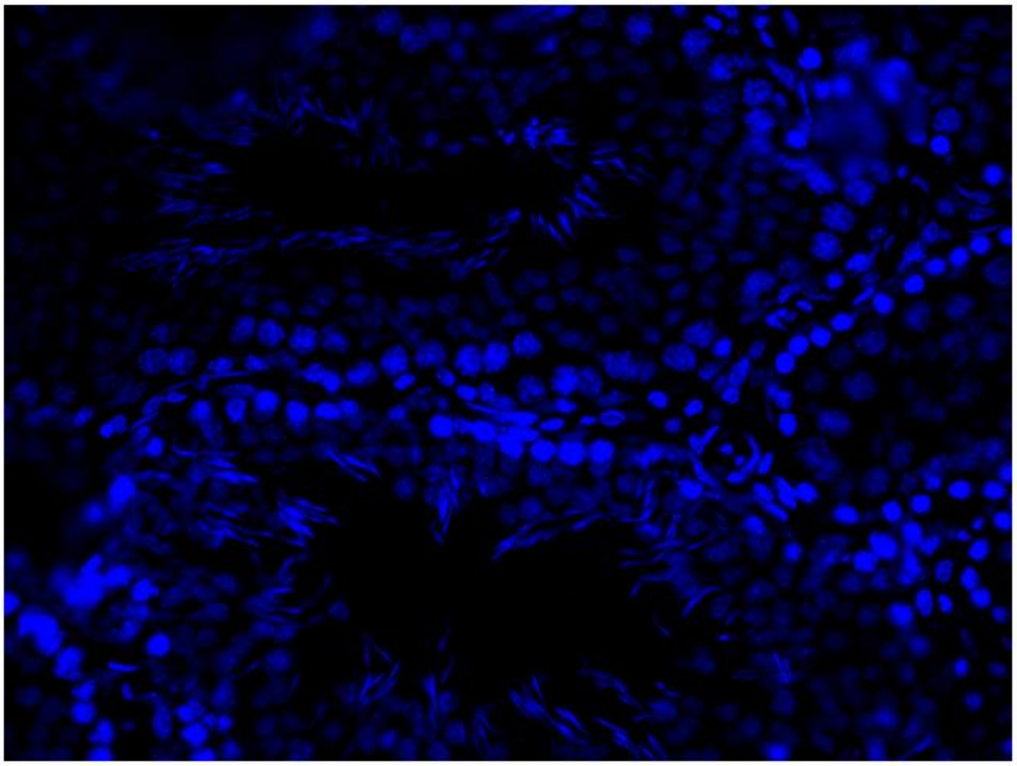
3.4. İmmünfloresan Yöntem Sonuçları

3.4.1. FITC-Phalloidin Boyaması

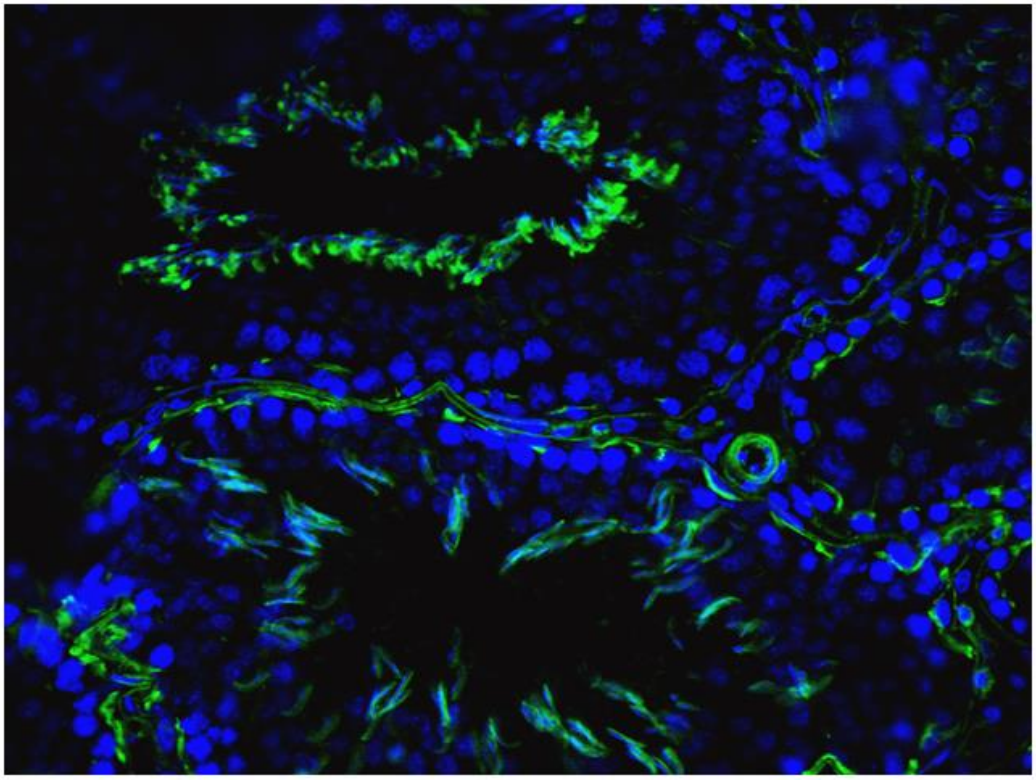
FITC-Phalloidin boyamasında yeşil ile boyanan mikrofilamanlar, Hoechst ile mavi boyanan çekirdeklerdir. Bu boyamanın amacı aktin hücre iskeletinin değişimini göstermektir. Kontrol grupları (Şekil 3.46, 3.47, 3.48) metilselüloz verilen gruplarla (Şekil 3.49, 3.50, 3.51) benzer özellikler gösterdi. Metilselüloz ve Adjudin verilen gruplarda 6. saat itibariyle aktin yapının dağılmaya başladığı ve bu özelliğin 24. (Şekil 3.52, 3.53, 3.54) ve 96. saatlerde (Şekil 3.55, 3.56, 3.57) oldukça belirgin olduğu belirlendi. Metilselüloz ve adjudin verilen gruplarda 0.saat kontrol ve metilselüloz verilen gruplara oldukça benzer özellikler gösterdi (Şekil 3.58).



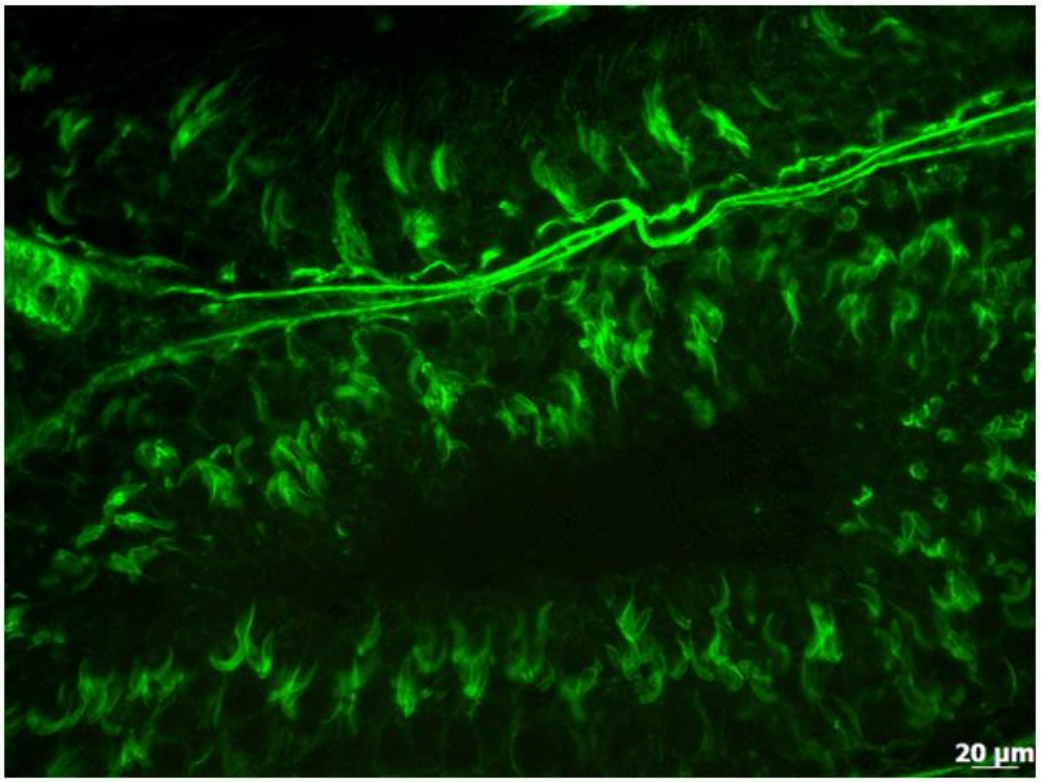
Şekil 3.46. Kontrol gruplarında 0. saatte FITC-Phalloidin boyamasıyla aktin hücre isketi yapısı izlenmektedir.



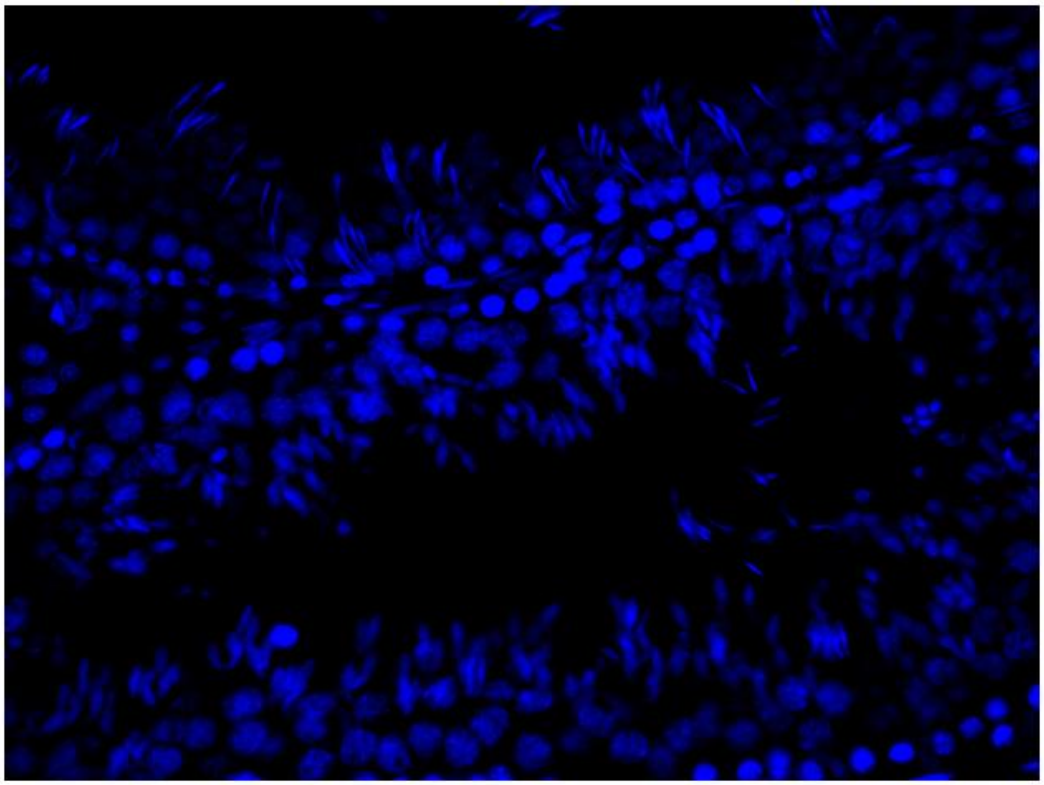
Şekil 3.47. Kontrol gruplarında 0. saatte Hoechst boyamasıyla çekirdek yapısı izlenmektedir.



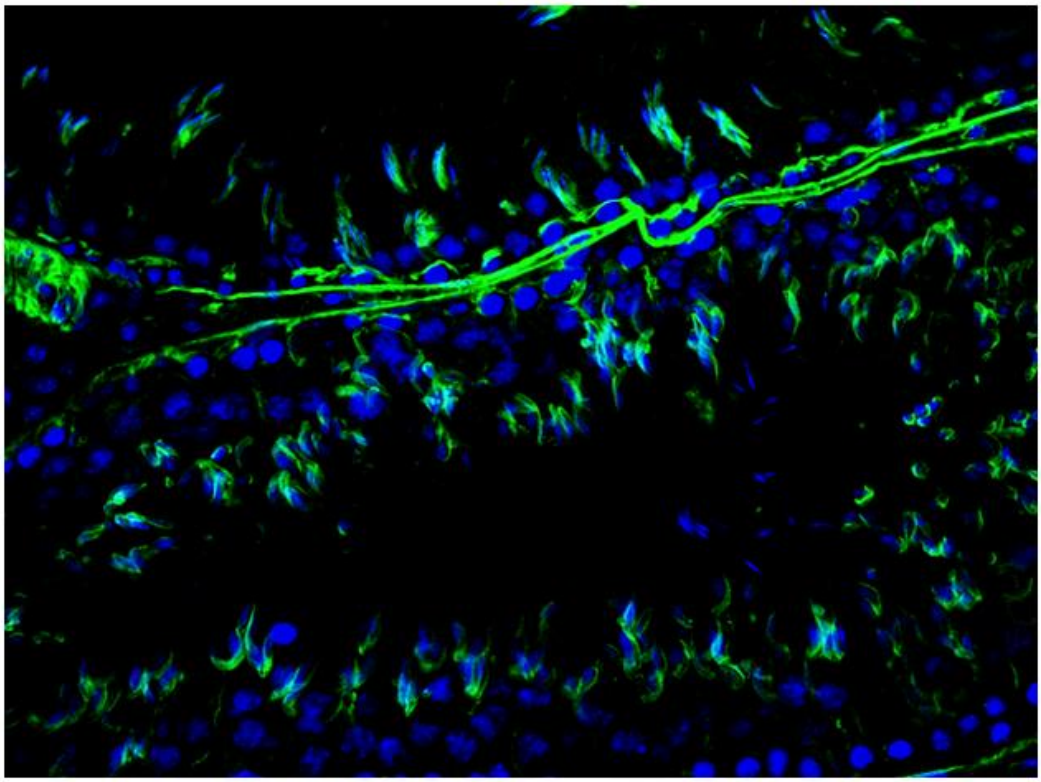
Şekil 3.48. Kontrol gruplarında 0. saatte FITC-Phalloidin ve Hoechst boyamasıyla aktin hücre isketi ve çekirdek yapısı izlenmektedir.



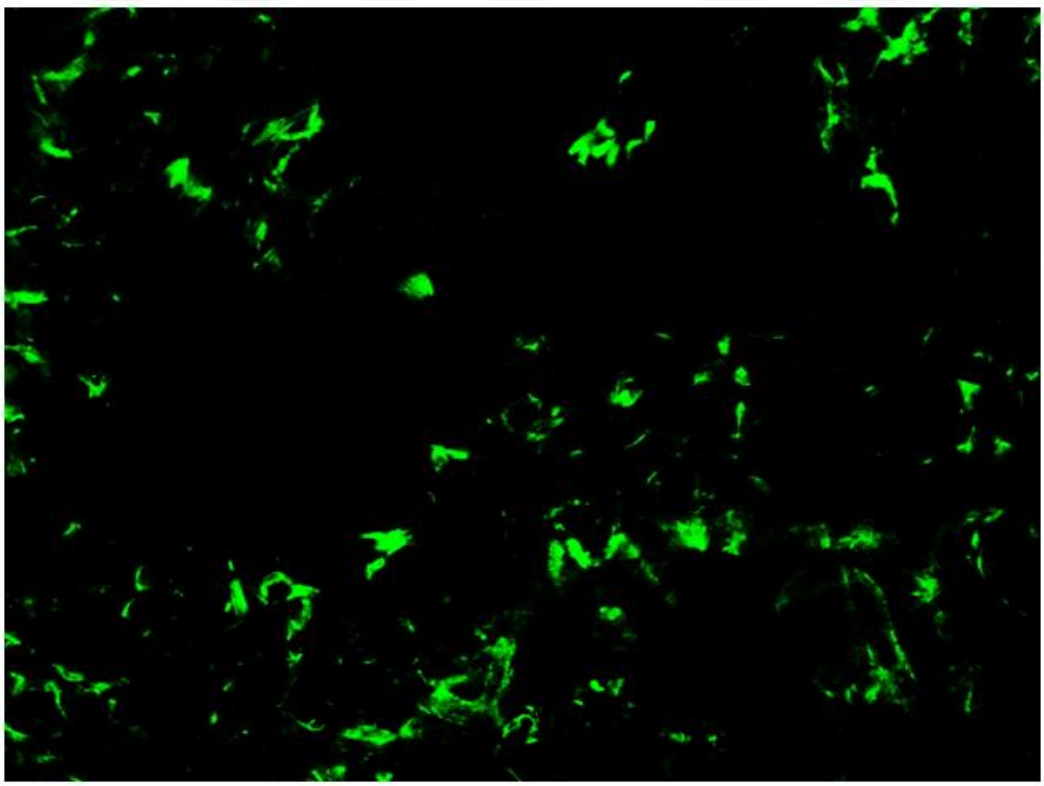
Şekil 3.49. Metiselüloz verilen gruplarda 0. saatte FITC-Phalloidin boyamasıyla aktin hücre isketi yapısı izlenmektedir.



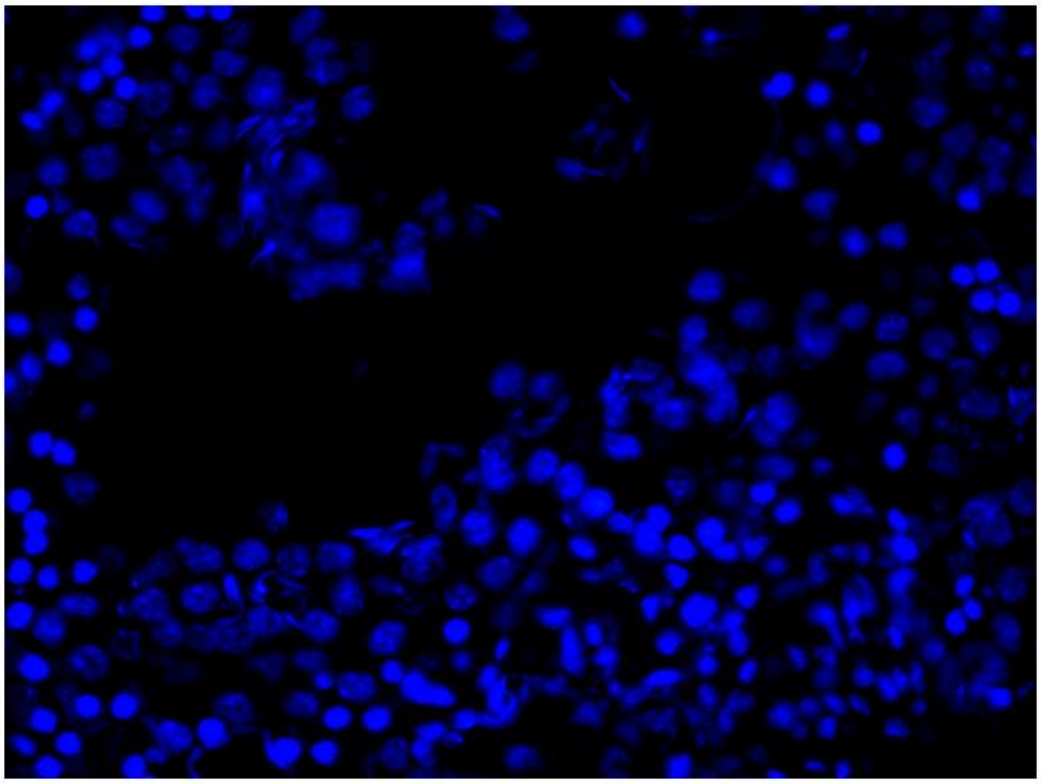
Şekil 3.50. Metiselüloz verilen gruplarda 0. saatte Hoechst boyamasıyla çekirdek yapısı izlenmektedir.



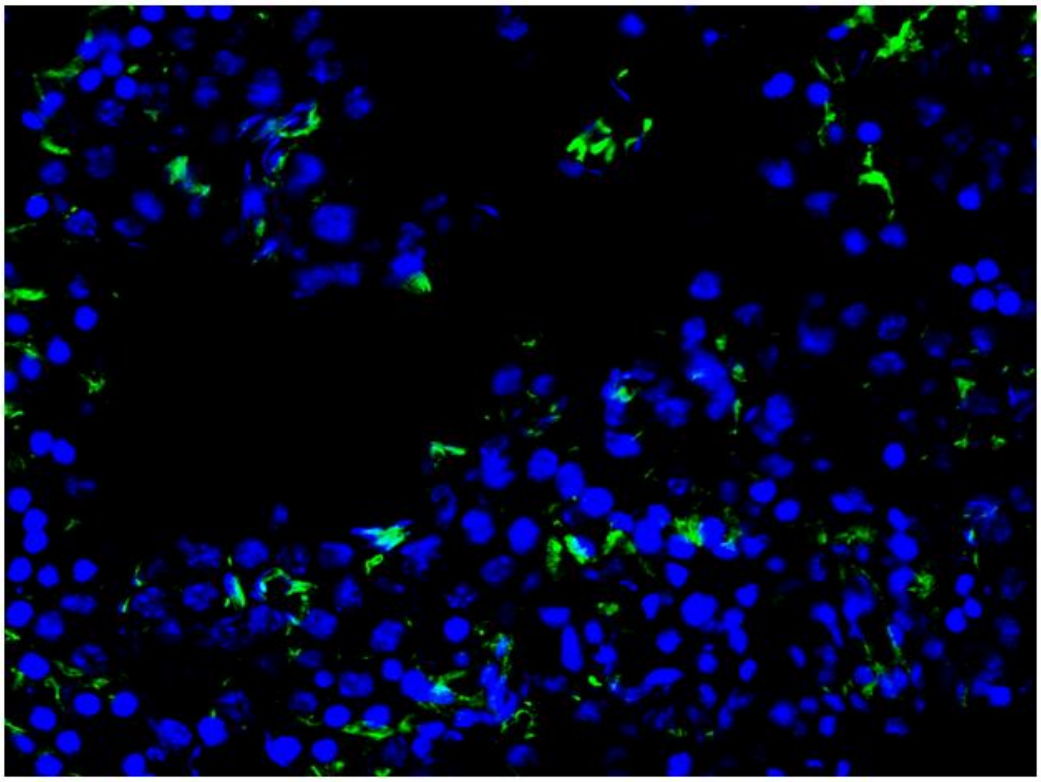
Şekil 3.51. Metilselüloz verilen gruplarda 0. saatte FITC-Phalloidin ve Hoechst boyamasıyla aktin hücre isketi ve çekirdek yapısı izlenmektedir.



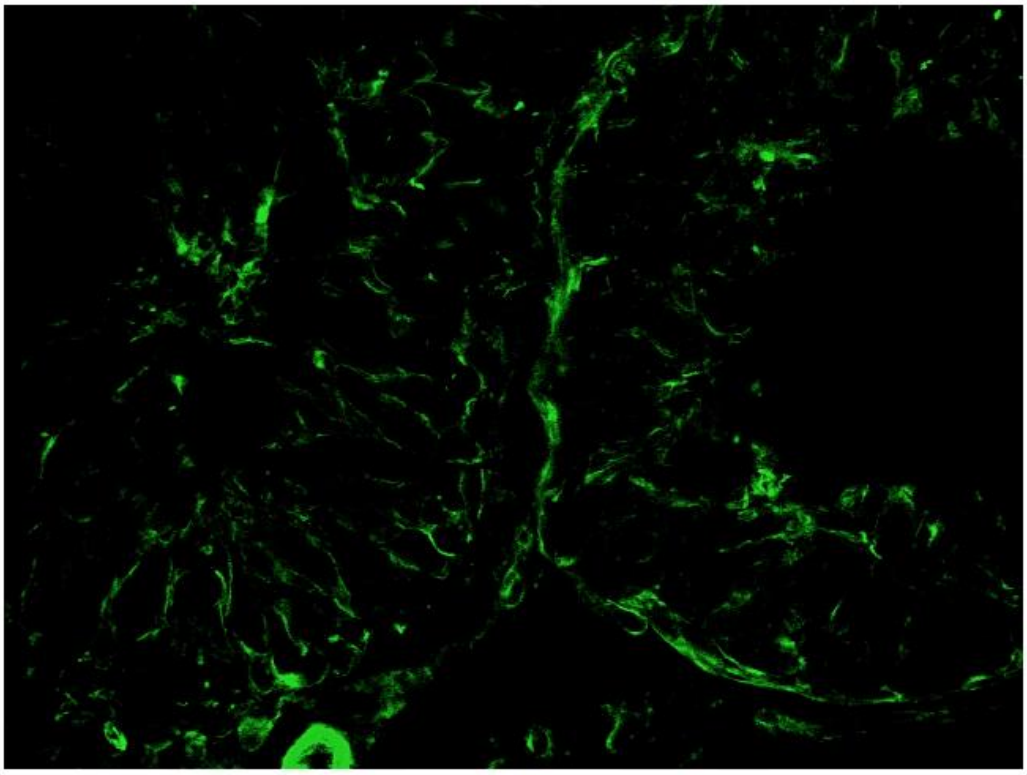
Şekil 3.52. Metiselüloz ve Adjudin verilen gruplarda 24. saatte FITC-Phalloidin boyamasıyla aktin hücre isketi yapısı izlenmektedir.



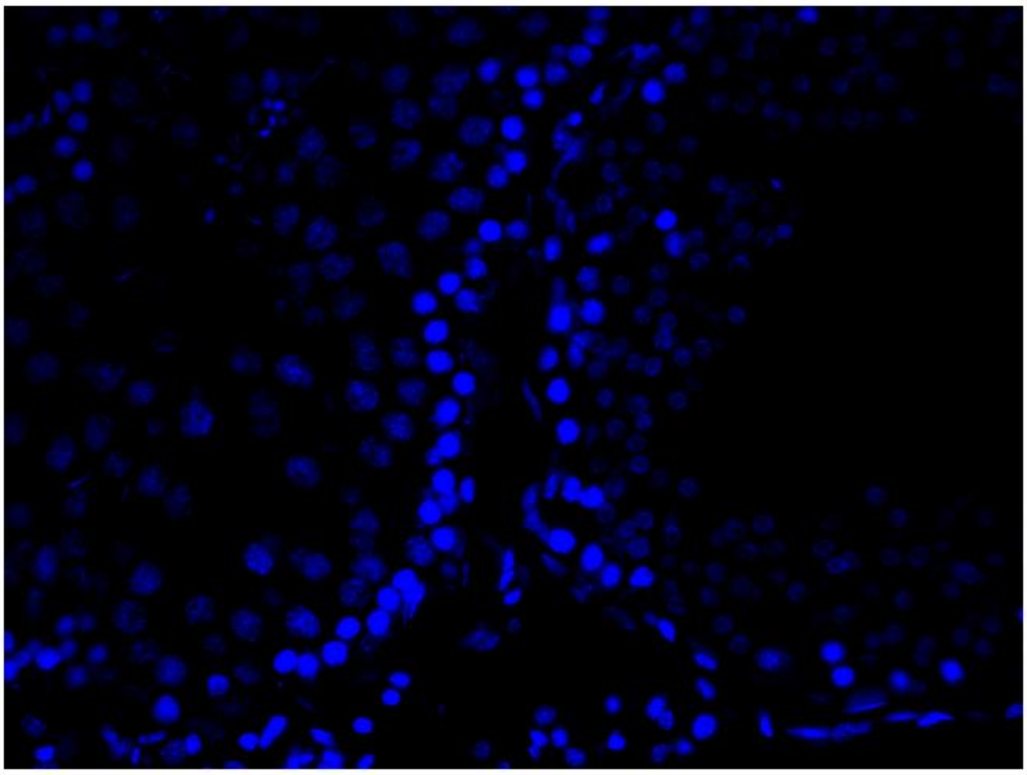
Şekil 3.53. Metiselüloz ve Adjudin verilen gruplarda 24. saatte Hoechst boyamasıyla çekirdek yapısı izlenmektedir.



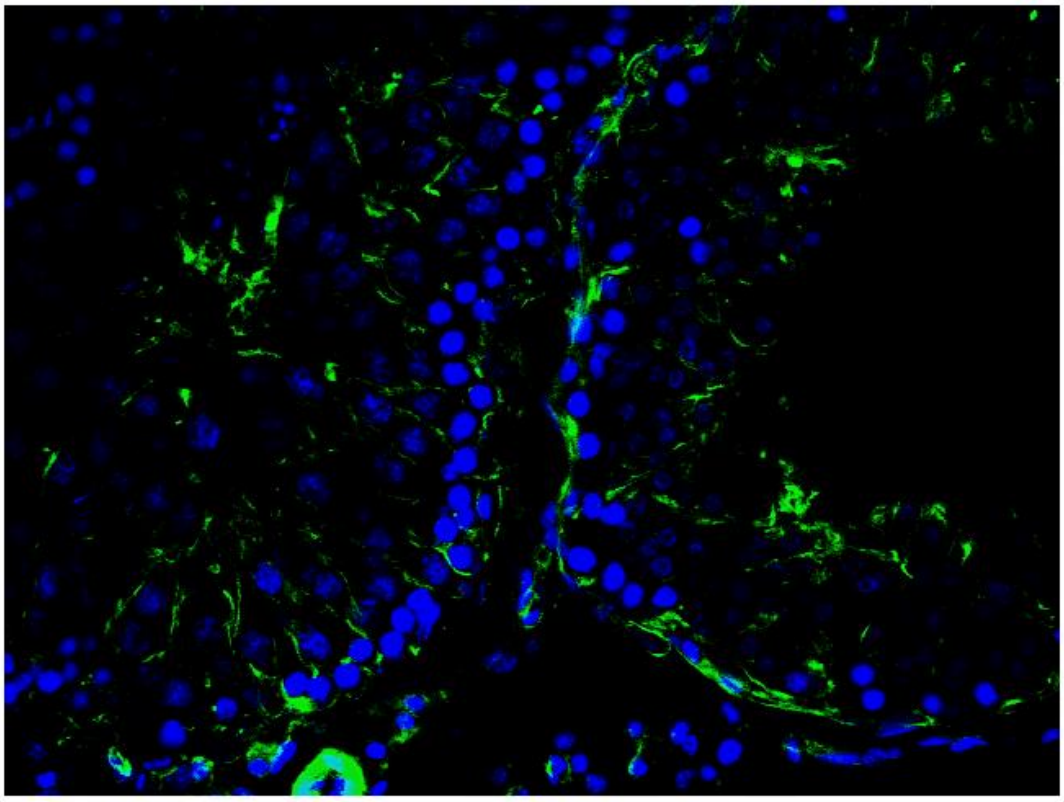
Şekil 3.54. Metiselüloz ve Adjudin verilen gruplarda 24. saatte FITC-Phalloidin ve Hoechst boyamasıyla aktin hücre iskeleti ve çekirdek yapısı izlenmektedir.



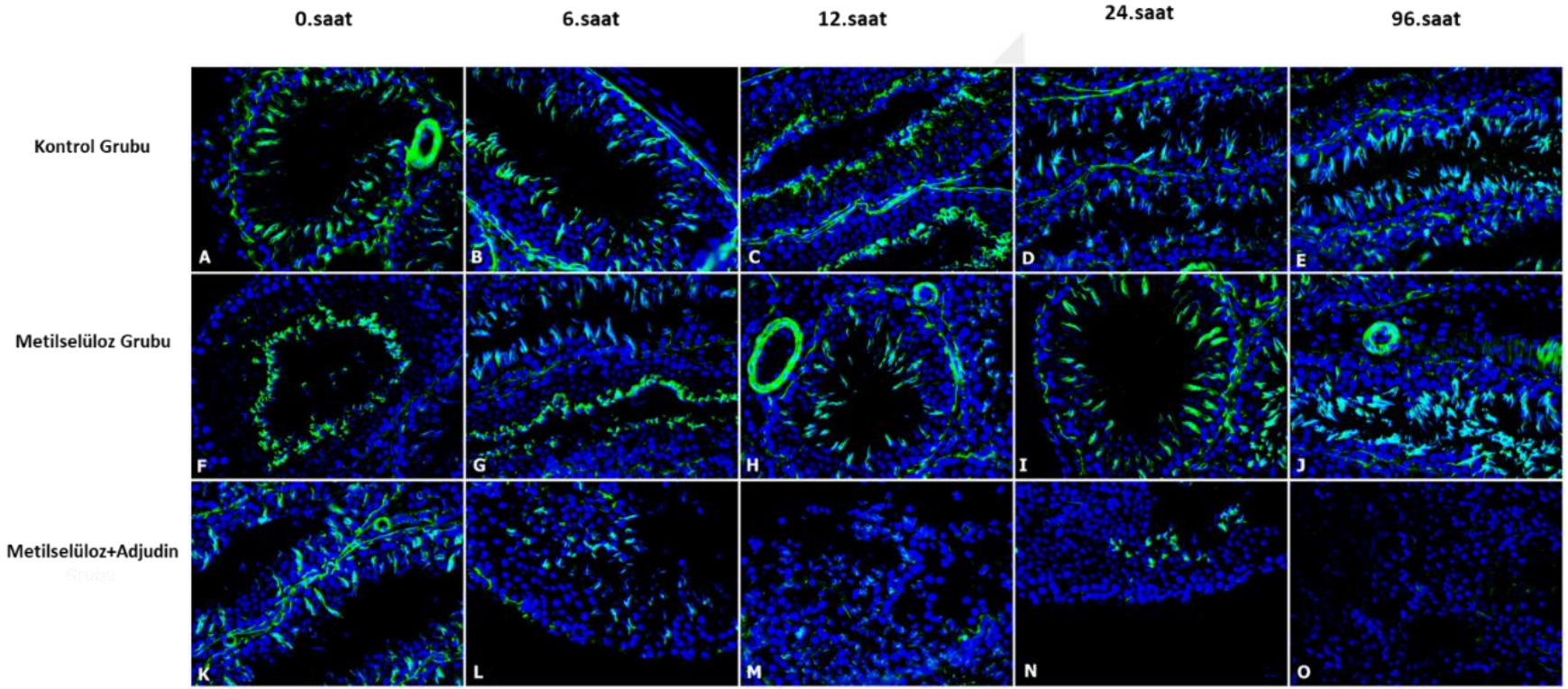
Şekil 3.55. Metiselüloz ve Adjudin verilen gruplarda 96. saatte FITC-Phalloidin boyamasıyla aktin hücre isketi yapısı izlenmektedir.



Şekil 3.56. Metilselüloz ve Adjudin verilen gruplarda 96. saatte Hoechst boyamasıyla çekirdek yapısı izlenmektedir.



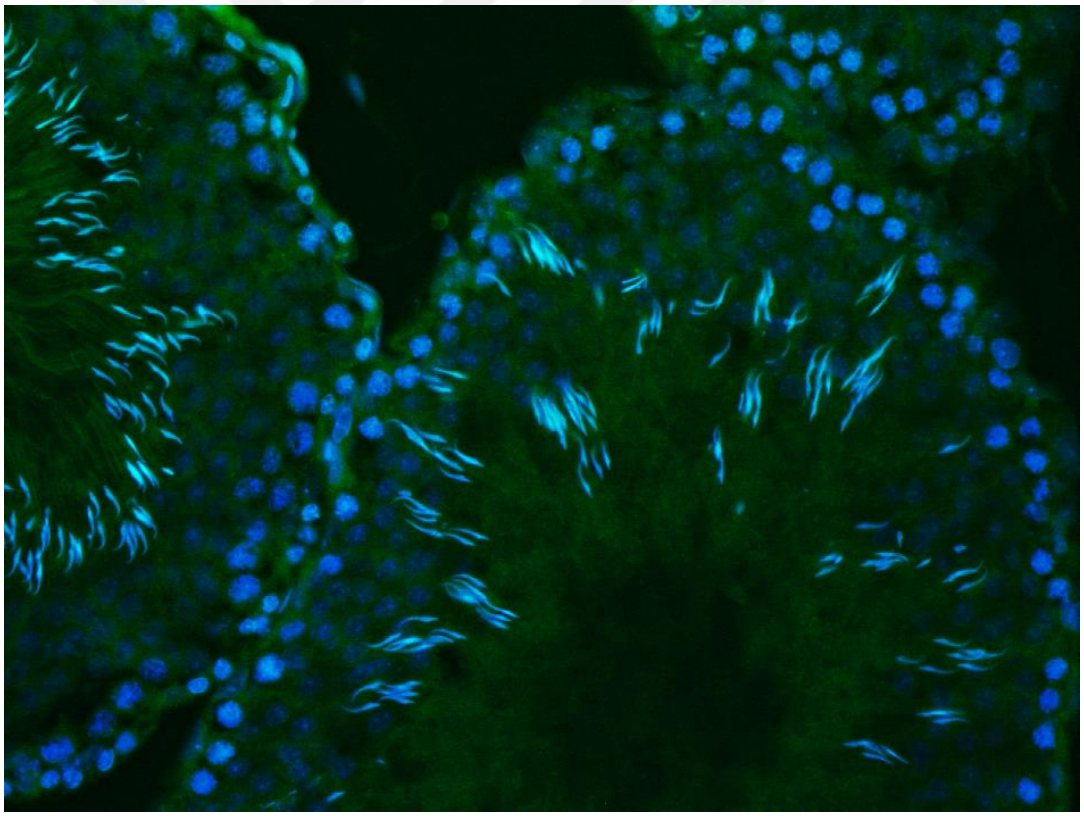
Şekil 3.57. Metiselüloz ve Adjudin verilen gruplarda 96. saatte FITC-Phalloidin ve Hoechst boyamasıyla aktin hücre iskeleti ve çekirdek yapısı izlenmektedir.



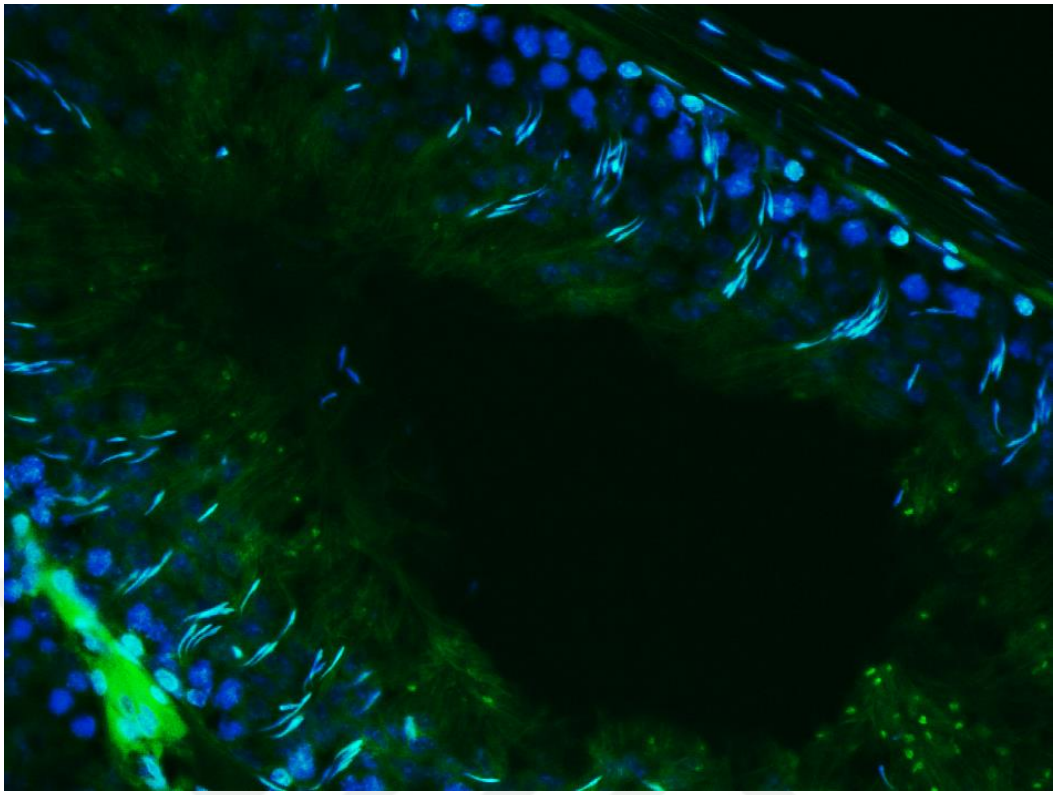
Şekil 3.58. Tüm gruplarda FITC-Phalloidin ve Hoechst boyaması izlenmektedir.

3.4.2. YAP ve p-YAP immünfloresans boyama sonuçları

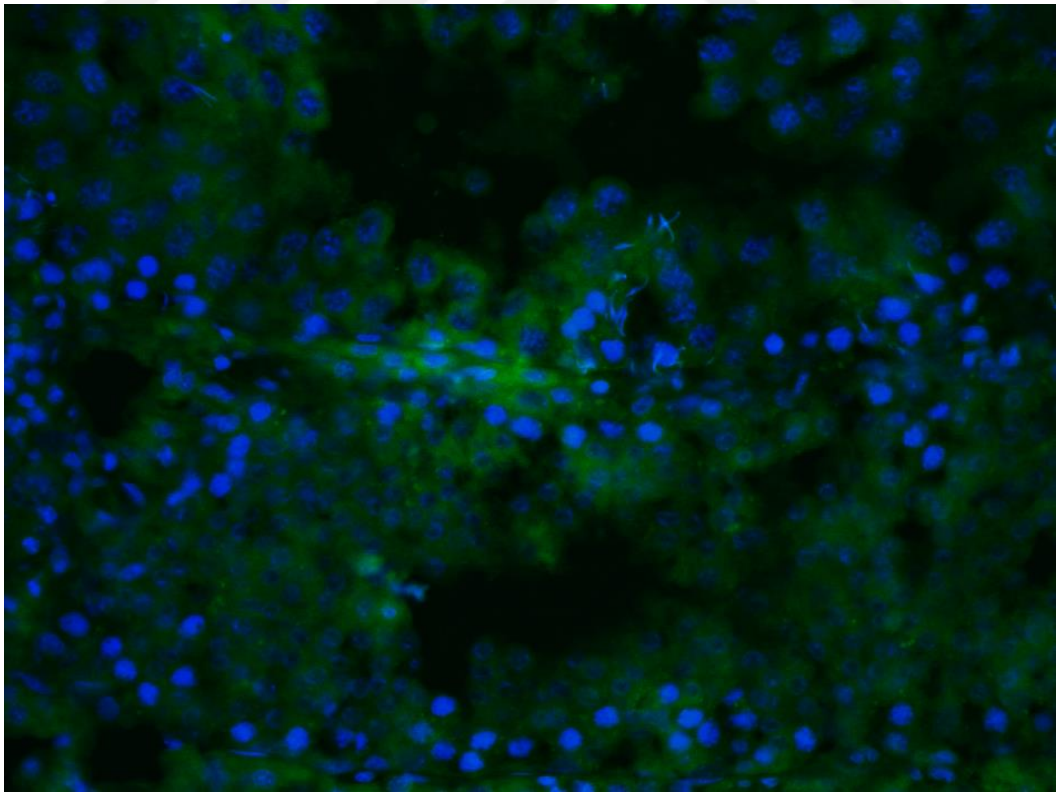
YAP ve p-YAP immünfloresans boyama sonuçları immünohistokimyasal sonuçlara benzer özellikler gösterdi. Kontrol ve metilselüloz grupları birbirleriyle benzer özellikler gösterirken (Şekil 3.59 , 3.60) Metilselüloz ve Adjudin verilen gruplarda özellikle 96.saatte YAP boyanmalarında azalma izlendi (Şekil 3.61). p-YAP ve YAP boyanma özellikleri benzer olup sitoplazmada yoğunluktaydı. Kontrol ve metilselüloz grupları birbirleriyle benzer özellikler gösterirken (Şekil 3.62, 3.63) Metilselüloz ve Adjudin verilen gruplarda özellikle 96.saatte p-YAP boyanmalarında azalma izlendi (Şekil 3.64). İmmünfloresans boyanma özelliklerine ait özellikler tüm gruplarda Şekil 3.65'de gösterildi.



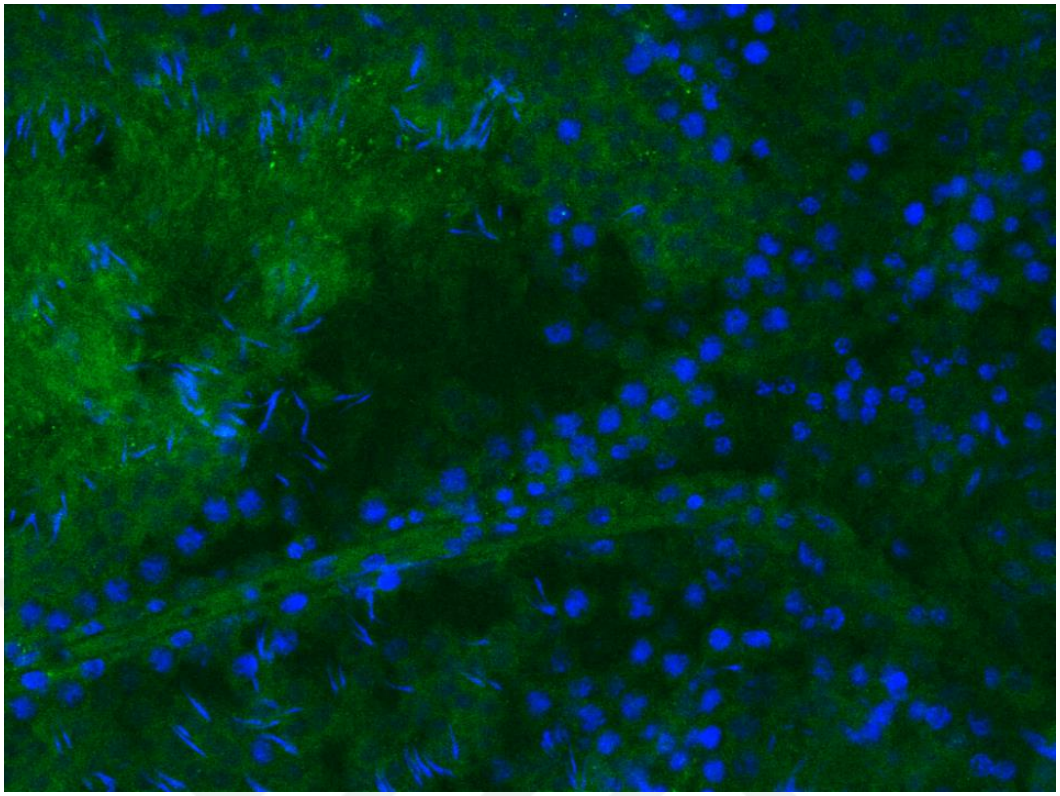
Şekil 3.59. Kontrol grubu 96.saatte testis seminifer tübülüslerinin YAP immünfloresan ile boyanması.



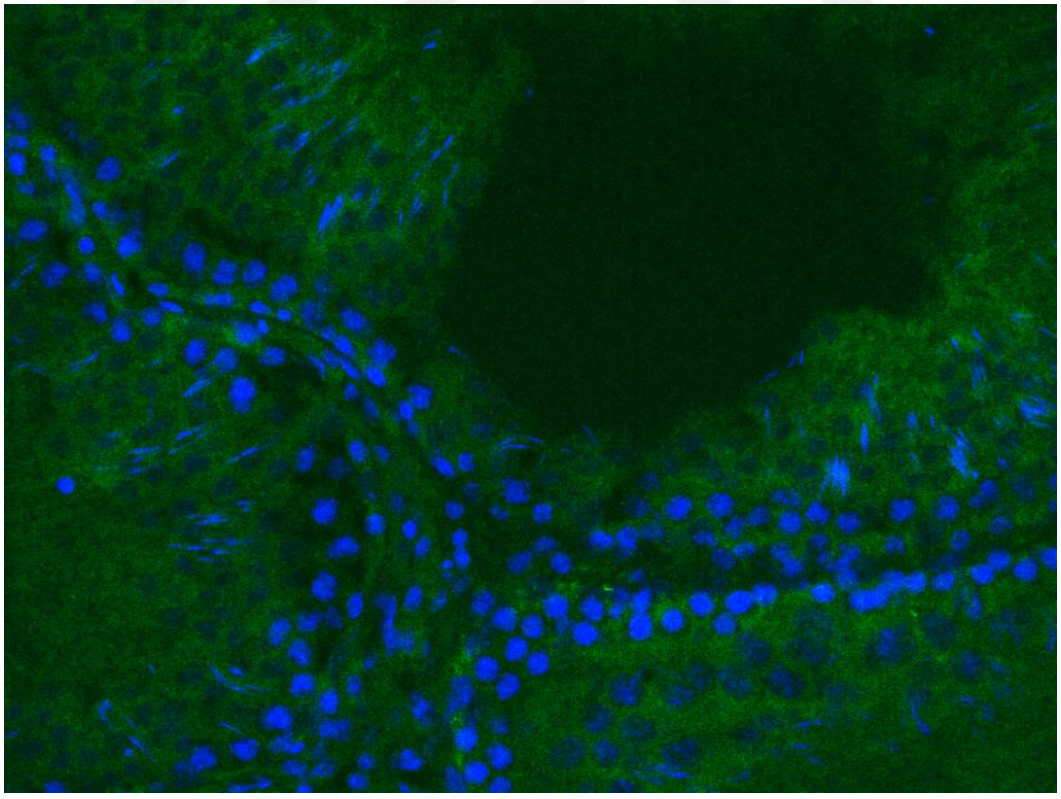
Şekil 3.60. Metilselüloz verilen grupta 96.saatte testis seminifer tübülüslerinin YAP immünfloresan ile boyanması.



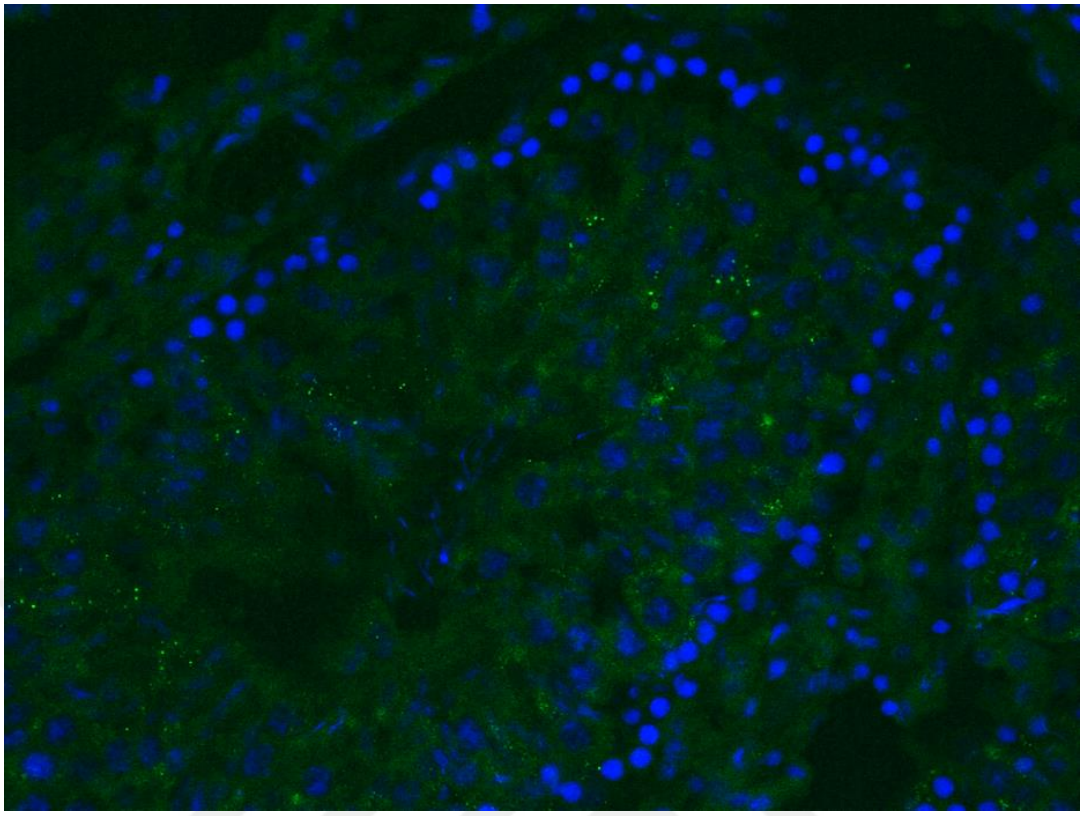
Şekil 3.61. Metilselüloz ve Adjudin verilen grupta 96.saatte testis seminifer tübülüslerinin YAP immünfloresan ile boyanması.



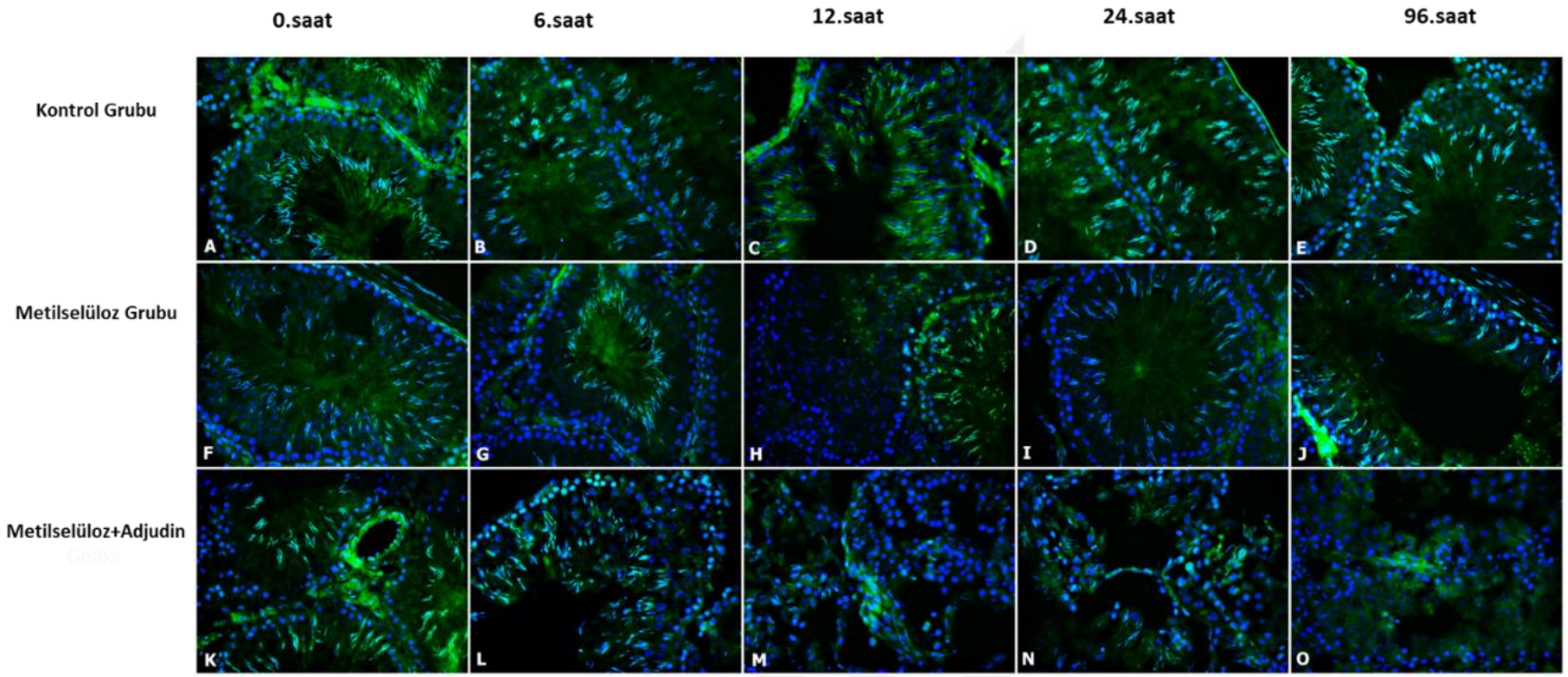
Şekil 3.62. Kontrol grubu 96.saatte testis seminifer tübülüslerinin p-YAP immünfloresan ile boyanması.



Şekil 3.63. Metilselüloz verilen grupta 96.saatte testis seminifer tübülüslerinin p-YAP immünfloresan ile boyanması.



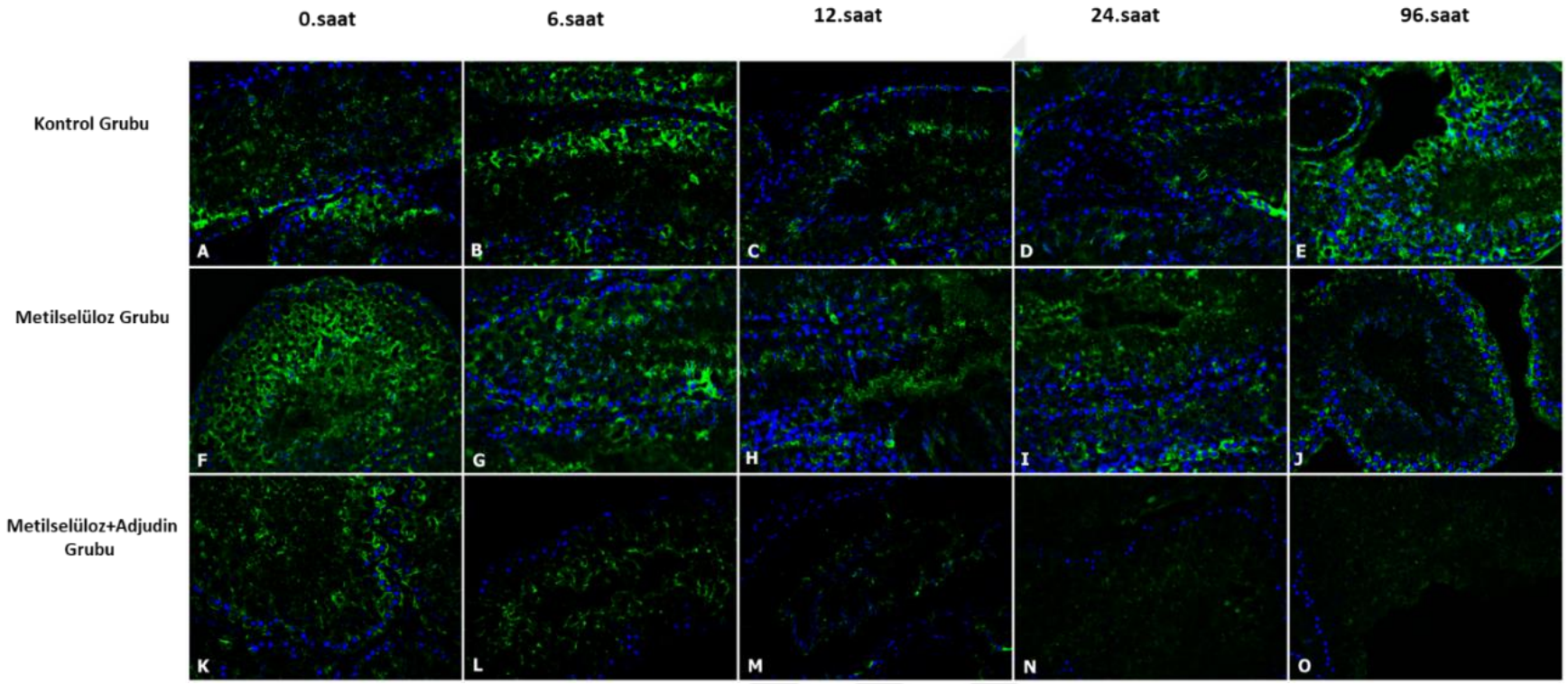
Şekil 3.64. Metilselüloz ve Adjudin verilen grupta 96.saatte testis seminifer tübülüslerinin p-YAP immünfloresan ile boyanması.



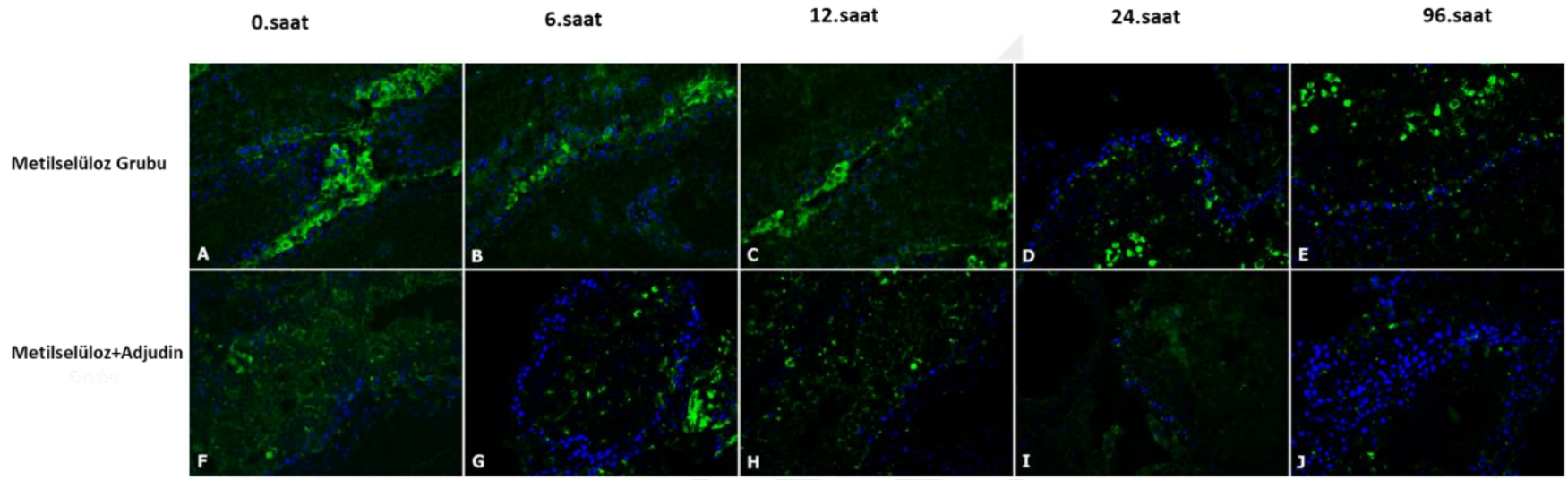
Şekil 3.65. Tüm gruplara ait YAP immunfloresans boyama özellikleri.

3.4.3. Arp3 ve EPS8 immünfloresans boyama sonuçları

Arp3 ve EPS8 immünfloresan boyanması benzer özellikler gösterdi. Özellikle Metilselüloz ve Adjudin verilen gruplarda 6. saat itibariyle azalan sinyal görüldü. Bu sinyal azalışı aynı grupta 96.saatte en az şekilde izlendi (Şekil 3.66 ve 3.67).



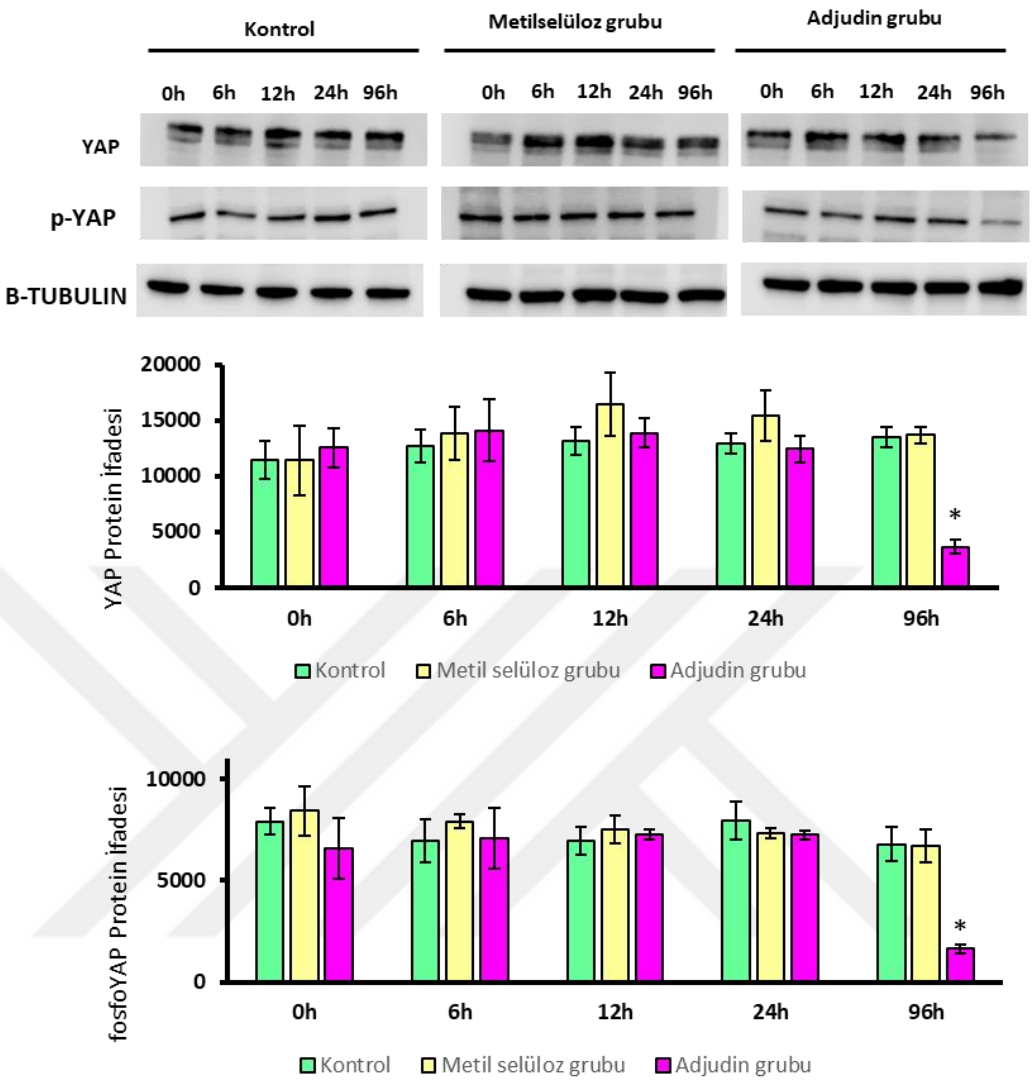
Şekil 3.66. Tüm gruplara ait Arp3 immunfloresans boyama özellikleri.



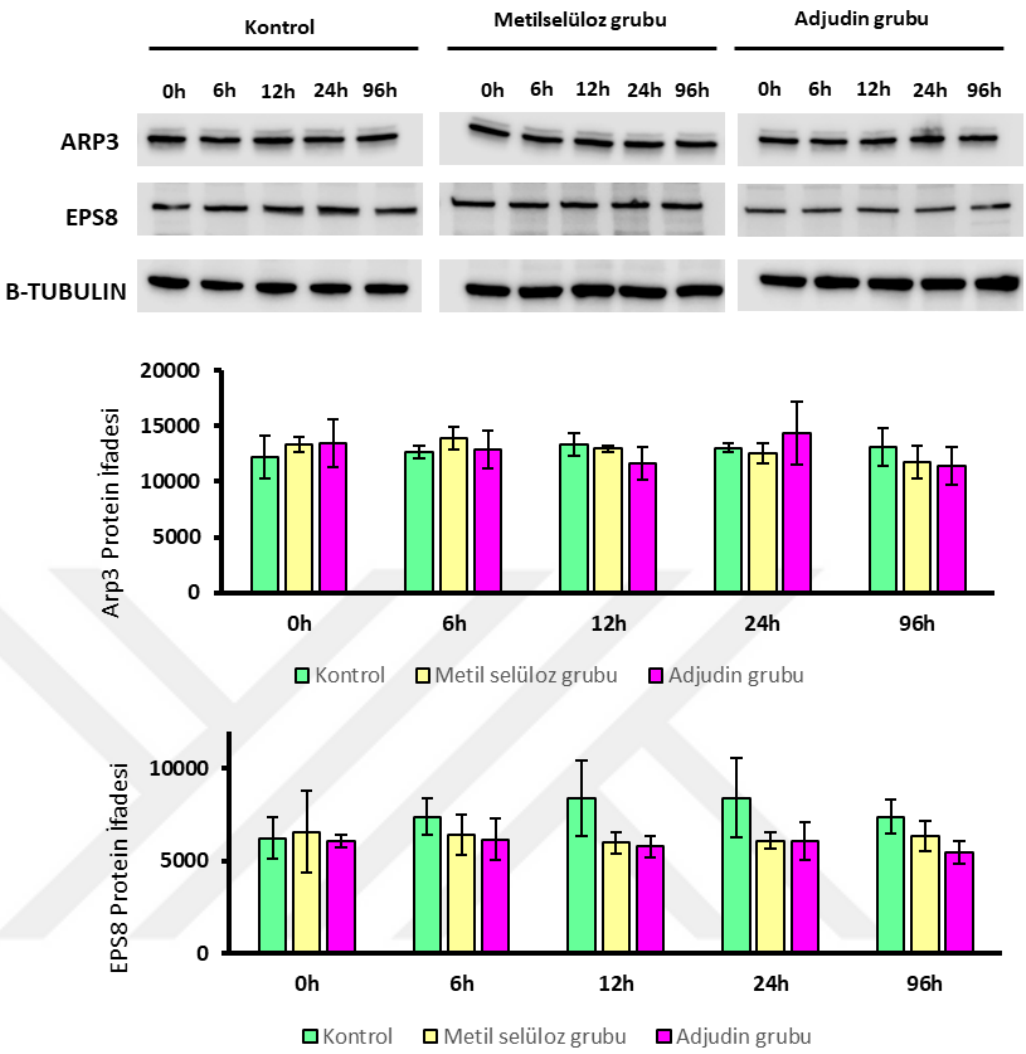
Şekil 3.67. EPS8'e ait immunfloresans boyama özellikleri.

3.5. Western Blot Uygulama Sonuçları

Kontrol ve Metilselüoz gruplarının tüm saat aralıklarında yapılan karşılaştırmasında iki grup arasında YAP, fosfoYAP, Arp3 ve EPS8 ifadeleri bakımından anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Böylelikle Adjudin'i çözücü ajan olarak kullanılan Metilselüloz'un ilgili hedeflerin protein ifade seviyelerine etki etmediği belirlendi. Deney grubu olarak ele alınan adjudin grubunda ise YAP protein ifade düzeyi 96. saatte yaklaşık 3,5 kat olarak anlamlı düzeyde azaldı ($p<0,05$). Aynı şekilde p-YAP ifadesi adjudin uygulanan deney grubunda 96. saatte anlamlı olarak 4 katlık azalış gösterdi ($p<0,05$). (Şekil 3.68). Yoğunluk değerlerine göre adjudin grubunda 96. saatte YAP/fosfoYAP oranı yaklaşık 2 olarak belirlendi. Arp3 ve EPS8 protein ifade seviyeleri ise Adjudin uygulanan deney setinin herhangi bir saat aralığında anlamlı düzeyde değişim göstermedi ($p>0,05$) (Şekil 3.69). Yoğunluk değerleri baz alındığında Arp3 protein ifade seviyesinin EPS8'e göre bir miktar yüksek bulunduğu gözlemlendi. Bant fenotipleri temel olarak her ne kadar ilgili antikorun bağlanma ilgisine bağlı olsa da gözlenen farklılık testiste bu iki protein açısından bir temel bilgi sağlayabileceği şeklinde düşünüldü.



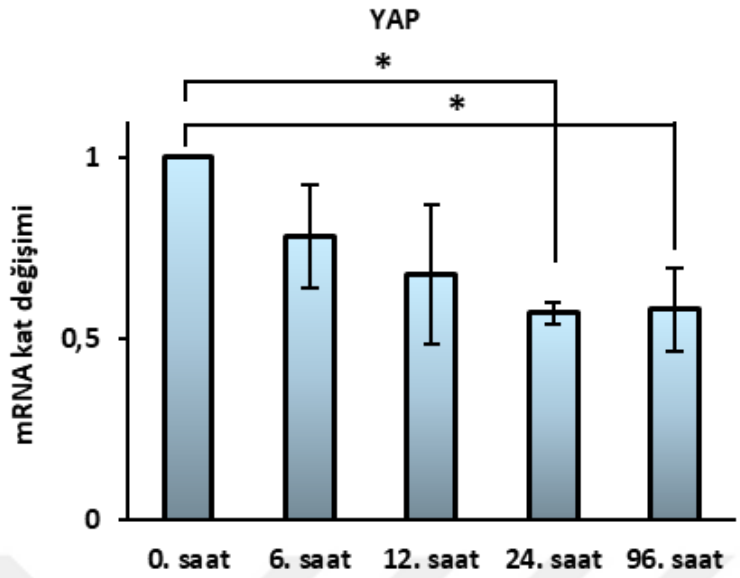
Şekil 3.68. YAP ve p-YAP antikorlarına ait Western blot ile işaretlenme sonuçları ve yoğunluk ölçüm sonuçlarının grafikleri



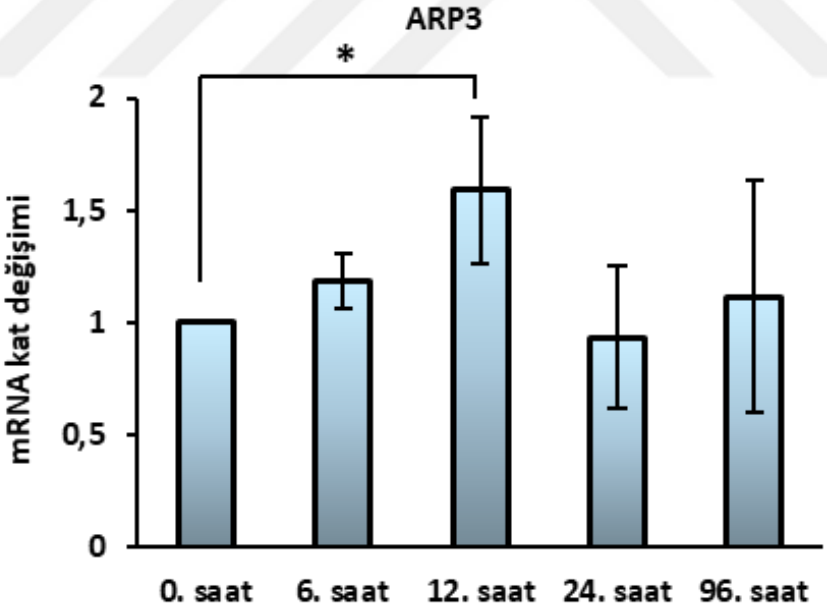
Şekil 3.69. EPS8 ve Arp3 antikorlarına ait Western blot ile işaretlenme sonuçları.

3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Analizi

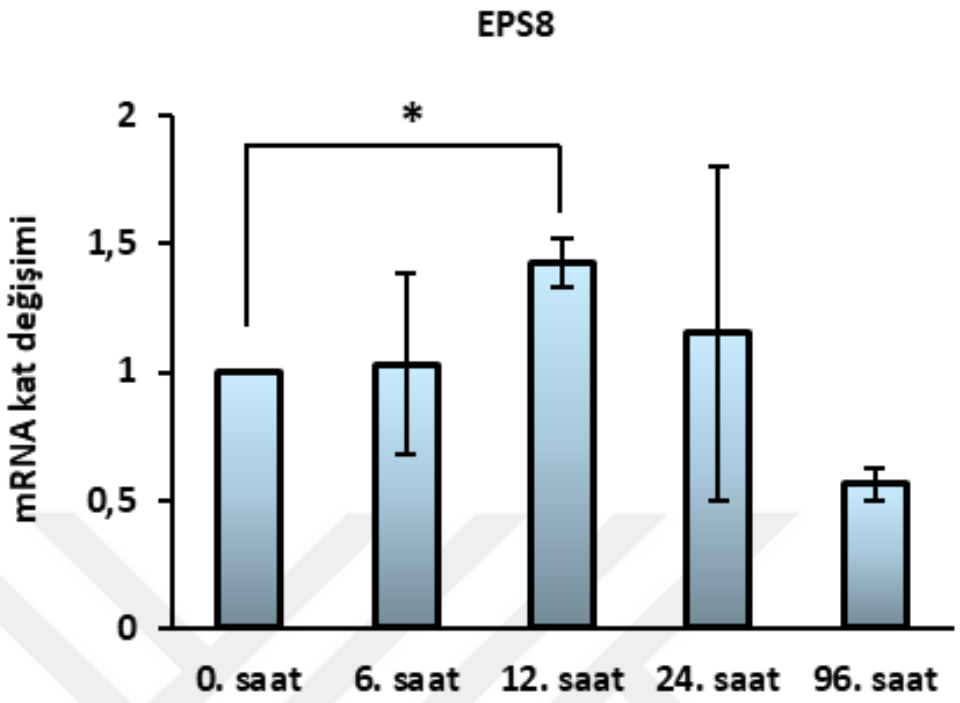
İzole edilen RNA örnekleri ile YAP, EPS8 ve Arp3 genlerine karşı kantitatif gerçek zamanlı PCR analizleri yapıldı. Hedef genlerin kat değişim analizleri 0. saat grubuna kıyasla hesaplandı ve buna göre YAP için 6 ve 12. saatlerde değişiklik gözlenmezken 24 ve 96. saatlerde anlamlı düzeyde ifade azalışı belirlendi ($p<0,05$). (Şekil 3.70). Arp3 için ise 12. saatte anlamlı bir artış gözlenmiş ($p<0,05$) diğer saatlerde değişiklik belirlenmedi (Şekil 3.71). EPS8 geninde de 12. saatteki artışın yanı sıra 96. saatte gen ifadesinde azalma izlendi ($p<0,05$) (Şekil 3.72). Şekil 3.73'da tüm PCR sonuçları verildi.



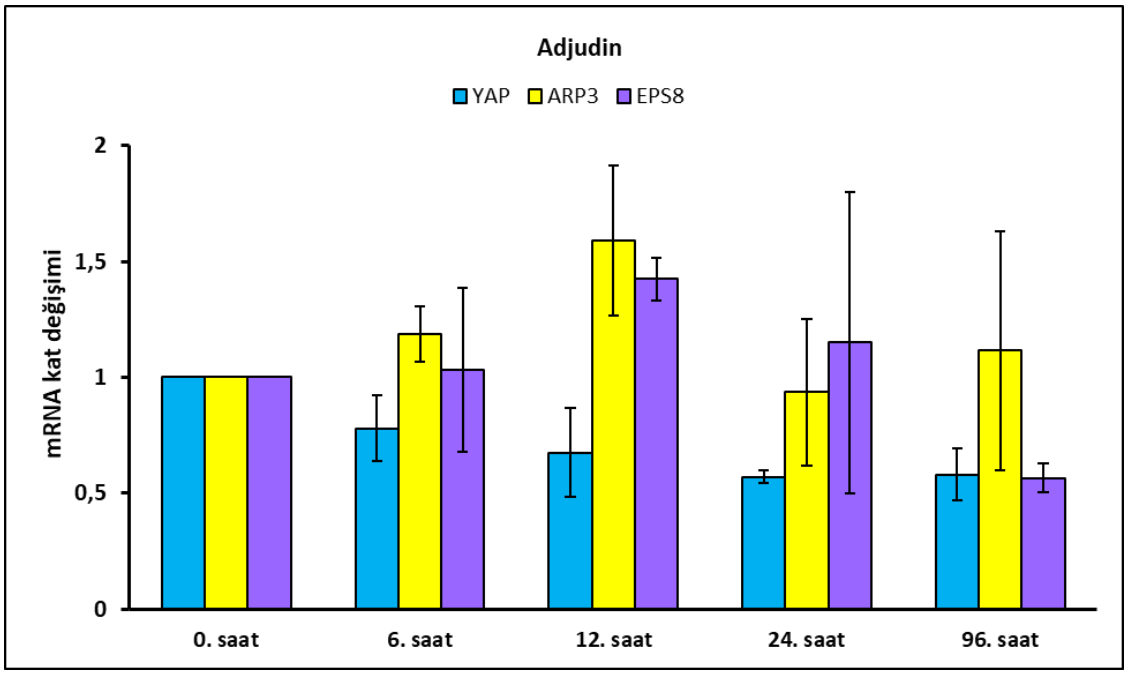
Şekil 3.70. YAP' ın gen analiz sonuçları.



Şekil 3.71. Arp3'ün gen analiz sonuçları.



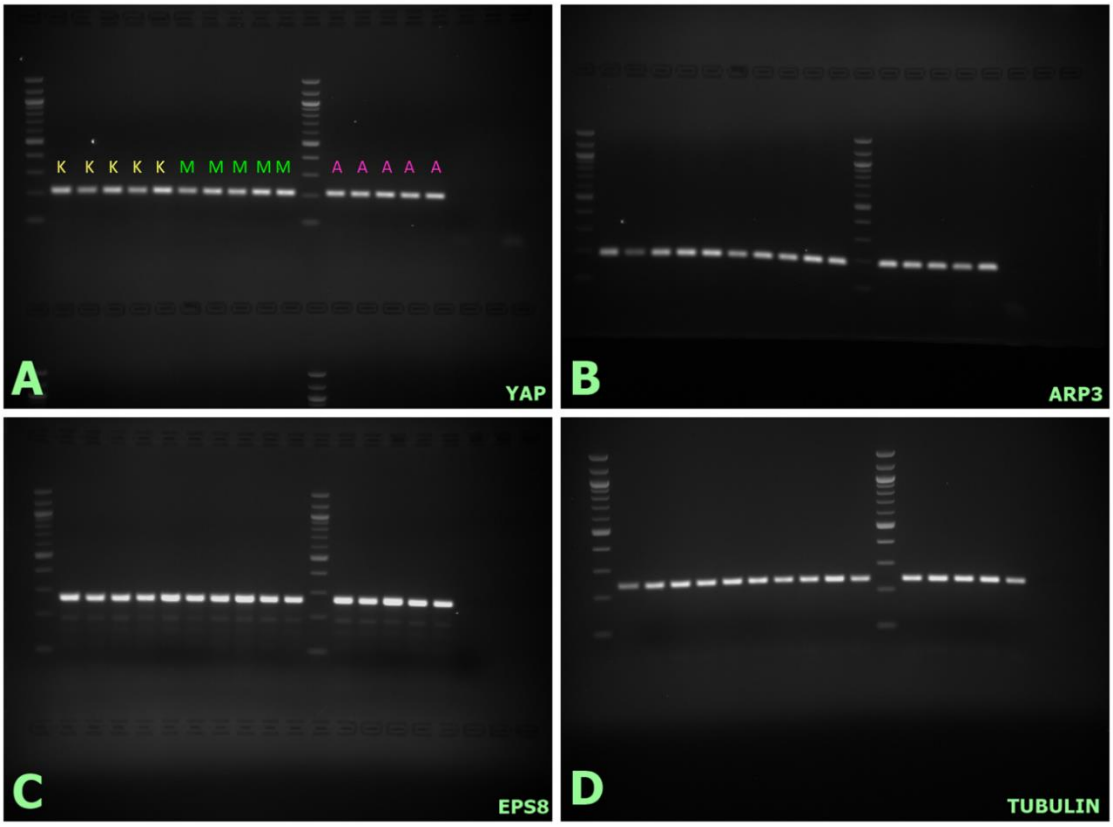
Şekil 3.72. EPS8'in gen analiz sonuçları.



Şekil 3.73. YAP, Arp3 ve EPS8'in tüm gen analiz sonuçlarını göstermektedir.

3.7. Agaroz jel elektroforezi sonuçları

PCR ürünlerimizin kalitesi ve deneylerin güvenirliğini ölçmek için agoroz jel elektroforezi yapıldı. Kontrol (K), Metilselüloz (M) ve Adjudin verilen gruplar (A) olarak Şekil 3.74'de belirtildi. Gruplar sırasıyla 0., 6., 12., 24. ve 96.saatler olmak üzere yüklendi. Adjudin 96.saatin yanındaki kuyuya nükleaz içermeyen su yüklendi. Yapmış olduğumuz bu analiz her bir genin doğru boyutta amplikon oluşturarak PCR sonuçlarımızın güvenilir olduğunu ve kontaminasyonun olmadığını gösterdi



Şekil 3.74. Tüm gruplardaki agoroz jel analiz sonuçları.

4. TARTIŞMA

Memeli spermatogenezi sperm üretimini yaparken aynı zamanda mitoz, mayoz, spermiyogenez, sperm salınımı gibi sayısız hücresel olayı içerir (Oatley ve Brinster 2008, Handel ve Schimenti 2010, Wolgemuth ve Roberts 2010, O'Donnell vd., 2011, Oatley ve Brinster 2012). Spermatogenez seminifer tübülüslerde gerçekleşir. Burada farklı aşamalardaki germ hücreleri bir arada bulunur ve belirgin bir biçimde hücresel ilişkiler kurar (Clermont ve Perey 1957, Hess 1990, Hess ve Renato de Franca 2008). Seminifer tübülüslerde aynı zamanda kutuplaşmaya sahip somatik bir hücre olan ve germ hücrelerine destek sağlayan Sertoli hücreleri de bulunmaktadır (Li vd., 2014, Franca vd., 2016). Memeli testisinde mayoz bölünme sonunda oluşan haploid spermatidlerden spermatozoa oluşturmak üzere meydan gelen hücresel, moleküler ve morfolojik değişikliklerin tümü oldukça kritik olaylardır. Erişkin hale gelen uzamış spermatidler, spermiasyon sırasında seminifer tübülüs epitelinden salınır. Bunun dışında kan testis bariyeri de preleptoten spermatositlerin bazalden apikal bölmeye geçişini sağlamak için yeniden düzenlenmeye geçmektedir. Bu şekilde bazal bölgede mitoz bölünmeler oluşurken apikal bölgede mayoz bölünmeler gelişmektedir. Bununla birlikte kan-testis bariyeri ve Sertoli ve spermatid ara yüzündeki değişimleri açıklayan yolaklar tam olarak bilinmemektedir (Cheng ve Mruk 2011, Lie vd., 2011). Bu süreci daha iyi anlamak için birçok çalışmada Sertoli ve germ hücrelerini in vitro koşullarda kültüre ederek birçok farklı tipte bağlantı biriminin etkili olduğu görülmüştür (Enders ve Millette 1988, Orth ve Boehm 1990, Cameron ve Muffly 1991, Mruk ve Cheng 2004, Lie vd., 2011).

İn vitro koşullarda Sertoli hücreleri oldukça hareketli olmalarına rağmen (Mruk vd., 1997, Mruk vd., 2003) in vivo koşullarda hareketli değildir. Sertoli hücreleri gelişmekte olan germ hücrelerini destekler ve spermatidlerin morfolojik değişikliklerine uyumlu olarak hücre şekillerinde değişiklik olur (Cheng ve Mruk 2011).

Potansiyel bir erkek kontraseptifi olan adjudin [1-(2,4 diklorobenzil)-1H-indazol-3-karbohidrazid] üzerinde yapılan çalışmalar sırasında, bu ilacın sperm atılımını hızlandırdığı ve spermatidlerin erken salınmasına neden olduğu izlenmiştir. Bu ilaç modelinin kullanılması, apikal ektoplazma özelleşmelerinde Sertoli hücresi ile spermatid arasındaki aktin filament ağının iyi bir şekilde izlenmesine ve çeşitli moleküllerin belirlenmesine olanak sağlamıştır (Cheng ve Mruk 2011). Bu çalışmalara bir örnek, hayvanlarda hormon yapısını bozmayan ve oral yolla verilebilen Adjudininin, testisinin aktin yapısı üzerinden kan-testis bariyerinin açılmasını ve mTOR sinyal yolağını etkin hale getiren mekanizmalardan biri olduğunu gösteren araştırma verilebilir (Mao vd., 2019).

İlk kez *Drosophila*' da keşfedilmiş ve memelilerde de korunduğu belirlenen Hippo sinyal yolağının hücrelerin bölünmesi, ölümü ya da proliferasyonu gibi hücrelerin kaderinin belirlendiği birçok aşamada oldukça önemli olduğu ortaya konmuştur (Varelas 2014). Bu süreçlere katılmasından ötürü Hippo sinyal yolağı birçok kanser türüyle de ilişkilendirilmiştir (Reggiani vd.,2020). Aynı zamanda bu sinyal yolağının kardiyomiyopati, polikistik böbrek hastalığı gibi çeşitli hastalıklarla da etkinliğinin ortaya konması tedaviye yönelik yaklaşımların geliştirilmesinde de katkılarının olabileceğini işaret etmektedir (Chen vd., 2014, Cai vd., 2018). Bu tedavi yaklaşımlarına bir örnek olarak primer ovaryan yetmezliği olan hastalarının ovaryumlarında Hippo sinyal yolağı baskılandığında oosit geliştiği ve başarılı gebelik ve doğumun gerçekleştiğini verebiliriz (Kawamura vd., 2013).

Bir kinaz kaskadı olarak çalışan Hippo sinyal yolağının temel bileşenleri MST1/2, LATS1/2 ve YAP/TAZ' dır. MST1/2 ve LATS1/2' nin fosforillenip fosforillenmemesine göre YAP sitoplazmada ya da çekirdek içerisinde konumlanır. Bu proteinlerin fosforillenip fosforillenmemesi ise hücrelerin bağlantı birimlerinden, hücre iskeletinden ya da metabolizması gibi birçok faktörden etkilenebilir (Piccolo vd., 2014, Varelas 2014). Hippo sinyal yolağı bileşenlerinin görevleri ve nasıl aktif/inaktif olduğu halen birçok organ ve dokuda gizemini korumaktadır.

Yapmış olduğumuz literatür taramasında testis ve Hippo sinyal yolağı arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmalar oldukça kısıtlıdır.

YAP'ın baskılandığı transgenik erkek farelerde seminifer tübülüslerin atrofiye gittiği, Leydig hücrelerinin anormal büyüdüğü, sperm sayısının azaldığı ortaya konulmuştur (Jeong vd., 2017). Başka bir çalışmada YAP, Sertoli hücresinde koşullu olarak silindiğinde seminifer tübülüslerde apopitozis ve testis ağırlıklarında azalış gözlemlenmiş ayrıca erişkin farelerde Sertoli hücre sayısında düşüş izlenmiştir (Levasseur vd., 2017). Sertoli hücreleri kültüründe maturasyon sürecinde YAP'ın ifadelenmesinde artış izlemiştir (Sen Sharma ve Majumdar 2017). Benzer bir çalışmada Hippo sinyal yolağı bileşenlerinin testiste matürasyon sürecinde arttığını ortaya koymuştur (Zhang, Zhang ve ark., 2018). Bu çalışmalar özellikle germ hücre matürasyon sürecinde bu sinyal yolağının etkin olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmalara benzer şekilde bizim yapmış olduğumuz çalışmada kontrol gruplarında YAP ve p-YAP ifadelenmesi özellikle Sertoli hücrelerinde ve matürasyonunu tamamlamak üzere olan uzamış spermatidlerde belirgin bir biçimde immünohistokimyasal olarak izlenmiştir. YAP ifadelenmesi ayrıca primer spermatositlerin sitoplazmalarında da gözlemlenmiştir. Yapmış olduğumuz çalışma matürasyon sürecinde seminifer tübülüsde farklı hücre gruplarında Hippo sinyal yolağının etkin bir biçimde çalışabileceğini göstermektedir.

Hippo sinyal yolu testiste Primordiyal germ hücresi (PGC) gelişiminde yer almaktadır (Ruthig ve ark., 2019). Puberteyle birlikte LH sekresyonunun düzenlenmesinde de etkin olduğu ortaya konulmuştur (Lalonde-Larue ve ark., 2022). Chi ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, Sertoli hücre proliferasyonunu ve hücre bağlantı birimleriyle de ilişkisi olabileceği düşünülmektedir (Chi vd.,2021).

Özellikle Hippo sinyal yolağı ve aktin hücre iskeleti üzerine yapılan çalışmalar oldukça önemli olup birbirleriyle ilişkilerini göstermektedir. Özellikle testis seminifer

tübülüs yapısı düşünüldüğünde benzersiz bir aktin hücre isketi bulunmaktadır (Mruk ve Cheng 2004, Mruk ve Cheng 2004, Wolski vd., 2006, Yan vd., 2007, Cheng ve Mruk 2011, Bu vd., 2022).

Bu çalışmaları da göz önüne alarak yaptığımız bu çalışmamızda literatürde seminifer tübülüsde bağlantı birimlerinin üzerinde etkili olduğu belirlenmiş ve hormon yapısını bozmayan bir madde olan adjudin'in uygulandığı deney düzeneğimizde Hippo sinyal yolağının etkinliğinin incelenmesi hedeflenmiştir.

Adjudin uygulanan sıçanlarda 11 saat içinde apikal ektoplazma özelleşmelerinde önemli bir EPS8 kaybı saptanmış ve 24 saat sonra apikal bölgede neredeyse hiç immünoreaktif EPS8 bulunamamıştır (Lie vd., 2009).

Adjudin uygulanan sıçan modelinde 0. Saatte normal seminifer tübülüs yapısı izlendiği fakat 6.-12. Saatler arasında EPS8, Arp3'ün immünfloresan boyamalarda giderek dağıldığı kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında belirlenmiştir. Aynı zamanda bu süreçte F-aktinin de dağılımının bozulması aktinin bu proteinlerle ilişkisi açısından hem de sperm salınımı durumu açısından oldukça önemlidir (Li vd., 2017).

Yapmış olduğumuz bu çalışmada literatürdeki çalışmalara benzer şekilde adjudin verilen gruplarda 0. Saatin kontrol ve metilselüloz verilen gruplara benzer özellikler gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle F-aktin ve aktin ilişkili proteinlerden Arp3 ve EPS8'in immünfloresan yöntemle 6. Saat itibariyle kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında normal dağılımının giderek bozulduğu izlenmiştir. Özellikle adjudin verilen grupların 96.saatinde seminifer tübülüs yapısında hasarlar dikkat çekmektedir ve çeşitli germ hücrelerinin lümene salınımı belirgindir. Yine bu saatte F-aktin, Arp3 ve EPS8 dağılımının en belirgin şekilde bozulduğu dikkat çekmekte ve literatüre benzer bir özellik göstermektedir. Yapmış olduğumuz çalışmada bu proteinlerle YAP ve p-YAP'ın özellikle 96.saatte belirgin düşüşü Hippo sinyal yolağı

ve seminifer tübülüslerdeki aktin ilişkili proteinlerin birlikte çalışabileceğini düşündürmektedir.

Mikroplastiklere maruz kalan farelerde testis yapısında bozulmalar izlenmiş ve Western blot analizlerinde Hippo sinyal yolağı aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir (Zhao vd., 2023).

Adjudinle oluşturmuş olduğumuz in vivo deney modelinde özellikle morfolojik olarak 6. Saatte seminifer tübülüs epitelinin bozulmaya başladığı ve 96.saatte bu epitelin literatürdekine benzer bir biçimde hasarlandığı belirgindir. Özellikle 96.saatte YAP ve p-YAP'ın immünohistokimyasal ve immünfloresans boyamalarında belirgin bir azalış izlenmiştir. Aynı zamanda yapmış olduğumuz Western blot analizi ve Q-RT PCR analizlerimiz de bu azalışa eşlenik bir yapı sergilemiştir. PCR analizlerinde 24. Saatte de YAP ifadelenmesinin azalışı dikkat çekmiştir.

Western blot analizlerimizde Arp3 ve EPS8'de gruplar arasında herhangi bir fark izlenmemiştir fakat immünfloresan boyamalarda özellikle deney grubunda bu proteinlerin dağılımlarının değiştiği belirlenmiştir.

Arp3, hücrelerde dallanmış bir aktin ağı oluşturan ana güç merkezlerinden biri olan Arp 2/3 kompleksinin bir bileşenidir (dos Remedios vd., 2003, Insall ve Machesky 2009, Campellone ve Welch 2010). EPS8, çok işlevli bir aktin düzenleyici proteindir (Di Fiore ve Scita 2002, Ahmed vd., 2010, Lie vd., 2010).

Adjudin uygulanan deney hayvanlarında ektoplazma özelleşmelerinin kaybolduğu ve EPS8 sinyalinin azaldığı dönemde aktin dallanma proteini olan Arp3'ün bir süre aktin dallanma aktivasyonu gerçekleştirdiği sonrasında EPS8 gibi sinyalinin silindiği belirlenmiştir (Cheng ve Mruk 2011, Li vd., 2017, Bu vd., 2022).

Çelışmamızda PCR analizlerine bakıldığında 12. Saatte deney gruplarında Arp3 seviyesinin en yüksek seviyede olması bu çalışmalara paralel özellik göstermektedir. EPS8'in 96. Saatte gen analizi açısından deney gruplarında azalışı Hippo sinyal yolağı açısından önemli bir bakış açısı getirebilir. Sperm salınımı açısından deney gruplarında YAP ve p-YAP seviyesinin immünohistokimyasal, immünfloresan, Western blot ve PCR analizlerindeki düşüşü belirgindir. EPS8'in bu azalışa benzer özellik göstermesi bu süreçte bu protein üzerinden Hippo sinyal yolağının etkinliğini sağlayabileceğini düşündürmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Erkek üreme hücrelerinin üretim ve salınımı süreci altında yatan mekanizmalar halen tam anlamıyla aydınlatılamamıştır. Literatürde aktin ilişkili proteinler, hücre iskeleti ve bağlantı birimlerindeki proteinlerle birlikte; hücrelerin proliferasyon, farklılaşma, programlı hücre ölümü gibi süreçlerinde Hippo sinyal yolağının etkin olarak çalıştığı belirlenmiştir. Ancak hem aktin ilişkili proteinlerin, hem hücre bağlantılarının hem de proliferasyon ve farklılaşma gibi süreçlerin oldukça fazla olduğu erkek genital sistemi üzerinde bu sinyal yolağıyla ilişkili çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Oysaki testis, hücre bölünmelerinin ve farklılaşmalarının yoğun olduğu, aynı zamanda hücre bağlantı birimlerinin oldukça etkin görev aldığı bir organdır.

Bu çalışmayla Hippo sinyal yolağının spermatogenezis sürecindeki varlığı ve etkinliğini belirlemeye çalıştık. Deney gruplarında adjudin uygulaması ile yapmış olduğumuz model literatürdeki çalışmalara uygun sonuçlar vermiştir ve başarıyla tamamlanmıştır. Kontrol ve Metiselüloz verilen gruplar birbiriyle benzer özellikler göstermiştir. YAP ve p-YAP immünohistokimyasal ifadelenmesi özellikle Sertoli ve uzamış spermatid hücrelerinde belirgindir. Sperm salınımı sırasında aktin ilişkili proteinlerin Sertoli ve spermatidler arasında yoğun etkileşimi olduğu düşünüldüğünde bu süreçte Hippo sinyal yolağının da etkin olabileceği akla gelmektedir. Adjudin verilen grupların 0. saatleri, kontrol ve metilsülüloz verilen gruplara benzer özellikler göstermektedir. 6.saat itibariyle F-aktin, Arp3 ve EPS8 sinyallerinin immünfloresan boyalamalarda giderek dağılmaya başladığı ve 12., 24. ve 96. saatlerde kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında bozulan bu dağılımın giderek arttığı belirlenmiştir. Özellikle deney gruplarında 96. saat seminifer tübülüs morfolojisinin bozulduğu en bariz gruptur. Bu saat aralığında kontrol, metilselüloz ve Adjudin grupları karşılaştırıldığında YAP ve p-YAP ifadelenmesinin hem immünohistokimyasal hem immünfloresan hem de Western blot analizlerinde düşüşü oldukça belirgindir. Bu bulgulara paralel olarak gen analizinde de deney gruplarında YAP'ın 24. saat ve 96. saatlerde ifadelenmesinin azaldığı belirlenmiştir. Aktin ilişkili bir protein olan EPS8'in gen analizinin de 96. saatte belirgin düşüşü Hippo sinyal yolağıyla ilişkisinin

olabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmanın sonucunda Sertoli hücrelerinde belirgin olarak bulunan YAP ve p-YAP sinyaliyle çeşitli aşamalarda bulunan germ hücrelerinin etkileşiminin olabilebileceği, özellikle apikal ektoplazma özelleşmelerinde etkin rol alabileceği ve sperm salınımı sırasında işlevlerinin varlığı düşünülmektedir. Aktin ilişkili proteinlerle Hippo sinyal yolağına ait YAP ve p-YAP'ın seminifer tübülüsde benzer yerlerdeki ifadelenmesi birbirleriyle etkileşimlerinin olabileceğini düşündürmektedir. Gelecekte yapılacak çalışmalarda Hippo sinyal yolağının erkek üreme organları üzerindeki önemi daha detaylı belirlenmesi hedeflerimiz arasındadır. Özellikle spermatogenez sürecindeki etkinliği ileride yapılacak çalışmalarda detaylandırılacaktır. Aynı zamanda Hippo sinyal yolağının erkek üreme organları üzerindeki etkisini detaylı bir biçimde belirleyerek infertilite gibi global sorunlara moleküler seviyede çözüm sunulmasında katkı sağlanması hedeflenmektedir.

KAYNAKLAR

Acien, P. (1992). Embryological observations on the female genital tract. Hum Reprod, 7(4), 437-445. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137666

Ahmed, S., Goh, W. I., & Bu, W. (2010). I-BAR domains, IRSp53 and filopodium formation. Semin Cell Dev Biol, 21(4), 350-356. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.11.008

Albrecht, K. H., & Eicher, E. M. (2001). Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. Dev Biol, 240(1), 92-107. https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0438

Assemat, E., Bazellieres, E., Pallesi-Pocachard, E., Le Bivic, A., & Massey-Harroche, D. (2008). Polarity complex proteins. Biochim Biophys Acta, 1778(3), 614-630. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.08.029

Avellar, M. C. W., Ribeiro, C. M., Dias-da-Silva, M. R., & Silva, E. J. R. (2019). In search of new paradigms for epididymal health and disease: innate immunity, inflammatory mediators, and steroid hormones. Andrology, 7(5), 690-702. https://doi.org/10.1111/andr.12654

Avruch, J., Zhou, D., & Bardeesy, N. (2012). YAP oncogene overexpression supercharges colon cancer proliferation. Cell Cycle, 11(6), 1090-1096. https://doi.org/10.4161/cc.11.6.19453

Bu, T., Wang, L., Wu, X., Li, L., Mao, B., Wong, C. K. C., Cheng, C. Y. (2022). A laminin-based local regulatory network in the testis that supports spermatogenesis. Semin Cell Dev Biol, 121, 40-52. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.03.025

Cai, J., Song, X., Wang, W., Watnick, T., Pei, Y., Qian, F., & Pan, D. (2018). A RhoA-YAP-c-Myc signaling axis promotes the development of polycystic kidney disease. Genes Dev, 32(11-12), 781-793. https://doi.org/10.1101/gad.315127.118

Cameron, D. F., & Muffly, K. E. (1991). Hormonal regulation of spermatid binding. J Cell Sci, 100 (Pt 3), 623-633. https://doi.org/10.1242/jcs.100.3.623

Campellone, K. G., & Welch, M. D. (2010). A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. Nat Rev Mol Cell Biol, 11(4), 237-251. https://doi.org/10.1038/nrm2867

Chen, C., Ouyang, W., Grigura, V., Zhou, Q., Carnes, K., Lim, H., Murphy, K. M. (2005). ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. Nature, 436(7053), 1030-1034. https://doi.org/10.1038/nature03894

Chen, S. N., Gurha, P., Lombardi, R., Ruggiero, A., Willerson, J. T., & Marian, A. J. (2014). The hippo pathway is activated and is a causal mechanism for adipogenesis in arrhythmogenic cardiomyopathy. Circ Res, 114(3), 454-468. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302810

Cheng, C. Y., Mruk, D., Silvestrini, B., Bonanomi, M., Wong, C. H., Siu, M. K., Mo, M. Y. (2005). AF-2364 [1-(2,4-dichlorobenzyl)-1H-indazole-3-carbohydrazide] is a potential male contraceptive: a review of recent data. Contraception, 72(4), 251-261. https://doi.org/10.1016/j.contraception.2005.03.008

Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2009). An intracellular trafficking pathway in the seminiferous epithelium regulating spermatogenesis: a biochemical and molecular perspective. Crit Rev Biochem Mol Biol, 44(5), 245-263. https://doi.org/10.1080/10409230903061207

Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2010). A local autocrine axis in the testes that regulates spermatogenesis. Nat Rev Endocrinol, 6(7), 380-395. https://doi.org/10.1038/nrendo.2010.71

Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2011). Regulation of spermiogenesis, spermiation and blood-testis barrier dynamics: novel insights from studies on Eps8 and Arp3. Biochem J, 435(3), 553-562. https://doi.org/10.1042/BJ20102121

Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2012). The blood-testis barrier and its implications for male contraception. Pharmacol Rev, 64(1), 16-64. https://doi.org/10.1124/pr.110.002790

Cheng, C. Y., Silvestrini, B., Grima, J., Mo, M. Y., Zhu, L. J., Johansson, E., Mruk, D. (2001). Two new male contraceptives exert their effects by depleting germ cells prematurely from the testis. Biol Reprod, 65(2), 449-461. https://doi.org/10.1095/biolreprod65.2.449

Cherrett, C., Furutani-Seiki, M., & Bagby, S. (2012). The Hippo pathway: key interaction and catalytic domains in organ growth control, stem cell self-renewal and tissue regeneration. Essays Biochem, 53, 111-127. https://doi.org/10.1042/bse0530111

Clermont, Y., & Perey, B. (1957). Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. Am J Anat, 100(2), 241-267. https://doi.org/10.1002/aja.1001000205

Creasy, D. M. (1997). Evaluation of testicular toxicity in safety evaluation studies: the appropriate use of spermatogenic staging. Toxicol Pathol, 25(2), 119-131. https://doi.org/10.1177/019262339702500201

Di Fiore, P. P., & Scita, G. (2002). Eps8 in the midst of GTPases. Int J Biochem Cell Biol, 34(10), 1178-1183. https://doi.org/10.1016/s1357-2725(02)00064-x

Disanza, A., Carlier, M. F., Stradal, T. E., Didry, D., Frittoli, E., Confalonieri, S., Scita, G. (2004). Eps8 controls actin-based motility by capping the barbed ends of actin filaments. Nat Cell Biol, 6(12), 1180-1188. https://doi.org/10.1038/ncb1199

Disanza, A., Mantoani, S., Hertzog, M., Gerboth, S., Frittoli, E., Steffen, A., Scita, G. (2006). Regulation of cell shape by Cdc42 is mediated by the synergic actin-bundling activity of the Eps8-IRSp53 complex. Nat Cell Biol, 8(12), 1337-1347. https://doi.org/10.1038/ncb1502

dos Remedios, C. G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I. V., Tsubakihara, M., Berry, D. A., & Nosworthy, N. J. (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. Physiol Rev, 83(2), 433-473. https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2002

Dym, M., & Cavicchia, J. C. (1977). Further observations on the blood-testis barrier in monkeys. Biol Reprod, 17(3), 390-403. https://doi.org/10.1095/biolreprod17.3.390

Enders, G. C., & Millette, C. F. (1988). Pachytene spermatocyte and round spermatid binding to Sertoli cells in vitro. J Cell Sci, 90 (Pt 1), 105-114. https://doi.org/10.1242/jcs.90.1.105

Franca, L. R., Hess, R. A., Dufour, J. M., Hofmann, M. C., & Griswold, M. D. (2016). The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. Andrology, 4(2), 189-212. https://doi.org/10.1111/andr.12165

Frojdman, K., Harley, V. R., & Pelliniemi, L. J. (2000). Sox9 protein in rat sertoli cells is age and stage dependent. Histochem Cell Biol, 113(1), 31-36. https://doi.org/10.1007/s004180050004

Fulford, A., Tapon, N., & Ribeiro, P. S. (2018). Upstairs, downstairs: spatial regulation of Hippo signalling. Curr Opin Cell Biol, 51, 22-32. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.10.006

Golachowska, M. R., Hoekstra, D., & van, I. S. C. (2010). Recycling endosomes in apical plasma membrane domain formation and epithelial cell polarity. Trends Cell Biol, 20(10), 618-626. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.08.004

Gomez, M., Gomez, V., & Hergovich, A. (2014). The Hippo pathway in disease and therapy: cancer and beyond. Clin Transl Med, 3, 22. https://doi.org/10.1186/2001-1326-3-22

Gropp, A., & Ohno, S. (1966). The presence of a common embryonic blastema for ovarian and testicular parenchymal (follicular, interstitial and tubular) cells in cattle Bos taurus. Z Zellforsch Mikrosk Anat, 74(4), 505-528. https://doi.org/10.1007/BF00496841

Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munsterberg, A., Lovell-Badge, R. (1990). A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. Nature, 346(6281), 245-250. https://doi.org/10.1038/346245a0

Handel, M. A., & Schimenti, J. C. (2010). Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. Nat Rev Genet, 11(2), 124-136. https://doi.org/10.1038/nrg2723

Hertzog, M., Milanesi, F., Hazelwood, L., Disanza, A., Liu, H., Perlade, E., Scita, G. (2010). Molecular basis for the dual function of Eps8 on actin dynamics: bundling and capping. PLoS Biol, 8(6), e1000387. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000387

Hess, R. A. (1990). Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: light microscopic observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testes. Biol Reprod, 43(3), 525-542. https://doi.org/10.1095/biolreprod43.3.525

Hess, R. A., & Renato de Franca, L. (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. Adv Exp Med Biol, 636, 1-15. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4_1

Hoare, B. S., & Khan, Y. S. (2023). Anatomy, Abdomen and Pelvis: Female Internal Genitals. In StatPearls. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32119488

Iden, S., & Collard, J. G. (2008). Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. Nat Rev Mol Cell Biol, 9(11), 846-859. https://doi.org/10.1038/nrm2521

Insall, R. H., & Machesky, L. M. (2009). Actin dynamics at the leading edge: from simple machinery to complex networks. Dev Cell, 17(3), 310-322. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.08.012

Jeong, M. G., Song, H., Shin, J. H., Jeong, H., Kim, H. K., & Hwang, E. S. (2017). Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif is required to sustain testicular function on aging. Aging Cell, 16(5), 1035-1042. https://doi.org/10.1111/acel.12631

Kawamura, K., Cheng, Y., Suzuki, N., Deguchi, M., Sato, Y., Takae, S., Hsueh, A. J. (2013). Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. Proc Natl Acad Sci U S A, 110(43), 17474-17479. https://doi.org/10.1073/pnas.1312830110

Larney, C., Bailey, T. L., & Koopman, P. (2014). Switching on sex: transcriptional regulation of the testis-determining gene Sry. Development, 141(11), 2195-2205. https://doi.org/10.1242/dev.107052

Leblond, C. P., & Clermont, Y. (1952). Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. Ann N Y Acad Sci, 55(4), 548-573. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1952.tb26576.x

Lee, N. P., & Cheng, C. Y. (2005). Protein kinases and adherens junction dynamics in the seminiferous epithelium of the rat testis. J Cell Physiol, 202(2), 344-360. https://doi.org/10.1002/jcp.20119

Lee, N. P., Mruk, D., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2003). Is the cadherin/catenin complex a functional unit of cell-cell actin-based adherens junctions in the rat testis? Biol Reprod, 68(2), 489-508. https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.005793

Lee, N. P., Mruk, D. D., Conway, A. M., & Cheng, C. Y. (2004). Zyxin, axin, and Wiskott-Aldrich syndrome protein are adaptors that link the cadherin/catenin protein complex to the cytoskeleton at adherens junctions in the seminiferous epithelium of the rat testis. J Androl, 25(2), 200-215. https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02780.x

Lee, N. P., Mruk, D. D., Wong, C. H., & Cheng, C. Y. (2005). Regulation of Sertoli-germ cell adherens junction dynamics in the testis via the nitric oxide synthase (NOS)/cGMP/protein kinase G (PRKG)/beta-catenin (CATNB) signaling pathway: an in vitro and in vivo study. Biol Reprod, 73(3), 458-471. https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.040766

Levasseur, A., Paquet, M., Boerboom, D., & Boyer, A. (2017). Yes-associated protein and WW-containing transcription regulator 1 regulate the expression of sex-determining genes in Sertoli cells, but their inactivation does not cause sex reversal. Biol Reprod, 97(1), 162-175. https://doi.org/10.1093/biolre/iox057

Li, L., Tang, E. I., Chen, H., Lian, Q., Ge, R., Silvestrini, B., & Cheng, C. Y. (2017). Sperm Release at Spermiation Is Regulated by Changes in the Organization of Actin- and Microtubule-Based Cytoskeletons at the Apical Ectoplasmic Specialization-A Study Using the Adjudin Model. Endocrinology, 158(12), 4300-4316. https://doi.org/10.1210/en.2017-00660

Li, M. W., Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2014). Sertolin mediates blood-testis barrier restructuring. Endocrinology, 155(4), 1520-1531. https://doi.org/10.1210/en.2013-1850

Lie, P. P., Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2011). The biology of the desmosome-like junction a versatile anchoring junction and signal transducer in the seminiferous epithelium. Int Rev Cell Mol Biol, 286, 223-269. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385859-7.00005-7

Lie, P. P., Mruk, D. D., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2009). Epidermal growth factor receptor pathway substrate 8 (Eps8) is a novel regulator of cell adhesion and the blood-testis barrier integrity in the seminiferous epithelium. FASEB J, 23(8), 2555-2567. https://doi.org/10.1096/fj.06-070573

Lie, P. P., Mruk, D. D., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2010). Cytoskeletal dynamics and spermatogenesis. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 365(1546), 1581-1592. https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0261

Lobl, T. J. (1979). 1-(2,4-dichlorobenzyl)-1H-indazole-3-carboxylic acid (DICA), an exfoliative antispermatogenic agent in the rat. Arch Androl, 2(4), 353-363. https://doi.org/10.3109/01485017908987337

Lobl, T. J., Bardin, C. W., Gunsalus, G. L., & Musto, N. A. (1981). Effects of Lonidamine (AF 1890) and its analogues on follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, testosterone and rat androgen binding protein concentrations in the rat and rhesus monkey. Chemotherapy, 27 Suppl 2, 61-76. https://doi.org/10.1159/000238046

Ma, S., Meng, Z., Chen, R., & Guan, K. L. (2019). The Hippo Pathway: Biology and Pathophysiology. Annu Rev Biochem, 88, 577-604. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111829

Mao, B., Li, L., Yan, M., Wong, C. K. C., Silvestrini, B., Li, C., Cheng, C. Y. (2019). F5-Peptide and mTORC1/rpS6 Effectively Enhance BTB Transport Function in the Testis-Lesson From the Adjudin Model. Endocrinology, 160(8), 1832-1853. https://doi.org/10.1210/en.2019-00308

McClusky, L. M., Patrick, S., Barnhoorn, I. E., van Dyk, J. C., de Jager, C., & Bornman, M. S. (2009). Immunohistochemical study of nuclear changes associated with male germ cell death and spermiogenesis. J Mol Histol, 40(4), 287-299. https://doi.org/10.1007/s10735-009-9240-3

Meroni, S. B., Galardo, M. N., Rindone, G., Gorga, A., Riera, M. F., & Cigorraga, S. B. (2019). Molecular Mechanisms and Signaling Pathways Involved in Sertoli Cell Proliferation. Front Endocrinol (Lausanne), 10, 224. https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00224

Miyoshi, J., & Takai, Y. (2005). Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity. Adv Drug Deliv Rev, 57(6), 815-855. https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.01.008

Mok, K. W., Mruk, D. D., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2012). Spermatogonial stem cells alone are not sufficient to re-initiate spermatogenesis in the rat testis following adjudin-induced infertility. Int J Androl, 35(1), 86-101. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2011.01183.x

Mori, M., Triboulet, R., Mohseni, M., Schlegelmilch, K., Shrestha, K., Camargo, F. D., & Gregory, R. I. (2014). Hippo signaling regulates microprocessor and links cell-density-dependent miRNA biogenesis to cancer. Cell, 156(5), 893-906. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.043

Mruk, D., Zhu, L. J., Silvestrini, B., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (1997). Interactions of proteases and protease inhibitors in Sertoli-germ cell cocultures preceding the formation of specialized Sertoli-germ cell junctions in vitro. J Androl, 18(6), 612-622. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9432134

Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. (2004a). Cell-cell interactions at the ectoplasmic specialization in the testis. Trends Endocrinol Metab, 15(9), 439-447. https://doi.org/10.1016/j.tem.2004.09.009

Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. (2004b). Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. Endocr Rev, 25(5), 747-806. https://doi.org/10.1210/er.2003-0022

Mruk, D. D., Siu, M. K., Conway, A. M., Lee, N. P., Lau, A. S., & Cheng, C. Y. (2003). Role of tissue inhibitor of metalloproteases-1 in junction dynamics in the testis. J Androl, 24(4), 510-523. https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02703.x

Ni, F. D., Hao, S. L., & Yang, W. X. (2019). Multiple signaling pathways in Sertoli cells: recent findings in spermatogenesis. Cell Death Dis, 10(8), 541. https://doi.org/10.1038/s41419-019-1782-z

O'Donnell, L., Nicholls, P. K., O'Bryan, M. K., McLachlan, R. I., & Stanton, P. G. (2011). Spermiation: The process of sperm release. Spermatogenesis, 1(1), 14-35. https://doi.org/10.4161/spmg.1.1.14525

Oatley, J. M., & Brinster, R. L. (2008). Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. Annu Rev Cell Dev Biol, 24, 263-286. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175355

Oatley, J. M., & Brinster, R. L. (2012). The germline stem cell niche unit in mammalian testes. Physiol Rev, 92(2), 577-595. https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2011

Orth, J. M., & Boehm, R. (1990). Functional coupling of neonatal rat Sertoli cells and gonocytes in coculture. Endocrinology, 127(6), 2812-2820. https://doi.org/10.1210/endo-127-6-2812

Pawlina W, (2016). *Histology: A text and Atlas*: With Correlated Cell and Molecular Biology (7 th ED.). Philadelphia: Wolters Kluwer .P.:790-808

Piccolo, S., Dupont, S., & Cordenonsi, M. (2014). The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. Physiol Rev, 94(4), 1287-1312. https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2014

Reddy, P., Deguchi, M., Cheng, Y., & Hsueh, A. J. (2013). Actin cytoskeleton regulates Hippo signaling. PLoS One, 8(9), e73763. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073763

Reggiani, F., Gobbi, G., Ciarrocchi, A., Ambrosetti, D. C., & Sancisi, V. (2020). Multiple roles and context-specific mechanisms underlying YAP and TAZ-mediated resistance to anti-cancer therapy. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 1873(1), 188341. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188341

Russell, L., & Clermont, Y. (1976). Anchoring device between Sertoli cells and late spermatids in rat seminiferous tubules. Anat Rec, 185(3), 259-278. https://doi.org/10.1002/ar.1091850302

Russell, L. D. (1979). Further observations on tubulobulbar complexes formed by late spermatids and Sertoli cells in the rat testis. Anat Rec, 194(2), 213-232. https://doi.org/10.1002/ar.1091940204

Russell, L. D., & Peterson, R. N. (1985). Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates. Int Rev Cytol, 94, 177-211. https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)60397-6

Sadler TW, (2019). Langman's Medical Embryology (14th ED.). Philadelphia: Wolters Kluwer. P: 267-272

Sar, M., Lubahn, D. B., French, F. S., & Wilson, E. M. (1990). Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues. Endocrinology, 127(6), 3180-3186. https://doi.org/10.1210/endo-127-6-3180

Schulze, C., Holstein, A. F., Schirren, C., & Korner, F. (1976). On the morphology of the human Sertoli cells under normal conditions and in patients with impaired fertility. Andrologia, 8(2), 167-178. https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1976.tb02128.x

Sen Sharma, S., & Majumdar, S. S. (2017). Transcriptional co-activator YAP regulates cAMP signaling in Sertoli cells. Mol Cell Endocrinol, 450, 64-73. https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.04.017

Sharpe, R. M., McKinnell, C., Kivlin, C., & Fisher, J. S. (2003). Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. Reproduction, 125(6), 769-784. https://doi.org/10.1530/rep.0.1250769

Silvestrini, B., Palazzo, G., & De Gregorio, M. (1984). Lonidamine and related compounds. Prog Med Chem, 21, 110-135. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6400133

Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., Goodfellow, P. N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. Nature, 346(6281), 240-244. https://doi.org/10.1038/346240a0

Siu, M. K., Mruk, D. D., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2003). Adhering junction dynamics in the testis are regulated by an interplay of beta 1-integrin and focal adhesion complex-associated proteins. Endocrinology, 144(5), 2141-2163. https://doi.org/10.1210/en.2002-221035

Siu, M. K., Wong, C. H., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2005). Sertoli-germ cell anchoring junction dynamics in the testis are regulated by an interplay of lipid and protein kinases. J Biol Chem, 280(26), 25029-25047. https://doi.org/10.1074/jbc.M501049200

Siu, M. K., Wong, C. H., Xia, W., Mruk, D. D., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2011). The beta1-integrin-p-FAK-p130Cas-DOCK180-RhoA-vinculin is a novel regulatory protein complex at the apical ectoplasmic specialization in adult rat testes. Spermatogenesis, 1(1), 73-86. https://doi.org/10.4161/spmg.1.1.15452

Toyama, Y., Maekawa, M., & Yuasa, S. (2003). Ectoplasmic specializations in the Sertoli cell: new vistas based on genetic defects and testicular toxicology. Anat Sci Int, 78(1), 1-16. https://doi.org/10.1046/j.0022-7722.2003.00034.x

Varelas, X. (2014). The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. Development, 141(8), 1614-1626. https://doi.org/10.1242/dev.102376

Vogl, A. W., Vaid, K. S., & Guttman, J. A. (2008). The Sertoli cell cytoskeleton. Adv Exp Med Biol, 636, 186-211. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4_11

Wang, X. N., Li, Z. S., Ren, Y., Jiang, T., Wang, Y. Q., Chen, M., Gao, F. (2013). The Wilms tumor gene, Wt1, is critical for mouse spermatogenesis via regulation of sertoli cell polarity and is associated with non-obstructive azoospermia in humans. PLoS Genet, 9(8), e1003645. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003645

Wang, Y., Hu, G., Liu, F., Wang, X., Wu, M., Schwarz, J. J., & Zhou, J. (2014). Deletion of yes-associated protein (YAP) specifically in cardiac and vascular smooth muscle cells reveals a crucial role for YAP in mouse cardiovascular development. Circ Res, 114(6), 957-965. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.303411

Warr, N., & Greenfield, A. (2012). The molecular and cellular basis of gonadal sex reversal in mice and humans. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 1(4), 559-577. https://doi.org/10.1002/wdev.42

Wen, Q., Tang, E. I., Li, N., Mruk, D. D., Lee, W. M., Silvestrini, B., & Cheng, C. Y. (2018). Regulation of Blood-Testis Barrier (BTB) Dynamics, Role of Actin-, and Microtubule-Based Cytoskeletons. Methods Mol Biol, 1748, 229-243. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7698-0_16

Wolgemuth, D. J., & Roberts, S. S. (2010). Regulating mitosis and meiosis in the male germ line: critical functions for cyclins. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 365(1546), 1653-1662. https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0254

Wolski, K. M., Mruk, D. D., & Cameron, D. F. (2006). The Sertoli-spermatid junctional complex adhesion strength is affected in vitro by adjudin. J Androl, 27(6), 790-794. https://doi.org/10.2164/jandrol.106.000422

Wong, E. W., & Cheng, C. Y. (2009). Polarity proteins and cell-cell interactions in the testis. Int Rev Cell Mol Biol, 278, 309-353. https://doi.org/10.1016/S1937-6448(09)78007-4

Wong, E. W., Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. (2008). Biology and regulation of ectoplasmic specialization, an atypical adherens junction type, in the testis. Biochim Biophys Acta, 1778(3), 692-708. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.11.006

Wong, E. W., Mruk, D. D., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2008). Par3/Par6 polarity complex coordinates apical ectoplasmic specialization and blood-testis barrier restructuring during spermatogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A, 105(28), 9657-9662. https://doi.org/10.1073/pnas.0801527105

Wong, E. W., Sun, S., Li, M. W., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2009). 14-3-3 Protein regulates cell adhesion in the seminiferous epithelium of rat testes. Endocrinology, 150(10), 4713-4723. https://doi.org/10.1210/en.2009-0427

Yan, H. H., Mruk, D. D., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2007). Ectoplasmic specialization: a friend or a foe of spermatogenesis? Bioessays, 29(1), 36-48. https://doi.org/10.1002/bies.20513

Yang, Y., Workman, S., & Wilson, M. (2018). The molecular pathways underlying early gonadal development. J Mol Endocrinol. https://doi.org/10.1530/JME-17-0314

Young, J. S., Guttman, J. A., Vaid, K. S., & Vogl, A. W. (2009). Tubulobulbar complexes are intercellular podosome-like structures that internalize intact intercellular junctions during epithelial remodeling events in the rat testis. Biol Reprod, 80(1), 162-174. https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.070623

Zhang, G. M., Zhang, T. T., An, S. Y., El-Samahy, M. A., Yang, H., Wan, Y. J., Lei, Z. H. (2018). Expression of Hippo signaling pathway components in Hu sheep male reproductive tract and spermatozoa. Theriogenology, 126, 239-248. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.12.029

Zhao, T., Shen, L., Ye, X., Bai, G., Liao, C., Chen, Z., An, G. (2023). Prenatal and postnatal exposure to polystyrene microplastics induces testis developmental disorder and affects male fertility in mice. J Hazard Mater, 445, 130544. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130544

Zirkin, B. R., & Papadopoulos, V. (2018). Leydig cells: formation, function, and regulation. Biol Reprod, 99(1), 101-111. https://doi.org/10.1093/biolre/ioy059

EKLER

Ek 1. Etik Kurul Kararı

T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 11/12/2019
TOPLANTI NO : 2019-22
DOSYA NO : 2019-139
KARAR NO : 2019-22-188

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Esra ERDEMLİ'nin yaptığı; araştırıcı olarak Arş. Gör. İrem İNANÇ'ın katıldığı "Hippo Sinyal Yolağının Spermatogenezis Sürecindeki Varlığının Belirlenmesi" başlıklı çalışma Kurulumuzca değerlendirilmiş ve söz konusu çalışmanın Üniversite senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi" ne göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Sıçan
Hayvan Sayısı : 30
Geçerlilik Süresi : 01/09/2020-01/09/2021

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof. Dr. Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr. Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof. Dr. Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof. Dr. Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü	Ziraat Fakültesi	K	
Doç. Dr. Gülnur GÖLLÜ BAHADIR (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	

Doç. Dr. Halit KANCA (Üye)	Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Dr. Vet. Hek. Nigar YERLİKAYA (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	K	
Dr. Vet. Hek. Gürbüz ERTÜRK (Üye)	Active Veteriner Sağlık Merkezi	Serbest	E	
Uzm. Vet. Hek. Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	
Uzm. Vet. Hek. Attila İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Fatma Aysun COŞKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K	

ÖZGEÇMİŞ