



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SALUBRİNALİN İN VİTRO ISI STRESİ OLUŞTURULMUŞ
SPERMATOGENİK HÜCRELERDE ER STRES YOLAĞI
ÜZERİNE ETKİSİ**

HAZIRLAYAN: SUNA KARADENİZ SAYGILI
DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
PROF. DR. MAHMUT KEMAL ÖZBİLGİN

MANİSA-2020



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SALUBRİNALİN İN VİTRO ISI STRESİ OLUŞTURULMUŞ
SPERMATOGENİK HÜCRELERDE ER STRES YOLAĞI
ÜZERİNE ETKİSİ**

HAZIRLAYAN: SUNA KARADENİZ SAYGILI

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
PROF. DR. MAHMUT KEMAL ÖZBİLGİN

TEZ SAVUNMA SINAVI JÜRİ ÜYELERİ

PROF. DR. ERCÜMENT ÖLMEZ

PROF. DR. BEKİR UĞUR ERGÜR

DOÇ. DR. SERAP CİLAKER MICILI

DOÇ. DR. ELGİN TÜRKÖZ ULUER

MANİSA-2020

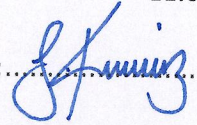
T.C
YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
ULUSAL TEZ MERKEZİ

TEZ VERİ GİRİŞ FORMU

Referans No	10318963
Yazar Adı / Soyadı	SUNA KARADENİZ SAYGILI
T.C.Kimlik No	10185137804
Telefon	5536082149
E-Posta	sunsa_saygili@hotmail.com
Tezin Dili	Türkçe
Tezin Özgün Adı	Salubrinalin İn Vitro Isı Stresi Oluşturulmuş Spermatogenik Hücrelerde ER Stres Yolağı Üzerine Etkisi
Tezin Tercümesi	The Effect of Salubrinal On ER Stress Pathway in Heat-Stressed Spermatogonial Cells in Vitro
Konu	Histoloji ve Embriyoloji = Histology and Embryology
Üniversite	Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Enstitü / Hastane	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Bilim Dalı	Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı
Tez Türü	Doktora
Yılı	2020
Sayfa	122
Tez Danışmanları	PROF. DR. MAHMUT KEMAL ÖZBİLGİN
Dizin Terimleri	
Önerilen Dizin Terimleri	Spermatogenez, GC1, GC2, Salubrinal, hücre kültürü, endoplazmik retikulum, Isı Stresi.

11.01.2020

İmza:.....



**SALUBRİNALİN İN VİTRO ISI STRESİ OLUŞTURULMUŞ
SPERMATOGENİK HÜCRELERDE ER STRES YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİ**

Öğrenci: Suna KARADENİZ SAYGILI

Danışman: Prof. Dr. M. Kemal ÖZBİLGİN

Bu tez çalışması 08.01.2020 tarihinde jürimiz tarafından “Histoloji ve Embriyoloji AD. Doktora Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. M. Kemal ÖZBİLGİN
MCBÜ Tıp Fakültesi

Üye:

Prof. Dr. Bekir Uğur ERGÜR
DEÜ Tıp Fakültesi

Üye:

Prof. Dr. Ercüment ÖLMEZ
MCBÜ Tıp Fakültesi

Üye:

Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER
MCBÜ Tıp Fakültesi

Üye:

Doç. Dr. Serap CİLAKE MICİLİ
DEÜ Tıp Fakültesi

Bu tez, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından başarılı bulunmuştur. / /

Prof. Dr. Ömer TETİK
Enstitü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilemeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışım olmadığını beyan ederim.

Suna KARADENİZ SAYGILI



İTHAF

Tezimi merhum babam Hacı Bayram KARADENİZ'e ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Tezimin gerçekleşmesinde bana her zaman yol gösteren, göstermiş olduğu özveri ve katkıların ötesinde, eğitimim boyunca manevi ve bilimsel desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. M. Kemal ÖZBİLGİN' e,

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini aktaran ve her konuda yardımcı olan Prof. Dr. Seda VATANSEVER, Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU, Prof. Dr. Sevinç İNAN, ve Doç.Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER hocalarıma,

Akademik hayatımı güzelleştiren, desteklerini her zaman hissettiren Doç. Dr. Orhan ÖZATİK ve Dr. Öğr. Üyesi Ahmet KOÇAK hocalarıma,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Mustafa ÖZTATLICI ve diğer lisansüstü öğrenci arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca her koşulda yanımda olan, hayırlı dileklerini biran olsun eksiltmeyen canım AİLEM'e

Akademisyenlik yolunda emin adımlarla yürümemde en büyük pay sahibi olan, bir an olsun elimi bırakmayan, varlığından her zaman güç bulduğum, desteğini her zaman yanımda hissettiğim biricik eşim Dr. Gökhan SAYGILI'ya

Yaşama sevincim, yürek sızım, canım oğlum İsmail Orhan SAYGILI'ya çok teşekkür ederim.

Siz olmasaydınız bu tez hiçbir zaman olmayacaktı. İyi ki varsınız...

Suna KARADENİZ SAYGILI

KISALTMALAR ve SİMGELER

UPR:	Yanlış Katlanmış Protein Cevabı
IRE1α:	inositol-requiring kinase 1 alfa
PERK:	protein kinase-like ER kinase
ATF6:	activating transcription factor 6
GRP78:	G-Related Protein
ERAD:	ER ile ilişkilendirilmiş degradasyon
bZIP:	temel lösin fermuar proteini
RNase:	endoribonükleaz
eIF2α:	eukaryotic Translational İnitiation Factor 2 subunit 1
SAL:	Salubrinal
PP1:	Protein fosfataz 1
SCF:	Stem Cell Factor
PGH:	Primordial Germ Hücreleri
SKH:	Spermatogonyal Kök Hücre
pSV3-neo:	SV40 büyük T antijeni ve neomisin direnci için kodlama dizileri içeren bir plazmid
ATCC:	American Type Culture Collection
HSP70:	Heat shock Protein
GTP:	Guanozin Trifosfat
ATF4:	Transkripsiyon faktör 4
GADD34:	Growth arrest and DNA damage-inducible protein
FBS:	Fetal Bovine Serum
PBS:	Phosphate-Buffered Saline
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO:	Dimetil Sülfooksit
MTT:	3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)
cDNA:	Komplementer DNA

BMP4:	Bone morphogenetic protein 4
BMP8b:	Bone morphogenetic protein 8b
CTCF:	Corrected Total Cell Fluorescence



İÇİNDEKİLER

BEYAN	i
İTHAF	ii
TEŞEKKÜR	iii
KISALTMA VE SİMGELER	iv
İÇİNDEKİLER	v
RESİM DİZİNİ	vii
ŞEKİL DİZİNİ	viii
TABLO DİZİNİ	x
1.ÖZET	1
2.ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1 GAMETOGENEZ	6
4.1.1.Primordiyal Germ Hücreleri	7
4.2. SPERMATOGENEZ	8
4.2.1 Spermatogonyal Faz	9
4.2.2 Spermatosit Fazı	11
4.2.3. Spermiyogenez	12
4.2.4. Olgun Sperm Yapısı	14
4.3. GC1 HÜCRE HATTI	15
4.4. GC2 HÜCRE HATTI	15
4.5. SPERMATOGENEZ ÜZERİNE ISI HASARI ETKİSİ	15
4.5.1 HSP70	17
4.6. ENDOPLAZMİK RETİKULUM	18
4.7. ER STRESİ	19

4.7.1. GRP78	20
4.7.2. ATF6	21
4.7.3. IRE1 α	22
4.7.4. PERK	23
4.7.5. eIF2 α	24
4.8. SALUBRİNAL	25
5. GEREÇ ve YÖNTEM	26
5.1. KULLANILAN CİHAZLAR	26
5.2. KULLANILAN KİMYASAL VE SARF MALZEMELER	27
5.3. HÜCRE KÜLTÜRÜ	29
5.3.1. Kullanılan Hücre Hatları	29
5.3.2. Hücre Hattı Besiyeri İçeriği	29
5.3.3. Hücre İnkübasyon Koşulları	30
5.3.4. Hücre Hatlarının Pasajlanması	30
5.3.5. SAL Uygulama Konsantrasyonunun Hesaplanması	30
5.3.6. SAL'ın Toksikite Etkisinin Analizi	31
5.3.7. ISM Oluşturulması	31
5.3.8. Deney Gruplarının Dizaynı	32
5.3.9. Birim Alan Başına Düşen Hücre Sayısının Hesaplanması	33
5.4. İMMÜNFLORESAN İNCELEME	33
5.4.1. Hücrelerin Fiksasyonu	33
5.4.2. İmmünfloresan Boyama	33
5.4.3. İmmünfloresan Değerlendirme	34
5.5. qRT-PCR İNCELEME	34
5.5.1. Total RNA İzolasyonu	34
5.5.2. Rnaların Kalite Kontrolü	35
5.5.3. Komplementer DNA Sentezi	35
5.5.4. qRT-PCR	37
5.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	39
6. BULGULAR	40
6.1. MTT BULGULARI	40
6.1.1. GC1 Hücre Hattı SAL MTT Bulguları	40
6.1.2. GC2 Hücre Hattı SAL MTT Bulguları	40

6.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ SAL UYGULAMA BULGULARI	41
6.2.1. GC1 Hücre Hattı SAL Uygulama Bulguları	41
6.2.2. GC2 Hücre Hattı SAL Uygulama Bulguları	42
6.3. ISI STRESİ UYGULAMA BULGULARI	43
6.3.1. GC1 Isı Stresi Uygulama Bulguları	43
6.3.2. GC2 Isı Stresi Uygulama Bulguları	45
6.4. İMMÜNFLORESAN İNCELEME BULGULARI	47
6.4.1. Hsp70 Bulguları	47
6.4.2. GRP78 Bulguları	51
6.4.3. ATF6 Bulguları	55
6.4.4. p-IRE1 α Bulguları	59
6.4.5. p-PERK Bulguları	63
6.4.6. p-eIF2 α Bulguları	67
6.5. qRT-PCR bulguları	71
6.5.1. GRP78 Bulguları	71
6.5.2. PERK Bulguları	73
6.5.3. eIF2 α Bulguları	75
7.TARTIŞMA	78
8. SONUÇ ve ÖNERİLER	89
9. KAYNAKLAR	91
10. EKLER	103
11.ÖZGEÇMİŞ	105

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Gc1 Sal Uygulaması Hücre Kültürü Fotoğrafları.	42
Resim 2. Gc2 Sal Uygulaması Hücre Kültürü Fotoğrafları.	43
Resim 3. Gc1 Deney Grupları İnverted Mikroskop Görüntüleri.	44
Resim 4. Gc2 Deney Grupları İnverted Mikroskop Görüntüleri.	46
Resim 5. GC1 Hücre Hattı HSP70 İmmünfloresan Boyama Görüntüleri.	48
Resim 6. GC2 Hücre Hattı HSP70 İmmünfloresan Boyama Görüntüleri.	50
Resim 7. GC1 Hücre Hattı GRP78 İmmünfloresan Boyama Görüntüleri.	52
Resim 8. GC2 Hücre Hattı GRP78 İmmünfloresan Boyama Görüntüleri	54
Resim 9. GC1 Hücre Hattı ATF6 İmmünfloresan Boyama Görüntüleri.	56
Resim 10. GC2 Hücre Hattı ATF6 İmmünfloresan Boyama Görüntüleri	58
Resim 11. GC1 Hücre Hattı p-IRE1 α İmmünfloresan Boyama Görüntüleri	60
Resim 12. GC2 Hücre Hattı p-IRE1 α İmmünfloresan Boyama Görüntüleri	62
Resim 13. GC1 Hücre Hattı p-PERK İmmünfloresan Boyama Görüntüleri	64
Resim 14. GC2 Hücre Hattı p-PERK İmmünfloresan Boyama Görüntüleri.	66
Resim 15. GC1 Hücre Hattı p-eIF2 α İmmünfloresan Boyama Görüntüleri	68
Resim 16. GC2 Hücre Hattı p-eIF2 α İmmünfloresan Boyama Görüntüleri	70

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Gametogenez ve Zigot Oluşumu	6
Şekil 2. Farede Germ Hücre Soyu ve Oluşumu	8
Şekil 3. Spermatogonial Kök Hücrelerin Kendini Yenileme ve Farklılaşma Süreci	10
Şekil 4. Spermatogenez Mayoz Süreci.	12
Şekil 5. Spermiyogenez Süreci.	13
Şekil 6. Olgun Sperm Yapısı	14
Şekil 7. Testiküler Isı Hasarı Mekanizmaları	17
Şekil 8. Endoplazmik Retikulum	18
Şekil 9. ER Stres Mekanizması	20
Şekil 10. ER stresinde ATF6	21
Şekil 11. ER stresinde IRE1 α	22
Şekil 12. ER Stresinde PERK	24
Şekil 13. SAL Kimyasal Formülü	25
Şekil 14. GC1 SAL Uygulaması Konsantrasyon ve % İnhibisyon Grafiği	40
Şekil 15. GC2 SAL Uygulaması Konsantrasyon ve % İnhibisyon Grafiği.	41
Şekil 16. GC1 hücre hattı birim alan hücre sayısı grafiği	45
Şekil 17. GC2 hücre hattı birim alan hücre sayısı grafiği.	47
Şekil 18. GC1 Hücre hattı HSP70 İmmünfloresan Yoğunluk İstatistiksel Analiz Sonuçları	49
Şekil 19. GC2 Hücre hattı HSP70 İmmünfloresan Yoğunluk İstatistiksel Analiz Sonuçları.	51
Şekil 20. GC1 GRP78 İmmünfloresan Yoğunluk İstatistiksel Analiz Sonuçları.	53
Şekil 21. GC2 GRP78 İmmünfloresan Yoğunluk İstatistiksel Analiz Sonuçları	55
Şekil 22. GC1 ATF6 İmmünfloresan Yoğunluk İstatistiksel Analiz Sonuçları	57
Şekil 23. GC2 ATF6 İmmünfloresan Yoğunluk İstatistiksel Analiz Grafiği	59
Şekil 24. GC1 p-IRE1 α İmmünfloresan Yoğunluk İstatistiksel Analiz Sonuçları.	61

Şekil 25. GC2 Hücre hattı p-IRE1 α İmmünfloresan Yoğunluk İstatistiksel Analiz Sonuçları	63
Şekil 26. GC1 Hücre hattı p-PERK İmmünfloresan Yoğunluk İstatistiksel Analiz Sonuçları	65
Şekil 27. GC2 Hücre hattı p-PERK İmmünfloresan Yoğunluk İstatistiksel Analiz Sonuçları	67
Şekil 28. GC1 p-eIF2 α İmmünfloresan Yoğunluk İstatistiksel Analiz Sonuçları.	69
Şekil 29. GC2 p-eIF2 α İmmünfloresan Yoğunluk İstatistiksel Analiz Sonuçları.	71
Şekil 30. GC1 için GRP78 geni ifadesinin qRT-PCR sonuçlarının gruplara göre değişimi.	72
Şekil 31. GC2 için GRP78 geni ifadesinin q-RT PCR sonuçlarının gruplara göre değişimi.	73
Şekil 32. GC1 için PERK geni ifadesinin q-RT PCR sonuçlarının gruplara göre değişimi	74
Şekil 33. GC2 için PERK geni ifadesinin qRT-PCR sonuçlarının gruplara göre değişimi.	75
Şekil 34. GC1 için eIF2 α geni ifadesinin q-RT PCR sonuçlarının gruplara göre değişimi.	76
Şekil 35. GC2 için eIF2 α geni ifadesinin q-RT PCR sonuçlarının gruplara göre değişimi	78

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Çalışmada kullanılan cihazlar.	26
Tablo 2. Çalışmada kullanılan malzemeler	27
Tablo 3. Deney Grupları Kısaltmaları	32
Tablo 4. Komplementer DNA sentezi için gerekli madde ve miktar listesi.	36
Tablo 5. cDNA sentez aşamaları.	36
Tablo 6. Kullanılan mRNA primer dizileri.	37
Tablo 7. qRT-PCR kullanılan bileşen madde ve miktarları.	38
Tablo 8. qRT-PCR aşamaları	38

Tezin Başlığı: Salubrinalin İn Vitro Isı Stresi Oluşturulmuş Spermatogenik Hücrelerde ER Stres Yolağı Üzerine Etkisi

Öğrencinin Adı: Suna KARADENİZ SAYGILI

Danışmanı: Prof. Dr. M. Kemal ÖZBİLGİN

Anabilim Dalı: Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı

1. ÖZET

Amaç: Deneysel olarak in vitro ısı stresi modeli (ISM) oluşturulmuş Spermatogenik hücrelerde Salubrinalin (SAL) endoplazmik retikulum (ER) stresi üzerinde etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada fare spermatogonyum (GC1) ve fare spermatosit (GC2) hücre hatları kullanıldı. SAL'ın IC50 dozu MTT yöntemi ile hesaplandı. Her bir hücre kontrol grubu (GC1-K, GC2-K), SAL grubu (GC1-SAL, GC2-SAL), ISM grubu (GC1-ISM, GC2-ISM) ve hem ISM hem SAL grubu (GC1-ISMSAL, GC2-ISMSAL) olmak üzere 4 alt gruba ayrıldı. Kontrol grubu hücreler standart kültür koşullarında inkübe edildi. ISM oluşturulan gruplar 43⁰C sıcaklıkta 60 dk. inkübe edildi. SAL uygulaması yapılan gruplarda 20 µM SAL içeren besiyerinde 24 saat inkübasyon gerçekleştirildi. Deney sonrasında tüm gruplarda p-PERK, ATF6, GRP78, p-IRE1α, p-eIF2α, HSP70 belirteçleri ile immünfloresan boyama analizi yapıldı. Ayrıca tüm deney gruplarında GRP78, PERK ve eIF2α mRNA seviyeleri qRT-PCR yöntemi ile ölçüldü.

Bulgular: ISM modelinin hücreler üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu görüldü. ISM oluşturulmuş gruplarda tüm belirteçlerin immünoreaktivitelerinin artmış olduğu, bu hücrelerde ER stresi meydana geldiğinin bir göstergesi olarak kabul edildi. SAL uygulamasının ER stresini azaltmış olduğu tespit edildi. GRP78, PERK ve eIF2α mRNA seviyelerinin ISM uygulanan gruplarda artmış olduğu bulundu. SAL uygulanan gruplarda mRNA seviyelerinde azalma olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

Sonuçlar: Bu bulgular ışığında, spermatogenik hücrelerde ısı stresinin, ER stresini tetiklediği ve SAL'ın bu stres belirteçleri üzerinde etkin olduğu düşünüldü. Yapılacak ileri moleküler analizlerle spermatogenik hücrelerde ısı stresinde ER kaynaklı stres mekanizmalarının araştırılması teröpatik stratejiler açısından önem kazanacaktır.

Anahtar Kelimeler: Spermatogenez, GC1, GC2, Salubrinal, hücre kültürü, endoplazmik retikulum, Isı Stresi.

Title: The Effect of Salubrinal On ER Stress Pathway in Heat-Stressed Spermatogonial Cells in Vitro

Student's Name: Suna KARADENİZ SAYGILI

Supervisor: Prof. Dr. M. Kemal ÖZBİLGİN

Department: Histology and Embryology

2. ABSTRACT

Aim: It was aimed to investigate the effect of SAL on endoplasmic reticulum (ER) stress on experimental in vitro heat stress model (HSM) of spermatogenic cells.

Materials and Methods: In the study Mouse spermatogonium (GC1) and spermatocyte (GC2) cell lines were used. IC50 dose of SAL were calculated via MTT assay. Each cell lines were separated into 4 different groups which are; control (GC1-C, GC2-C), SAL treated (GC1-SAL, GC2-SAL), HSM experimental model (GC1-HSM, GC2-HSM) and SAL treated HSM model (GC1-HSMSAL, GC2-HSMSAL). Control cells were incubated under standard culture conditions. HSM model group cells were incubated under 43°C for 60 minutes. In the SAL group, cells were incubated with 20 µM SAL containing culture medium for 24 hours. After the experiments, all groups were stained with immunofluorescence probes of p-PERK, ATF6, GRP78, p-IRE1α, p-eIF2α, HSP70 antibodies. Moreover, mRNA levels of GRP78, PERK, eIF2α were evaluated with qRT-PCR.

Results: It was observed that HSM model has cytotoxicity. In the experimental model of HSM cells, all the markers showed elevated levels of immunoreactivity, that they were agreed upon to have ER stress. With the treatment of SAL, decreased levels of ER stress detected. GRP78, PERK and eIF2α mRNA levels were upregulated in the HSM model group. Even though there was a downregulation following SAL treatment, the difference was not statistically significant.

Conclusions: In the view of such findings, it was thought that heat stress triggered ER stress on spermatogenic cells, and SAL has effect on these markers. Studies of ER-related stress mechanisms on spermatogenic cells will be important for the therapeutical strategies with the forthcoming advanced molecular analyses.

Key words: Spermatogenesis, GC1, GC2, Salubrinal, Cell culture, Endoplasmic Reticulum, Heat stress.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Spermatogenez, mitoz, mayoz ve spermiyogenez adı verilen proliferasyon ve farklılaşma aşamalarına içeren erkek germ hücre gelişim sürecidir. Endojen ve ekzojen biyolojik, fizyolojik ve çevresel faktörler bu süreci etkilemektedir (Kerr 2006). Memelilerde testislerde meydana gelen spermatogenez süreci vücut ısısından daha düşük bir ısıda meydana gelmektedir (Danno ve ark. 2000). Erkeklerde, yüksek ısıya maruz kalma fertilité üzerinde ciddi zararlı bir etkiye sahip olmanın yanı sıra, infertilité için önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (Thonneau ve ark. 1998). Anormal bir ısı artışına maruz kalan spermatogenik hücrelerde artmış DNA hasarı, apoptoz görülmekle birlikte bu süreçlerin altında yatan moleküler ve hücresel olaylar zinciri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Kim ve ark. 2013).

Endoplazmik retikulum (ER) hücre metabolizması, canlılığının devam ettirilmesi ve gelişim aşamalarında önemli fonksiyonlara sahip organellerden birisidir (Kim ve ark. 2008). Membran proteinleri ve hormon, büyüme faktörleri gibi salgılanan proteinlerin sentezi, katlanması, uygun yapıda katlanıp katlanmadığının kontrolünün yapılmasında önemli rollere sahiptir (Burman ve ark 2018). ER fonksiyonlarının intraselüler veya ekstraselüler etkenler nedeniyle bozulması ER stresi olarak adlandırılmaktadır (Mori 2000). Isı yüksekliği, hücrede ER stresine sebep olan çevresel faktörlerden birisidir (Liu ve ark. 2012). ER stresi, endoplazmik retikulumda katlanmamış veya yanlış katlanmış protein birikimine neden olur ve bu da hücresel aktivitenin bozulmasına neden olmaktadır.

Hücreler, uzamış ER stres koşullarında Yanlış Katlanmış Protein Cevabı (Unfolded Protein Response, UPR) adı verilen bir koruma mekanizmasını harekete geçirir bu koşullar altında hayatta kalma mücadelesi verir. Memelilerde UPR sinyal yolağı, ER-membranına bağlı 3 transmembran sensör proteini aracılığıyla başlatılır. Bunlar IRE1 alfa (inositol-requiring kinase 1 alfa), PERK (protein kinase-like ER kinase) ve ATF6 (activating transcription factor 6) dır. Normal koşullar altında sensör proteinlerin luminal kısımları bir ER şaperon protein olan GRP78 bağlı haldeyken, stres koşullarında ayrılma gerçekleşir (Ron ve Walter 2007). Uzamış UPR cevabında ER homeostasisi bozulur, hücre stres ile baş edemez ve ölüm mekanizmaları aktifleşir (Tabas ve Ron 2011).

GRP78, HSP70 (ısı şok protein 70) ailesinin üyesi olan ATPaz' dır. Şaperon protein GRP78 yeni sentezlenen polipeptitlerin ER membranı boyunca translokasyonu, yanlış katlanmış proteinleri hedef alan ER ile ilişkilendirilmiş degradasyon (ERAD), kalsiyum homeostazisinin düzenlenmesi gibi birçok hücresel süreçte görev almaktadır (Bertolotti ve ark. 2000; Liu ve ark. 2003).

ATF6, temel lösün fermuar proteini (bZIP) içeren bir transkripsiyon faktörü ve tip II ER transmembran proteinidir. Yanlış katlanmış proteinlerin birikimine cevap olarak ER'de, glucose-regulated protein 78 (GRP78) olarak da bilinen bir ER chaperonu olan immünoglobulin bağlayıcı protein (BiP), ATF6 den ayrılır ve yanlış katlanmış proteinle ATF6 ile etkileşime girer. En son çekirdeğe translokalle edilen ATF6 ERAD yolağının ve UPR hedef genlerinin transkripsiyonunu indüklenmesini sağlar (Chen ve ark. 2002; Kadowaki ve Nishitoh 2013; Yamamoto ve ark. 2007).

IRE1 α , C-terminal sitosolik domaininde serin / treonin kinaz aktivitesi ve endoribonükleaz (RNase) aktivitesi olan tip I ER transmembran proteinidir. Hücrede meydana gelen ER stresi sonucunda oligomerizasyona ve otofosforilasyona uğrayarak ERAD yolağının ve UPR hedef genlerinin transkripsiyonunu düzenlenmesini sağlar (Lee ve ark. 2005; Papa ve ark. 2003).

PERK, C-terminal sitosolik alanında serin / treonin kinaz aktivitesine sahip olan ve luminal domain N-terminalinde yanlış katlanmış proteinlerin birikimini tanıyan tip I ER transmembran proteinidir ve eIF2 α kinaz 3 (eIF2 α K3) geni kodlamaktadır. ER stresi koşullarında UPR sinyal yolağında protein translasyonunu azaltarak ER yeni girecek protein miktarının düşmesini sağlamaktadır (Harding ve ark. 2000; Harding ve Ron 1999; Ron 2002).

eIF2 α insanda EIF2S1 geni tarafından kodlanan eukaryotic Translational Initiation Factor 2 subunit 1 (eIF2 α) proteini, başlatıcı tRNA'nın (Met-tRNAⁱMet) 40S ribozomal alt birimlerine bağlanmasını sağlayarak, hücrede gerçekleşecek olan protein sentezi başlama basamağını katalize eder (Cnop ve ark. 2007).

SAL protein fosfataz 1'i (PP1) inhibe ederek Ökaryotik Translasyon Başlatma Faktörü 2 Alfa (EIF2 α). Fosforilasyonunu baskılamak için kullanılan ve ER stres baskılayıcı olarak bilinen kimyasal bir bileşiktir (Boyce ve ark. 2005; Fullwood ve ark. 2012).

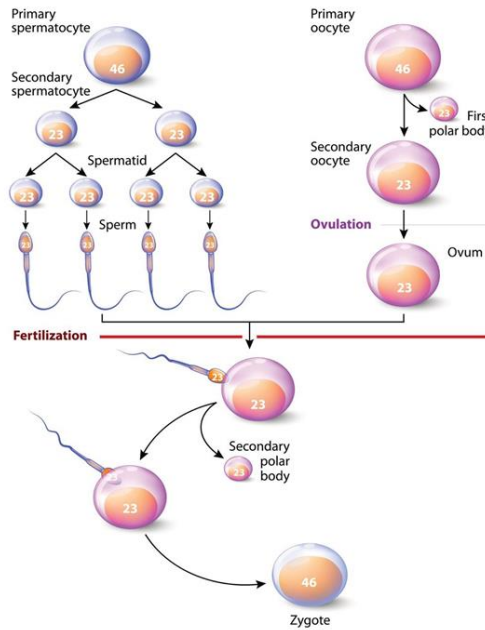
Bu çalışmada SAL'ın in vitro ISM oluşturulmuş spermatogenik hücrelerde ER stress sensör proteinleri üzerine etkisinin incelemesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. GAMETOGENEZ

Trilyonlarca hücrenin sekronize bir şekilde uyum içinde yaşadığı organizma, aslında haploid yapıda olan olgun dişi üreme hücresi ovumun; erkek üreme hücresi sperm tarafından döllenmesi sonucu oluşur. İki haploid karakterdeki hücrenin genetik materyali birleşerek son derecede özelleşmiş diploid yapıdaki totipotent bir hücre olan zigotu meydana getirirler. Zigot hücre bölünmesi, hücre göçü, hücre farklılaşması ve büyüme sonucunda organizma haline dönüşür (Moore ve Persaud 2004).

Gelişmiş bir organizmada meydana gelen ve türün devamlılığını sağlamada kilit rol oynayan gametogenez (Şekil 1) özelleşmiş üreme hücreleri olan sperm ve oositin oluşum ve gelişim sürecidir. Bu olay sırasında erkek ve dişi bireyde bulunan spermatogonyum ve oogonium (Üreme Kök Hücreleri) mayoz bölünme geçirerek kromozom setlerinin sayısını yarıya indirerek haploid yapıda sperm ve ovumu oluştururlar (Moore ve Persaud 2004).



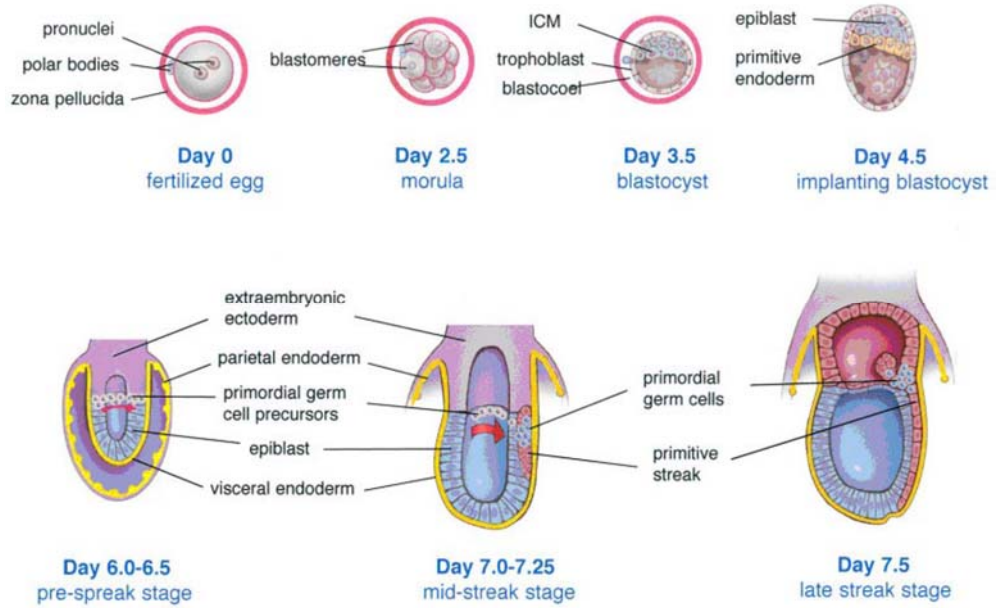
Şekil 1. Gametogenez ve zigot oluşumu <https://biologywise.com/diploid-haploid> Erişim Tarihi :

02.07.2019

4.1.1. Primordiyal Germ Hücreleri

Spermatogonyumlar postnatal testiste Primordiyal Germ Hücrelerinden (PGH) farklı gonositlerden köken almaktadırlar. Embriyonik dönem yaklaşık altı buçuk günde farklılaşmaya başlayan bu hücreler alkalen fosfat pozitif hücrelerdir (Ginsburg ve ark. 1990). PGH'lerin farklılaşma süreci ekstraembriyonik ektodermden BMP4 ve BMP8b'nin ekspresyonuna bağlıdır (Lawson ve ark. 1999). Embriyonik dönem sekiz buçuk ve 12. günler arasında arka barsağın invaginasyonu ile pasif olarak farklılaşmamış gonadlara doğru göç hareketi başlamaktadır (Bendel–Stenzel ve ark. 1998) (Şekil 2). İlk olarak pasif başlayan ve sonrasında aktif olarak devam eden göç olayında tirozin kinaz reseptörü olan c-kit ve ligandı Kök Hücre Faktörü (SCF) oldukça önemli bir role sahiptir. Yaklaşık embriyonik dönem 13,5 günde erkek gonadına ulaşan PGH gonosit adını alır ve genital epitel prekürsör hücreleri tarafından oluşturulan testiküler kord ile çevrelenir. Gonositler mitotik- prospermatogonyum, T1-prospermatogonyum ve T2-prospermatogonyum olmak üzere üç alt popülasyon şeklinde karakterizedir (McCarrey 1993). M-prospermatogonyumlar, testis kordonlarının merkezinde ve bazal membrandan uzakta lokalizedir. Embriyonik 16,5 güne kadar olan süreçte T1-prospermatogonyuma dönüşüm aşamasına kadar proliferasyon olarak hızla çoğalırlar (Töhönen ve ark 2003). Doğumdan yaklaşık bir hafta sonra sürece kadar proliferasyonlarını devam ettirerek T2-prospermatogonyum adını alırlar ve bazal membran üzerine oturmuş halde bulunurlar (Clermont ve Perey 1957).

Bazal membran üzerinde bulunan T2-prospermatogonyumlar spermatogenez sürecini başlatan hücrelerdir ve aynı zamanda postpubertal yaşam boyunca spermatogenezinin devamlılığını sağlayan ilk Spermatogonyal Kök Hücre (SKH) havuzunu oluştururlar (Clermont ve Perey 1957).



Şekil 2. Farede Germ Hücre Soyu Oluşumu.

4.2. SPERMATOGENEZ

Erkek üreme sistemi testislerden, genital boşaltım kanallarından, aksesuar cinsiyet bezlerinden ve penisten oluşmaktadır. Bu sistemin görevi haploid sperm üretiminin gerçekleştirilmesi ve erkek seks hormonlarının üretiminin ve salgılanmasının yapılmasıdır (Kierszenbaum ve Tres 2002).

Testislerde spermatogenez oldukça karmaşık ve kompleks bir süreç olarak meydana gelmektedir. Farelerde doğumla beraber gonadotropinlerin seviyelerinin artmasının etkisiyle başlar ve yaşam boyunca devam eder (Ross ve Pawlina 2017).

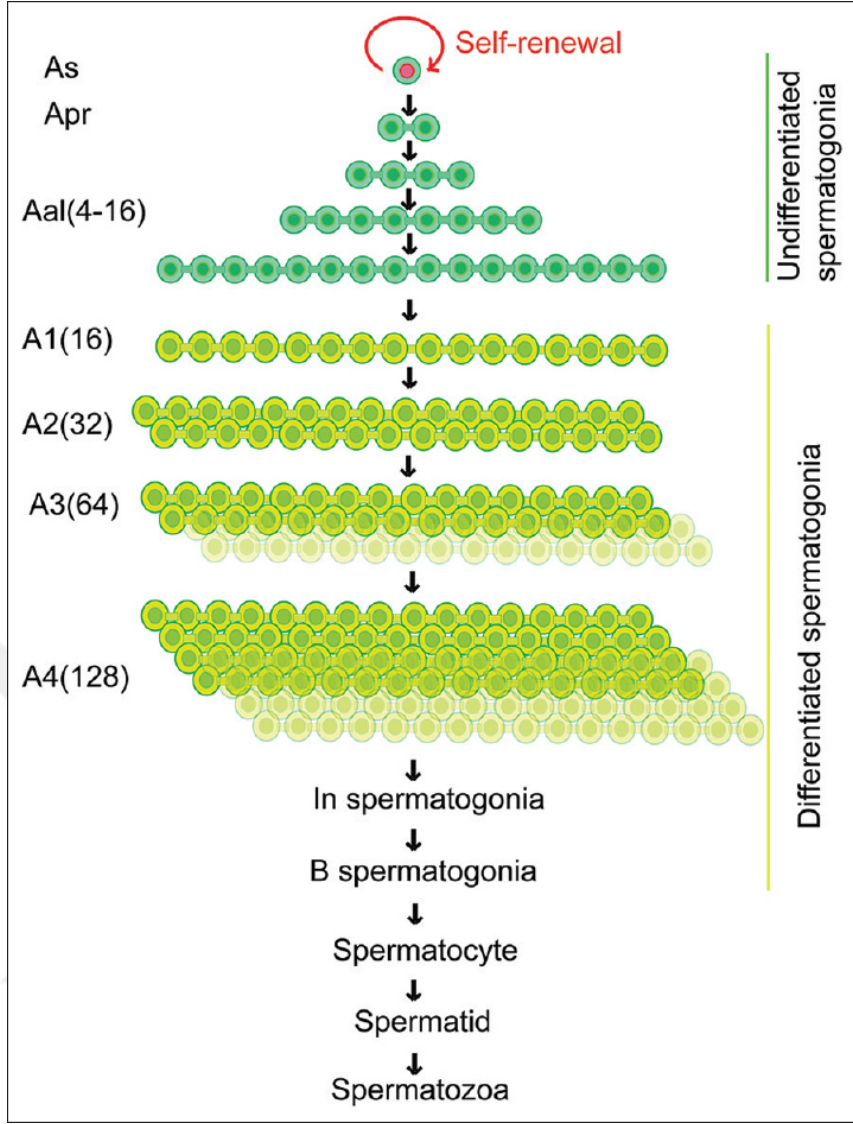
Spermatogenez erkek üreme kök hücresi olan spermatogoniumların olgun sperme dönüşmesi sırasında meydana gelen süreçtir. Fetal ve postnatal dönemde primordial germ hücrelerinden köken alan spermatogonyalar testis seminifer tübüllerinde inaktif olarak bulunur.

Spermatogenez üreme fonksiyonunun devamlılığını sağlayacak spermatogenik kök hücre popülasyonunun mitozunun gerçekleştirildiği spermatogonyal faz, döllenmeyi sağlayacak olan gametin oluşturulmasını sağlayan mayoz bölünmenin gerçekleştirildiği spermatosit fazı ve mayoz sonucu oluşmuş olan spermatidin bir dizi morfolojik değişiklikler geçirdiği spermiyogenez adı verilen süreçleri kapsar. Bu sürecin sonunda ise spermiasyon adı verilen bir işlemle yüksek düzeyde organize

olmuş spermin sertoli hücrelerinden ayrılarak seminifer tübül lümenine salıverilir (Griswold 2015).

4.2.1. Spermatogonyal Faz

Bu fazda bazal membran tabanına oturmuş olan spermatogonyumlar çok sayıda bölünme geçirirler ve histolojik kesitlerde nükleer farklılık sergileyen spermatogonyal alt hücre gruplarını oluştururlar (Phillips ve ark. 2010). Spermatogonyumlar Tip A, İntermediyet ve Tip B olmak üzere üç sınıfa ayrılır. Tip A spermatogonyum farklılaşmamış spermatogonyumdur ve A single olarakta isimlendirilir (De rooij ve russell 2000). Tip A spermatogonyumlar mitotik aktivite sonucunda kendilerini yenilerken bir taraftan sitoplazmik köprüler ile birbirleriyle bağlantı halinde bulunan A paired (Apr) ve A aligned (Aal) tip spermatogonyum altsoylarını oluşturmaktadırlar (Zhou ve Griswold 2008). Hücreler arasında bulunan sitoplazmik köprülerin mRNA ve protein hareketine olanak sağladığı bilinmektedir (Kerr 2006). Bu hücrelerin tümü “farklılaşmamış” spermatogonyum olarak kabul edilirken, Apr ve Aal hücreleri, germ hücre farklılaşmasına giden yolda bulunur ve transit çoğaltıcı progenitör hücreler olarak kabul edilir (De Rooij ve Griswold 2012). Aal hücrelerin çoğu herhangi bir hücre bölünmesi olmadan farklılaşmış spermatogonyum olan A1 spermatogonyuma dönüşür. Aal'in A1 spermatogonyuma geçişine takiben A2, A3, A4, In ve B spermatogonyum oluşturmak üzere beş senkronize hücre bölünmesi meydana gelir ve son bir mitoz sonucunda ise preleptoten spermatositler oluşur (de Rooij 2001). Oluşan preleptoten primer spermatositler spermatosit fazı olarakta adlandırılan mayoz bölünmenin gerçekleştiği sürece dahil olur (L. Russell 1990). Spermatogonyumlar bazal membran ile bağlantılıdır. Hücresel farklılaşma sürecinde bu fiziksel bağlantı azalır ve preleptoten spermatogonyumların bazal membranla bağlantısı tamamen kopar (Kerr 2006) (Şekil 3).

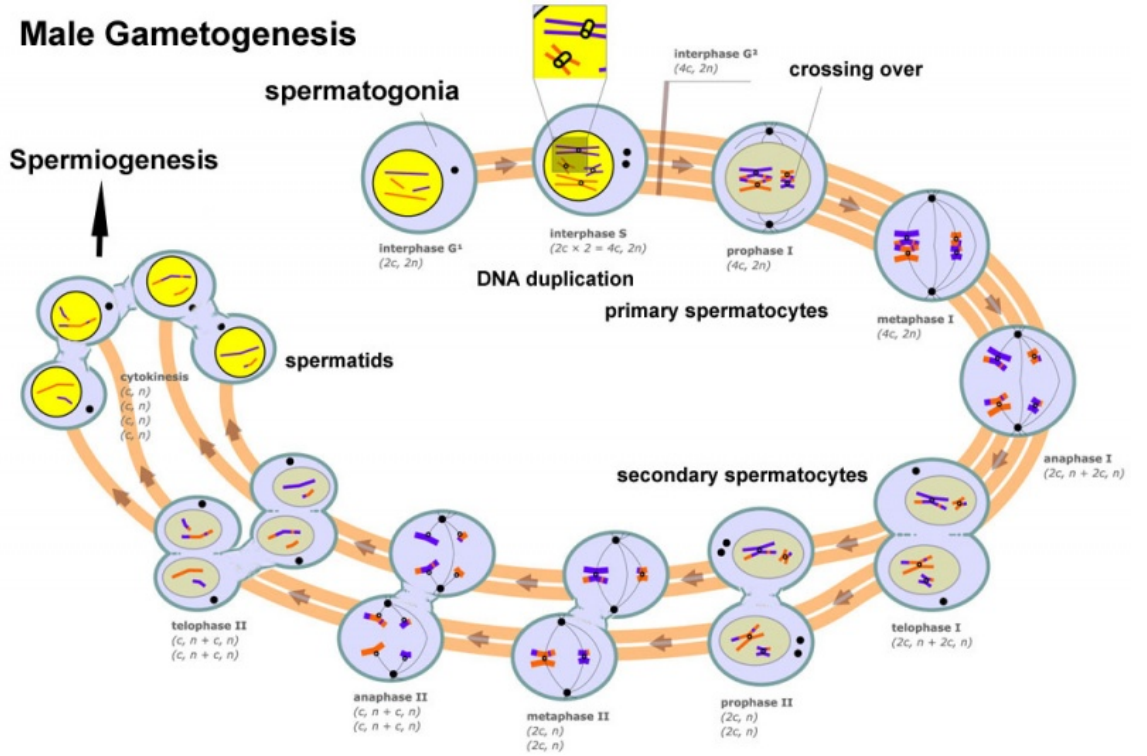


Şekil 3. Spermatogonial Kök Hücrelerin Kendini Yenileme ve Farklılaşma Süreci.

4.2.2. Spermatozoid fazı

Spermatozoid fazında primer spermatozoidler mayoz bölünme geçirerek kromozom sayısını ve DNA miktarını yarıya indirir. Bu faz sonucunda haploid sayıda kromozom taşıyan dört tane spermatid oluşur (Ross ve Pawlina 2017). Mayotik profaz leptoten, zigoten, pakiten, diploten ve diakinez olmak üzere beş safhadan meydana gelir. Leptoten fazında ipliksi halde gözlemlenen kromozomlar oluşmaya başlar. Zigoten fazına geçildiğinde homolog kromozomların eşleştiği ve kalınlaştığı görülür ve sineptonemal kompleks oluşumunun başladığı gözlenir. Pakiten fazı homolog kromozomların sinaps yapısını oluşturduğu sineptonemal kompleks oluşumunun tamamlandığı evredir. Rekombinasyonun meydana geldiği pakiten fazından sonraki

evre olan diploten safhası rekombinasyon varlığı, kiazmata bölgelerinin görünebildiği, Sineptonemal kompleksin birbirinden ayrılmaya başlaması ile karakterizedir. Mayoz bölünme Profaz I aşaması diyakinezle son bulur, bu evrede kromatin ağı üst düzeyde kondanse olduğu ve kiazma bölgelerinin ayrılmaya olanak sağlaması açısından serbest hale gelmesi ile karakterizedir. Profaz I aşamasında takiben meydana gelen metafaz I aşamasında homolog kromozomlar iğ ipliklerine tutunur, anafaz I aşamasında zıt kutuplara çekilir. Telofaz I evresinde haploid kromozom seti içeren ve sitoplazmik köprü vasıtasıyla birbiriyle bağlantı halinde olan iki kardeş hücre meydana gelir (Nunes ve ark. 2017). Birinci mayozun tamamlanması sonucunda sekonder spermatositler oluşur. Mayoz II evresi çok hızlı meydana geldiğinden oluşan bu hücreler histolojik kesitlerde çok fark edilmemekle birlikte kısa ömürlüdür. Mayoz II tipik bir mitoz bölünme evresi özelliklerini göstermekle birlikte bölünme sonucunda haploid kromozom setine sahip 4 adet spermatid hücresi meydana gelir (de Kretser ve ark. 1998) (Şekil 4).



Şekil 4. Spermatogenez Mayoz Süreci.

https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/File:Male_gametogenesis.jpg

Erişim Tarihi 02.07.2019

4.2.3. Spermiyogenez

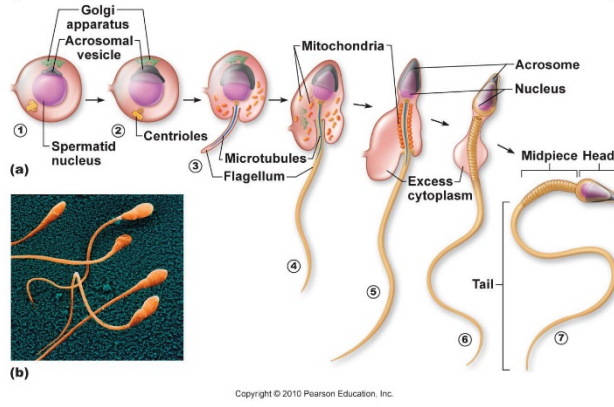
İkinci mayoz bölünme sonrası oluşan spermatidlerin morfolojik ve fonksiyonel değişimler sonrası oldukça özelleşmiş bir hücre tipi olan spermatozoayı oluşturma sürecine spermiyogenez adı verilir. Spermiyogenez süreci eşsiz olmakla birlikte oldukça sekronize bir şekilde meydana gelen süreçtir. Akrozom oluşumu, çekirdek yoğunlaşması ve uzama, kuyruk (flagellum) gelişimi, sitoplazmanın yeniden organizasyonu ve spermiyasyon spermiyogenezde meydana gelen olaylar zinciridir. Akrozom oluşumu esnasında golgi kompleksinin sisternaları proakrozomal granülleri oluştururlar. Proakrozomal granüller birleşerek akrozomal vezikülü meydana getirirler. Sonuçta çekirdeğin apikale göç ederek çekirdeği çevreleyen bir akrozom sistemini oluştururlar (Russell ve ark. 1993).

Çekirdeğin yoğunlaşması ve uzaması sırasında kromatin kademeli bir şekilde kondense olur ve şekil değiştirir. Bu değişim sürecinde histonlar, protaminler ve bu iki protein arasında geçişi sağlayan transizyon proteinleri görev almaktadır. Bu değişim süreci sonrasında sperm DNA'sı normal bir somatik hücrenin 1/20 'si kadar sıkı bir şekilde paketlenir (Balhorn ve ark. 1999).

Kuyruk gelişimi sırasında sentriyol çifti akrozom kutbunun zıt yönü olan nükleusun arka kısmına göç ederler. Sentriyollerden bir tanesi ışınal düzenleme ile kuyruğun 9+2 mikrotübül yapısındaki aksonem kısmını oluştururken diğer sentriyol kuyruğu çekirdeğe bağlayan kısmı meydana getirir. Kuyruk gelişimi aksesuar kısımların katılımına takiben esas, orta ve son parça yapılarının oluşumuyla tamamlanır (Fawcett 1975).

Spermatidlerin yeniden şekillenmesinin son fazında fazla sitoplazmik kısımların atılması ile olgun spermatozoon oluşur. Rezidüel cisimcik olarak adlandırılan fazla sitoplazmik kısımlar sertoli hücreleri tarafından fagosit edilirler (Ross ve Pawlina 2017).

Spermiyogenez fazının sonuna doğru uzamış spermatidler sertoli hücreleri ile yapmış olduğu hücre-hücre bağlantılarını kaybeder ve seminifer tübül lümenine salınması olayına spermiyasyon adı verilir. Testisteki spermiyasyon hızı ejakulatta bulunan sperm sayısı ile doğru orantılıdır (Kierszenbaum ve Tres 2002) (Şekil 5).

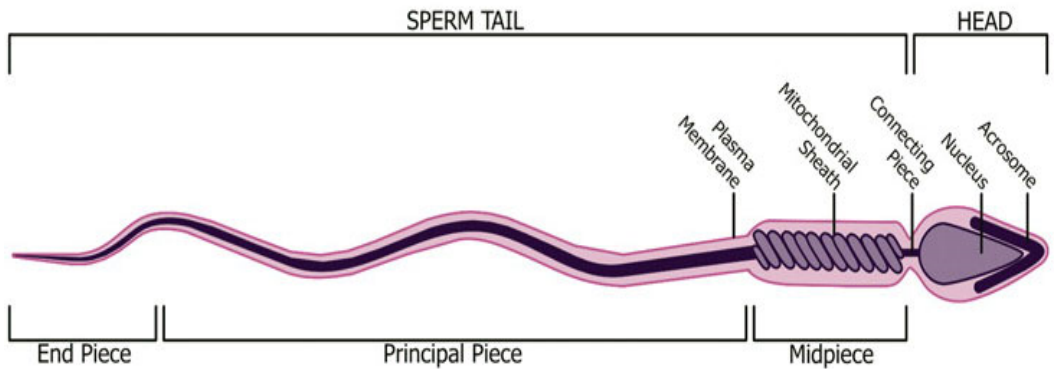


Şekil 5. Spermiyogenez Süreci.

https://facweb.northseattle.edu/jlearn/BIOL_241_242/images/spermiogenesis.html erişim Tarihi 03.07.2019

4.2.4. Olgun Sperm Yapısı

Olgunlaşmış olan sperm baş ve kuyruk olmak üzere iki kısımdan meydana gelmektedir. Baş kısmında çekirdeğin anterior üçte ikilik bölümünü saran akrozom ve sıkıca paketlenmiş kromatine sahip yassı bir çekirdek bulunur. Kuyruk kısmı boyun, orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere dört kısma ayrılır. Boyun kısmı bir çift sentriyol ve kaba fiberlerin başlangıç kısımlarını içerirken orta parça mitokondrionları içermektedir. Orta parçada bulunan mitokondrionlar sarmal dizilim göstermekte ve sperm hareketi sırasında gerekli enerjiyi sağlamaktan sorumludur. Esas parça kalın fiber yapıları ve aksonemal kompleks dışındaki fibröz kılıfı içerirken son kısım yalnızca aksonemal kompleksi içermektedir (Ross ve Pawlina 2017) (şekil 6).



Şekil 6. Olgun Sperm Yapısı.

https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Spermatozoa_Development Erişim Tarihi 04.07.2019

4.3. GC1 HÜCRE HATTI

10 günlük balb/c Mus musculus farelerinin testislerinden izole edilmiştir. Bu hücre hattı Tip B spermatogonyum ile primer spermatosit arasında bulunan evre karakteristiğine sahiptir. Hücreler sitokrom c ve laktat dehidrogenaz C4 adı verilen testise ait iki spesifik izoproteini eksprese ederler. B tipi spermatogonia olarakta isimlendirilen bu hücreler, pSV3-neo (SV40 büyük T antijeni ve neomisin direnci için kodlama dizileri içeren bir plazmid) ile transfeksiyon yöntemiyle immortalize edilmiştir. Hücre dondurulmuş bir şekilde ATCC firmasından alınmıştır. Hücreler morfolojik olarak epitelyal karakterde ve hücre kültürü tipi olarakta adherent tiptedir.

4.4. GC2 HÜCRE HATTI

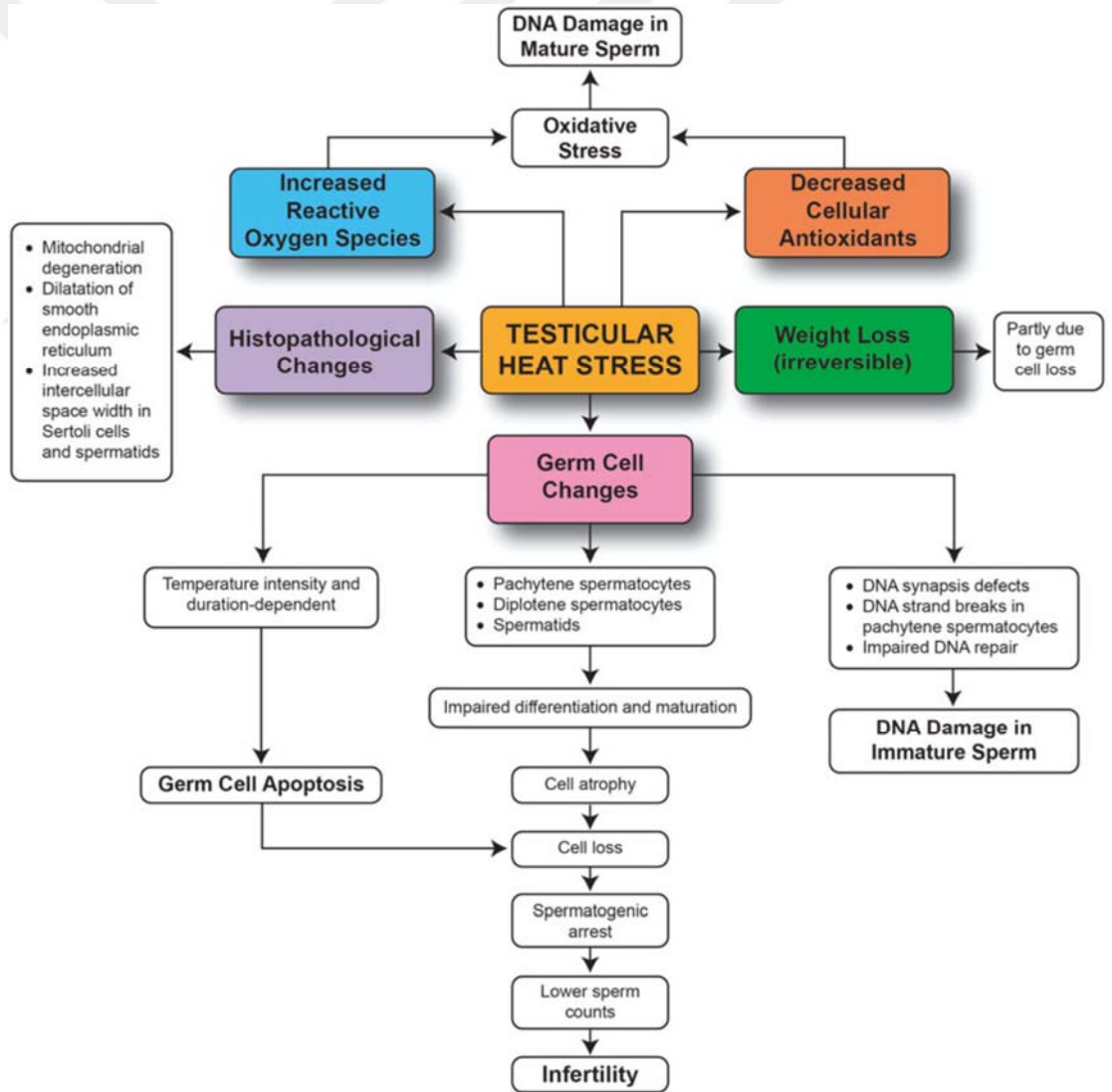
6 haftalık balb/c Mus musculus farelerinin testislerinden izole edilmiştir. pSV3-neo (SV40 büyük T antijeni ve neomisin direnci için kodlama dizileri içeren bir plazmid) ve ısıya duyarlı p53 tümör baskılayıcı gen (LTRp53cG9) ile transfekte edilmiştir. Hücreler G-418 ile seçilip, 6 ay boyunca kültüre edilerek tek bir hücre klonu elde edilmiştir. Yumuşak agar kültürlerinde klonal proliferasyon oluşturduğu gözlemlenmemiştir. Hücre dondurulmuş bir şekilde ATCC firmasından alınmıştır. Hücreler morfolojik olarak epitelyal karakterde ve hücre kültürü tipi olarakta adherent tiptedir.

4.5. SPERMATOGENEZ ÜZERİNE ISI HASARI ETKİSİ

Erkek bireylerde ısıya maruz kalmanın fertilité üzerinde ciddi zararı bulunmakla birlikte infertilite için önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Spermatogenik süreçler, sıcaklığa bağımlıdır ve ideal olarak vücut sıcaklığının en az 1-2 °C altında bir sıcaklıkta gerçekleşir (Thonneau ve ark. 1998). Germ hücreleri yüksek mitotik aktiviteye sahiptir ve bu da onları ısı stresine karşı daha duyarlı hale getirmektedir (Shiraishi 2012). Pakiten ve diploten spermatositler ile erken dönem spermatidlerin ısıya karşı oldukça duyarlı olduğu hem insan hem hayvan çalışmalarında gösterilmiştir (Carlsen ve ark. 2003; Lue ve ark. 1999). Isı artışına bağlı olarak germinal epitel tabakada atrofi ve spermatogenik arreste bağlı olarak total sperm sayısında azalma meydana gelmektedir (Munkelwitz ve Gilbert 1998). Isıya

maruz kalmaya takiben testiste mitokondriyal dejenerasyon, düz endoplazmik retikulum dilatasyonu ve hücreler arasında geniş boşluklar gibi çeşitli histopatolojik değişikliklerde gözlemlenmektedir (Kanter ve ark. 2013). Isı hasarında spermatogenik hücrelerde apoptotik mekanizmaların tetiklendiği ve artmış DNA hasarının olduğu bilinmektedir (Lue ve ark. 2002; Paul ve ark. 2008) (Şekil 7).

Günlük yaşamda birçok eksternal ve internal faktör sebebiyle testislerin ısıya maruziyeti meydana gelmektedir. Yaşam koşulları, kıyafet seçimi, bilgisayar kullanımı, mesleki açıdan maruziyet, sauna ve hamam kullanımı eksternal faktörler arasında değerlendirilirken, varikosel, inmemiş testis gibi çeşitli internal faktörlerde ısı hasarının oluşmasına sebep olmaktadır (Durairajanayagam ve ark. 2015).



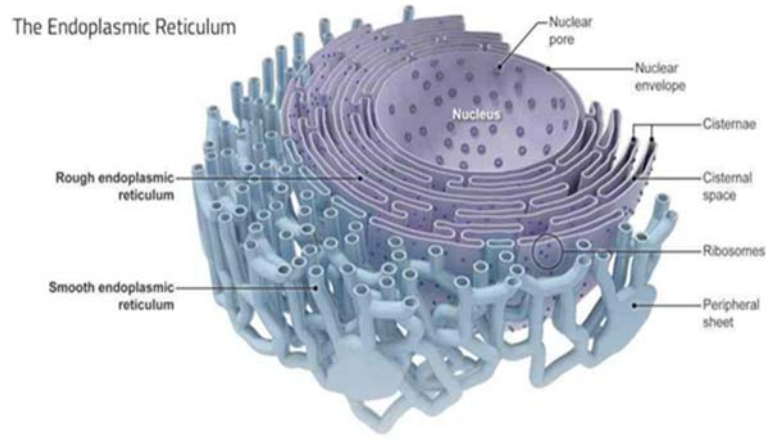
Şekil 7. Testiküler Isı Hasarı Mekanizmaları (30).

4.5.1. HSP70

HSPA1A olarak da bilinen indüklenabilir 70 kDa ısı şoku proteini (HSP70), hücrede meydana gelen stres yanıtının önemli bir bileşeni olan moleküler bir şaperondur. Bir hücrede yüksek sıcaklık, enflamasyon, toksik kimyasallar, oksidatif stres, hipoksi gibi fizyolojik ortamını değiştiren koşullar meydana geldiğinde HSP70 sentezinin arttığı bilinmektedir (Parsell ve Lindquist 1993).

4.6. ENDOPLAZMİK RETİKULUM

Endoplazmik retikulum hücredeki en büyük organeldir. Protein sentezi ve taşınımı, Ca depolama, protein katlanması, lipid- steroid sentezi ve karbonhidrat metabolizmasında aktif görev almaktadır (Schwarz ve Blower 2016). Hücre içinde meydana gelen sekretuar yolaklarda ana organel görevini üstlenmektedir. Sekretuar proteinler, integral membran proteinleri (Jan ve ark. 2014) ve sitozolik proteinlerin bir kısmı (Reid ve Nicchitta 2015) endoplazmik retikulumda sentezlenmektedir. Organelin multifonksiyonel yapısı fiziki yapısında yansımıştır. Perinükleer yerleşimli olup düz ve dallanmış tübül yapılardan oluşan eşsiz bir mikro yapıya sahiptir. Bu ER alanlarının şekli ve dağılımının yapısı integral membran proteinlerinin diğer organeller ve hücre iskeleti etkileşimleri ile düzenlenmektedir. Proteinlerin işlevlerini yerine getirebilmeleri için doğru bir şekilde katlanması gerekmektedir. Doğru bir şekilde katlanmayan proteinler hücrenin canlılığı ve işlevselliği için bir tehdit oluştururlar. Bip, kalretokulin GRP94 gibi moleküller ER lümeninde yer alarak protein katlanmasında yer alır ve böylece protein birikimine engel olurlar (Zhang ve Kaufman 2006). ER içerisinde proteinin katlanması, post-translasyonel modifikasyonu ve trafiği protein kalite kontrol sistemi tarafından düzenlenir (Kadowaki ve Nishitoh 2013) (Şekil 8).

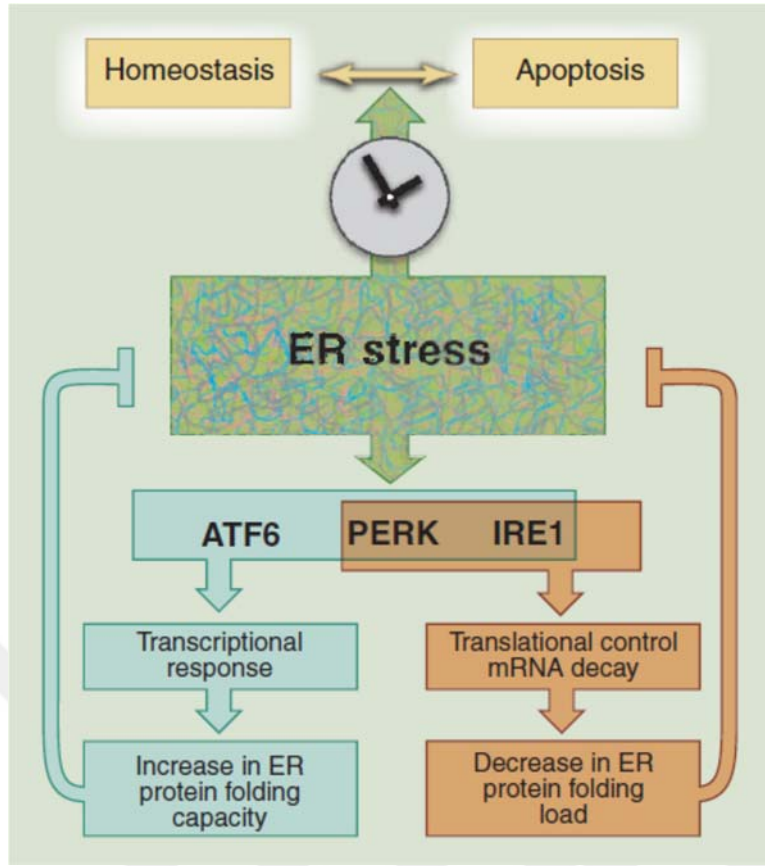


Şekil 8. Endoplazmik Retikulum

4.7. ER STRESİ

ER fonksiyonlarının intraselüler veya ekstraselüler etkenler nedeniyle bozulması ER stresi olarak adlandırılmaktadır (Şekil 9). ER stresi endoplazmik retikulumda katlanmamış veya yanlış katlanmış protein birikimine neden olmakta ve bu da hücrenin aktivitenin bozulmasına neden olmaktadır. Bu koşullarda hücrenin cevabı, ya hayatta kalmak ya da apoptoza gitmek biçiminde gerçekleşmektedir. Hücreler yanlış katlanmış proteinler varlığında Yanlış Katlanmış Protein Cevabı (Unfolded Protein Response, UPR) adı verilen bir koruma mekanizmasını harekete geçirir ve ER stres koşulları altında hayatta kalma mücadelesi verir. Ökaryotik hücrelerde UPR sistemi 3 mekanizma içerir. Bunlar; daha fazla protein yükünün oluşmasını engellemek için translayonel zayıflama, ER protein katlanması ve parçalanmasında rol oynayan genlerin transkripsiyonel aktivasyonunun sağlanması ve ubiquitin –proteazom yoluyla yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin ER’den sitozole gönderilerek degradasyonunun sağlandığı ERAD yoludur (Kadowaki ve Nishitoh 2013).

Memelilerde UPR sinyal yolağı ER-membranına bağlı 3 transmembran sensör proteini aracılığıyla başlatılır. Bunlar IRE1 alfa (inositol-requiring kinase 1 alfa), PERK (protein kinase-like ER kinase) ve ATF6 (activating transcription factor 6)dır (Wang ve Kaufman 2012). Bu proteinler stres olmayan durumlarda GRP78 ile birlikte inaktif hâldedir (Bertolotti ve ark. 2000).



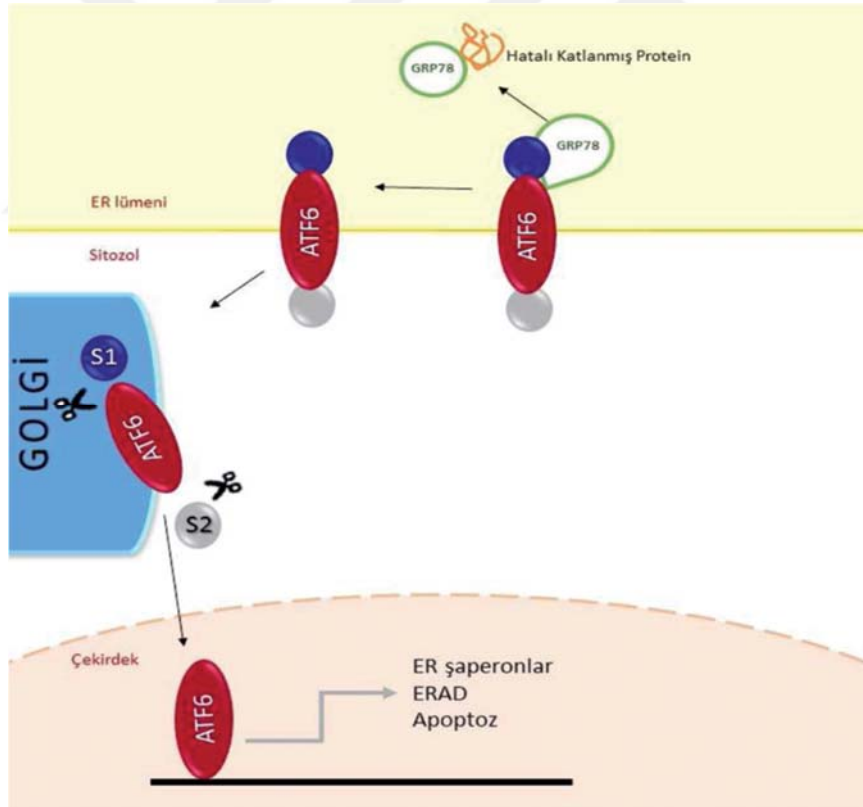
Şekil 9. ER Stres Mekanizması.

4.7.1. GRP78

ER'nin hücrede fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için şaperon moleküller oldukça önemlidir. En iyi karakterize edilen ER şaperonlarından biri BiP veya HSPA5 olarak bilinen GRP78'tir. GRP78, HSP70 (ısı şok protein 70) ailesinin üyesi olan ATPaz'dır. Şaperon protein GRP78 yeni sentezlenen polipeptitlerin ER membranı boyunca translokasyonu, yanlış katlanmış proteinleri hedef alan ER ile ilişkilendirilmiş degradasyon (ERAD), kalsiyum homeostazisinin düzenlenmesi gibi birçok hücresel süreçte görev almaktadır. ER'da sentezi yeni gerçekleştirilmiş proteinlere geçici olarak bağlanırken, glikozillenme sürecinde ve hatalı veya katlanmamış proteinlere ise kalıcı bir şekilde bağlanmaktadır. Diğer bir deyişle stres koşullarının olmadığı süreçte IRE1 α , PERK ve ATF6'ye bağlanarak bu proteinlerin inaktif halde kalmasına neden olmaktadır. UPR sinyal proteinlerinin aktif forma gelmesini düzenleyerek ER stres sürecinde ana düzenleyici protein olarak görev almaktadır (Bertolotti ve ark. 2000; Lee 2005; Liu ve ark. 2003).

4.7.2. ATF6 (Activation Transcription Factor 6)

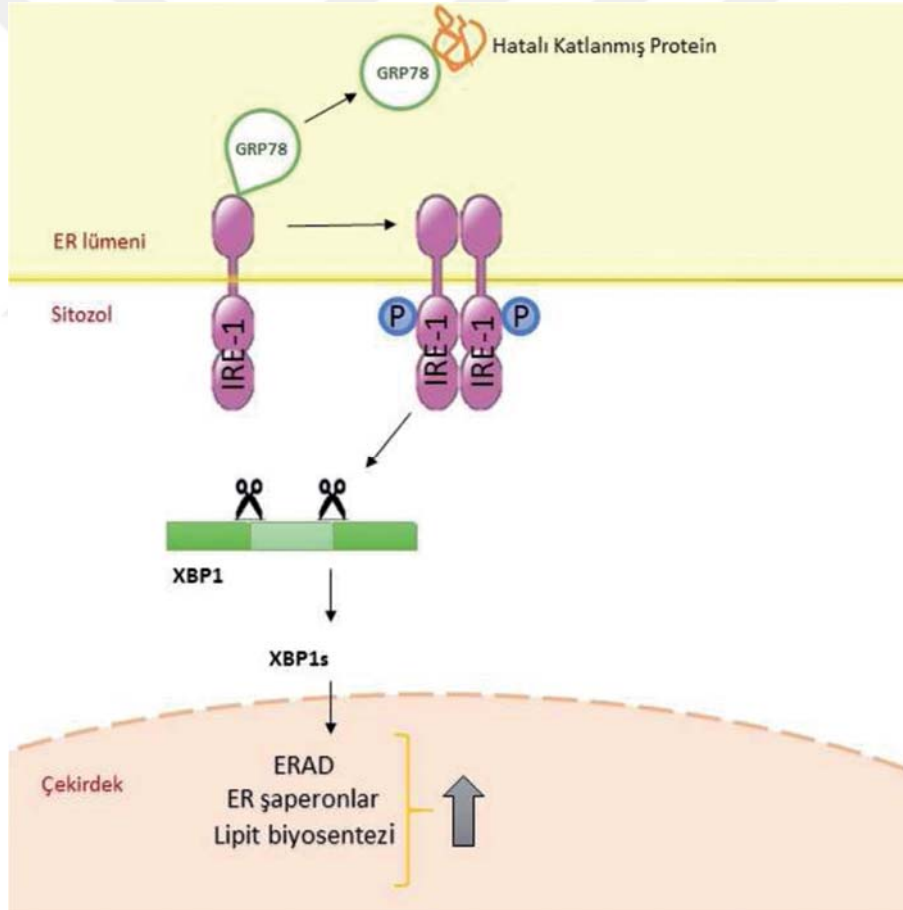
ATF6, temel lösin fermuar proteini (bZIP) içeren bir transkripsiyon faktörü ve tip II ER transmembran proteinidir (Şekil 10). Memelilerde ATF6a ve ATF6b olmak üzere iki ATF6 geni bulunmakta ve tüm hücrelerden eksprese edilmektedir. Yanlış katlanmış proteinlerin birikimine cevap olarak ER'de, glucose-regulated protein 78 (GRP78) olarak da bilinen bir ER chaperonu olan immünoglobulin bağlayıcı protein (BiP), ATF6 den ayrılır ve yanlış katlanmış proteinle ATF6 ile etkileşime girer. ATF6 ER membranından Golgiye translokale olur. Bu süreç sırasıyla luminal alanda ve transmembran bölgede site-1 proteaz (S1P) ve site-2 proteaz (S2P) tarafından kısmen kesilerek transkripsiyon faktör alt birimi aktif hale getirilir. En son çekirdeğe translokale olan ATF6 ERAD yolağının ve UPR hedef genlerinin transkripsiyonun indüklenmesini sağlar (Bertolotti ve ark. 2000; X. Chen ve ark. 2002; Kadowaki ve Nishitoh 2013).



Şekil 10. ER stresinde ATF6.

4.7.3. IRE1 α (Inositol Requiring Kinase 1 alfa)

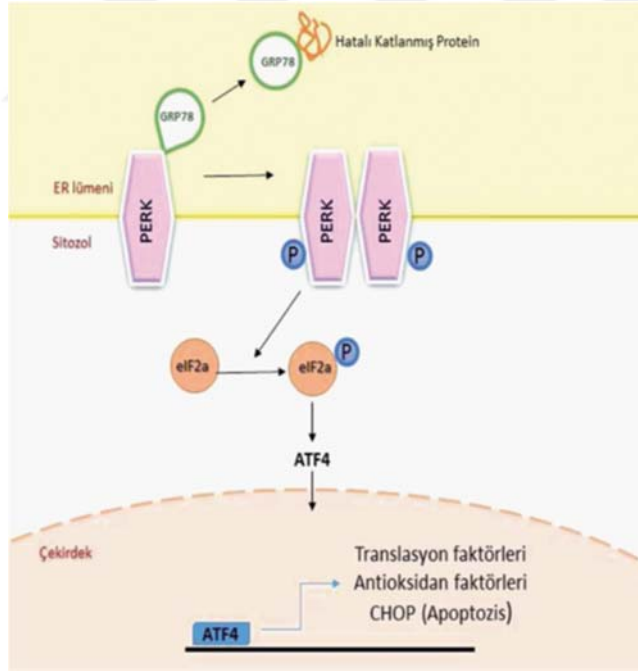
IRE1, C-terminal sitosolik domaininde serin / treonin kinaz aktivitesi ve endoribonükleaz (RNase) aktivitesi olan tip I ER transmembran proteinidir (Şekil 11). Memelilerde IRE1 α ve IRE1 β olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. IRE1 α tüm hücrelerde bulunurken IRE1 β sadece intestinal epitel hücrelerinde ifade edilmektedir. IRE1 α luminal bölgesi protein katlanmasına duyarlı iken sitoplazmik kısmı protein kinaz aktivitesi göstermektedir. IRE1'in aktivasyonu, GRP78'in IRE1'in luminal bölgesinden ayrılması ile tetiklenir. Ayrılma sonrasında kinaz kısmında otofosforilasyon ve oligomerizasyon gerçekleşmesi sonucunda endoribonükleaz fonksiyonu aktifleşir. Bunun sonucunda ERAD yolağının ve UPR hedef genlerinin transkripsiyonun düzenlenmesini sağlar (Lee ve ark. 2005; Papa ve ark. 2003).



Şekil 11. ER stresinde IRE1 α .

4.7.4. PERK (Protein kinase-like ER kinase)

PERK, C-terminal sitosolik alanında serin / treonin kinaz aktivitesine sahip olan ve luminal domain N-terminalinde yanlış katlanmış proteinlerin birikimini tanıyan tip I ER transmembran proteinidir ve eIF2 α kinaz 3 (eIF2 α K3) geni kodlamaktadır (Şekil 12). PERK'in aktivasyonu, GRP78'in PERK'in lümen alanından ayrılması ile tetiklenir. PERK otofosforilasyon ve oligomerizasyona uğrar. Aktive olmuş PERK eIF2 α 'nın fosforilasyonunu sağlar. eIF2 α fosforilasyonu Guanin nükleotid değiştirme faktörünün engellenmesine neden olarak eIF2 α aktif GTP' ye bağlı bir forma dönüşür. Translasyon başlama kompleksinin (eIF2 α -GTP-tRNA met) aktivitesindeki düşüş translasyon seviyesinde azamaya ve dolayısıyla yeni sentezlenen protein miktarının azalmasına sebep olur. PERK total protein sentezini azaltmasının yanında, transkripsiyon faktör 4 (ATF4) translasyonunun aktifleşmesini sağlayarak UPR sinyal yolağında aktif rol oynayan genlerin transkripsiyonunu indükler. Sonuç olarak UPR sinyal yolağında protein translasyonunu azaltarak ER yeni girecek protein miktarının düşmesini sağlamaktadır (Harding ve ark. 2000; Harding ve ark. 1999; Ron 2002).



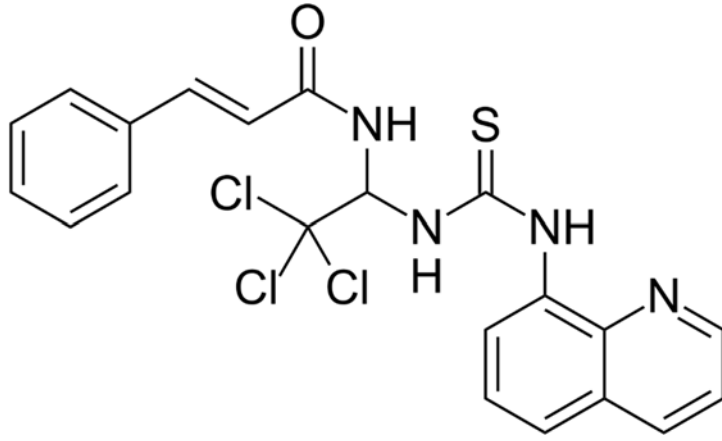
Şekil 12. ER Stresinde PERK.

4.7.5. eIF2 α

İnsanda EIF2S1 geni tarafından kodlanan eukaryotic Translational Initiation Factor 2 subunit 1 (eIF2 α) proteini, başlatıcı tRNA'nın (Met-tRNA^{iMet}) 40S ribozomal alt birimlerine bağlanmasını sağlayarak, hücrede gerçekleşecek olan protein sentezi başlama basamağını katalize eder (Cnop ve ark. 2007). Hücreler, eksternal veya internal stres ile karşı karşıya kaldıklarında hücresel işlevi sürdürmelerini sağlayan çeşitli stres yanıt mekanizmalarına sahiptir. Stres-aktif kinazlar tarafından başlatılan bir sinyal yolu olan ve eukaryotic Translational Initiation Factor (eIF2 α)'ün forforile hale gelmesini sağlayan süreç bu mekanizmalardan birisidir (Ryoo ve Vasudevan 2017; Walter ve Ron 2011). eIF2 α 'nın fosforile halde kalması ile hücresel düzeyde translasyon başlama aktivitesi inhibe edilmekte böylece ER stresi sırasında protein yükünün azaltılmasına bağlı olarak sitoprotektif etkiye sebep olduğu bildirilmektedir (Hotamisligil 2010).

4.8. SALUBRİNAL

Stres koşullarında tüm ökaryotik hücrelerde, eIF2 α 'nın fosforilasyonu aracılığıyla protein sentezinde azalma sağlanmaktadır. Serin/treonin protein fosfataz 1 (PP1) kofaktörü olan GADD34 serin/treonin PP1'e bağlıdır ve eIF2 α 'nın defosforilasyonuna sebep olmaktadır. SAL (SAL) (C21H17Cl3N4OS, (E)-3-phenyl-N-[2,2,2-trichloro-1-(quinolin-8-ylcarbamothioylamino)ethyl]prop-2-enamide) PP1/GADD34 kompleksini inhibe ederek eIF2 α 'nın defosforilasyonunu engelleyip fosforile halde kalmasına neden olmaktadır (Şekil 13). eIF2 α fosforile halde kalması sayesinde total protein translasyonunda azalmaya bağlı olarak katlanmamış veya hatalı katlanmış protein sentezi azalmaktadır. SAL genel apoptoz inhibitörü olmamakla birlikte ER stresini baskıladığı yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir (Boyce ve ark. 2005; Choy ve ark. 2015; Michalak ve Gye 2015; Sui ve ark. 2017).



Şekil 13. SAL Kimyasal Formülü.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

Tez çalışmalarımızın tamamı Manisa Celal Bayar Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı ve Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi bünyesindeki Multidisipliner Hücre Kültürü ve Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

5.1.KULLANILAN CİHAZLAR

Tezde kullanılan cihazlar markaları ile birlikte tabloda verilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Çalışmada kullanılan cihazlar.

Cihaz Adı	Marka
Otomatik pipetler (0,5-10µl, 2-20µl, 20-200µl, 100-1000µl)	Eppendorf®
Otomatik Pipet Tabancası	Eppendorf®
Biyogüvenlik kabini (Class II)	Esco
CO2 inkübatörü	Esco
Soğutmalı santrifüj	Sigma
Floresan ataçmanlı inverted mikroskop	Zeiss
Multiplaka ELİSA okuyucusu	Thermo
Buzdolabı	Vestel
Derin dondurucu (-86 °C)	Thermo
Derin dondurucu (-20°C)	Vestel
Vorteks	Heidolph
Hassas terazi	Kern
Su Banyosu	Lauda
Sitosantrifüj Cihazı	Thermo

5.2.KULLANILAN KİMYASAL VE SARF MALZEMELER

Kullanılan Kimyasal ve sarf malzemeler markaları ile birlikte tablo halinde özetlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Çalışmada kullanılan malzemeler

Kimyasal- Sarf Malzeme Adı	Marka
SAL	Sigma SML0951
DMEM	ATCC 30-2002
FBS	PAN Biotech P30-3302
Tripsin-EDTA	Capricorn TRY-3B
DMSO	PAN Biotech P60-36720100
HBSS	Gibco
PBS-Tween20	Thermo
%3 Hidrojen Peroksit	Thermo
Kapama Medyumu	Thermo Scientific TA-125-UG
T25 Flask	SUNUBIS/TCF-25V
T75 Flask	SUNUBIS/TCF-75V
Falkon Tüp (15 ml)	Tarsons 546021
Falkon Tüp (50 ml)	Tarsons 546041-RK
Hücre Kazıyıcı	Sarstedt 83.1832
Mikroplaka (96'lı, 24'lü)	SUNUBIS/TCP-24, SUNUBIS/TCP-96
Şırınga Filtresi	GVS
MTT toksitite kiti	Boster AR1156
Steril Pipet Uçları (0.1-10 µL, 10-100, 100-1000 µL, 1-5 mL)	İsolab TB010
Serolojik Pipetler (2 ml, 5 ml, 10 ml)	SDL 91001, SDL 91005, SDL 910010
Lam	Laborant ANT-MS90PC01W
Lamel	Citoglass 10212450C
DAPI	Boster AR1177
Kryotüp	Tarsons E523021

Etanol	Tekkim TK.200655.05001
RNA İzole Kiti	Ambion, Kat no., 12183018A
cDNA Sentez Kiti	Applied Biosystems, 4368814
Powerup Syber Green	Applied Biosystems, A25741

5.3. HÜCRE KÜLTÜRÜ

5.3.1. Kullanılan Hücre Hatları

GC1 (ATCC® CRL-2053™) ve GC2 (ATCC® CRL-2196™) hücre hatları ATCC (USA) firmasından ticari olarak satın alınmıştır.

5.3.2. Hücre Hattı Besiyeri İçeriği

Dulbecco'nun Modifiye Eagle's Medium DMEM (ATCC, 30-2002) içerisine %10 oranında Fetal Sığır Serum (FBS, Pan Biotech P30-3302) eklenerek kullanıma hazır besiyeri hazırlandı. Hazırlanan besiyeri uygulama yapılmadan önce 0.20 µm'lik filtreden geçirilerek steril hale getirildi.

5.3.3. Hücre İnkübasyon Koşulları

Hücrelerin %5 CO₂ 37 °C'e sıcaklıktaki inkübatörde steril şartlarda inkübe edilerek çoğalmaları sağlandı.

5.3.4. Hücre Hatlarının Pasajlanması

İnverted mikroskop altında günlük rutin olarak izlenen 25 cm² lik flasklarda bulunan hücreler %80 Konfluensi aşamasına geldiğinde besiyeri boşaltıldı. Flask içerisine 3 ml Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek 37 °C'de 5 -10 dk arasında değişen süreler içerisinde inkübasyonu sağlandı. Flaskla ve birbirleriyle bağlantısını

kaybederek asılı halde bulunan hücreler 6 ml besiyeri eklenerek 15 ml falkon tüplerine aktarıldı. 125 g de 6 dk santrifüj edildi. Santrifüj edilen hücreler 1:6 oranında bölünerek subkültüre edildi. Her 3 günde bir besiyeri değişimi gerçekleştirildi.

5.3.5. SAL Uygulama Konsantrasyonunun Hesaplanması

Ticari olarak alınan SAL'ın hücre hatlarına uygulanacağı konsantrasyonların tespiti, çalışma öncesi ön deneylerden ve literatür taraması yapılarak planlanmıştır. İlk olarak 5 mg SAL DMSO içerisinde çözündürülerek 1000 μ M stok solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan bu stok solüsyondan 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M ve 100 μ M olacak şekilde DMEM ile dilüe edilerek uygulama besiyerleri hazırlandı. Hazır konsantrasyonların sterilizasyon filtresinden geçirilerek steril edilmesi sağlandı.

5.3.6. SAL'ın Toksikite Etkisinin Analizi

Bu çalışmada SAL'ın hücre proliferasyonu ve büyümesi üzerinde herhangi bir toksik etkisinin olup olmadığının araştırılması için MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) testi kullanıldı. MTT ilk defa Wossman tarafından yapılan radyoaktif izotoplar kullanılmadan hücre büyümesinin ve canlılığının spektrofotometrik ölçüm ile analizinin yapıldığı bir testtir. Canlı ve erken apoptotik evredeki hücreler mitokondrileri içinde bulunan dehidrogenaz enzimi vasıtasıyla MTT bileşeni ile reaksiyona girer ve sonuçta mor renkli formazan kristalleri oluşur. Formazan kristalleri ölü hücrelerde oluşmamaktadır. Oluşan renk mitokondriyel aktiviteyle ilişkili olup, oluşan formazan kristalleri izopropanol/HCl veya dimetilsülfoksit (DMSO) içeren çözücülerde çözülebilmektedir ve oluşan mavi/mor renk spektrofotometrik yöntemle (mikroplaka okuyucuda) 570 nm'de ölçülmektedir. Hücreler 96 kuyucuklu mikroplakalara 1×10^6 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Buna takiben SAL hücrelere 1 μ M-100 μ M arasında değişen oranlarda 24 saat boyunca uygulanarak inkübe edildi. Uygulama sonrasında hücreler PBS ile yıkandı ve 1 dk

bekletilip PBS uzaklaştırıldı. Daha sonra, her bir kuyucuğa 100 µl taze kültür vasatı ve üzerine 10 µl MTT stok solüsyonundan eklendi . Alüminyum folyoya sarılarak inkübatörde 4 saat 37°C'de bekletildi. İnkübasyon sonrası solusyon çıkartıldıktan sonra MTT içeren kültür vasatı pipetle çekilerek uzaklaştırıldı. Hücrelere 100 µl DMSO eklendi, oda ısısında 10 dk süreyle bekletildi. Mikroplaka okuyucu spektrofotometrede 570 nm absorbands değerinde ölçüm gerçekleştirildi. Tüm deney protokolü 3 kez tekrarlandı.

5.3.7. ISM oluşturulması

İn vitro ısı stresi modeli (ISM) uygulamasına çalışma öncesi ön deneylerden ve literatür kaynaklarından elde edilen bilgiler ışığında karar verildi. Hücreler inkübatör içersinde 43 °C içersinde 60 dk da ısı stresine maruz bırakılarak ISM oluşturuldu. Maruziyet süresinin sonunda inkübatör ısısı tekrar 37 °C ye ayarlandı. ISM gruplarında besiyeri normal besiyeri ile değiştirilirken, ISMSAL gruplarında ise SAL içeren besiyeri ile değiştirilmesi sağlandı. Sonrasında hücrelerin 24 saat inkübasyonu sağlandı. 24 saat sonrasında analizlerin yapılması için hücrelerin fiksasyonu gerçekleştirildi.

5.3.8. Deney gruplarının dizaynı

SAL uygulama konsantrasyonu sonuçları sonrasında diğer analiz yöntemleri için 20 µM uygulama dozu olarak belirlendi. Kontrol grubunda herhangi bir ön işlem olmadan ISM gruplarında 60 dakika ısı stresi uygulmasının sonrasında eski besiyeri içeriğinin değiştirilmesine takiben doz uygulamasının 24 saat sonrasında analizlerin yapılması için hücrelerin fiksasyonu gerçekleştirildi. Grupların tasarımı GC1 ve GC2 hücreleri için tablo halinde özetlenmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. Deney Grupları Kısaltmaları.

	Grup Adı	Grup Kısaltması
GC1 Hücre Hattı	Kontrol Grubu	GC1-K
	Kontrol Grubu + 20 μ M SAL	GC1-SAL
	Isı Stresi Modeli	GC1-ISM
	Isı Stresi Modeli + 20 μ M SAL	GC1-ISMSAL
GC2 Hücre Hattı	Kontrol Grubu	GC2-K
	Kontrol Grubu + 20 μ M SAL	GC2-SAL
	Isı Stresi Modeli	GC2-ISM
	Isı Stresi Modeli + 20 μ M SAL	GC2-ISMSAL

5.3.9. Birim alan başına düşen hücre sayısının hesaplanması

Deney sonunda tüm gruplara ait örnekler taze besiyeri eklenmesinin ardından inverted mikroskop altında 20x büyütmede 5 fotoğraf çekilerek birim alana düşen hücre sayısı İmage J yazılım programı kullanılarak hesaplandı.

5.4. İMMÜNFLORESAN İNCELEME

5.4.1.Hücrelerin Fiksasyonu

Hücrelerin fiksasyonu için süspanse hale getirilen hücreleri santrifüj yolu ile lam üzerinde tek tabaka halde yaymayı sağlayan Sitospin cihazı kullanıldı. Deney sonrasında hücreler kazıyıcı kullanılarak flasklardan toplandı. Elde edilen hücre süspansiyonu 1000 rpm’da 5 dk santrifüj edilip ardından süpernatant kısım uzaklaştırıldı. Hücreler Hanks’ın Dengeli Tuz Çözeltisi (Hanks Balanced Salt Solution; HBSS) ile tekrar resüspanse edildi. Lam ve sitofunnel sitoklip aracılığıyla sabitlendi ve sitospin cihazına yerleştirildi. Sitofunnel üzerinde bulunan örnek haznesine süspansiyon eklenerek 1500 rpm 5 dk santrifüj işlemi

gerçekleştirildi. Santrifüj işlemi sonrasında lama yayılan örnekler kurutulduktan sonra %95'lik etanolde 15 dk fikse edildi.

5.4.2 İmmü floresan Boyama

Boyama nemli ortamda kapalı bir şekilde gerçekleştirildi. Lam yüzeyindeki hücre yayması hücre sınırlama kalemi kullanılarak yuvarlak içine alındı. 1 dk distile su uygulamasının ardından %3'lük hidrojen peroksit 5 dk uygulandı. Tween 20 içeren PBS ile 3 dk yıkandı. Sonrasında 30 dk Bloklama serumu ile inkübe edildi. Bloklama serumu sonrasında HSP70 (Biorbyt, orb147550), p-eIF2 α (Bioss, BS-4842) p-PERK (Bioss, bs-3330R), p- IRE1 α (Biorbyt, orb157704), ATF6 (Bioss, bs-1634R) ve GRP78 (Bioss, bs-1219R) primer antikorları ile bir gece +4 0C inkübe edildi. PBS-tween 20 ile 3 dk yıkandı, oda sıcaklığında karanlık ortamda 1 saat süresince 1:500 anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 Conjugate (Thermo, CST #4412) ve Anti-mouse IgG Alexa Fluor 555 Conjugate (Thermo, CST #4409) sekonder antikorları ile inkübe edildi. Sonrasında 1:1 oranında hazırlanan 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ve kapama medyumunu ile kapatıldı.

5.4.3. İmmü floresan Değerlendirme

İmmü floresan yöntemle boyanan preparatlarda kantitatif floresan yoğunluğunun ölçümü İmage J Görüntü Analiz Yazılımı (v1.48, National Institutes of Health) kullanılarak yapıldı. Floresan ataçmanlı inverted mikroskobu altında her bir gruptan rastgele 20x büyütmede 10 farklı alanda tiff formatında görüntü alındı. Görüntüler İmage J analiz programına aktarıldıktan sonra floresan ölçümleri yapıldı. Ölçüm sonrasında CTCF (Corrected Total Cell Fluorescence) değerleri CTCF= Bütün yoğunluk – (Seçilen Alan x Arka plan Floresan Okumasının Ortalaması) formülü kullanılarak hesaplandı (Piera-Velazquez ve ark 2015).

5.5. qRT-PCR İNCELEME

5.5.1. Total RNA İzolasyonu

Tüm gruplardaki hücreler deney bitimi sonrasında 500 µl PBS ile yıkandı. Yıkanmaya takiben 500 µl PBS içerisinde 1500 rpm’da 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısım uzaklaştırıldı. RNA izolasyonu üretici firmanın önerdiği protokole göre yapılmıştır (Ambion, Purelink RNA Mini Kit, Kat no., 12183018A). RNA izolasyonunda aşağıda verilen basamaklar sırasıyla uygulanmıştır.

1. Santrifüjle çöktürülen hücreler %1 2- merkaptoetanol içeren 600 µl Lizis Tampon Çözeltilisi ile süspanse edilerek vortekslle homojen bir şekilde karıştırıldı.
2. Oluşan hücre lizatına 600 µl %70 etanol eklenerek vortekslendi.
3. Toplama tüpüne yerleştirilen spin kolonu üzerine 700 µl örnek solüsyonu eklenerek, 15 saniye 12.000 rpm’de santrifüj edildi. Örnek lizatı bitene kadar bu aşama tekrar edildi.
4. Toplama tüpü boşaltıldı ve spin kolon üzerine 700 µl Yıkama Solüsyonu I (WBI) eklenerek 15 saniye 12.000 rpm’de santrifüj edildi.
5. Toplama tüpü tekrar boşaltıldı ve spin kolon üzerine 500 µl Yıkama Solüsyonu II (WBII) eklenerek 12.000 rpm’de 15 saniye santrifüj edildi. Bu aşama 2 kez tekrarlandı.
6. Toplama tüpü boşaltıldı ve spin kolon kuru bir şekilde 12.000 rpm.’de 2 dk santrifüj edildi.
7. Toplama tüpü çıkarıldı ve spin kolon recovery tüpüne yerleştirildi.
8. Spin kolon merkezine 100 µl RNAaz-free su ilave edilerek 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
9. 12.000 rpm.’de 2 dk. Santrifüj edildi ve RNA’nın membran recovery tüpe aktarımı sağlandı.

5.5.2. RNAların Kalite Kontrolü

Elde edilen RNA örneklerinin Maestro NanoDrop cihazı kullanılarak kalitatif ve kantitatif analizleri spektrofotometrik ölçümle yapıldı.

5.5.3. Komplementer DNA (cDNA) sentezi

Hücrelerden elde edilen RNA hiç bekletilmeden cDNA'ya çevrildi. cDNA sentezi için High Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (Applied Biosystems, Kat. No: 4368814) kullanıldı. 2 µl 10X RT Buffer, 0,8 µl 25X dNTP mix, 2 µl Random Primer, 1 µl Multiscribe Reverse Transkriptaz, 4,2 µl ddH₂O ve 10 µl elde edilen RNA eklenerek RNA-primer karışımı oluşturuldu (Tablo 4).

Tablo 4. Komplementer DNA sentezi için gerekli madde ve miktar listesi.

Madde	Miktar
10X RT Buffer	2 µl
25X dNTP mix	0,8 µl
Random Primer	2 µl
Multiscribe Reverse Transkriptaz	1 µl
ddH₂O	4,2 µl
RNA	10 µl
Total Hacim	20 µl

Total hacmi 20 µl olan karışım 96 kuyucuklu mikrolakalara yüklenerek StepOnePlus Real Time PCR cihazına yüklendi. Tabloda (Tablo 5) belirtilen işlem basamakları takip edilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar qRT-PCR analizi yapılincaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

Tablo 5. cDNA sentez aşamaları.

	1.Aşama	2.Aşama	3.Aşama	4.Aşama
		ma	a	
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Süre (Dk)	10	120	5	∞

5.5.4. qRT-PCR

cDNA sentezi sonrasında hücrelerde üretilen PERK, GRP78 ve eIF2a'nın mRNA ekspresyon miktarlarının ölçülmesinin sağlanması amaçlanmıştır. qRT-PCR'da kullanılacak primer problemler hazır olarak üretici firmadan (SentebioLab, Ankara) alındı. qRT-PCR çalışması için PERK, GRP78 ve eIF2a mRNA dizileri için uygun primerler literatür taraması ve web tabanlı yazılım programı primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) programı kullanılarak tasarlandı. Çalışmada kullanılan mRNA dizileri tablo halinde verilmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. Kullanılan mRNA primer dizileri.

Gen İsmi	Primer Dizisi	Baz Çifti	Kaynak
PERK	F GGTATTTCAACGCCTGGCTG	20	Zanotto ve ark 2016
	R GGCCAGTCTGTGCTTTCGTC	20	
eIF2α	F TTCGACCTCCCAAAGCAGT	20	Kuang ve ark 2016
	R TTGTAGGTTAGGCGTCCCAG	20	
GRP78	F GGCGTGAGGTAGAAAAGG	18	Zhang ve ark 2017
	R ATGGTAGAGCGGAACAGG	18	

qRT-PCR gen analizi için PowerUp Syber Green Kiti kullanıldı (Tablo 7). Deneyisel hataları minimuma indirmek amacıyla tüm analizler steril şartlarda ve aynı koşullarda 3 kez tekrarlandı. Tablo halinde verilen koşullarda (Tablo 8) ve program süreleriyle reaksiyon kuruldu. Veriler analiz sonunda alındı ve her bir örnek referans genin ifadesine göre normalize edildi. Örnekler arasındaki ifade farkları $2^{\Delta\Delta Ct}$ hesaplamasına göre yapıldı.

Tablo 7. qRT-PCR kullanılan bileşen madde ve miktarları.

Bileşen Madde (her bir kuyucuk için)	Miktar
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (2X)	5 µl
Forward ve reverse primer mix	0,8 µl
cDNA (10ng) +Nuclease-Free Water	4,2 µl
Total	10 µl

Tablo 8. qRT-PCR aşamaları.

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
UDG aktivasyonu	50°C	2 dk	40
Dual-Lock™ DNA polimeraz	95°C	2 dk	
Denatürasyon	95°C	15 saniye	
Amplifikasyon/Uzama	60°C	1 dk	

5.6.İSTATİSTİKSEL ANALİZ

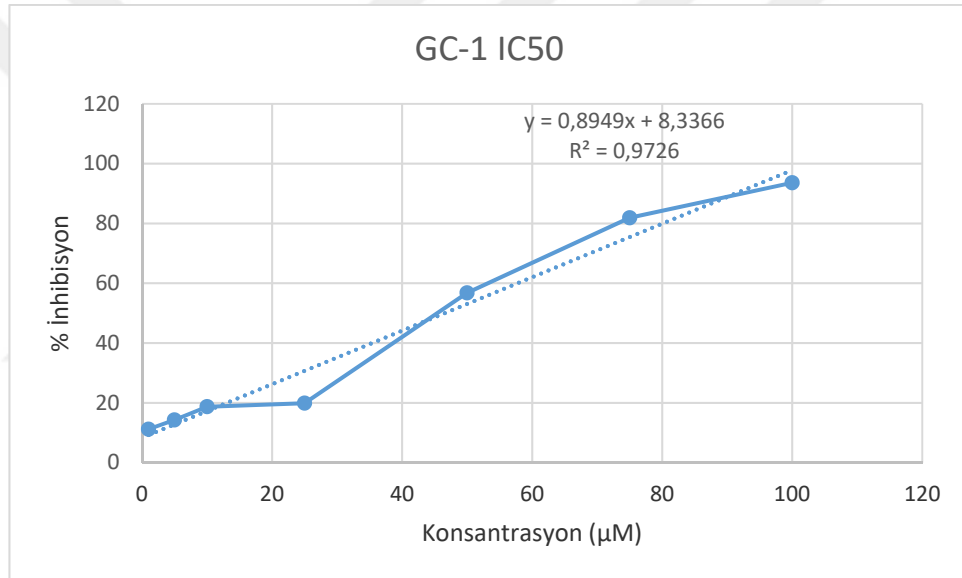
İmmünfloresan boyamalar için gruplar arası farkın istatistik kontrollerinde One-Way ANOVA (Tek Yönlü Varyans Analizi) testi kullanıldı. Çoklu karşılaştırma için Post hoc testi olarak Sidak testi kullanıldı. qRT-PCR ve birim alana düşen hücre sayısının istatistiksel analizi için non parametrik istatistiksel analiz olan Kruskal Wallis testi uygulandı. Çoklu karşılaştırma için Post hoc testi olarak Dunn testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme sonuçlarında $P \leq 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi. Elde edilen sayısal veriler Graphpad Prism 8.3.0 lisanslı istatistik analiz programı kullanılarak değerlendirildi.

6. BULGULAR

6.1. MTT BULGULARI

6.1.1. GC1 Hücre Hattı SAL MTT Bulguları

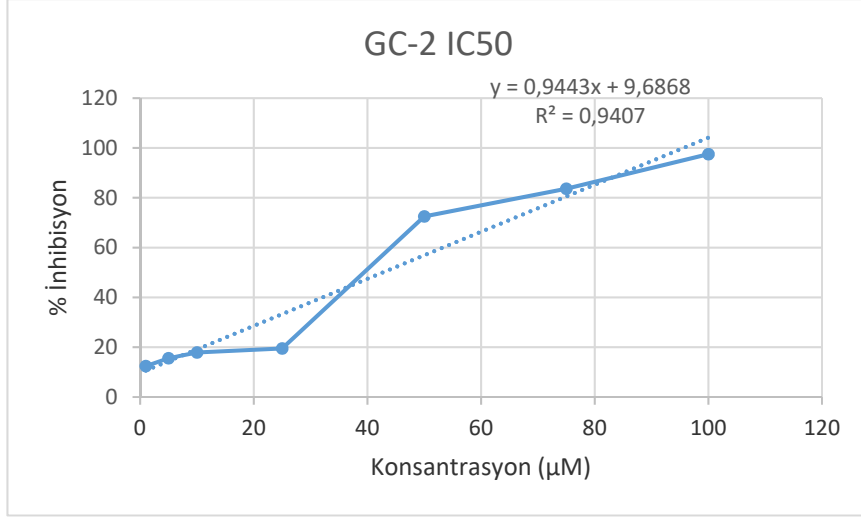
In vitro şartlarda gerçekleştirilen deneyde MTT sonuçları ile SAL'ın artan doz uygulamalarında (1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 µM) GC1 hücre hattında canlılık üzerine etkileri değerlendirildi. Yapılan MTT analizi sonucu GC1 hücre hattında SAL'ın IC50 değeri 46,5564 µM olarak bulundu (Şekil 14). Artan konsantrasyon seviyelerine bağlı olarak inhibisyon yüzdesinin arttığı saptandı.



Şekil 14. GC1 SAL Uygulaması Konsantrasyon ve % İnhibisyon Grafiği.

6.1.2. GC2 hücre hattı SAL MTT bulguları

In vitro şartlarda gerçekleştirilen deneyde MTT sonuçları ile SALın artan doz uygulamalarında (1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 µM) GC2 hücre hattında canlılık üzerine etkileri değerlendirildi. Yapılan MTT analizi sonucu GC2 hücre hattında SALın IC50 değeri 42,691 µM olarak bulundu (şekil 15). Artan konsantrasyon değerleri ile orantılı olarak inhibisyon yüzdesinin arttığı bulundu.

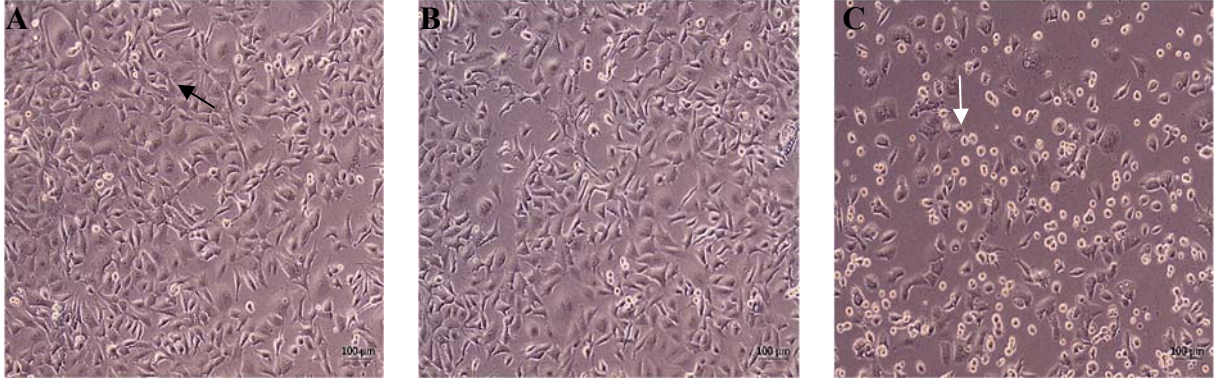


Şekil 15. GC2 SAL Uygulaması Konsantrasyon ve % İnhibisyon Grafiği.

6.2 HÜCRE KÜLTÜRÜ SAL UYGULAMA BULGULARI

6.2.1. GC1 Hücre Hattı SAL Uygulama Bulguları

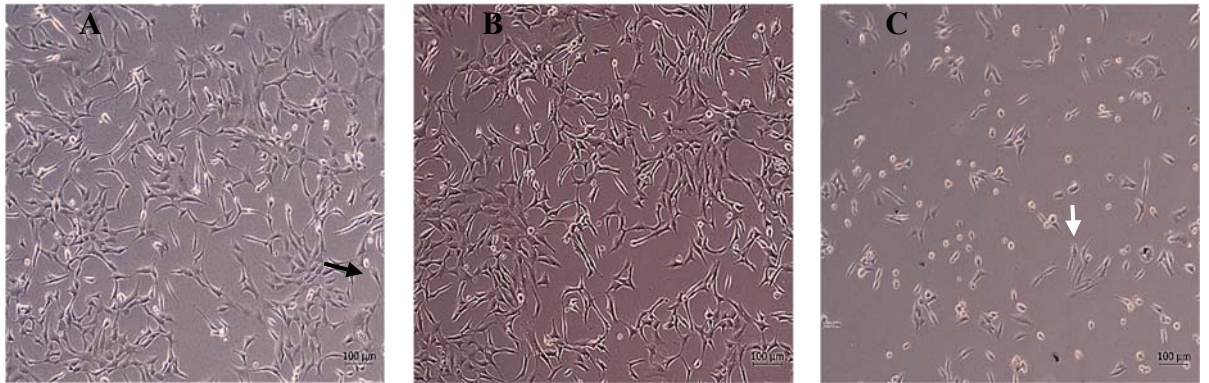
GC1 hücre hattının normal koşullar altında herhangi bir uygulama yapılmadığında epiteloid karakter sergilediği görüldü (Resim 1A). Deney uygulama dozu olarak seçilen 20 µM SAL uygulamasının hücreler üzerinde minimal seviyede inhibisyon yaptığı bulundu. Hücrelerin epiteloid karakterlerini uygulama süresince korudukları gözlemlendi (Resim 1B). IC50 dozunda yapılan uygulamada ise hücreler üzerinde ciddi oranda sitotoksitite ve sitopatik etki gösterdiği saptandı. Morfolojik olarak hücrelerin yuvarlaklaştığı ve hacim olarak küçüldüğü saptandı (Resim 1C).



Resim 1. GC1 SAL Uygulaması Hücre Kültürü Fotoğrafları. GC1 normal besiyerinde olan hücrelerin epiteloid hücre karakteri sergilediği (A), 20µM SAL uygulanan hücrelerde inhibisyonun çok az düzeyde olduğu (B), IC50 dozunda ise inhibisyonun daha yüksek oranda olduğu gözlemlendi (C). Siyah ok: Canlı Hücre. Beyaz Ok: Ölü Hücre.

6.2.2. GC2 hücre hattı SAL uygulama bulguları

GC2 hücre hattında herhangi bir uygulama yapılmadığında hücrelerin epiteloid benzeri karakter sergilediği ve hücrelerin uzantı oluşturduğu gözlemlendi (Resim 2A). Hücre besiyeri içerisine 20 µM SAL ilavesi yapılan hücrelerde inhibisyon seviyesinin az olduğu görüldü (Resim 2B). Bulunan IC50 değerinde besiyerine SAL uygulaması yapılmasının hücrelerde yüksek oranda sitotoksik ve sitopatik etkinliğe neden olduğu saptandı (Resim 2C).

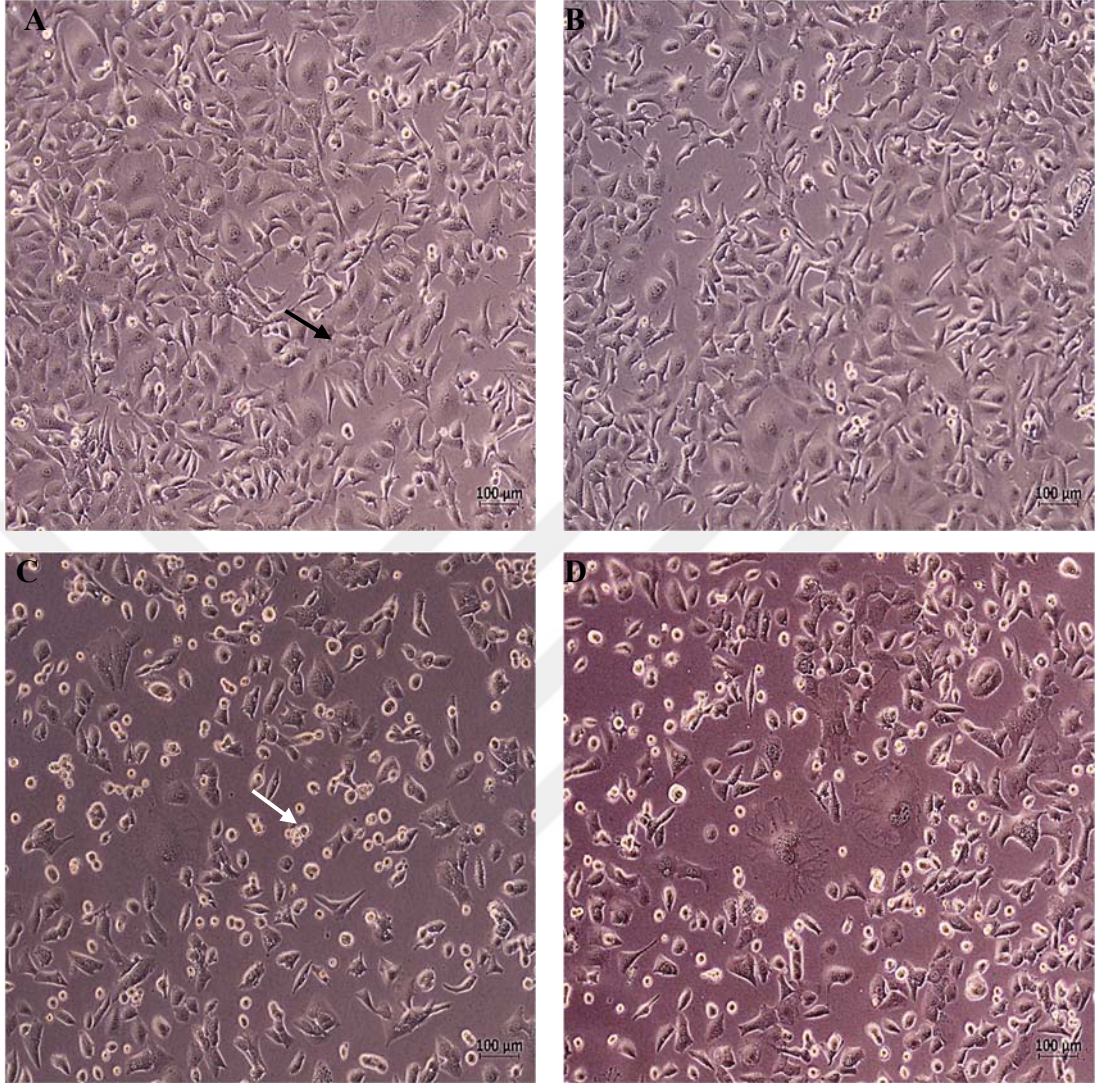


Resim 2. GC2 SAL Uygulaması Hücre Kültürü Fotoğrafları. GC2 hücre hattında kontrol grubunda epiteloid benzeri karakter sergilediği (A), 20 µM SAL ilavesi yapılan grupta hücre sayısının normale yakın olduğu (B), IC50 değerinde besiyerine SAL uygulaması yapıldığında çok sayıda hücre sayısının azaldığı görülmektedir (C). Siyah Ok: Canlı hücre. Beyaz Ok: Ölü hücre.

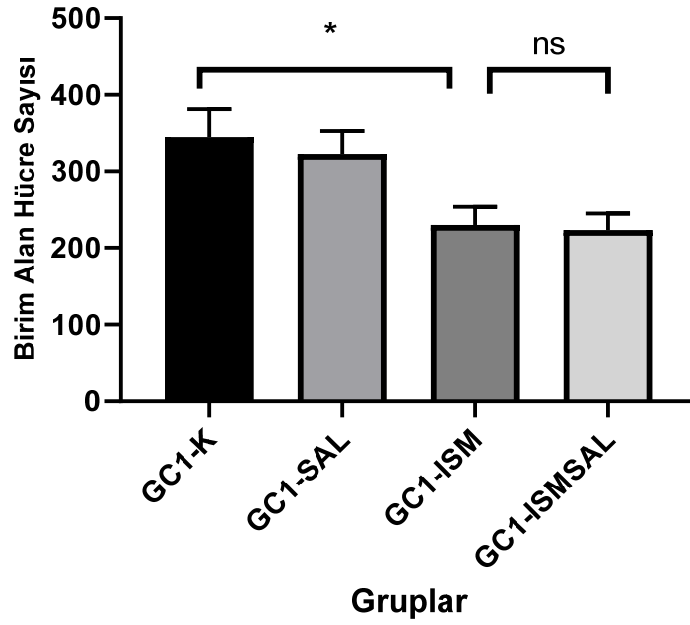
6.3.ISİ STRESİ UYGULAMA BULGULARI

6.3.1. GC1 Isı Stresi Uygulama Bulguları

Isı uygulaması yapılmayan GC1-K grubunda birim alan başına düşen hücre sayısı $344,6 \pm 36,81$ bulundu. Hücrelerin morfolojik özelliklerini koruduğu ve konfluent olduğu gözlemlendi (Resim 3A). GC1-SAL grubunda ise birim alan başına düşen hücre sayısı $322,8 \pm 29,72$ bulundu. Hücrelerin morfolojik özelliklerini korudukları gözlemlendi (Resim 3B). GC1-ISM grubunda birim alana düşen hücre sayısı $230,2 \pm 23,72$ bulundu. Hücre sayısında azalma ve hücreler üzerinde sitopatik etkinin olduğu saptandı (Resim 3C). GC1-ISMSAL grubunda ise birim alana düşen hücre sayısı $223,4 \pm 21,79$ olarak hesaplandı. Hücrelerin morfolojik olarak değişime uğradığı, sitopatik etkinliğin olduğu ve hücrelerde sayısal azalmanın meydana geldiği saptandı. (Resim 3D). Yapılan istatistiksel analiz sonrasında gruplar arasında anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$) (Şekil 16).



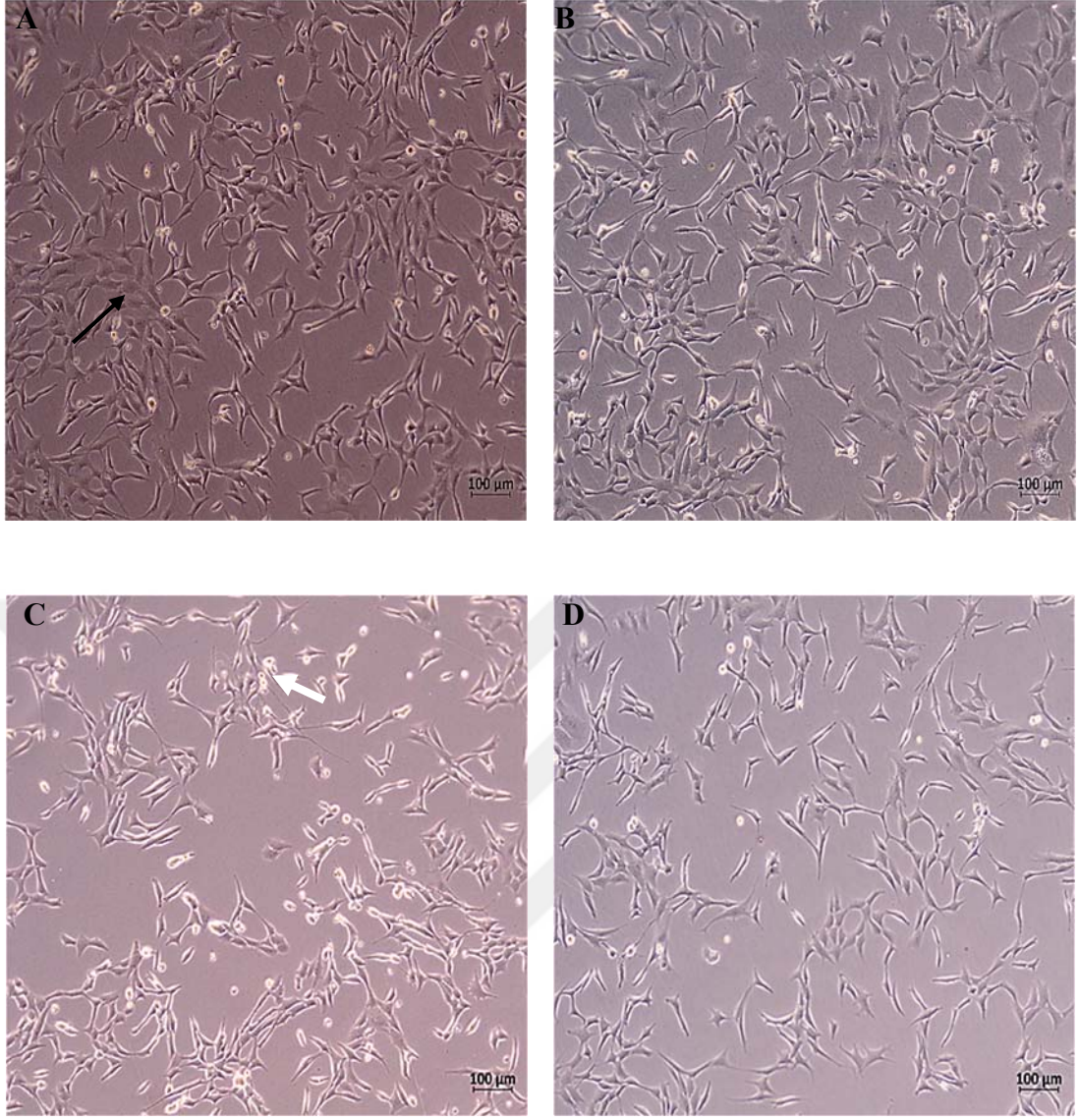
Resim 3. GC1 Deney Grupları İnvrted Mikroskop Görüntüleri. (A) GC1-K, (B) GC1-SAL, (C) GC1-ISM, (D) GC1-ISMSAL. ISM uygulanan gruplarda (C,D) hücre sayısındaki azalma dikkat çekmektedir. Siyah Ok: Canlı hücre. Beyaz Ok: Ölü hücre



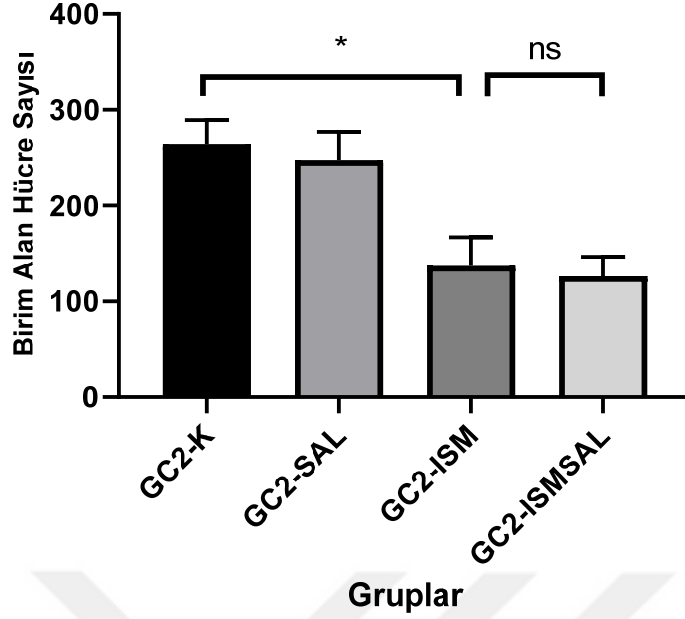
Şekil 16. GC1 hücre hattı birim alan hücre sayısı grafiği. Gruplar arası karşılaştırmada Kruskal Wallis istatistiksel analizi yapıldı. . Çoklu karşılaştırma için Post hoc testi olarak Dunn testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme sonuçlarında $P \leq 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

6.3.2. GC2 ısı stresi uygulama bulguları

Isı uygulaması yapılmayan GC2-K grubunda birim alan başına düşen hücre sayısı $264 \pm 25,16$ bulundu. Hücrelerin morfolojik özelliklerini koruduğu ve herhangi bir sitopatik bulgunun olmadığı gözlemlendi (Resim 4A). GC2-SAL grubunda ise birim alan başına düşen hücre sayısı $247,6 \pm 29,20$ bulundu. Hücrelerin morfolojik özelliklerini korudukları gözlemlendi (Resim 4B). GC2-ISM grubunda birim alana düşen hücre sayısı $137,6 \pm 29,36$ bulundu. Hücre sayısında azalma ve hücreler üzerinde sitopatik etkinin olduğu saptandı (Resim 4C). GC2-ISMSAL grubunda ise birim alana düşen hücre sayısı $126,6 \pm 19,69$ olarak hesaplandı. Hücrelerin morfolojik olarak değişime uğradığı, sitopatik etkinliğin olduğu fakat GC2-ISM grubuna göre daha az olduğu ve hücrelerde sayısal azalmanın meydana geldiği saptandı. (Resim 4D). Yapılan istatistiksel analiz sonrasında gruplar arasında anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$) (şekil 17).



Resim 4. GC2 Deney Grupları İnvrted Mikroskop Görüntüleri. (A) GC2-K, (B) GC2-SAL, (C) GC2-ISM, (D) GC2-ISMSAL. ISM modeli uygulanan hücre gruplarında (C,D) hücre sayısındaki azalma dikkat çekmektedir. Siyah Ok: Canlı Hücre. Beyaz ok: Ölü hücre.

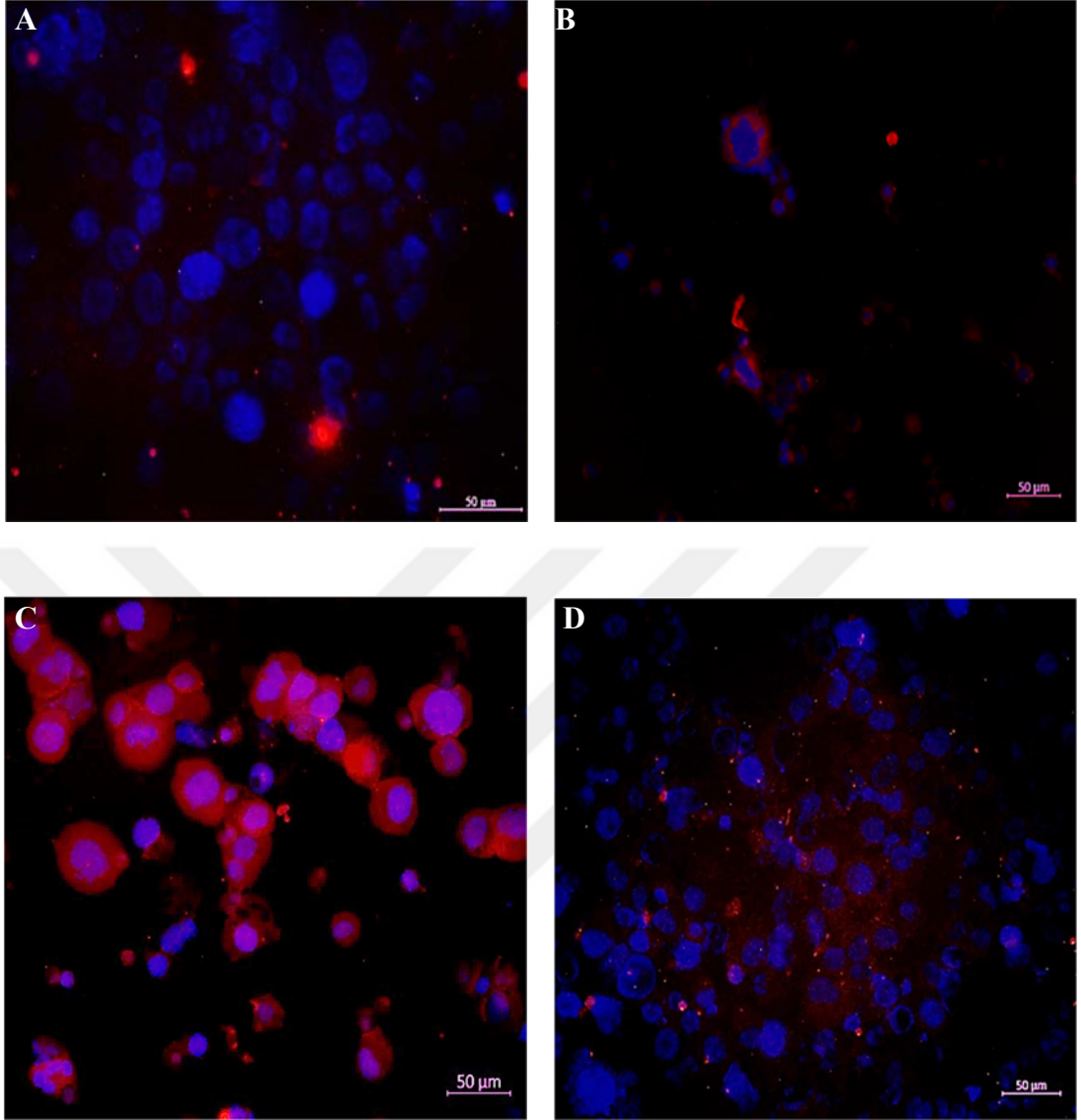


Şekil 17. GC2 hücre hattı birim alan hücre sayısı grafiği. Gruplar arası karşılaştırmada Kruskal Wallis istatistiksel analizi yapıldı. . Çoklu karşılaştırma için Post hoc testi olarak Dunn testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme sonuçlarında $P \leq 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi

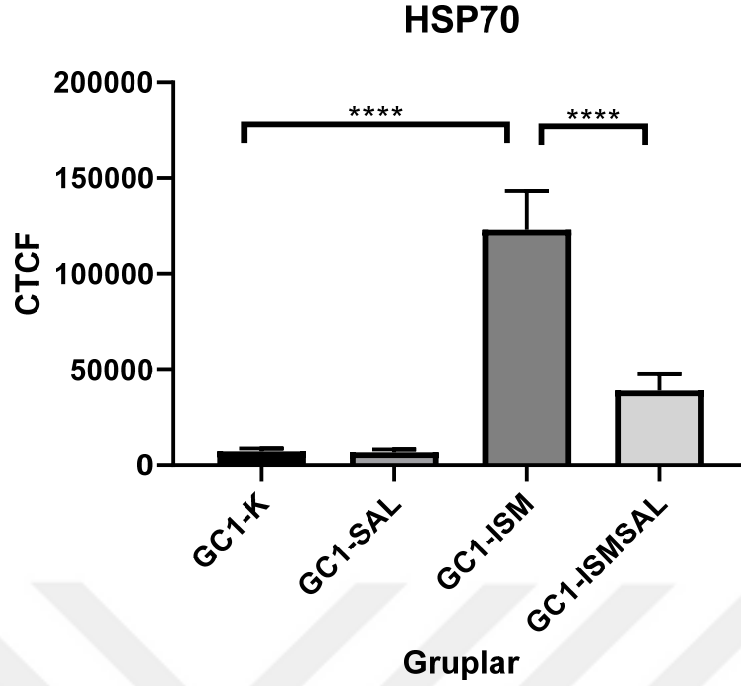
6.4. İMMÜNFLORESAN İNCELEME BULGULARI

6.4.1.HSP70 bulguları

Yapılan HSP70 immünfloresan boyaması sonrasında her bir gruptan 20x büyütmede 10 farklı alanda CTCF değerleri hesaplandı. GC1 hücre hattı için CTCF değerleri sırasıyla GC1-K grubunda (Resim 5A) $7\,269 \pm 1\,428$ GC1-SAL (Resim 5B) grubunda $6\,775 \pm 1\,476$ GC1-ISM (Resim 5C) grubunda $123\,156 \pm 20\,129$ ve GC1-ISMSAL (Resim 5D) grubunda $39\,058 \pm 8\,737$ bulundu. İstatistiksel değerlendirme sonrasında GC1-K ve GC1-SAL grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p \geq 0,05$). HSP70 CTCF değerlerinin GC1-ISM grubunda GC1-K grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı bulundu ($p \leq 0,05$). SAL uygulanan GC1-ISMSAL grubunda GC1-ISM grubuna göre CTCF değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış bulundu ($p \leq 0,05$). Gruplar arasında farkların değerlendirildiği istatistiksel veriler grafik halinde özetlendi (Şekil 18).

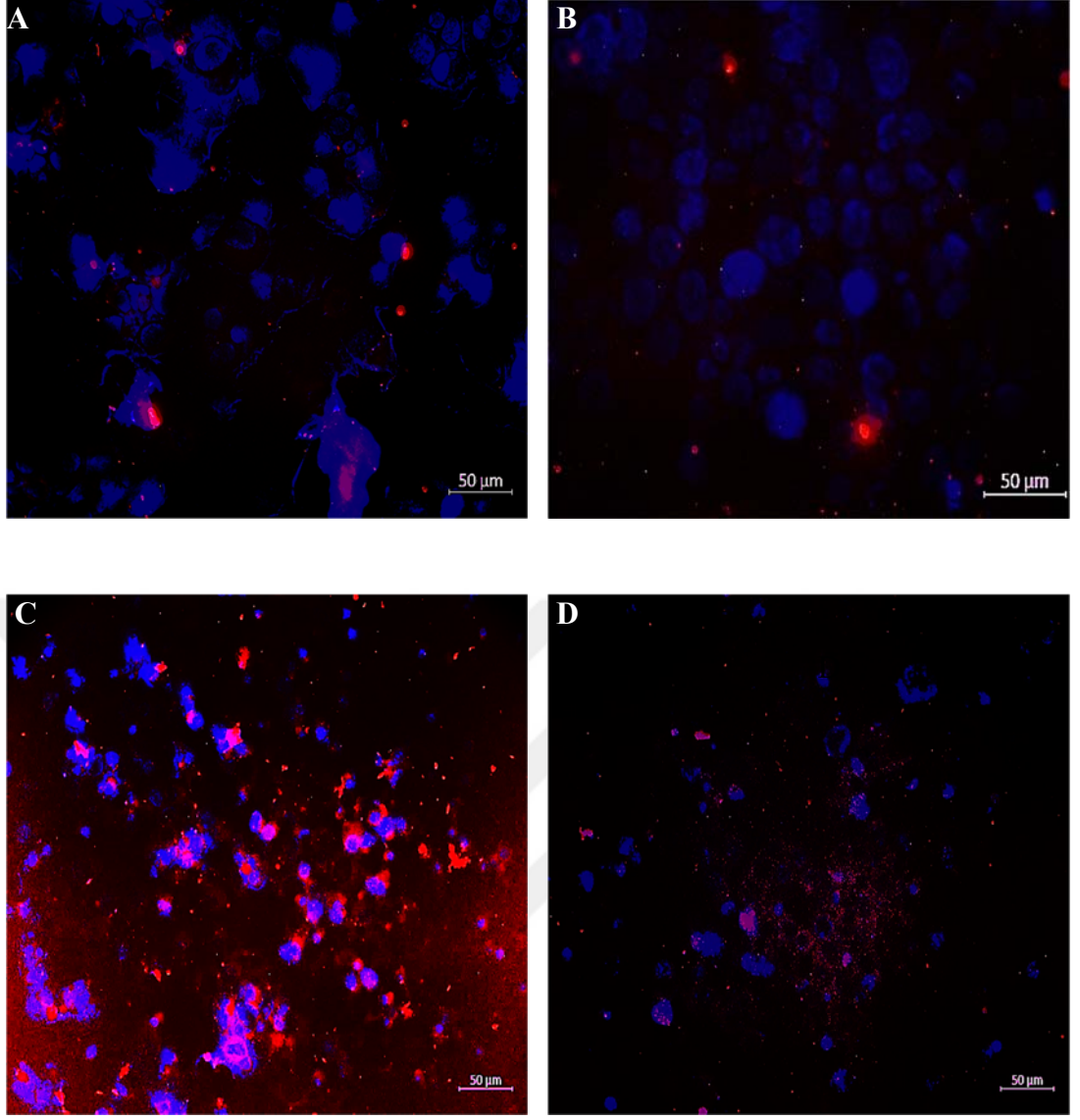


Resim 5. GC1 hücre hattı HSP70 immünfloresan boyama görüntüleri. Anti-HSP70 primer antikor ile boyanan örneklerin immünfloresan boyamasında GC1-K (A) ve GC1-SAL (B) grubu hücrelerinin zayıf immünoreaktivite; GC1-ISM (C) grubunda şiddetli immünoreaktivite; GC1-ISMSAL (D) grubunda orta immünoreaktivite olduğu görülmektedir. Çekirdek boyaması DAPI ile yapılmıştır.

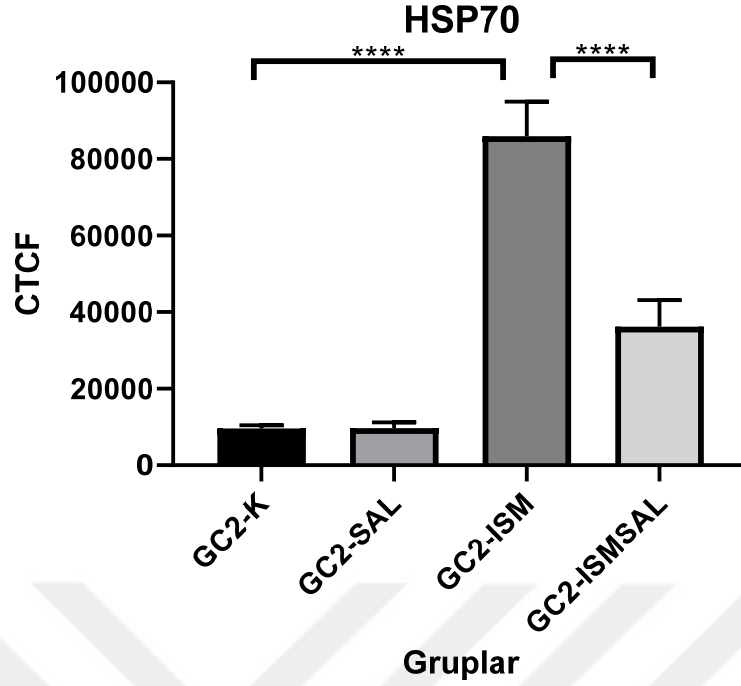


Şekil 18. GC1 Hücre hattı HSP70 İmmünfloresan Yoğunluk İstatistiksel Analiz Sonuçları. Gruplar arası karşılaştırmada One-Way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) yapıldı. Çoklu karşılaştırma için Post hoc testi olarak Sidak testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme sonuçlarında $P \leq 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

GC2 hücre hattı HSP70 immünfloresan boyama CTCF değerleri sırasıyla GC2-K grubunda (Resim 6A) $9\,619 \pm 873,9$ GC2-SAL (Resim 6B) grubunda $9\,733 \pm 1\,459$ GC2-ISM (Resim 6C) grubunda 85983 ± 9004 ve GC2-ISMSAL (Resim 6D) grubunda $36\,204 \pm 6\,925$ bulundu. İstatistiksel değerlendirme sonrasında HSP70 CTCF değerlerinin GC2-ISM grubunda GC2-K grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı bulundu ($p \leq 0,05$). SAL uygulanan GC2-ISMSAL grubunda GC2-ISM grubuna göre CTCF değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı değişim bulunamadı ($p \geq 0,05$). Gruplar arasında farkların değerlendirildiği istatistiksel veriler tablo halinde özetlendi (Şekil 19).



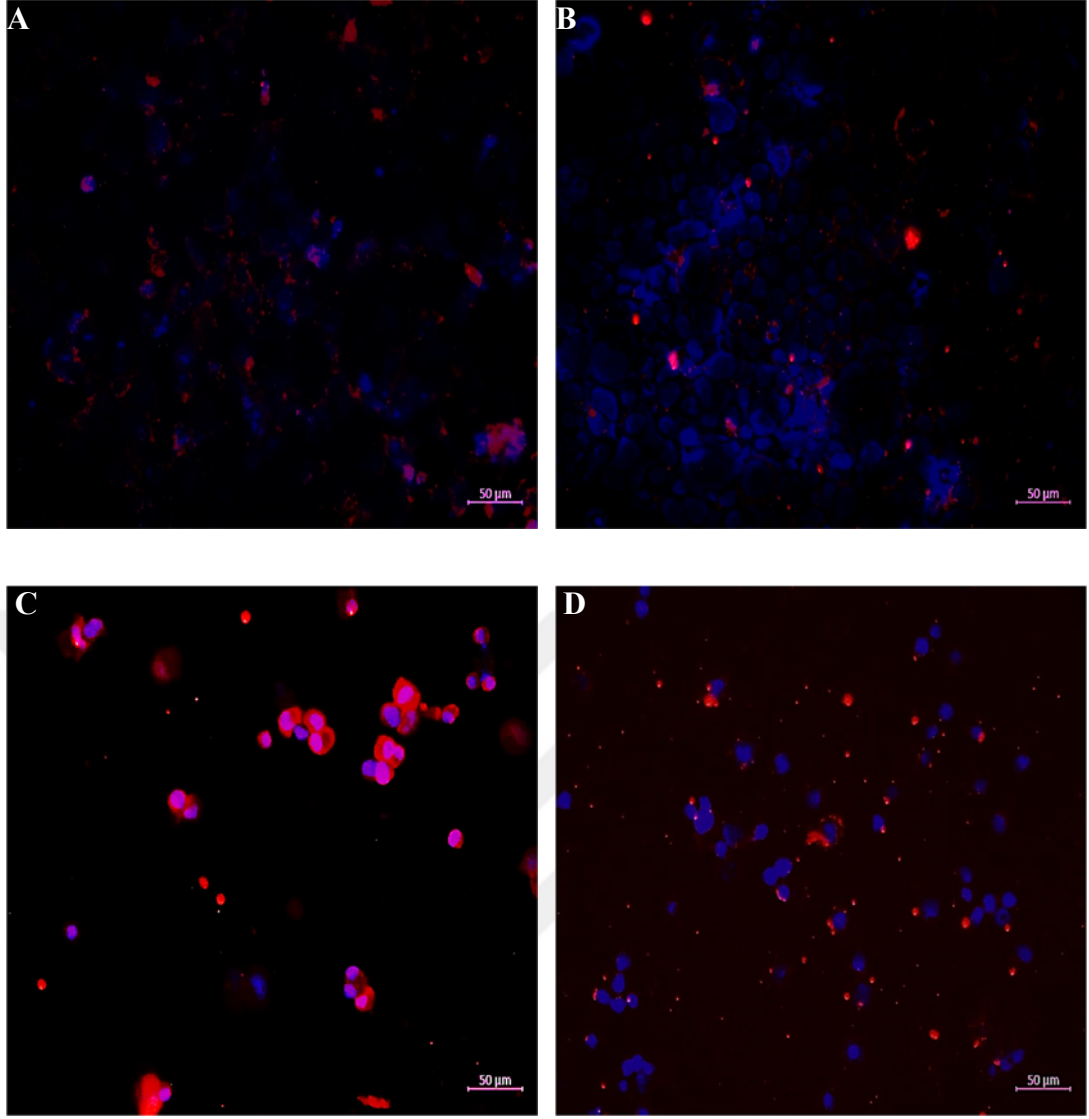
Resim 6. GC2 hücre hattı HSP70 immünfloresan boyama görüntüleri. Anti-HSP70 primer antikor ile boyanan örneklerin immünfloresan boyamasında GC2-K (A) ve GC2-SAL (B) grubu hücrelerinin zayıf immünoreaktivite; GC2-ISM (C) grubunda şiddetli immünoreaktivite; GC2-ISMSAL (D) grubunda orta immünoreaktivite olduğu görülmektedir. Çekirdek boyaması DAPI ile yapılmıştır.



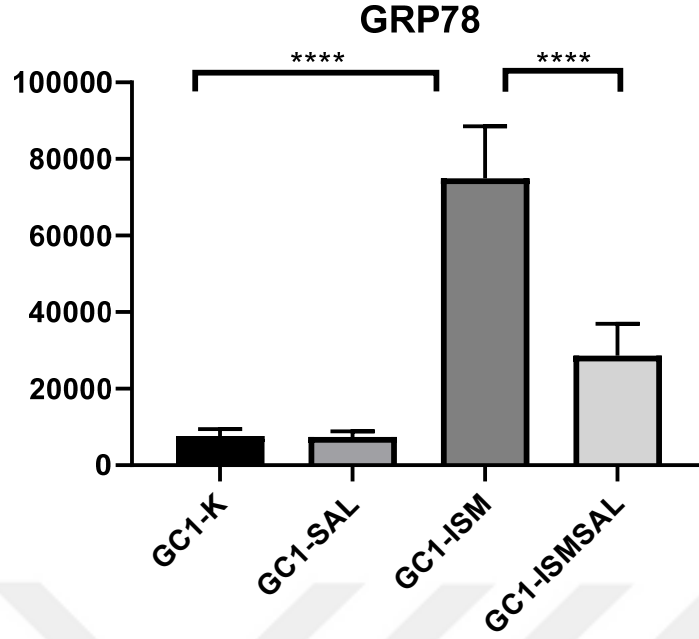
Şekil 19. GC2 Hücre hattı HSP70 İmmünfloresan Yoğunluk İstatistiksel Analiz Sonuçları. Gruplar arası karşılaştırmada One-Way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) yapıldı. Çoklu karşılaştırma için Post hoc testi olarak Sidak testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme sonuçlarında $P \leq 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

6.4.2. GRP78 bulguları

Yapılan GRP78 immünfloresan boyaması sonrasında her bir gruptan 20x büyütmede 10 farklı alanda CTCF değerleri hesaplandı. GC1 hücre hattı için CTCF değerleri sırasıyla GC1-K grubunda (Resim 7A) $7\,609 \pm 1\,887$ GC1-SAL (Resim 7B) grubunda $7\,402 \pm 1\,432$ GC1-ISM (Resim 7C) grubunda $74\,973 \pm 13\,580$ ve GC1-ISMSAL (Resim 7D) grubunda $28\,627 \pm 8\,342$ bulundu. İstatistiksel değerlendirme sonrasında GC1-K ve GC1-SAL grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p \geq 0,05$). GRP78 CTCF değerlerinin GC1-ISM grubunda GC1-K grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı bulundu ($p \leq 0,05$). SAL uygulanan GC1-ISMSAL grubunda GC1-ISM grubuna göre CTCF değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış bulundu ($p \leq 0,05$). Gruplar arasında farkların değerlendirildiği istatistiksel veriler tablo halinde özetlendi (Şekil 20).

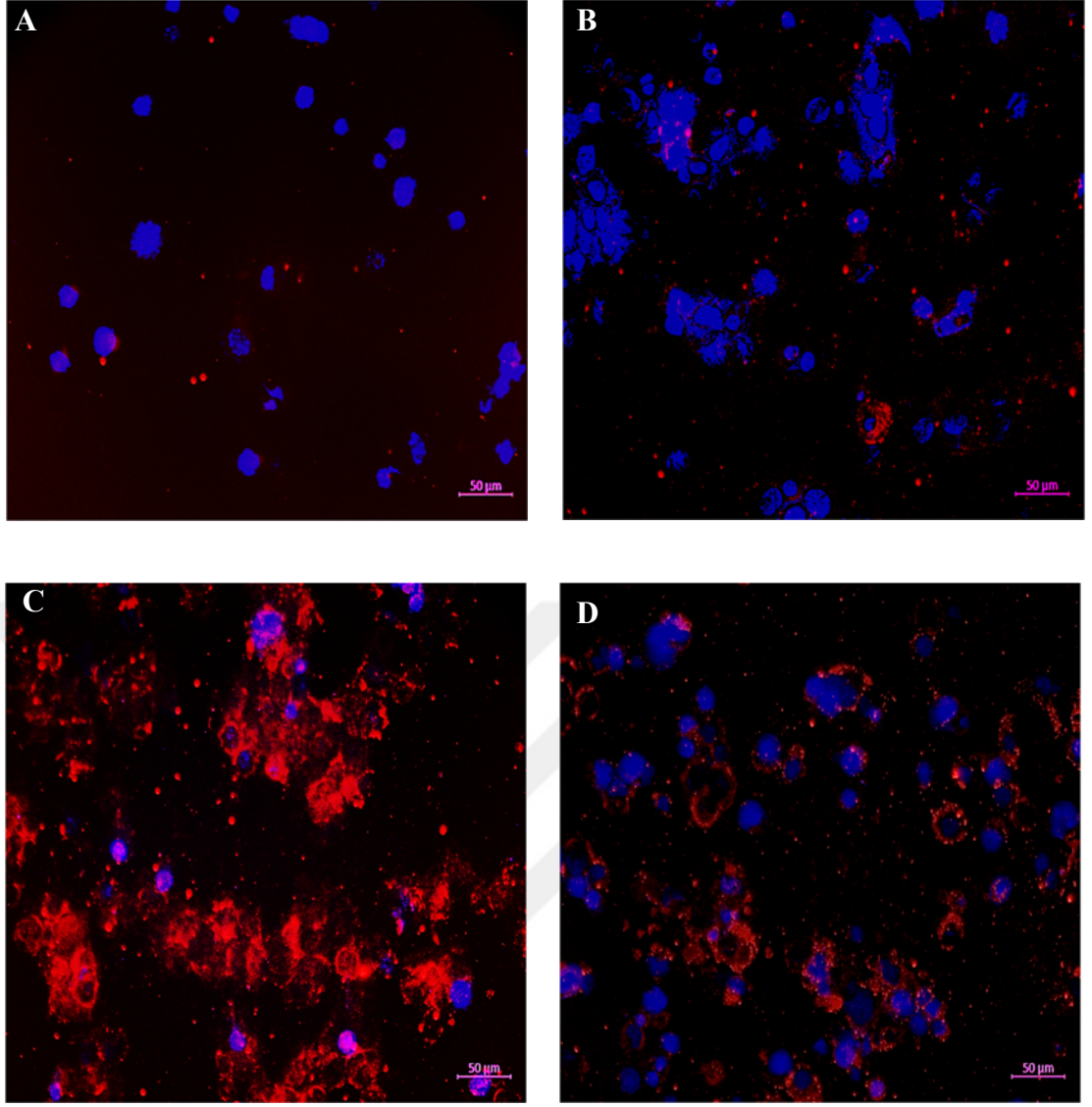


Resim 7. GC1 hücre hattı GRP78 immünfloresan boyama görüntüleri. Anti-GRP78 primer antikor ile boyanan örneklerin immünfloresan boyamasında GC1-K (A) ve GC1-SAL (B) grubu hücrelerinin zayıf immünoreaktivite; GC1-ISM (C) grubunda şiddetli immünoreaktivite; GC1-ISMSAL (D) grubunda orta immünoreaktivite olduğu görülmektedir. Çekirdek boyaması DAPI ile yapılmıştır.

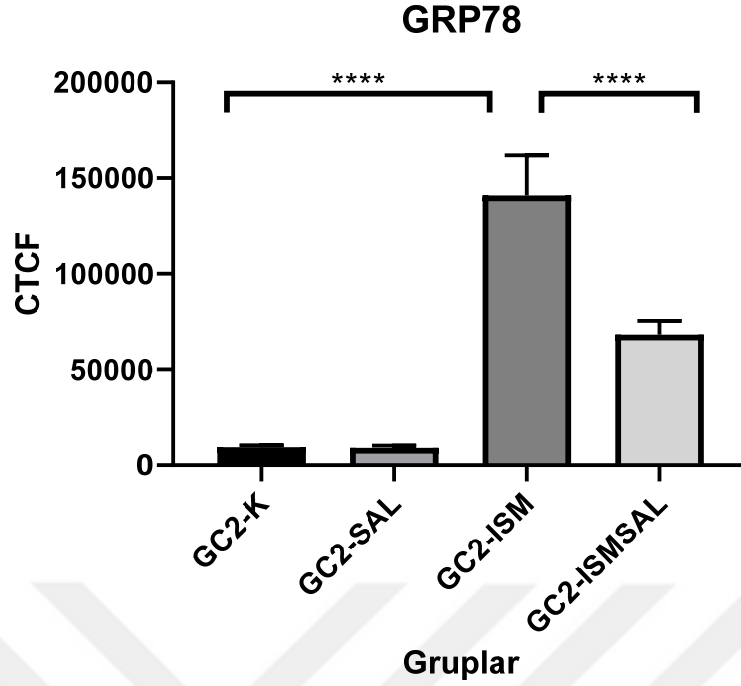


Şekil 20. GC1 GRP78 İmmünfloresan Yoğunluk İstatistiksel Analiz Sonuçları. Gruplar arası karşılaştırmada One-Way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) yapıldı. Çoklu karşılaştırma için Post hoc testi olarak Sidak testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme sonuçlarında $P \leq 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

GC2 hücre hattı GRP78 immünfloresan boyama CTCF değerleri sırasıyla GC2-K grubunda (Resim 8A) $9\,398 \pm 1\,078$ GC2-SAL (Resim 8B) grubunda $9\,905 \pm 1\,107$ GC2-ISM (Resim 8C) grubunda $140\,999 \pm 20\,984$ ve GC2-ISMSAL (Resim 8D) grubunda $68\,190 \pm 7\,192$ bulundu. İstatistiksel değerlendirme sonrasında GRP78 CTCF değerlerinin GC2-ISM grubunda GC2-K grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı bulundu ($p \leq 0,05$). SAL uygulanan GC2-ISMSAL grubunda GC2-ISM grubuna göre CTCF değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış bulundu ($p \leq 0,05$). Gruplar arasında farkların değerlendirildiği istatistiksel veriler tablo halinde özetlendi (Şekil 21).



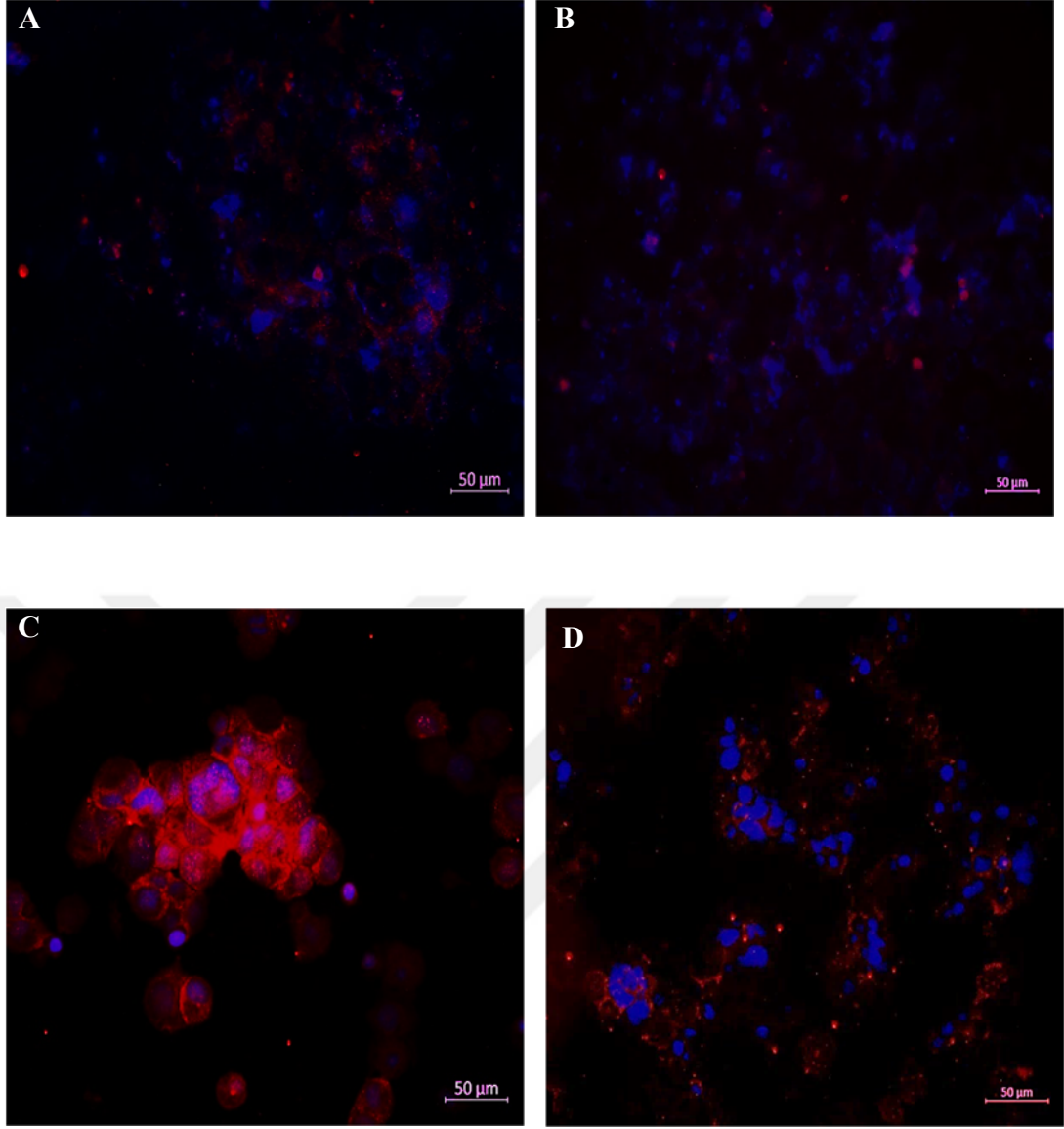
Resim 8. GC2 hücre hattı GRP78 immünfloresan boDyama görüntüleri. Anti-GRP78 primer antikoruna ile boyanan örneklerin immünfloresan boyamasında GC2-K (A) ve GC2-SAL (B) grubu hücrelerinin zayıf immünoreaktivite; GC2-ISM (C) grubunda şiddetli immünoreaktivite; GC2-ISMSAL (D) grubunda orta immünoreaktivite olduğu görülmektedir. Çekirdek boyaması DAPI ile yapılmıştır.



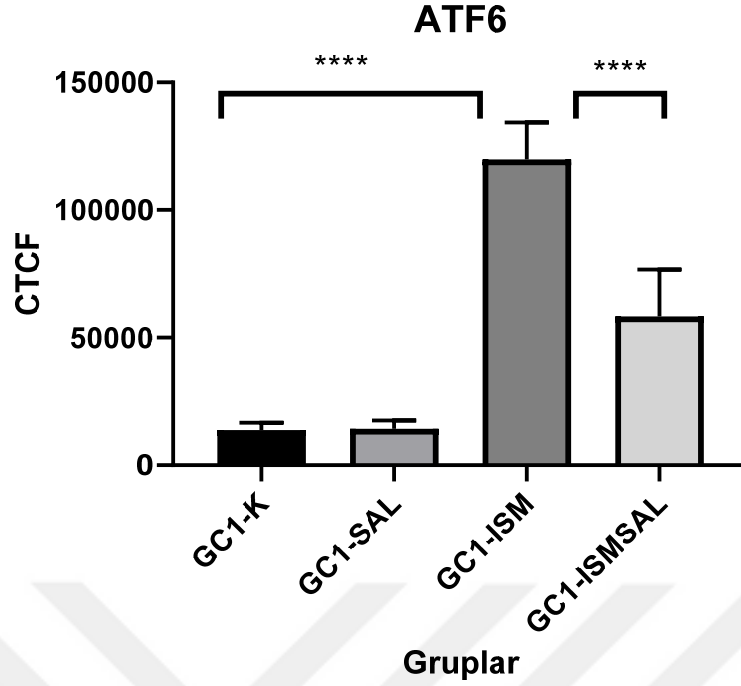
Şekil 21. GC2 GRP78 İmmünofloresan Yoğunluk İstatistiksel Analiz Sonuçları. Gruplar arası karşılaştırmada One-Way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) yapıldı. Çoklu karşılaştırma için Post hoc testi olarak Sidak testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme sonuçlarında $P \leq 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

6.4.3.ATF6 Bulguları

Yapılan ATF immünofloresan boyaması sonrasında her bir gruptan 20x büyütmede 10 farklı alanda CTCF değerleri hesaplandı. GC1 hücre hattı için CTCF değerleri sırasıyla GC1-K grubunda (Resim 9A) $13\,844 \pm 2\,819$ GC1-SAL (Resim 9B) grubunda $14\,346 \pm 3\,156$ GC1-ISM (Resim 9C) grubunda $119\,862 \pm 14\,508$ ve GC1-ISMSAL (Resim 9D) grubunda $58\,350 \pm 18\,280$ bulundu. İstatistiksel değerlendirme sonrasında GC1-K ve GC1-SAL grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p \geq 0,05$). ATF6 CTCF değerlerinin GC1-ISM grubunda GC1-K grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı bulundu ($p \leq 0,05$). SAL uygulanan GC1-ISMSAL grubunda GC1-ISM grubuna göre CTCF değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış bulundu ($p \leq 0,05$). Gruplar arasında farkların değerlendirildiği istatistiksel veriler grafik halinde özetlendi (şekil 22).

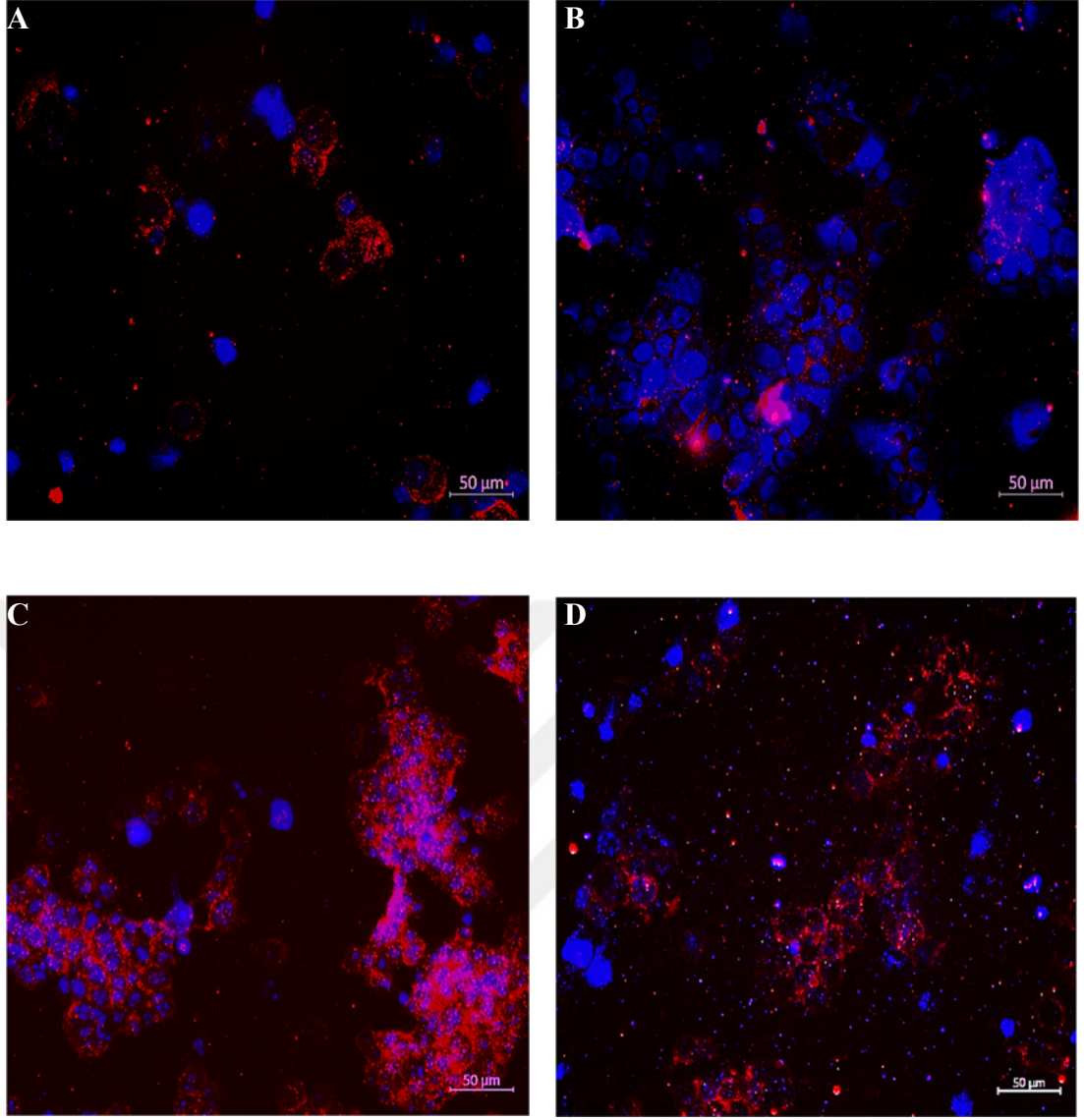


Resim 9. GC1 hücre hattı ATF6 immünfloresan boyama görüntüleri. Anti-ATF6 primer antikor ile boyanan örneklerin immünfloresan boyamasında GC1-K (A) ve GC1-SAL (B) grubu hücrelerinin zayıf immünoreaktivite; GC1-ISM (C) grubunda şiddetli immünoreaktivite; GC1-ISMSAL (D) grubunda orta immünoreaktivite olduğu görülmektedir. Çekirdek boyaması DAPI ile yapılmıştır.

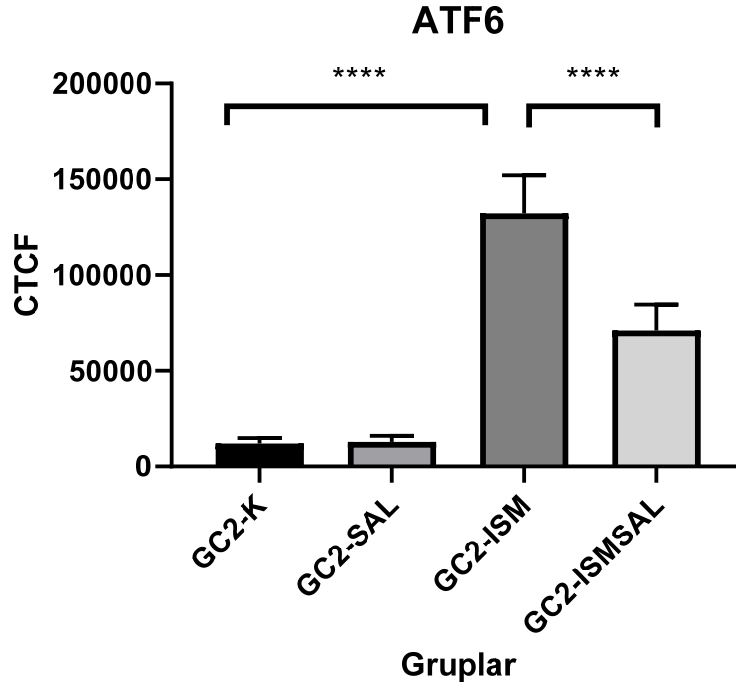


Şekil 22. GC1 ATF6 İmmünfloresan Yoğunluk İstatistiksel Analiz Sonuçları. Gruplar arası karşılaştırmada One-Way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) yapıldı. Çoklu karşılaştırma için Post hoc testi olarak Sidak testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme sonuçlarında $P \leq 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

GC2 hücre hattı için CTCF değerleri sırasıyla GC2-K grubunda (Resim 10A) $12\ 027 \pm 2\ 929$ GC2-SAL (Resim 10B) grubunda $12\ 911 \pm 3\ 104$ GC2-ISM (Resim 10C) grubunda $132\ 177 \pm 19\ 944$ ve GC2-ISMSAL (Resim 10D) grubunda $71\ 131 \pm 13\ 481$ bulundu. İstatistiksel değerlendirme sonrasında GC2-K ve GC2-SAL grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p \geq 0,05$). ATF6 CTCF değerlerinin GC2-ISM grubunda GC2-K grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı bulundu ($p \leq 0,05$). SAL uygulanan GC2-ISMSAL grubunda GC2-ISM grubuna göre CTCF değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış bulundu ($p \leq 0,05$). Gruplar arasında farkların değerlendirildiği istatistiksel veriler grafik halinde gösterildi. (Şekil 23).



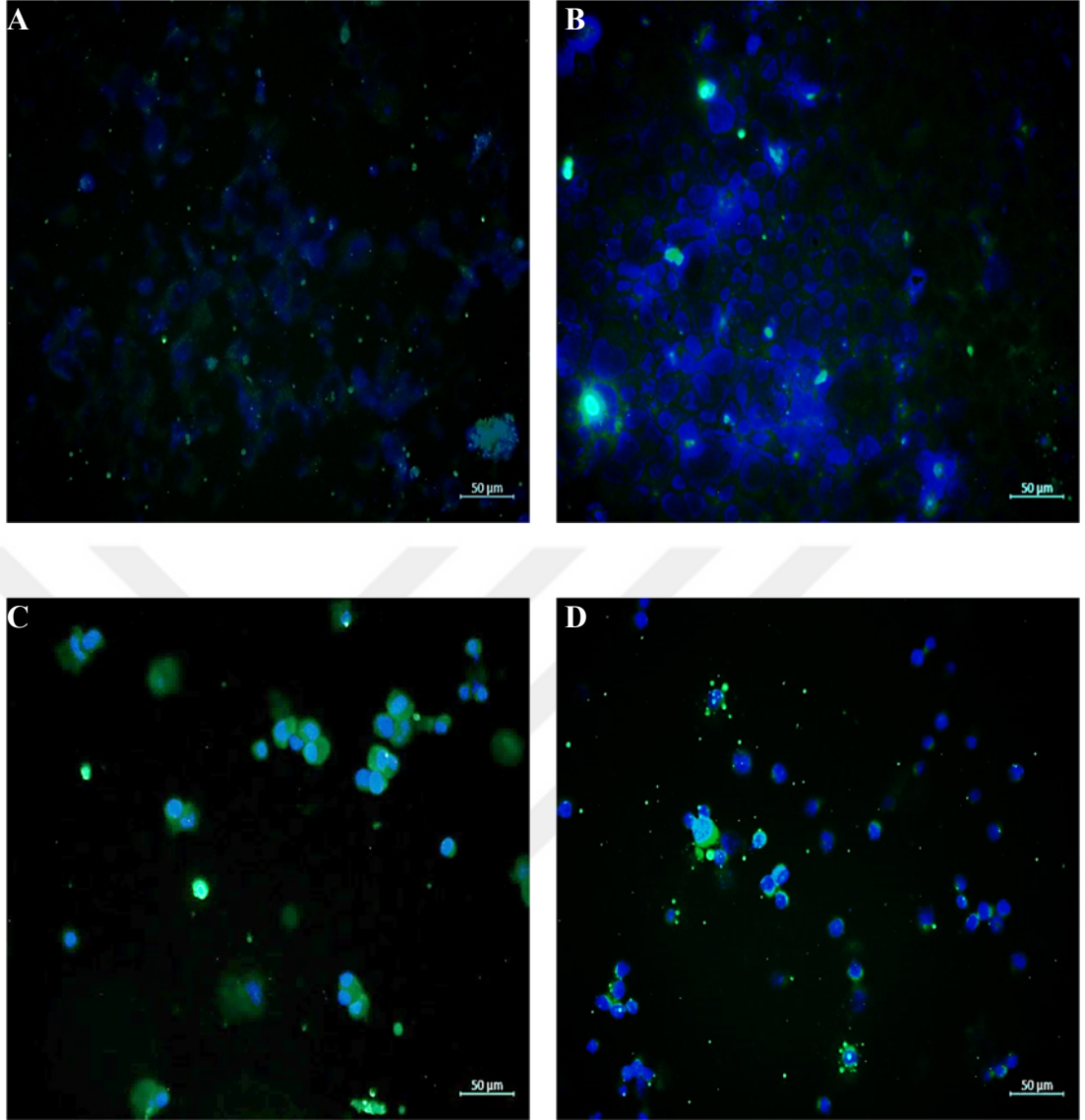
Resim 10. GC2 hücre hattı ATF6 immünfloresan boyama görüntüleri. Anti-ATF6 primer antikoruna ile boyanan örneklerin immünfloresan boyamasında GC2-K (A) ve GC2-SAL (B) grubu hücrelerinin zayıf immünoreaktivite; GC2-ISM (C) grubunda şiddetli immünoreaktivite; GC2-ISMSAL (D) grubunda orta immünoreaktivite olduğu görülmektedir. Çekirdek boyaması DAPI ile yapılmıştır.



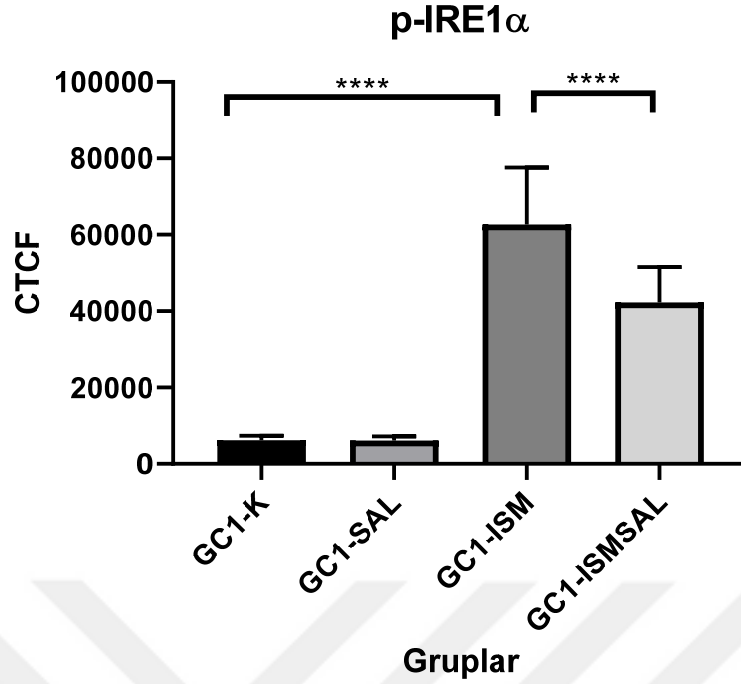
Şekil 23. GC2 ATF6 İmmünfloresan Yoğunluk İstatistiksel Analiz Grafiği. Gruplar arası karşılaştırmada One-Way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) yapıldı. Çoklu karşılaştırma için Post hoc testi olarak Sidak testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme sonuçlarında $P \leq 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

6.4.4. p-IRE1 α Bulguları

Yapılan p-IRE1 α immünfloresan boyaması sonrasında her bir gruptan 20x büyütmede 10 farklı alanda CTCF değerleri hesaplandı. GC1 hücre hattı için CTCF değerleri sırasıyla GC1-K grubunda (Resim 11A) $6\,205 \pm 1\,178$ GC1-SAL (Resim 11B) grubunda $6\,127 \pm 1\,113$ GC1-ISM (Resim 11C) grubunda $62\,732 \pm 14\,894$ ve GC1-ISMSAL (Resim 11D) grubunda $42\,262 \pm 9\,287$ bulundu. İstatistiksel değerlendirme sonrasında GC1-K ve GC1-SAL grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p \geq 0,05$). p-IRE1 α CTCF değerlerinin GC1-ISM grubunda GC1-K grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı bulundu ($p \leq 0,05$). SAL uygulanan GC1-ISMSAL grubunda GC1-ISM grubuna göre CTCF değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış bulundu ($p \leq 0,05$). Gruplar arasında farkların değerlendirildiği istatistiksel veriler tablo halinde özetlendi (Şekil 24).

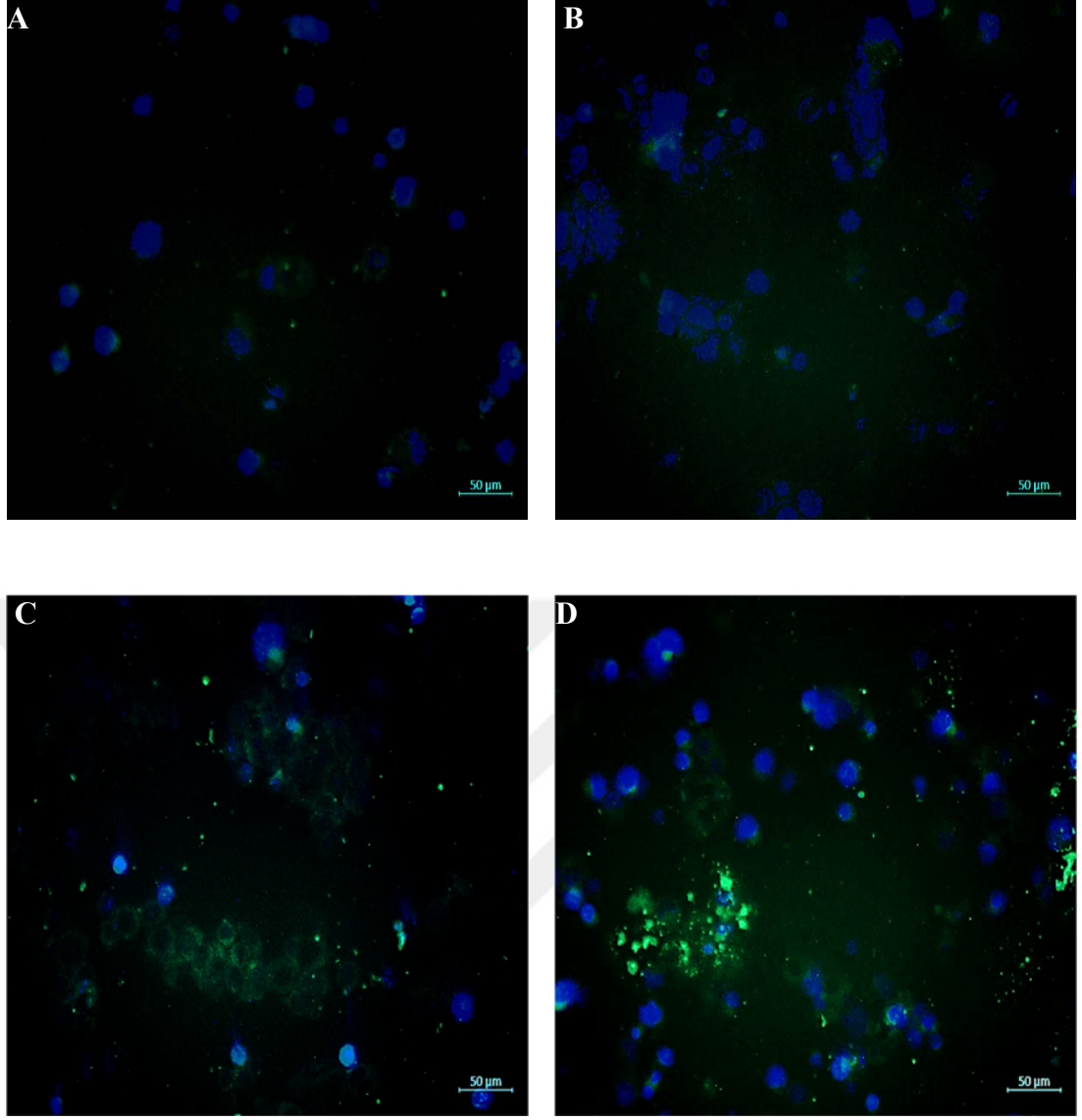


Resim 11. GC1 hücre hattı p-IRE1 α immüno Floresan boyama görüntüleri. Anti-p-IRE1 α primer antikoru ile boyanan örneklerin immüno Floresan boyamasında GC1-K (A) ve GC1-SAL (B) grubu hücrelerinin zayıf immüno reaktivite; GC1-ISM (C) grubunda şiddetli immüno reaktivite; GC1-ISMSAL (D) grubunda orta immüno reaktivite olduğu görülmektedir. Çekirdek boyaması DAPI ile yapılmıştır.

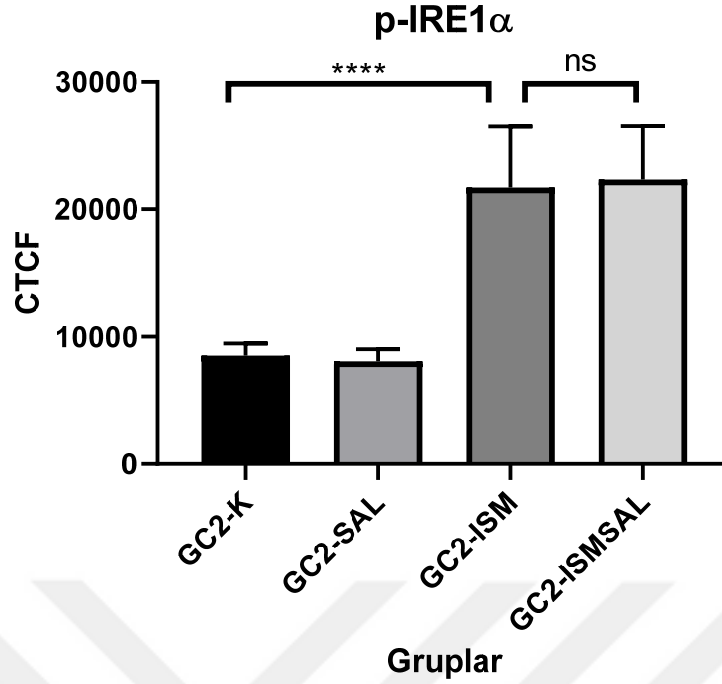


Şekil 24. GC1 Hücre hattı p-IRE1 α İmmü floresan Yoğunluk İstatistiksel Analiz Sonuçları. Gruplar arası karşılaştırmada One-Way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) yapıldı. Çoklu karşılaştırma için Post hoc testi olarak Sidak testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme sonuçlarında $P \leq 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

GC2 hücre hattı p-IRE1 α immü floresan boyama CTCF değerleri sırasıyla GC2-K grubunda (Resim 12A) $8517 \pm 951,9$ GC2-SAL (Resim 12B) grubunda $8056 \pm 945,2$ GC2-ISM (Resim 12C) grubunda 21720 ± 4805 ve GC2-ISMSAL (Resim 12D) grubunda 22328 ± 4205 bulundu. İstatistiksel değerlendirme sonrasında p-IRE1 α CTCF değerlerinin GC2-ISM grubunda GC2-K grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı bulundu ($p \leq 0,05$). SAL uygulanan GC2-ISMSAL grubunda GC2-ISM grubuna göre CTCF değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı değişim bulunamadı ($p \geq 0,05$). Gruplar arasında farkların değerlendirildiği istatistiksel veriler tablo halinde özetlendi (Şekil 25).



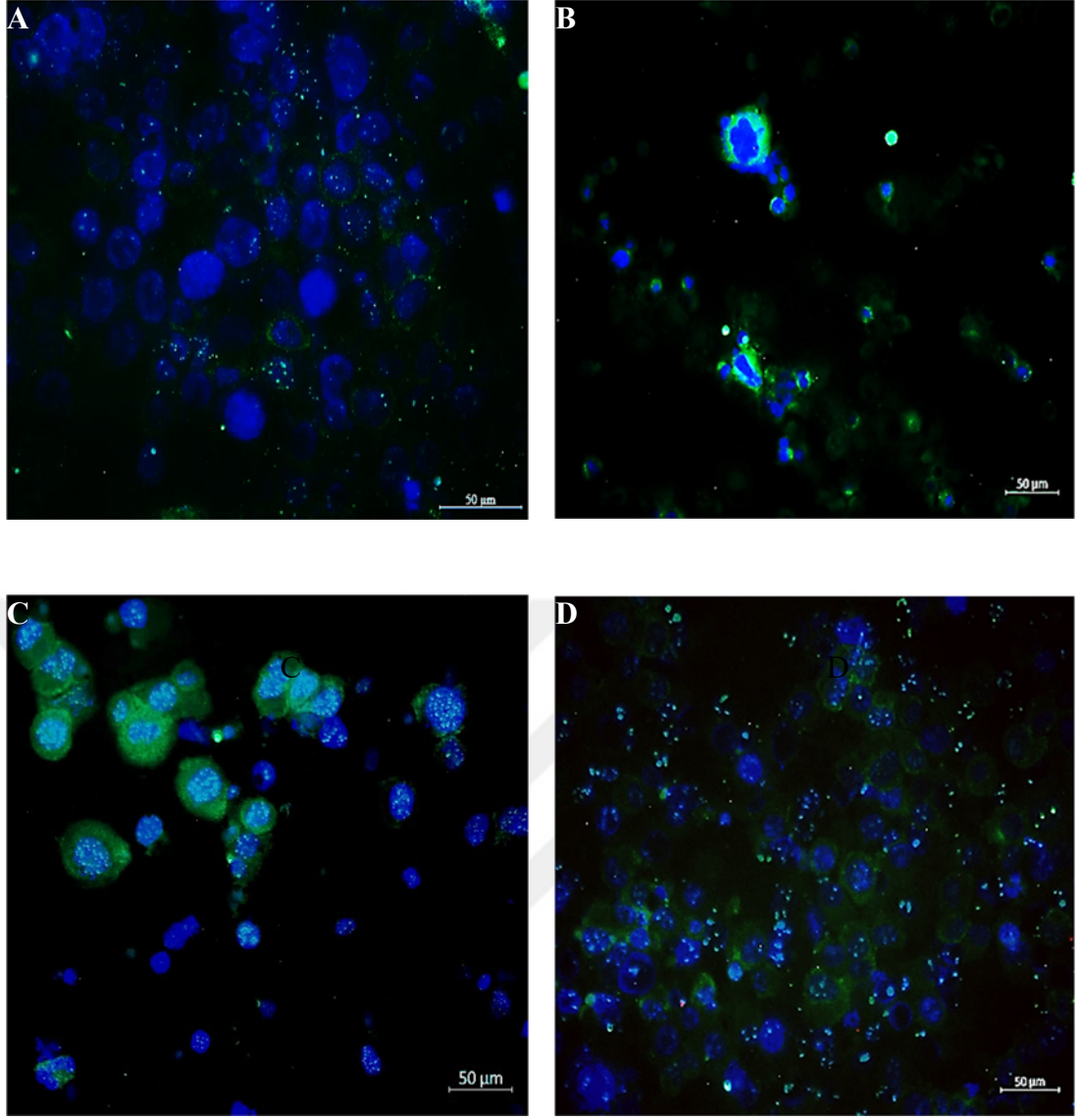
Resim 12. GC2 hücre hattı p-IRE1 α immünfloresan boyama görüntüleri. Anti-p-IRE1 α primer antikor ile boyanan örneklerin immünfloresan boyamasında GC2-K (A) ve GC2-SAL (B) grubu hücrelerinin zayıf immünoreaktivite; GC2-ISM (C) ve GC2-ISMSAL (D) grubunda orta immünoreaktivite olduğu görülmektedir. Çekirdek boyaması DAPI ile yapılmıştır.



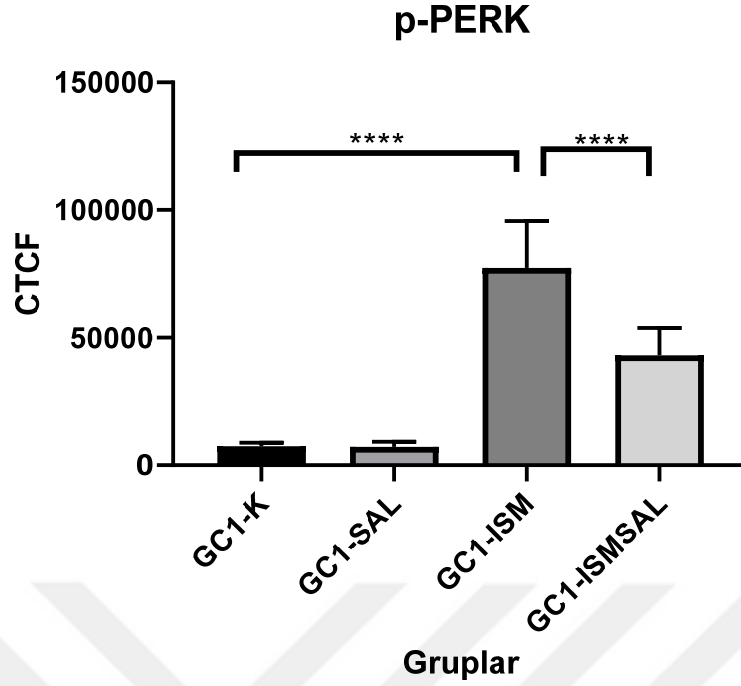
Şekil 25. GC2 Hücre hattı p-IRE1 α İmmü floresan Yoğunluk İstatistiksel Analiz Sonuçları. Gruplar arası karşılaştırmada One-Way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) yapıldı. Çoklu karşılaştırma için Post hoc testi olarak Sidak testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme sonuçlarında $P \leq 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

6.4.5. p-PERK bulguları

Yapılan p-PERK immü floresan boyaması sonrasında her bir gruptan 20x büyütmede 10 farklı alanda CTCF değerleri hesaplandı. GC1 hücre hattı için CTCF değerleri sırasıyla GC1-K grubunda (Resim 13A) $7\,439 \pm 1\,375$ GC1-SAL (Resim 13B) grubunda $7\,144 \pm 1\,994$ GC1-ISM (Resim 13C) grubunda $77\,309 \pm 18\,317$ ve GC1-ISMSAL (Resim 13D) grubunda $43\,064 \pm 10\,698$ bulundu. İstatistiksel değerlendirme sonrasında GC1-K ve GC1-SAL grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p \geq 0,05$). p-PERK CTCF değerlerinin GC1-ISM grubunda GC1-K grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı bulundu ($p \leq 0,05$). SAL uygulanan GC1-ISMSAL grubunda GC1-ISM grubuna göre CTCF değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış bulundu ($p \leq 0,05$). Gruplar arasında farkların değerlendirildiği istatistiksel veriler tablo halinde özetlendi (Şekil 26).

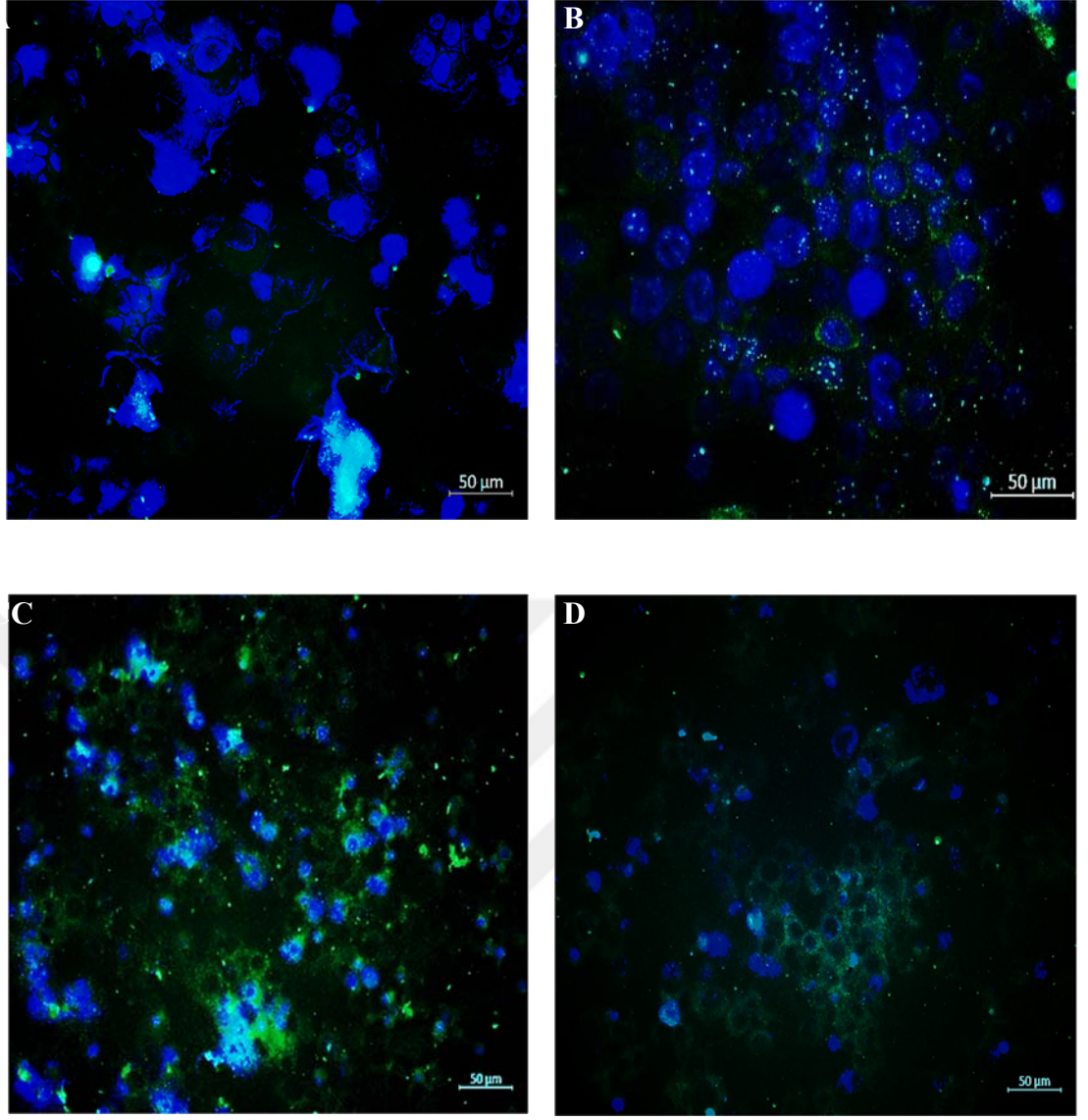


Resim 13. GC1 hücre hattı p-PERK immünfloresan boyama görüntüleri. Anti-p-PERK primer antikor ile boyanan örneklerin immünfloresan boyamasında GC1-K (A) ve GC1-SAL (B) grubu hücrelerinin zayıf immünoreaktivite; GC1-ISM (C) grubunda şiddetli immünoreaktivite; GC1-ISMSAL (D) grubunda orta immünoreaktivite olduğu görülmektedir. Çekirdek boyaması DAPI ile yapılmıştır.

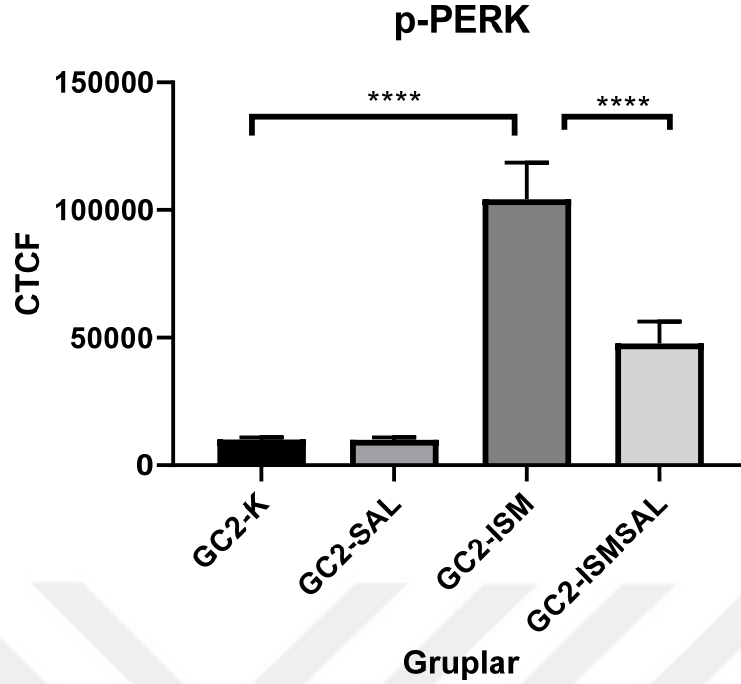


Şekil 26. GC1 Hücre hattı p-PERK İmmünfloresan Yoğunluk İstatistiksel Analiz Sonuçları. Gruplar arası karşılaştırmada One-Way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) yapıldı. Çoklu karşılaştırma için Post hoc testi olarak Sidak testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme sonuçlarında $P \leq 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

GC2 hücre hattı p-PERK immünfloresan boyama CTCF değerleri sırasıyla GC2-K grubunda (Resim 14A) $10\,013 \pm 957,7$ GC2-SAL (Resim 14B) grubunda $9\,890 \pm 1\,107$ GC2-ISM (Resim 14C) grubunda $104\,139 \pm 14\,482$ ve GC2-ISMSAL (Resim 14D) grubunda $47\,714 \pm 8\,578$ bulundu. İstatistiksel değerlendirme sonrasında p-PERK CTCF değerlerinin GC2-ISM grubunda GC2-K grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı bulundu ($p \leq 0,05$). SAL uygulanan GC2-ISMSAL grubunda GC2-ISM grubuna göre CTCF değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı değişim bulundu ($p \leq 0,05$). Gruplar arasında farkların değerlendirildiği istatistiksel veriler tablo halinde özetlendi (Şekil 27).



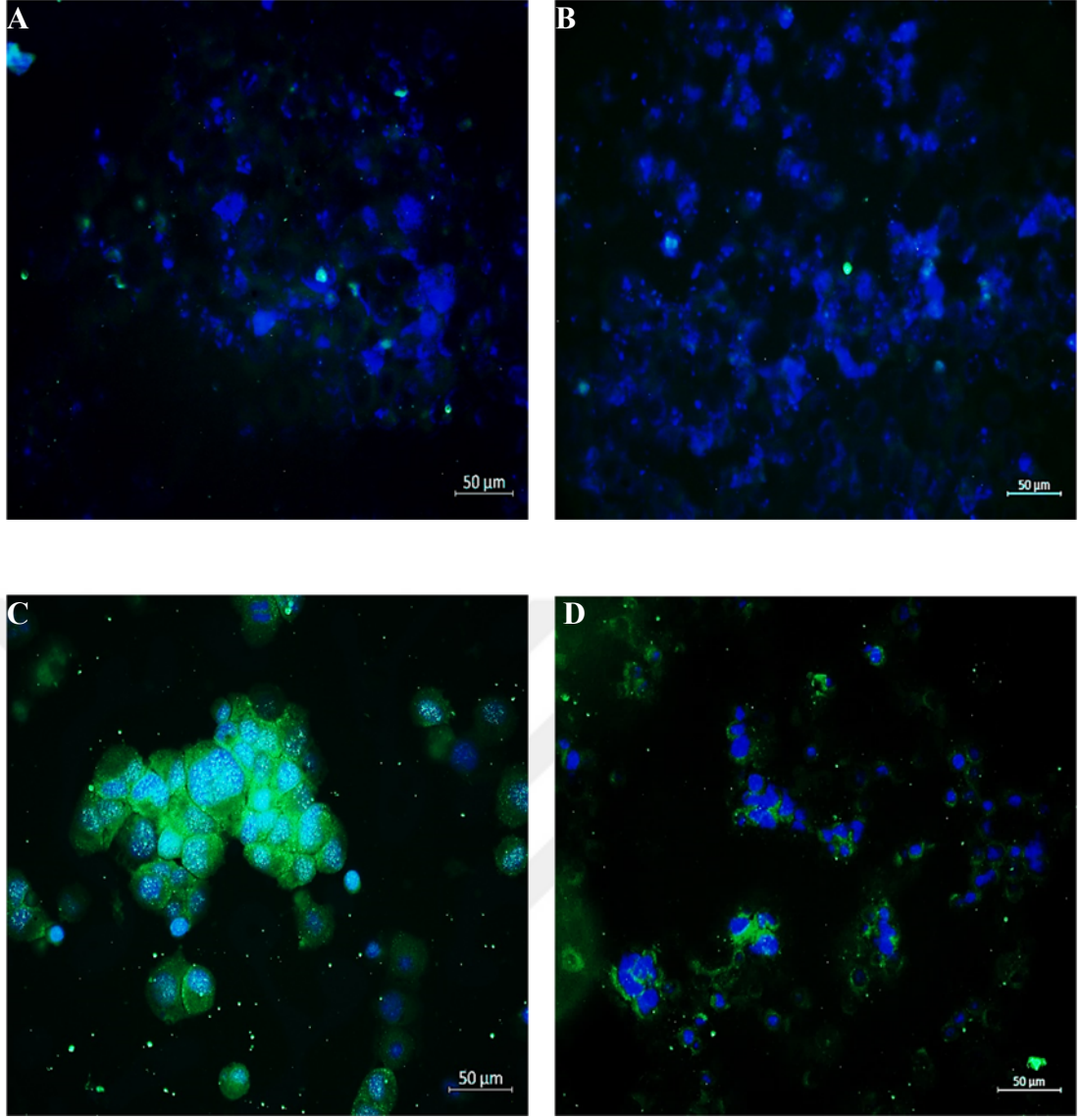
Resim 14. GC2 hücre hattı p-PERK immünfloresan boyama görüntüleri. Anti-p-PERK primer antikor ile boyanan örneklerin immünfloresan boyamasında GC2-K (A) ve GC2-SAL (B) grubu hücrelerinin zayıf immünoreaktivite; GC2-ISM (C) grubunda şiddetli immünoreaktivite; GC2-ISMSAL (D) grubunda orta immünoreaktivite olduğu görülmektedir. Çekirdek boyaması DAPİ ile yapılmıştır.



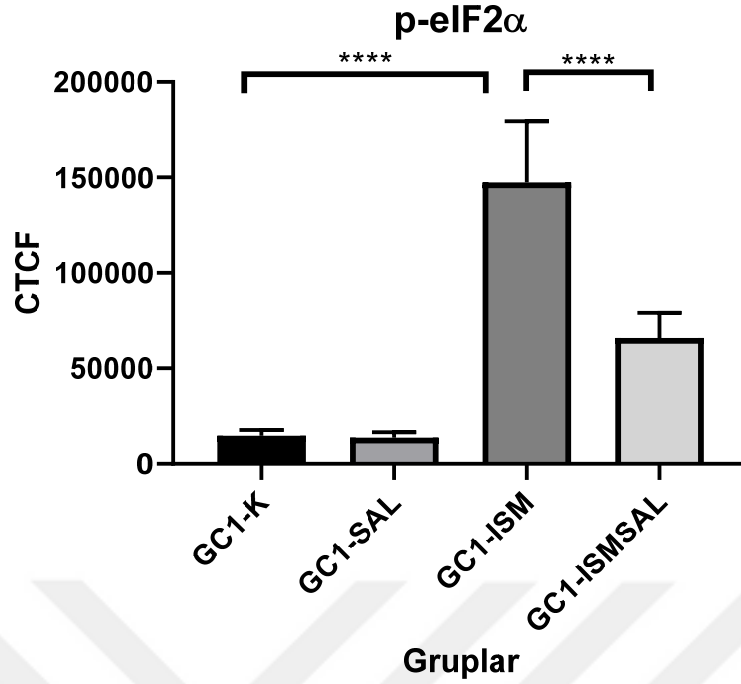
Şekil 27. GC2 Hücre hattı p-PERK İmmünfloresan Yoğunluk İstatistiksel Analiz Sonuçları. Gruplar arası karşılaştırmada One-Way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) yapıldı. . Çoklu karşılaştırma için Post hoc testi olarak SİDAK'S TESTİ kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme sonuçlarında $P \leq 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

6.4.6. p-eIF2 α İmmünfloresan Bulguları

Yapılan p-eIF2 α immünfloresan boyaması sonrasında her bir gruptan 20x büyütmede 10 farklı alanda CTCF değerleri hesaplandı. GC1 hücre hattı için CTCF değerleri sırasıyla GC1-K grubunda (Resim 15A) $14\,807 \pm 3\,012$ GC1-SAL (Resim 15B) grubunda $13\,670 \pm 2\,874$ GC1-ISM (Resim 15C) grubunda $147\,385 \pm 32\,023$ ve GC1-ISMSAL (Resim 15D) grubunda $65\,891 \pm 13\,255$ bulundu. İstatistiksel değerlendirme sonrasında GC1-K ve GC1-SAL grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p \geq 0,05$). p-eIF2 α CTCF değerlerinin GC1-ISM grubunda GC1-K grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı bulundu ($p \leq 0,05$). SAL uygulanan GC1-ISMSAL grubunda GC1-ISM grubuna göre CTCF değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış bulundu ($p \leq 0,05$). Gruplar arasında farkların değerlendirildiği istatistiksel veriler tablo halinde özetlendi (Şekil 28).

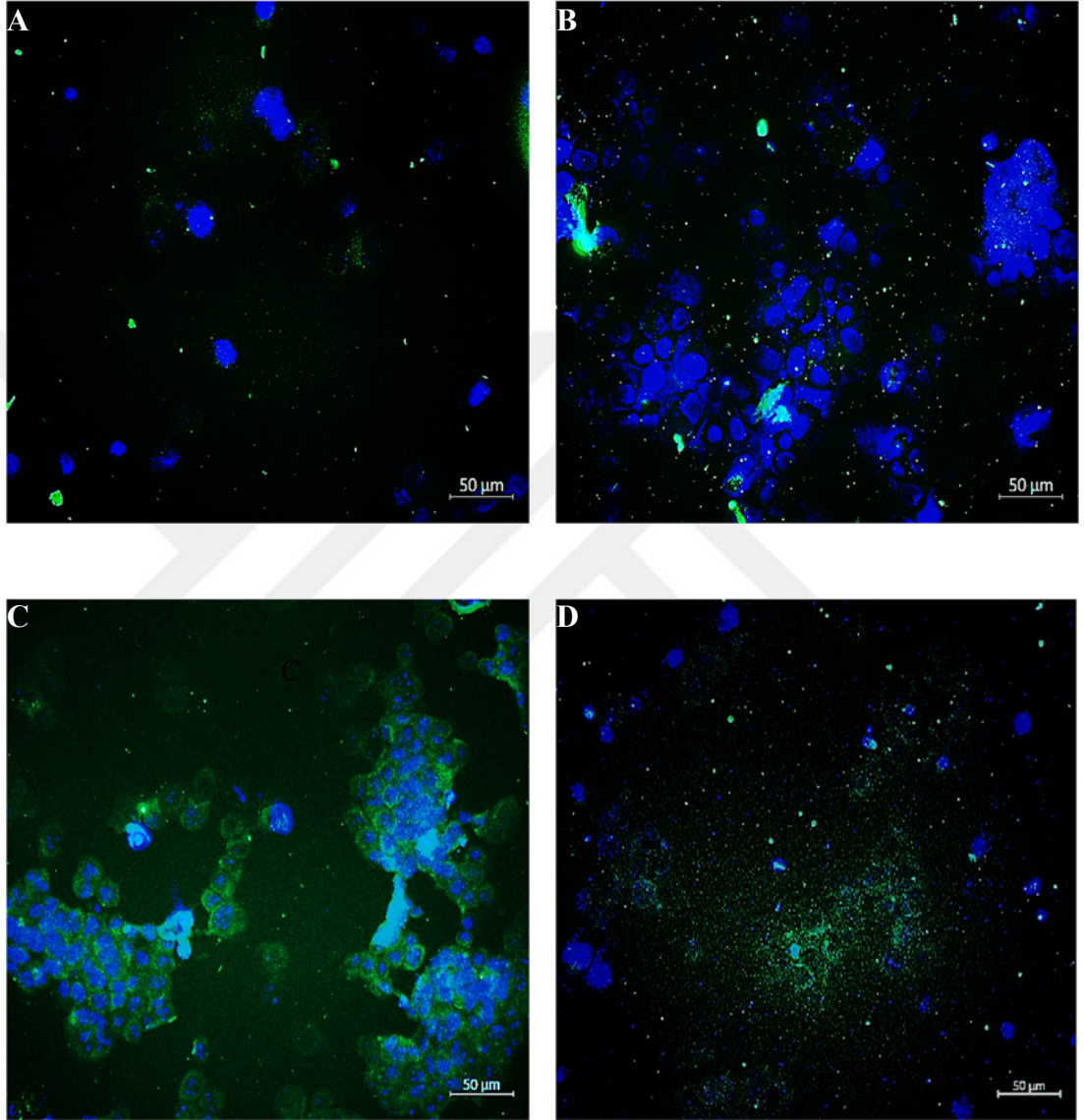


Resim 15. GC1 hücre hattı p-eIF2 α immünfloresan boyama görüntüleri. Anti-p-eIF2 α primer antikor ile boyanan örneklerin immünfloresan boyamasında GC1-K (A) ve GC1-SAL (B) grubu hücrelerinin zayıf immünoreaktivite; GC1-ISM (C) grubunda şiddetli immünoreaktivite; GC1-ISMSAL (D) grubunda orta immünoreaktivite olduğu görülmektedir. Çekirdek boyaması DAPI ile yapılmıştır.

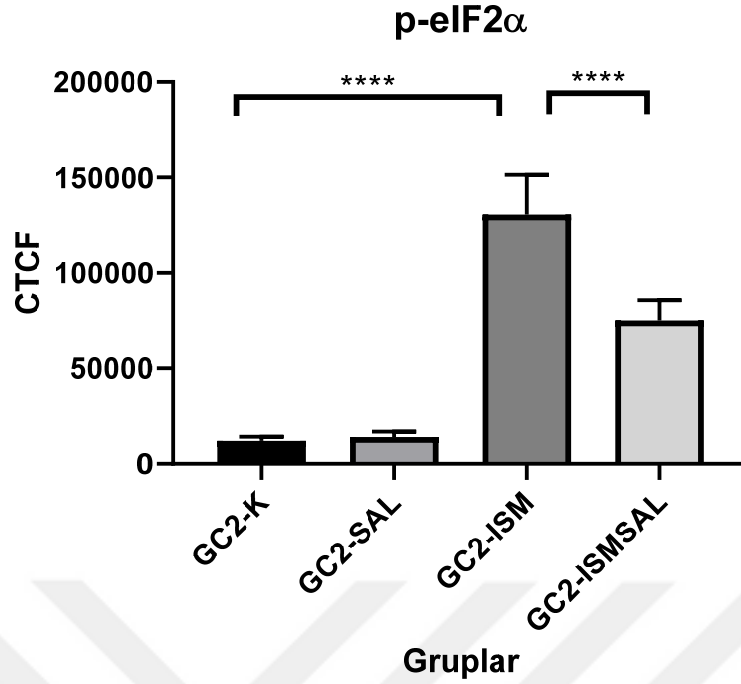


Şekil 28. GC1 p-eIF2 α İmmünfloresan Yoğunluk İstatistiksel Analiz Sonuçları. Gruplar arası karşılaştırmada One-Way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) yapıldı. Çoklu karşılaştırma için Post hoc testi olarak SİDAK'S TESTİ kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme sonuçlarında $P \leq 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

GC2 hücre hattı için CTCF değerleri sırasıyla GC2-K grubunda (Resim 12A) $12\,092 \pm 2\,131$ GC2-SAL (Resim 16B) grubunda $14\,106 \pm 2\,799$ GC2-ISM (Resim 16C) grubunda $130\,595 \pm 20\,895$ ve GC2-ISMSAL (Resim 16D) grubunda $75\,093 \pm 10\,726$ bulundu. İstatistiksel değerlendirme sonrasında p-eIF2 α CTCF değerlerinin GC2-ISM grubunda GC2-K grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı bulundu ($p \leq 0,05$). SAL uygulanan GC2-ISMSAL grubunda GC2-ISM grubuna göre CTCF değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış bulundu ($p \leq 0,05$). Gruplar arasında farkların değerlendirildiği istatistiksel veriler tablo halinde özetlendi (Şekil 29).



Resim 16. GC2 hücre hattı p-eIF2 α immüno Floresan boyama görüntüleri. Anti-p-eIF2 α primer antikor ile boyanan örneklerin immüno Floresan boyamasında GC2-K (A) ve GC2-SAL (B) grubu hücrelerinin zayıf immüno reaktivite; GC2-ISM (C) grubunda şiddetli immüno reaktivite; GC2-ISMSAL (D) grubunda orta immüno reaktivite olduğu görülmektedir. Çekirdek boyaması DAPI ile yapılmıştır.

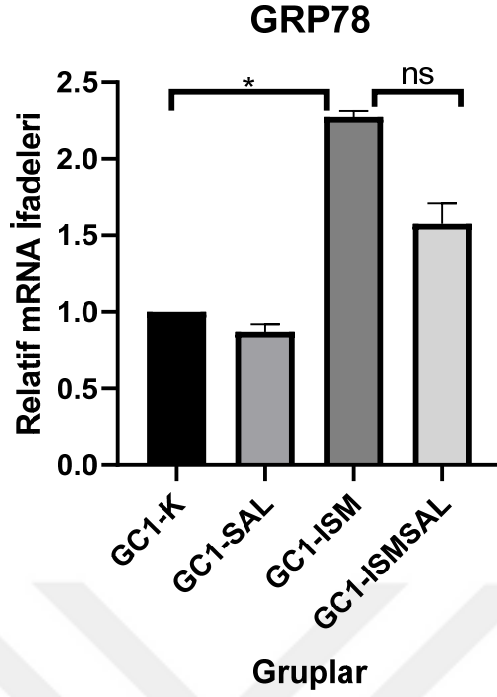


Şekil 29. GC2 p-eIF2α İmmünfloresan Yoğunluk İstatistiksel Analiz Sonuçları. Gruplar arası karşılaştırmada One-Way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) yapıldı. Çoklu karşılaştırma için Post hoc testi olarak SİDAK'S TESTİ kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme sonuçlarında $P \leq 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

6.5. qRT-PCR BULGULARI

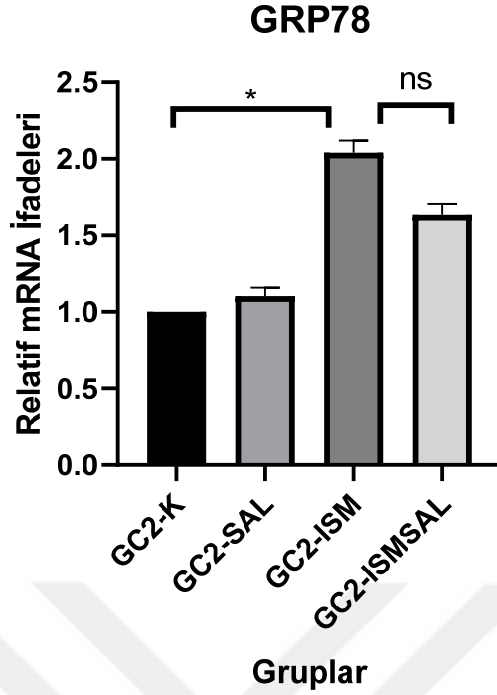
6.5.1. GRP78 Bulguları

Isı stresinin ve SAL uygulamasının GRP78 mRNA ifade düzeylerinde etkinliği olup olmadığını belirlemek amacıyla qRT-PCR analizi yapıldı. GC1 hücre hattı için bakıldığında GC1-ISM modelinde GC1-K grubuna göre GRP78 geninin ifadesinin yaklaşık olarak 2.5 kat artmış olduğu gözlemlendi. GC1-ISMSAL modelinde GRP78 relatif mRNA ifadesinde GC1-ISM grubuna oranla bir azalma olduğu fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p \geq 0,05$) (Şekil 30).



Şekil 30. GC1 için GRP78 geni ifadesinin qRT-PCR sonuçlarının gruplara göre değişimi. Gruplar arası karşılaştırmada Kruskal Wallis istatistiksel analizi yapıldı. . Çoklu karşılaştırma için Post hoc testi olarak Dunn testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme sonuçlarında $P \leq 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

GC2 hücre hattı için bakıldığında GC2-ISM modelinde GC2-K grubuna göre GRP78 geninin ifadesinin 2 kat artmış olduğu gözlemlendi. GC2-ISMSAL modelinde GRP78 relatif mRNA ifadesinde GC2-ISM grubuna oranla bir azalma olduğu fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu ($p \geq 0,05$) (Şekil 31).

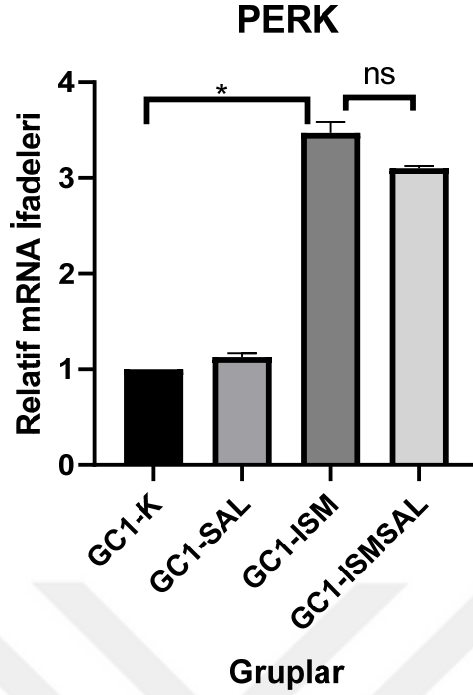


Şekil 31. GC2 için GRP78 geni ifadesinin qRT-PCR sonuçlarının gruplara göre değişimi.

Gruplar arası karşılaştırmada Kruskal Wallis istatistiksel analizi yapıldı. Çoklu karşılaştırma için Post hoc testi olarak Dunn testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme sonuçlarında $P \leq 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi

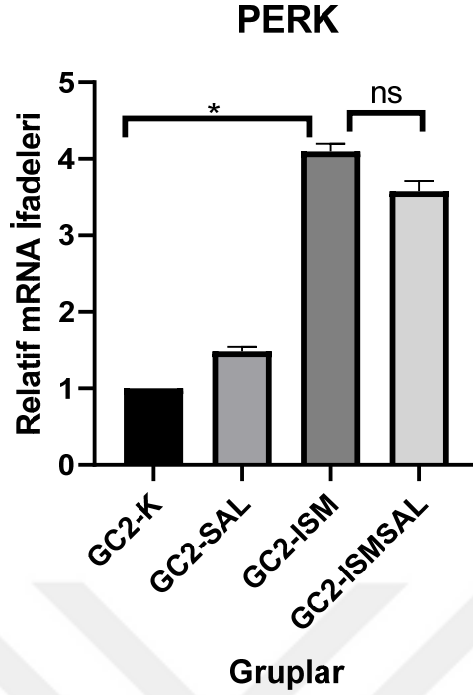
6.5.3.PERK bulguları

Isı stresinin ve SAL uygulamasının PERK mRNA ifade düzeylerinde etkinliği olup olmadığını belirlemek amacıyla qRT-PCR analizi yapıldı. GC1 hücre hattı için bakıldığında GC1-ISM modelinde GC1-K grubuna göre PERK geninin ifadesinin yaklaşık olarak 4 kat artmış olduğu gözlemlendi. GC1-ISMSAL modelinde PERK relatif mRNA ifadesinde GC1-ISM grubuna oranla bir azalma olduğu fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p \geq 0,05$) (Şekil 32).



Şekil 32. GC1 için PERK geni ifadesinin qRT-PCR sonuçlarının gruplara göre değişimi. Gruplar arası karşılaştırmada Kruskal Wallis istatistiksel analizi yapıldı. . Çoklu karşılaştırma için Post hoc testi olarak Dunn testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme sonuçlarında $P \leq 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi

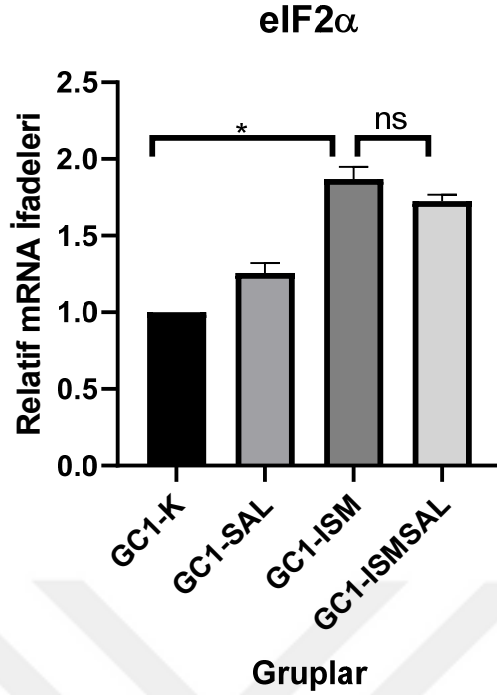
GC2 hücre hattı için bakıldığında GC2-ISM modelinde GC2-K grubuna göre PERK geninin ifadesinin yaklaşık 4 kat artmış olduğu gözlemlendi. GC2-ISMSAL modelinde PERK relatif mRNA ifadesinde GC2-ISM grubuna oranla bir azalma olduğu fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p \geq 0,05$) (Şekil 33).



Şekil 33. GC2 için PERK geni ifadesinin qRT-PCR sonuçlarının gruplara göre değişimi. Gruplar arası karşılaştırmada Kruskal Wallis istatistiksel analizi yapıldı. . Çoklu karşılaştırma için Post hoc testi olarak Dunn testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme sonuçlarında $P \leq 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

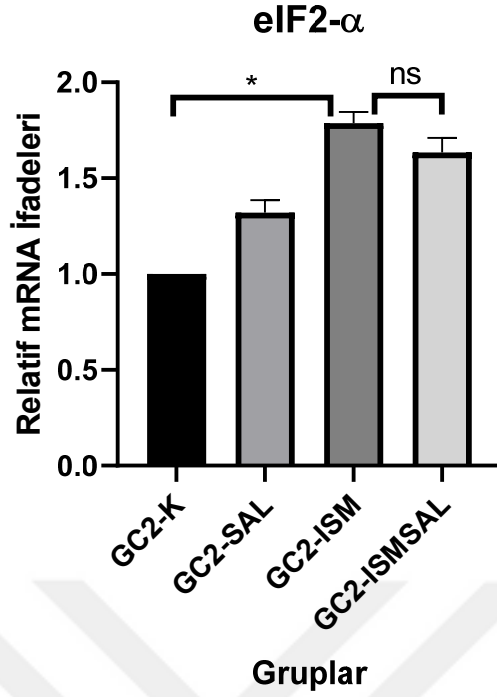
6.5.3. eIF2 α bulguları

Isı stresinin ve SAL uygulamasının eIF2 α mRNA ifade düzeylerinde etkinliği olup olmadığını belirlemek amacıyla qRT-PCR analizi yapıldı. GC1 hücre hattı için bakıldığında GC1-ISM modelinde GC1-K grubuna göre eIF2 α geninin ifadesinin yaklaşık olarak 2 kat artmış olduğu gözlemlendi. GC1-ISMSAL modelinde eIF2 α relatif mRNA ifadesinde GC1-ISM grubuna oranla bir azalma olduğu fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p \geq 0,05$) (Şekil 34).



Şekil 34. GC1 için eIF2 α geni ifadesinin qRT-PCR sonuçlarının gruplara göre değişimi. Gruplar arası karşılaştırmada Kruskal Wallis istatistiksel analizi yapıldı. . Çoklu karşılaştırma için Post hoc testi olarak Dunn testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme sonuçlarında $P \leq 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi

GC2 hücre hattı için bakıldığında GC2-ISM modelinde GC2-K grubuna göre eIF2 α geninin ifadesinin yaklaşık olarak 2 kat artmış olduğu gözlemlendi. GC2-ISMSAL modelinde eIF2 α relatif mRNA ifadesinde GC2-ISM grubuna oranla bir azalma olduğu fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu ($p \geq 0,05$) (Şekil 35).



Şekil 35. GC2 için eIF2 α geni ifadesinin qRT-PCR sonuçlarının gruplara göre değişimi. Gruplar arası karşılaştırmada Kruskal Wallis istatistiksel analizi yapıldı. . Çoklu karşılaştırma için Post hoc testi olarak Dunn testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme sonuçlarında $P \leq 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi

7.TARTIŞMA

Memelilerde testislerde meydana gelen spermatogenez süreci, vücut ısısından daha düşük bir ısıda meydana gelmektedir (Danno ve ark. 2000). Erkeklerde, ısıya maruz kalma fertilité üzerinde ciddi zararlı bir etkiye sahip olmanın yanı sıra, infertilité için önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (Thonneau ve ark. 1998). Anormal bir ısı artışına maruz kalan spermatogenik hücrelerde artmış DNA hasarı, apoptoz görülmekle birlikte bu süreçlerin altında yatan moleküler ve hücreyel olaylar zinciri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (J.-H. Kim ve ark. 2013). Endoplazmik retikulum hücre metabolizması, canlılığının devam ettirilmesi ve gelişim aşamalarında önemli fonksiyonlara sahip organellerden birisidir (Kim ve ark. 2008). ER fonksiyonlarının intrasellüler veya ekstrasellüler etkenler nedeniyle bozulması ER stresi olarak adlandırılmaktadır (Mori 2000). Artmış ısı miktarı hücrede ER stresine sebep olan çevresel faktörlerden birisidir (Liu ve ark. 2012). ER stresi endoplazmik retikulumda katlanmamış veya yanlış katlanmış protein birikimi meydana gelir ve bu da hücreyel aktivitenin bozulmasına neden olur. Hücre uzamış ER stres koşullarında UPR adı verilen bir koruma mekanizmasını harekete geçirir ve bu koşullar altında hayatta kalma mücadelesi verir. Memelilerde UPR sinyal yolağı ER-membranına bağı 3 transmembran sensör proteini aracılığıyla başlatılır. Bunlar IRE1 α , PERK ve ATF6'dır. Normal koşullar altında sensör proteinlerin luminal kısımları bir ER şaperon protein olan GRP78 bağı haldeyken stres koşullarında ayrılma gerçekleşir (Ron ve Walter 2007). Uzamış UPR cevabında ER homeostasisi bozulur, hücre stres ile baş edemez ve ölüm mekanizmaları aktifleşir (Tabas ve Ron 2011). SAL, PP1 inhibe ederek eIF2 α defosforilasyonunu baskılamak için kullanılan ve ER stres baskılayıcı olarak bilinen kimyasal bir bileşiktir (Boyce ve ark. 2005; Fullwood ve ark. 2012). Bu çalışmada SALın in vitro ISM oluşturulmuş spermatogenik hücrelerde ER stress sensör proteinleri üzerine etkisinin incelemesi amaçlanmıştır.

SALın sitotoksik konsantrasyon değerinin hesaplanması sonucunda GC1 hücre hattı için IC50 doz değeri 46,5564 μ M; GC2 hücre hattı için 42,691 μ M

bulundu. Uygulama dozu olarak seçilen 20 μ M doz değerinin her iki hücre içinde oldukça düşük seviyede sitotoksik ve sitopatik bir etki oluşturduğu bulundu. Bu sonuçlar ışığında ISM uygulaması ve diğer hücrel teröpatik yaklaşımlar için bu hücrelere uygulanması gereken en uygun dozun 20 μ M olabileceği düşünüldü. İlaç tedavi potansiyellerinin araştırılmasında önemli bir belirteç olan IC50 değeri farmakolojik bir ajanın hücredeki bazal ve maksimum seviyeler arasındaki aktivitesinin % 50'sini engellediği konsantrasyonu ifade etmektedir (Cortés ve ark. 2001). SAL'ın genel hücrel serin/treonin fosfataz PP1 ve enzimatik olmayan kofaktör GADD34'den oluşan protein kompleksi GADD34 / PP1 inhibe ederek eIF2 α defosforilasyonunu önlediği bilinmektedir (Boyce ve ark. 2005; Long ve ark. 2005). Chen ve arkadaşları tarafından 2016'da fare kolon hücre hattında yapılan bir çalışmada SAL'ın hücreler üzerinde 40 μ M ve 80 μ M uygulama dozlarında sitotoksik etkiye sahip olduğu; 5 μ M, 10 μ M ve 20 μ M doz uygulamalarında ise düşük veya sitotoksik olmayan bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Chen ve ark. 2017). Ji ve arkadaşlarının insan deri fibroblast hücreleri üzerinde yapmış olduğu çalışmada SAL'ın değişik konsantrasyonlardaki uygulamalarının (5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M) hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerinde herhangi bir negatif etkiye sahip olmadığı bulunmuştur (Ji ve ark. 2017). İnsan umbilikal kord ven endotel hücrelerinin kullanıldığı bir çalışmada SAL IC50 dozu 42 μ M olarak hesaplanırken 20 μ M uygulamada hücreler üzerinde minör inhibitör etki gösterdiği belirtilmiştir (Sylvest ve ark. 2010). Farmakolojik ajanların IC50 değerleri ve sitotoksik etkileri kullanılan hücre hattına ve uygulama biçimine göre değişiklik gösterebilmektedir (Cortés ve ark. 2001). Bu sonuçlar ışığında uygulama dozu olarak seçilen 20 μ M doz değerinin, hücre tipine ve uygulama şartlarına bağlı olarak değişebileceğinin bir göstergesi olarak değerlendirildi.

Bu çalışmada hücreler inkübatör içerisinde 43 $^{\circ}$ C de 60 dk tutularak spermatogenik hücrelere ISM uygulandı. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, ISM uygulanan gruplarda hücre canlılığının anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi. Bu bulgular ışığında ısı stresi kaynaklı hasarın hücrelerde sayısal olarak azalmaya neden olması nedeni ile uygulamanın ölüm mekanizmalarını aktivelediği düşünüldü. Organizmada bulunan tüm hücreler biyolojik aktivitelerini yerine getirmek için optimal bir sıcaklık ortamına gereksinim duymaktadır (Baeuerle 2013). Eksternal bir stimulus olan ısı stresi birçok sebepten kaynaklanabilir ve yüksek ısı hücrelerde

apoptoza neden olması sebebiyle lethal bir etkiye sahiptir (Matsuki ve ark. 2003). Yapılan birçok in vitro çalışmada ısı stresinin hücre canlılığı üzerine ciddi yan etkileri olduğu gösterilmiştir (Bhardwaj ve ark 2015; Homma ve Fujii 2016; Yang ve ark. 2018). Yang ve arkadaşları tarafından domuz sertoli hücrelerinde yapılan ISM çalışmasında, hücre canlılığının anlamlı bir şekilde azaldığı ve apoptotik hücre sayısının arttığı gösterilmiştir (Yang ve ark. 2018). Homma ve Fujii'nin 2016'da içerisinde GC2 hücre hattında bulunduğu birçok hücre hattının kullanıldığı çalışmada, ısı stresinin hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azalttığı bulunmuştur (Homma ve Fujii 2016). Bhardwaj ve arkadaşları tarafından insan akciğer epitelyal karsinoma hücre hattında (A549 cell line) ısı stresi modeli oluşturulmuş ve hücrelerde canlılığın anlamlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir (Bhardwaj ve ark. 2015). Bu çalışmada da GC1 ve GC2 hücre hatlarında hücre sayısındaki azalmaya ısı stresi modelinin uygulanmasının neden olduğu düşünüldü.

Çalışmamızda GC1 ve GC2 hücre hatlarında kontrol grubu ile kıyaslandığında ISM gruplarında HSP70 immünfloresan CTCF değerlerinin anlamlı bir şekilde artmış olduğu bulundu. Artmış HSP70 immünoreaktivitesi sebebiyle HSP70'in ısı stresini belirteci olarak kullanılabileceği düşünüldü. HSPA1A olarak da bilinen indüklenabilir 70 kDa ısı şoku proteini (HSP70), hücrede meydana gelen stres yanıtının önemli bir bileşeni olan moleküler bir şaperondur. Bir hücrede yüksek sıcaklık, enflamasyon, toksik kimyasallar, oksidatif stres, hipoksi gibi fizyolojik ortamını değiştiren koşullar meydana geldiğinde HSP70 sentezinin arttığı bilinmektedir (Parsell ve Lindquist 1993). Erkek üreme sisteminde hücresel ve dokusal düzeyde ısı stresi sonucu HSP70 immünoreaktivitesinde artış meydana geldiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Chan ve Wu 2013; Kim ve ark. 2013). Kim ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, fare testislerinin 43°C ile oluşturulan hipertermik koşullarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde artmış HSP70 ekspresyonuna sahip olduğu bulunmuştur ve ısı stres belirteci olarak ifade edilmiştir (Kim ve ark. 2013). Hsp70 spesifik olarak spermatosit apoptozu ile ilişkili olduğu ve artmış Hsp70 ekspresyonunun artan TUNEL pozitif hücre sayısı ile korelasyona sahip olduğu bilinmektedir (Rockett ve ark. 2001). Bu bulgular ışığında çalışmamız sonucunda ısı stresinin HSP70 ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir artışa sebep olduğu ve ısı stres belirteci olarak kullanılabileceği düşünüldü.

SAL uygulaması sonrasında GC1 ve GC2 hücre hatlarında ISM gruplarına göre HSP70 CTCF değerlerinde anlamlı bir azalma bulundu. Gao ve arkadaşları tarafından 2013'te sıçan beyinlerinde iskemik model oluşturdukları çalışmada western blot analizleri sonucunda SAL uygulanan gruplarda HSP70 ekspresyonun azaldığı gösterilmiştir (Gao ve ark. 2013). Bu bulgular ışığında SAL'ın ısı stres belirtici olan HSP70 immünoreaktivitesindeki azaltıcı etkisi nedeniyle ısı kaynaklı hasarı azalttığı ileri sürülebilir. Ayrıca ER stres inhibitörü olan SAL'ın hücrede total düzeyde protein translasyonunu düşürdüğü ve ER giren protein yükünü azalttığı için HSP70 ekspresyon seviyelerinde de azalmaya neden olabileceği düşünüldü.

Bu çalışmada her iki hücre hattında yapılan GRP78 immünfloresan değerlendirmede kontrol grubuna göre ISM uygulanan gruplarda CTCF değerleri anlamlı bir şekilde daha yüksek bulundu. Yapılan qRT-PCR analiz sonuçlarında ise immünfloresan değerlendirme sonuçlarıyla uyumlu olarak her 2 hücre hattında da GRP78 mRNA ekspresyon miktarlarında artış meydana geldiği saptandı. Bu sonuçlara göre ısı stresinin ER stresine sebep olduğu düşünüldü. ER'in hücrede fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için şaperon moleküller oldukça önemlidir. En iyi karakterize edilen ER şaperonlarından biri BiP veya HSPA5 olarak bilinen GRP78'tir. Şaperon protein GRP78 yeni sentezlenen polipeptitlerin ER membranı boyunca translokasyonu, yanlış katlanmış proteinleri hedef alan ER ile ilişkilendirilmiş degradasyon (ERAD), kalsiyum homeostazisinin düzenlenmesi gibi birçok hücresel süreçte görev almaktadır. UPR sinyal proteinlerinin aktif forma gelmesini düzenleyerek ER stres sürecinde ana düzenleyici protein olarak görev almaktadır (Lee 2005). GRP78'in homozigot knock-out fare modeli uygulamasında embriyonik hücre proliferasyonun oldukça azaldığı, iç hücre kitlesinde apoptotik hücre miktarının arttığı ve sonuçta embriyonik üçüncü günde ölüm meydana geldiği gösterilmiştir (Luo ve atk. 2006). Kim ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, fare testislerinde GRP78 ekspresyonun olduğu gösterilmiştir. 43°C 15 dk 1 kez ısı uygulaması sonrasında ise GRP78'in ekspresyon miktarının arttığı 3 ve 5 kez uygulama sonrasında ise giderek azaldığı western blot yöntemiyle gösterilmiştir (Kim ve ark. 2013). Uzun süreli ısı uygulaması sonucunda apoptotik hücre ölümünün artışına bağlı olarak GRP78 ekspresyonunun azalması meydana gelebilir. İnsan akciğer kanser hücre hattında (A549) yapılan bir çalışmada 30, 60, 90 dk süre ile ısı stresi uygulanmış ve ER stres yolları incelenmiştir. Bu çalışmada hücrelerde süreyle doğru orantılı bir şekilde GRP78 ekspresyonunun arttığı immünblotlama yöntemiyle gösterilmiştir (Xie ve Ran

2016). Sonuç olarak spermatogenik hücrelerde ER stresi ana düzenleyici şaperon protein olan GRP78'in ekspresyonunun artmış olması bu hücrelerde ER stresinin varlığını göstermektedir.

ISMSAL uygulama gruplarında ISM gruplarında göre GRP78 CTCF değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmanın gerçekleştiği bulundu. Bu bulguların elde edilen GRP78 mRNA qRT-PCR sonuçları ile uyumlu olduğu görüldü. SAL'ın GRP78 seviyelerinde azalmaya neden olması bu hücrelerde ER stresine karşı tedavi amaçlı kullanılabilecek etkili bir molekül olabileceği düşünüldü. Oositlerin partenogenetik aktivasyonun gerçekleştirildiği bir çalışmada, SAL'ın ER stresi üzerine etkileri incelenmiş ve elektrik stimülasyonuna bağlı artan GRP78 ekspresyonunun SAL uygulaması sonrasında azaldığı tespit edilmiştir (Park ve ark. 2018). Yoshida ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada Retinitis Pigmentoza hastalarından alınan deri hücreleri indüklenabilir pluripotent kök hücreye dönüştürülmüş ve sonrasında bu hücreler retinal farklılaştırma ile fotoreseptör hücrelere farklılaştırılmıştır. Farklılaştıran hücrelere SAL uygulaması sonrasında kontrol grubuna kıyasla GRP78 mRNA seviyelerinde anlamlı bir azalış bulunduğu tespit edilmiştir (Yoshida ve ark. 2014). İn vitro ortamda vasküler düz kas hücreleri üzerinde arsenik trioksit uygulamasının yapıldığı bir çalışmada hücreler 10 ve 20 µM SAL ile 16 saat inkübe edilmiştir. Deney sonrasında yapılan western blot analiz sonuçlarına göre SAL uygulamasının yapıldığı gruplarda GRP78 protein seviyesi anlamlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir (Weng ve ark. 2014). Ratlarda iskemik beyin hasarının oluşturulduğu bir çalışmada 150 pmol SAL tedavisi yapılmış ve hasar oluşturulan gruba nazaran uygulama gruplarında GRP78 protein miktarının anlamlı bir şekilde azaldığı bulunmuştur (Gao ve ark. 2013).

GC1 ve GC2 hücre hatlarında ISM gruplarında ATF6 CTCF değerlerinin anlamlı bir şekilde arttığı bulundu. Bu veriler doğrultusunda spermatogenik hücrelerde ER stresinde ATF6 yolağının aktif rol oynadığı düşünüldü. ER lümeninde yanlış katlanmış protein birikimi ER stres koşullarının oluşmasına neden olmaktadır. Bu koşullar altında hücre kendini korumak için UPR adı verilen bir cevap oluşturur (S. Wang ve Kaufman 2012). Memelilerde, UPR sinyal yolu üç ER membranla ilişkili sensör tarafından başlatılmaktadır (Ron ve Walter 2007). Bu üç ER stress sensöründen biri olan ATF6, temel lösin fermuar proteini (bZIP) içeren bir transkripsiyon faktörü ve tip II ER transmembran proteindir.

Memelilerde ATF6a ve ATF6b olmak üzere iki ATF6 geni bulunmakta ve tüm hücrelerden eksprese edilmektedir (Haze ve ark. 2001). ATF6'nın fare testis hücrelerinde eksprese edildiği birçok çalışma ile gösterilmiştir (Du ve ark. 2017; Homma ve Fujii 2016; Kim ve ark. 2013). Kim ve arkadaşları tarafından yapılan farelerde oluşturulan testiküler hipertermi modelinde ATF6'nın ER stresine karşı UPR cevabında aktif rol aldığı western blot analiz yöntemi ile gösterilmiştir (Kim ve ark. 2013). Fare testislerinde vazektomi sonrasında ER stres analizinin yapıldığı bir çalışmada ATF6 mRNA seviyelerinin artmış olduğu bulunmuştur (Du ve ark. 2017). GC2 hücre hattı üzerinde 43 °C 6 saatlik ısı stresi uygulaması sonrasında ATF6 protein seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı immünblotlama yöntemiyle gösterilmiştir (Homma ve Fujii 2016). İnsan akciğer kanser hücre hattında uygulanan ISM sonrasında ise ATF6 protein seviyelerinde anlamlı bir değişiklik olmadığının görüldüğü bildirilmiştir (Xie ve ark. 2016). Bu sonuçlar ışığında spermatogenik hücrelerde ısı stresinin ER stres sensörlerinden olan ATF6 ekspresyon seviyelerini değiştirdiği ve ER stres yolağında etkin bir belirteç olarak değerlendirilebileceği düşünüldü.

SAL uygulanan gruplarda ise ISM gruplarına göre ATF6 CTCF değerlerinin anlamlı bir şekilde azaldığı bulundu. Yeager ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada monokrotalin ile pulmoner hipertansiyon modeli oluşturulan ratlara, SAL uygulaması yapılmış ve sonuçta ATF6 protein seviyelerinin SAL uygulanan gruplarda anlamlı bir şekilde azaldığı bulunmuştur (Yeager ve ark. 2012). Başka bir çalışmada fare kümülüs oosit kompleksi (COC) üzerine in vitro ortamda ER stres indükleyici 16 saat 100 nm thapsigargin ve 100 nm SAL uygulaması yapılmıştır. Çalışma sonucunda ATF6 mRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında SAL uygulanan grupta ATF6'nın anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir (Wu ve ark. 2012). Bu veriler doğrultusunda SAL uygulamasında ER stresini baskıladığı ve ATF6 seviyelerinde anlamlı bir azalma meydana getirdiği görüldü.

GC1 ve GC2 hücre hatlarının her ikisi içinde kontrol grupları ile ISM grupları arasında karşılaştırma yapıldığında p-IRE1 α CTCF değerlerinin ISM gruplarında anlamlı bir şekilde artmış olduğu bulundu. Artmış p-Ire1 α immünfloresan yoğunluğu bu hücre serilerinde ısı stresinin endoplazmik retikulum stresine sebep olduğunun bir göstergesi olarak kabul edildi. ER membranında bulunan ve stres sensörü olarak

adlandırılan Ire1 α sitozolik kinaz ve endoribonükleaz (RNaz) aktivitesine sahip Tip 1 transmembran proteindir. IRE1 α ve IRE1 β olarak adlandırılan iki izoformu bulunmaktadır (Ron 2002). IRE1 α , tüm hücrelerde eksprese olur ve gebelik döneminde embriyoda bu gen bölgesinde meydana gelecek olası bir DNA hasarının ölümle sonuçlandığı bildirilmiştir (Iwawaki ve ark. 2009). ER membran üzerinde bulunan IRE1 α strese karşı duyarlıdır ve stresle ilişkili yolları aktive etme kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir (Bertolotti ve ark. 2001). IRE1 α diğer UPR sensörleri gibi stres olmadığı durumlarda GRP78 ile bağlı durumda inaktif formdadır. ER stresi meydana geldiğinde GRP78'den ayrılarak dimerize olur ve fosforillenir (Bertolotti ve ark. 2001). Kim ve arkadaşları tarafından testiküler hipertermi modeli oluşturan farelerden alınan testis örneklerinde artmış p-IRE1 α ekspresyonu western blot yöntemiyle gösterilmiştir (Kim ve ark. 2013). Başka bir çalışmada ise GC2 hücre hattında 3 ve 6 saatlik 43 °C'de oluşturulan ısı stresi uygulamasında IRE1 α 'nın inaktif formunun süreyle korele bir şekilde azaldığının bulunduğu bildirilmiştir (Homma ve Fujii 2016). Bu sonuçlar ışığında spermatogenik hücrelerde IRE1 α 'nın ER stres yolağında aktif bir rol aldığı bulunmuştur.

GC1 ISM ve ISMSAL grupları karşılaştırıldığında p-IRE1 α CTCF değerlerinin anlamlı bir şekilde azaldığı bulundu. SAL uygulamasının hücrelerde ER stresini baskılayıcı bir ajan olarak sensör protein olan p-IRE1 α seviyelerini etkileyerek azalmaya sebep olduğu gösterildi. GC2 hücre hattında ise ISM ve ISMSAL grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı. SAL'ın bu hücre tipinde p-IRE1 α üzerinde etkin olmadığı sonucuna varıldı. Thapsigargin ile ER stresi oluşturulmuş COC üzerine yapılan bir çalışmada uygulaması sonrasında p-IRE1 α seviyelerinin kontrol grubuna göre arttığı fakat SAL uygulanan tedavi grubunda anlamlı bir değişiklik olmadığı gösterilmiştir (Wu ve ark. 2012). Ji ve arkadaşları tarafından yapılan in vitro ortamda insan deri fibroblast hücrelerinde UVB kaynaklı hücre ölümü üzerine SAL'ın etkisinin incelendiği çalışmada, 20 μ M SAL uygulaması sonrasında p-IRE1 α seviyelerinin anlamlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir (Ji ve ark. 2017). Rani ve arkadaşları tarafından farelerde Transvers Aort Daraltma yapılarak oluşturulmuş kardiyak hipertrofi modelinde SAL uygulaması sonrasında tedavi gruplarında p-IRE1 α seviyelerinin anlamlı bir şekilde azaldığı immünoblotlama yöntemiyle gösterilmiştir (Rani ve ark. 2017). Bu

veriler ışığında hücreler üzerine SAL uygulamasının p-IRE1 α seviyeleri üzerine etkilerinin spesifik olabileceği düşünüldü.

GC1 ve GC2 hücrelerinde yapmış olduğumuz bu çalışmada, p-PERK CTCF değerleri incelendiğinde kontrol grubuna göre ISM gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulundu. Yapılan qRT-PCR değerlendirmesinde ise immünfloresan boyama sonuçları ile uyumlu olarak PERK mRNA ekspresyon seviyelerinde ISM uygulamalarında kontrol grubuna göre artış olduğu saptandı. Isı stresi modelinin hücrelerde ER stresine yol açtığı ve UPR sinyal yolağında PERK aktivasyonunun gerçekleştiği düşünüldü. eIF kinaz ailesi hücrel stresle cevaben genel translasyonun azaltılmasında ve stresle indüklenbilir gen ekspresyonlarının düzenlenmesinde görevli olan protein ailesidir. Tanımlanmış en iyi fonksiyonlarının eIF2 α fosforilasyonun sağlanmasına karşın farklı substratlara etki ettikleri bilinmekte ve hala keşfedilmektedir (Donnelly ve ark. 2013). eIF kinaz ailesinin üyesi olan PERK, C-terminal sitosolik alanında serin / treonin kinaz aktivitesine sahip olan ve luminal domain N-terminalinde yanlış katlanmış proteinlerin birikimini tanıyan tip I ER transmembran proteini (Harding ve ark. 1999). PERK'in aktivasyonu, GRP78'in PERK'in lümen alanından ayrışması ile tetiklenir ve sonuçta PERK otofosforilasyon ve oligomerizasyona uğrar (Bertolotti ve ark. 2000). Xie ve arkadaşları akciğer kanser hücre hatlarında yapmış oldukları çalışmada ısı stresiyle hücrelerde p-PERK protein ekspresyon seviyelerinin artmış olduğunu western blot analizi ile göstermişlerdir (Xie ve ark. 2016). Ursolik asitin ısı stresi oluşturulmuş fare kalp kası hücreleri üzerine etkisinin incelendiği çalışmada ısı artışı olan gruplarda p-PERK seviyelerinin artmış olduğu bulunmuştur (Yang ve ark. 2014). Paraquat ile apoptozun indüklendiği A549 hücrelerinde yapılan bir çalışmada p-PERK protein miktarının kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı belirtilmiştir (Wang ve ark. 2018). Bu sonuçlar ışığında spermatogenik hücrelerde ısı artışının PERK fosforilasyonunun artışına sebep olduğu ve bu durumun ER stres yollarının tetiklendiğinin belirteci olduğu düşünüldü.

SAL uygulaması sonrasında hem GC1 hemde GC2 hücrelerinde p-PERK CTCF değerlerinin anlamlı bir şekilde azaldığı bulundu. Bu bulgular qRT-PCR PERK mRNA seviyelerinin analizi ile uyumlu idi. SAL uygulamasının p-PERK seviyelerindeki değişimi değerlendirildiğinde uygulamanın ER stresini azalttığı düşünüldü. Wang ve arkadaşları tarafından yapılmış çalışmada SAL'ın paraquat ile apoptoz indüklenmiş A549 hücre hattında p-PERK protein miktarları üzerinde anlamlı bir değişiklik yapmadığı bulunmuştur (Wang ve ark. 2018). UV-B uygulaması yapılan

insan dermal fibroblast hücreleri üzerine SAL uygulamasının etkisinin incelendiği bir çalışmada deney sonrasında p-PERK miktarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı western blot analizi ile gösterilmiştir (Ji ve ark. 2017). Beyin ölümü modeli oluşturulmuş ratlarda karaciğer hasarına karşı SALin protektif etkilerinin incelendiği bir çalışmada SAL'ın p-PERK seviyesini anlamlı bir şekilde azalttığı gösterilmiştir (Wang ve ark. 2015). SAL'ın spermatogenik hücrelerde p-PERK seviyesinde azalmaya sebep vererek ısı stresi uygulamasında ER stresinin azalmasında rol oynadığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda p-eIF2 α CTCF değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonrasında ISM gruplarında kontrol gruplarına göre değerlerin anlamlı bir artış gösterdiği saptandı. Alınan immünfloresan sonuçları yapılan qRT-PCR analizi ile uyumlu olduğu görüldü. Artmış ER stresinin eIF2 α 'nın fosforile hale getirerek UPR sinyal yollarının aktiviteye geçmesine sebep olduğu düşünüldü. İnsanda EIF2S1 geni tarafından kodlanan eIF2 α proteini, başlatıcı tRNA'nın (Met-tRNA^{iMet}) 40S ribozomal alt birimlerine bağlanmasını sağlayarak, hücrede gerçekleşecek olan protein sentezi başlama basamağını katalize eder (Spilka ve ark. 2013). Hücreler, eksternal veya internal stres ile karşı karşıya kaldıklarında hücresel işlevi sürdürmelerini sağlayan çeşitli stres yanıt mekanizmalarına sahiptir. Stres-aktif kinazlar tarafından başlatılan bir sinyal yolu olan ve eIF2 α 'nın fosforile hale gelmesini sağlayan süreç bu mekanizmalardan birisidir (Ryoo ve Vasudevan 2017; Walter ve Ron 2011). eIF2 α 'nın fosforile halde kalması ile hücresel düzeyde translasyon başlama aktivitesi inhibe edilmekte böylece ER stres sırasında protein yükünün azaltılmasına bağlı olarak sitoprotektif etkiye sebep olduğu bildirilmektedir (Hotamisligil 2010). Fare testiküler hipertermi modeli oluşturulan çalışmada 43°C uygulama sonrasında p-eIF2 α protein seviyelerinin kontrol grubuna göre artmış olduğu gösterilmiştir (Kim ve ark. 2013). Yapılan başka bir çalışmada ise A549 hücre hatlarına uygulanan ISM'de deney sonunda yapılan analizde ısı artışıyla doğru orantılı bir şekilde p-eIF2 α protein ekspresyon seviyelerinin artmış olduğu bulunmuştur (Xie ve ark. 2016). Homma ve Fujii tarafından yapılan çalışmada, HELA hücrelerinde 3 ve 6 saat ısı stresi oluşturulduğunda p-eIF2 α protein ekspresyonunun arttığı belirtilmiştir (Homma ve Fujii 2016). Çalışmamızın sonuçlarının literatür

bilgisiyle uyumlu olduğu ve spermatogenik hücrelerde ER stres yolağının aktif olarak çalıştığı görüldü.

İmmünfloresan boyama sonuçları değerlendirildiğinde SAL uygulaması yapılan ISMSAL gruplarında ISM gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde CTCF değerlerinin azaldığı bulundu. qRT-PCR ile mRNA ekspresyon seviyelerinde de her iki hücre hattı için ISMSAL gruplarında azalma saptandı. SAL uygulamasının hücrede meydana gelen ER stresin baskılanmasında görev aldığı düşünöldü. Erkek Sprague-Dawley ratlarda yapılan bir çalışmada 150 pmol SAL uygulamasına takiben beyin iskemik model oluşturulmuş ve 6, 12, 24 saat sakrifikasyon sonrası beyin örneklerinden western blot analizi yapılmıştır. 6. saat örneklerinde p-eIF2 α 'nın anlamlı bir artış gösterdiği, 12. ve 24. saat örneklerinde ise uygulamanın ekspresyon seviyeleri üzerinde anlamlı bir değişikliğe sebep olmadığı gösterilmiştir (Gao ve ark. 2013). Paraquat ile hücre hasarı oluşturulmuş A549 akciğer hücre hatlarında SAL uygulaması sonrasında p-eIF2 α değerlerinin anlamlı bir şekilde arttığı immünblotlama yöntemi ile gösterilmiştir (Wang ve ark. 2018). Okazaki ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada C57BL/6 wild-tip farelerde deneysel kolit modeli oluşturulmuş ve SAL uygulaması yapılmıştır. Deney sonunda SAL uygulanan gruplarda p-eIF2 α protein değerleri anlamlı bir şekilde artmış olduğu bildirilmiştir (Okazaki ve ark. 2014). Nörotoksin β -N-methylamino-L-alanine uygulanan nöranal hücrelerde ER stres sinyal yolağının analizinin yapıldığı çalışmada 30 μ M SAL ilavesi sonrasında p-eIF2 α protein miktarının sadece nörotoksin uygulanan gruplara göre anlamlı bir şekilde azalmış olduğu gösterildi (Shen ve ark. 2016). Pek çok koşulda hücreye sağladığı faydaya rağmen, eIF2 α 'nın fosforilasyonunun kendisinin pro-apoptotik mi yoksa anti-apoptotik sinyal olup olmadığı konusu halen tartışmalıdır (Perkins ve Barber 2004; Scheuner ve ark. 2006). Bu sonuçlar ışığında ER stresinin baskılanması nedeniyle p-eIF2 α seviyelerinde azalma meydana gelebileceğı görüldü. Literatür taramasında çıkan farklı sonuçlar değerlendirildiğinde ER stres yolaklarında aktif görev yapan diğer mekanizmaların (pro-apoptotik veya antiapoptotik mekanizmalar) analizinin yapılmasının gerekli olduğu düşünöldü.

8.SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışmamızda GC1 spermatogonyum ve GC2 spermatosit hücre hattı olan spermatogeneik hücrelerde ISM oluşturuldu. Kültür ortamında SAL etken maddesinin IC50 değeri MTT yöntemi ile hesaplanarak bulundu. Bu hücrelerde SAL uygulamasının ER stres yolağında rol oynayan PERK, eIF2 α , ATF6, GRP78, HSP70, IRE1 α molekülleri üzerine etkisi immünfloresan boyama ve qRT-PCR tekniği ile analiz edildi.

SALin GC1 hücre hattı için IC50 doz değeri 46,5 μ M ; GC2 hücre hattı için 42,6 μ M bulundu. Uygulama dozu olarak seçilen 20 μ M doz değerinin her iki hücre içinde oldukça düşük seviyede sitotoksik ve sitopatik bir etki oluşturduğu bulundu.

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ISM uygulanan gruplarda hücre canlılığının anlamlı bir şekilde azaldığı ve ölü hücre sayısının arttığı bulundu.

Çalışmamızda GC1 ve GC2 hücre hatlarında kontrol grubu ile kıyaslandığında ISM gruplarında HSP70 immünfloresan CTCF değerlerinin anlamlı bir şekilde artmış olduğu bulundu. Bununla birlikte SAL uygulaması sonrasında GC1 ve GC2 hücre hatlarında ISM gruplarına göre HSP70 CTCF değerlerinde anlamlı bir azalma bulundu.

GC1 ve GC2 hücre hatlarında ISM gruplarında ATF6 CTCF değerlerinin anlamlı bir şekilde arttığı bulundu. SAL uygulanan gruplarda ise ISM gruplarına göre ATF6 CTCF değerlerinin anlamlı bir şekilde azaldığı bulundu.

GC1 ve GC2 hücre hatlarının her ikisi içinde kontrol grupları ile ISM grupları arasında karşılaştırma yapıldığında p-IRE1 α CTCF değerlerinin ISM gruplarında anlamlı bir şekilde artmış olduğu bulundu. GC1 ISM ve ISMSAL grupları karşılaştırıldığında p-IRE1 α CTCF değerlerinin anlamlı bir şekilde azaldığı bulundu. GC2 ISM ve ISMSAL grupları karşılaştırıldığında ise p-IRE1 α CTCF değerleri arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı bulundu.

Bu çalışmada her iki hücre hattında yapılan GRP78 immünfloresan değerlendirmede kontrol grubuna göre ISM uygulanan gruplarda CTCF değerleri

anlamli bir sekilde daha yuiksek bulundu. ISMSAL uygulama gruplarinda ISM gruplarinda gore GRP78 CTCF degerlerinde istatistiksel olarak anlamli bir sekilde azalmanin gerceklestigi bulundu. Bu bulgularin elde edilen GRP78 mRNA qRT-PCR sonuclari ile uyumlu olduğu goruildi.

p-eIF2 α CTCF degerlerinin istatistiksel olarak degerlendirilmesi sonrasinda ISM gruplarinda kontrol gruplarina gore degerlerin anlamli bir artis gosterdigi saptandi. Alinan immunfloresan sonuclari yapilan qRT-PCR analizi ile uyumlu olduğu goruildi. Immunfloresan boyama sonuclari degerlendirildiginde SAL uygulaması yapilan ISMSAL gruplarinda ISM gruplarina gore istatistiksel olarak anlamli bir sekilde CTCF degerlerinin azaldigi bulundu. qRT-PCR ile mRNA ekspresyon seviyelerinde de her iki hucre hattı için ISMSAL gruplarinda azalma saptandi.

GC1 ve GC2 hucrelerinde yaptis oldugumuz bu calismada p-PERK CTCF degerleri incelendiginde kontrol grubuna gore ISM gruplarinda istatistiksel olarak anlamli bir artis bulundu. Yapilan qRT-PCR degerlendirmesinde ise immunfloresan boyama sonuclari ile uyumlu olarak PERK mRNA ekspresyon seviyelerinde ISM uygulamalarinda kontrol grubuna gore artis olduğu saptandi. SAL uygulaması sonrasinda hem GC1 hemde GC2 hucrelerinde p-PERK CTCF degerlerinin anlamli bir sekilde azaldigi bulundu. Bu bulgular qRT-PCR PERK mRNA seviyelerinin analizi ile uyumlu idi.

Sonuc olarak bu calismada ısı stresi uygulaması ile spermatogenik hucrelerde ER stres yolağı molekullerinin aktive olduğu gorulmüstür. Buna paralel olarak SAL uygulamasının ER stres belirteçlerinin aktivitesini azalttigi bulunmuştur. Daha ileride yapılacak calismalarla bu yolak ve belirteçleri ile diger hucre sinyal mekanizmalarının etkilesimi ve iletisimi daha detaylı olarak calisilmalıdır. Elde edilen verilerle ısı stresi hasarı sonucu olusmus erkek infertilitesi olgularında tedavi ve terapi potansiyelleri arastirilmalıdır.

9.KAYNAKLAR

Baeuerle, P. A. *Inducible Gene Expression, Volume 1: Environmental Stresses and Nutrients* ((2013).): Springer Science & Business Media.

Balhorn, R., Cosman, M., Thornton, K., Krishnan, V., Corzett, M., Bench, G., . . . Prieto, M. (1999). Protamine mediated condensation of DNA in mammalian sperm. In: Cache River Press.

Bendel–Stenzel, M., Anderson, R., Heasman, J. ve Wylie, C. (1998). *The origin and migration of primordial germ cells in the mouse*. Paper presented at the Seminars in cell & developmental biology.

Bertolotti, A., Wang, X., Novoa, I., Jungreis, R., Schlessinger, K., Cho, J. H., . . . Ron, D. Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1 β -deficient mice. *The Journal of clinical investigation*, (2001). 107(5), 585-593.

Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P. ve Ron, D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature cell biology*, (2000). 2(6), 326.

Bhardwaj, M., Paul, S., Jakhar, R. ve Kang, S. C. Potential role of vitexin in alleviating heat stress-induced cytotoxicity: Regulatory effect of Hsp90 on ER stress-mediated autophagy. *Life sciences*, (2015). 142, 36-48.

Boyce, M., Bryant, K. F., Jousse, C., Long, K., Harding, H. P., Scheuner, D., . . . Ron, D. A selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science*, (2005). 307(5711), 935-939.

Burman, A., Tanjore, H. ve Blackwell, T. S. Endoplasmic reticulum stress in pulmonary fibrosis. *Matrix Biology*, (2018). 68, 355-365.

Carlsen, E., Andersson, A. M., Petersen, J. H. ve Skakkebaek, N. E. History of febrile illness and variation in semen quality. *Human reproduction*, (2003). 18(10), 2089-2092.

Chan, C.-C., Sun, G.-H., Shui, H.-A. ve Wu, G.-J. Differential spermatozoal protein expression profiles in men with varicocele compared to control subjects: upregulation of heat shock proteins 70 and 90 in varicocele. *Urology*, (2013). 81(6), 1379. e1371-1379. e1378.

Chen, S., Sun, C., Gu, H., Wang, H., Li, S., Ma, Y. ve Wang, J. Salubrinal protects against *Clostridium difficile* toxin B-induced CT26 cell death. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, (2017). 49(3), 228-237.

Chen, X., Shen, J. ve Prywes, R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *Journal of Biological Chemistry*, (2002). 277(15), 13045-13052.

Choy, M. S., Yusoff, P., Lee, I. C., Newton, J. C., Goh, C. W., Page, R., . . . Peti, W. Structural and functional analysis of the GADD34: PP1 eIF2 α phosphatase. *Cell reports*, (2015). 11(12), 1885-1891.

Clermont, Y. ve Perey, B. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *American Journal of Anatomy*, (1957). 100(2), 241-267.

Cnop, M., Ladriere, L., Hekerman, P., Ortis, F., Cardozo, A. K., Dogusan, Z., . . . Eizirik, D. L. Selective inhibition of eukaryotic translation initiation factor 2 α dephosphorylation potentiates fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress and causes pancreatic β -cell dysfunction and apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, (2007). 282(6), 3989-3997.

Cortés, A., Cascante, M., Cárdenas, M. L. ve Cornish-Bowden, A. Relationships between inhibition constants, inhibitor concentrations for 50% inhibition and types of inhibition: new ways of analysing data. *Biochemical Journal*, (2001). 357(1), 263-268.

Danno, S., Itoh, K., Matsuda, T. ve Fujita, J. Decreased expression of mouse Rbm3, a cold-shock protein, in Sertoli cells of cryptorchid testis. *The American journal of pathology*, (2000). 156(5), 1685-1692.

de Kretser, D. M., Loveland, K. L., Meinhardt, A., Simorangkir, D. ve Wreford, N. Spermatogenesis. *Human reproduction*, (1998). 13(suppl_1), 1-8.

de Rooij, D. G. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction (Cambridge, England)*, (2001). 121(3), 347.

De Rooij, D. G. ve Griswold, M. D. Questions about spermatogonia posed and answered since 2000. *Journal of andrology*, (2012). 33(6), 1085-1095.

DE ROOIJ, D. G. ve RUSSELL, L. D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *Journal of andrology*, (2000). 21(6), 776-798.

Donnelly, N., Gorman, A. M., Gupta, S. ve Samali, A. The eIF2 α kinases: their structures and functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, (2013). 70(19), 3493-3511.

Du, Z.-N., Rong, C.-T., Hui, S., Peng, Z., Jin, S.-H., Li, S.-J., . . . Li, J.-Y. Expression and function of HSP110 family in mouse testis after vasectomy. *Asian journal of andrology*, (2017). 19(3), 355.

Durairajanayagam, D., Agarwal, A. ve Ong, C. Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. *Reproductive biomedicine online*, (2015). 30(1), 14-27.

Fawcett, D. W. The mammalian spermatozoon. *Developmental biology*, (1975). 44(2), 394-436.

Fullwood, M. J., Zhou, W., & Shenolikar, S. (2012). Targeting phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2 α to treat human disease. In *Progress in molecular biology and translational science* (Vol. 106, pp. 75-106). Academic Press.

Gao, B., Zhang, X.-y., Han, R., Zhang, T.-t., Chen, C., Qin, Z.-h. ve Sheng, R. The endoplasmic reticulum stress inhibitor salubrinal inhibits the activation of autophagy and neuroprotection induced by brain ischemic preconditioning. *Acta Pharmacologica Sinica*, (2013). 34(5), 657.

Ginsburg, M., Snow, M. ve McLAREN, A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*, (1990). 110(2), 521-528.

Griswold, M. D. Spermatogenesis: the commitment to meiosis. *Physiological reviews*, (2015). 96(1), 1-17.

Harding, H. P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H. ve Ron, D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Molecular cell*, (2000). 5(5), 897-904.

Harding, H. P., Zhang, Y. ve Ron, D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, (1999). 397(6716), 271.

HAZE, K., OKADA, T., YOSHIDA, H., YANAGI, H., YURA, T., NEGISHI, M. ve MORI, K. Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response. *Biochemical Journal*, (2001). 355(1), 19-28.

Homma, T. ve Fujii, J. Heat stress promotes the down-regulation of IRE1 α in cells: An atypical modulation of the UPR pathway. *Experimental cell research*, (2016). 349(1), 128-138.

Hotamisligil, G. S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*, (2010). 140(6), 900-917.

Iwawaki, T., Akai, R., Yamanaka, S. ve Kohno, K. Function of IRE1 alpha in the placenta is essential for placental development and embryonic viability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (2009). 106(39), 16657-16662.

Jan, C. H., Williams, C. C. ve Weissman, J. S. Principles of ER cotranslational translocation revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science*, (2014). 346(6210), 1257521.

Ji, C., Yang, B., Huang, S.-y., Huang, J.-w. ve Cheng, B. Salubrinal protects human skin fibroblasts against UVB-induced cell death by blocking endoplasmic reticulum (ER) stress and regulating calcium homeostasis. *Biochemical and biophysical research communications*, (2017). 493(4), 1371-1376.

Kadowaki, H. ve Nishitoh, H. Signaling pathways from the endoplasmic reticulum and their roles in disease. *Genes*, (2013). 4(3), 306-333.

Kanter, M., Aktas, C. ve Erboga, M. Heat stress decreases testicular germ cell proliferation and increases apoptosis in short term: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Toxicology and industrial health*, (2013). 29(2), 99-113.

Kerr, J. B. Cytology of the testis and intrinsic control mechanism. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*, (2006). 827-947.

Kierszenbaum, A. L. ve Tres, L. Histology and cell biology. *An Introduction to Pathology*. St. Louis, (2002). 95.

Kim, I., Xu, W. ve Reed, J. C. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nature reviews Drug discovery*, (2008). 7(12), 1013.

Kim, J.-H., Park, S.-J., Kim, T.-S., Park, H.-J., Park, J., Kim, B. K., . . . Chae, J.-I. Testicular hyperthermia induces unfolded protein response signaling activation in spermatocyte. *Biochemical and biophysical research communications*, (2013). 434(4), 861-866.

Kuang, H., Yang, P., Yang, L., Aguilar, Z. P., & Xu, H.. Size dependent effect of ZnO nanoparticles on endoplasmic reticulum stress signaling pathway in murine liver. *Journal of hazardous materials*, (2016). 317, 119-126.

Lawson, K. A., Dunn, N. R., Roelen, B. A., Zeinstra, L. M., Davis, A. M., Wright, C. V., . . . Hogan, B. L. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes & development*, (1999). 13(4), 424-436.

Lee, A. H., Chu, G. C., Iwakoshi, N. N. ve Glimcher, L. H. XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands. *The EMBO journal*, (2005). 24(24), 4368-4380.

Lee, A. S. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods*, (2005). 35(4), 373-381.

Liu, C. Y., Xu, Z. ve Kaufman, R. J. Structure and intermolecular interactions of the luminal dimerization domain of human IRE1 α . *Journal of Biological Chemistry*, (2003). 278(20), 17680-17687.

Liu, Y., Sakamoto, H., Adachi, M., Zhao, S., Ukai, W., Hashimoto, E., . . . Shinomura, Y. Heat stress activates ER stress signals which suppress the heat shock response, an effect occurring preferentially in the cortex in rats. *Molecular biology reports*, (2012). 39(4), 3987-3993.

Long, K., Boyce, M., Lin, H., Yuan, J. ve Ma, D. Structure–activity relationship studies of salubrinal lead to its active biotinylated derivative. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, (2005). 15(17), 3849-3852.

Lue, Y.-H., Sinha Hikim, A. P., Swerdloff, R. S., Im, P., Taing, K. S., Bui, T., . . . Wang, C. Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology*, (1999). 140(4), 1709-1717.

Lue, Y. H., Lasley, B. L., Laughlin, L. S., Swerdloff, R. S., Hikim, A. P. S., Leung, A., . . . Wang, C. Mild testicular hyperthermia induces profound transitional spermatogenic suppression through increased germ cell apoptosis in adult cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Journal of andrology*, (2002). 23(6), 799-805.

Luo, S., Mao, C., Lee, B. ve Lee, A. S. GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. *Molecular and cellular biology*, (2006). 26(15), 5688-5697.

Matsuki, S., Iuchi, Y., Ikeda, Y., Sasagawa, I., Tomita, Y. ve Fujii, J. Suppression of cytochrome c release and apoptosis in testes with heat stress by minocycline. *Biochemical and biophysical research communications*, (2003). 312(3), 843-849.

McCarrey, J. Cell and Molecular Biology of the Testis. *New York: Oxford UP*, (1993). 58-89.

Michalak, M. ve Gye, M. C. Endoplasmic reticulum stress in periimplantation embryos. *Clinical and experimental reproductive medicine*, (2015). 42(1), 1-7.

Moore, K. L. ve Persaud, T. Clinically oriented embryology. *The Developing Human*, (2004). 10.

Mori, K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*, (2000). 101(5), 451-454.

Munkelwitz, R. ve GILBERT, B. R. Are boxer shorts really better? A critical analysis of the role of underwear type in male subfertility. *The Journal of urology*, (1998). 160(4), 1329-1333.

Nunes, A., Santos, J., Gouveia, B., Menezes, V., Matos, M., Faria, M. ve Gradel, A. Morphological development of the testicles and spermatogenesis in guinea pigs (*Cavia porcellus* Linnaeus, 1758). *Journal of Morphological Sciences*, (2017). 34(03), 143-151.

Okazaki, T., Nishio, A., Takeo, M., Sakaguchi, Y., Fukui, T., Uchida, K. ve Okazaki, K. Inhibition of the Dephosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor 2E Ameliorates Murine Experimental Colitis. *Digestion*, (2014). 90(3), 167-178.

Papa, F. R., Zhang, C., Shokat, K. ve Walter, P. Bypassing a kinase activity with an ATP-competitive drug. *Science*, (2003). 302(5650), 1533-1537.

Park, H.-B., Kim, M.-J., Jung, B.-D., Lee, S., Park, C.-K., Yang, B.-K. ve Cheong, H.-T. Effect of Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Inhibitor Treatment during Parthenogenetic Activation on the Apoptosis and In Vitro Development of Parthenogenetic Porcine Embryos. *Development & reproduction*, (2018). 22(3), 235.

Parsell, D. ve Lindquist, S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual review of genetics*, (1993). 27(1), 437-496.

Paul, C., Murray, A. A., Spears, N. ve Saunders, P. T. A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. *Reproduction*, (2008). 136(1), 73-84.

Perkins, D. J. ve Barber, G. N. Defects in translational regulation mediated by the α subunit of eukaryotic initiation factor 2 inhibit antiviral activity and facilitate the malignant transformation of human fibroblasts. *Molecular and cellular biology*, (2004). 24(5), 2025-2040.

Phillips, B. T., Gassei, K. ve Orwig, K. E. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, (2010). 365(1546), 1663-1678.

Piera-Valezquez S., Makul A., Jimenez SA., Increased expression of NADPH Oxidase 4 in Systemic Sclerosis Dermal Fibroblasts. *Arthritis and Rheumatology* (2015). 67(10), 2749-2758.

Rani, S., Sreenivasaiah, P. K., Cho, C. ve Kim, D. H. Salubrinol alleviates pressure overload-induced cardiac hypertrophy by inhibiting endoplasmic reticulum stress pathway. *Molecules and cells*, (2017). 40(1), 66.

Reid, D. W. ve Nicchitta, C. V. Diversity and selectivity in mRNA translation on the endoplasmic reticulum. *Nature reviews Molecular cell biology*, (2015). 16(4), 221-231.

Rockett, J. C., Mapp, F. L., Garges, J. B., Luft, J. C., Mori, C. ve Dix, D. J. Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. *Biology of reproduction*, (2001). 65(1), 229-239.

Ron, D. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *The Journal of clinical investigation*, (2002). 110(10), 1383-1388.

Ron, D. ve Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews Molecular cell biology*, (2007). 8(7), 519.

Ross, M. ve Pawlina, W. *Histology, A text and atlas, with correlated cell and molecular biology* ((2017).): Lippincott Williams & Wilkins.

Russell, L. Mammalian spermatogenesis. *Histological and histopathological evaluation of the testis*, (1990). 1-40.

Russell, L. D., Ettlin, R. A., Hikim, A. P. S. ve Clegg, E. D. Histological and histopathological evaluation of the testis. *International journal of andrology*, (1993). 16(1), 83-83.

Ryoo, H. D. ve Vasudevan, D. Two distinct nodes of translational inhibition in the Integrated Stress Response. *BMB reports*, (2017). 50(11), 539.

Scheuner, D., Patel, R., Wang, F., Lee, K., Kumar, K., Wu, J., . . . Kaufman, R. J. Double-stranded RNA-dependent protein kinase phosphorylation of the α -subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, (2006). 281(30), 21458-21468.

Schwarz, D. S. ve Blower, M. D. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, (2016). 73(1), 79-94.

Shen, H., Kim, K., Oh, Y., Yoon, K. S., Baik, H. H., Kim, S. S., . . . Choe, W. Neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine induces endoplasmic reticulum stress-mediated neuronal apoptosis Corrigendum in/10.3892/mmr. 2018.9242. *Molecular medicine reports*, (2016). 14(5), 4873-4880.

Shiraishi, K. (2012). Heat and oxidative stress in the germ line. In *Studies on Men's Health and Fertility* (pp. 149-178): Springer.

Spilka, R., Ernst, C., Mehta, A. K. ve Haybaeck, J. Eukaryotic translation initiation factors in cancer development and progression. *Cancer letters*, (2013). 340(1), 9-21.

Sui, T., Ge, D.-w., Yang, L., Tang, J., Cao, X.-j. ve Ge, Y.-b. Mitomycin C induces apoptosis in human epidural scar fibroblasts after surgical decompression for spinal cord injury. *Neural regeneration research*, (2017). 12(4), 644.

Sylvest, L., Bendiksen, C. D. ve Houen, G. Phosphatase inhibitors with anti-angiogenic effect in vitro. *Apmis*, (2010). 118(1), 49-59.

Tabas, I. ve Ron, D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature cell biology*, (2011). 13(3), 184.

Thonneau, P., Bujan, L., Multigner, L. ve Mieusset, R. Occupational heat exposure and male fertility: a review. *Human Reproduction (Oxford, England)*, (1998). 13(8), 2122-2125.

Töihönen, V., Ritzen, E., Nordqvist, K. ve Wedell, A. Male sex determination and prenatal differentiation of the testis. *The developing testis. physiology and pathophysiology. Karger, Basel. p*, (2003). 1-23.

Walter, P. ve Ron, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, (2011). 334(6059), 1081-1086.

Wang, R., Sun, D.-Z., Song, C.-Q., Xu, Y.-M., Liu, W., Liu, Z. ve Dong, X.-S. Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit α (eIF2 α) inhibitor salubrinal attenuates paraquat-induced human lung epithelial-like A549 cell apoptosis by regulating the PERK-eIF2 α signaling pathway. *Toxicology in Vitro*, (2018). 46, 58-65.

Wang, S. ve Kaufman, R. J. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J cell Biol*, (2012). 197(7), 857-867.

Wang, T., Zhang, S.-J., Cao, S.-L., Guo, W.-Z., Yan, B. ve Fang, H.-B. Protective effects of salubrinal on liver injury in rat models of brain death. *Chinese medical journal*, (2015). 128(11), 1523.

Weng, C.-Y., Chiou, S.-Y., Wang, L., Kou, M.-C., Wang, Y.-J. ve Wu, M.-J. Arsenic trioxide induces unfolded protein response in vascular endothelial cells. *Archives of toxicology*, (2014). 88(2), 213-226.

Wu, L. L., Russell, D. L., Norman, R. J. ve Robker, R. L. Endoplasmic reticulum (ER) stress in cumulus-oocyte complexes impairs pentraxin-3 secretion, mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), and embryo development. *Molecular endocrinology*, (2012). 26(4), 562-573.

Xie, W.-Y., Zhou, X.-D., Yang, J., Chen, L.-X. ve Ran, D.-H. Inhibition of autophagy enhances heat-induced apoptosis in human non-small cell lung cancer cells through ER stress pathways. *Archives of biochemistry and biophysics*, (2016). 607, 55-66.

Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., . . . Mori, K. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6 α and XBP1. *Developmental cell*, (2007). 13(3), 365-376.

Yang, W.-R., Liao, T.-T., Bao, Z.-Q., Zhou, C.-Q., Luo, H.-Y., Lu, C., . . . Wang, X.-Z. Role of AMPK in the expression of tight junction proteins in heat-treated porcine Sertoli cells. *Theriogenology*, (2018). 121, 42-52.

Yang, Y., Li, C., Xiang, X., Dai, Z., Chang, J., Zhang, M., . . . Guo, Y. Ursolic acid prevents endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis induced by heat stress in mouse cardiac myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, (2014). 67, 103-111.

Yeager, M. E., Belchenko, D. D., Nguyen, C. M., Colvin, K. L., Ivy, D. D., & Stenmark, K. R. (2012). Endothelin-1, the unfolded protein response, and persistent inflammation: role of pulmonary artery smooth muscle cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 46(1), 14-22.

Yoshida, T., Ozawa, Y., Suzuki, K., Yuki, K., Ohyama, M., Akamatsu, W., . . . Tsubota, K. The use of induced pluripotent stem cells to reveal pathogenic gene mutations and explore treatments for retinitis pigmentosa. *Molecular brain*, (2014). 7(1), 45.

Zanotto TM., Quaresma PGF, Guadagnini D., Weissmann L., Santos AC., Vecina JF., Calisto K., Santos A., Prada PO., Saad MJA. Blocking iNOS and endoplasmic reticulum stress synergistically improves insulin resistance in mice. *Molecular Metabolism*, (2016). 6(2), 206-208.

Zhang, K. ve Kaufman, R. (2006). Protein folding in the endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. In *Molecular chaperones in health and disease* (pp. 69-91): Springer.

Zhang, L., Tian, Z., Li, W., Wang, X., Man, Z., & Sun, S.. Inhibitory effect of quercetin on titanium particle induced endoplasmic reticulum stress related apoptosis and in vivo osteolysis. *Bioscience reports*, (2017). 37(4), BSR20170961.

Zhou, Q. ve Griswold, M. D. (2008). Regulation of spermatogonia. In *StemBook [Internet]*: Harvard Stem Cell Institute.



T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

Sayı : 28233352-302.14.01-
Konu : Suna SAYGILI'nın Tez Konusu
Değişikliği Hk.

SBE HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

Enstitümüz 18.01.2019 tarih ve 2/10 sayılı yönetim kurulu toplantısında Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı 151348009 numaralı öğrencisi Suna SAYGILI'nın 07.02.2018 tarih ve 05/03 sayılı Yönetim Kurulu Toplantısında "Isı Stresi Oluşturulmuş Testislerden Alınan Testiküler Hücrelerin Üç Boyutlu Hücre Kültürü Ortamında Karakterizasyonu" olarak belirlenen tez konusunun, etik kurul onayı alınması kaydı ile "Salubrinalin İn Vitro Isı Stresi Oluşturulmuş Spermatogenik Hücrelerde ER Stres Yolağı Üzerine Etkisi" değiştirilmesine OY BİRLİĞİ ile karar verildi.

Gereğini ve bilgilerinizi rica ederim.

e-imzalıdır

Prof. Dr. Bilal-i Habeş GÜMÜŞ
Enstitü Müdürü V.



T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu

.....
Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Başkanlığı'na

Tez Adı SALUBRİNALİN İN VİTRO ISI STRESİ OLUŞTURULMUS SPERMATOGENİK HÜCRELERDE ER STRES YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİ

Tezime ilişkin...16/12/2019. tarihinde yapılan Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 9'tür.

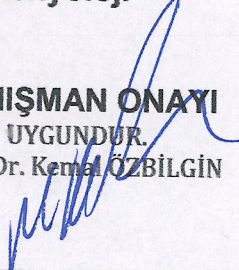
Belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Tarih ve İmza



Adı Soyadı : Suna Karadeniz Saygılı
Öğrenci No : 151348009
Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji
Programı : Doktora

DANIŞMAN ONAYI
 UYGUNDUR.
 Prof. Dr. Kemal ÖZBİLGİN



Açıklamalar

1-Tez Çalışması Orijinallik Raporu (TÇOR), TURNITIN İntihal Tespit Programı kullanımı için kişisel hesap alma hakkı bulunan tez danışmanları, Enstitülerde görevlendirilen personeller, Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı'nda görevlendirilen kütüphaneciler tarafından alınır.

2-Sayfa sayısı 400'den az olan tezler için tez savunmasından önce ve başarılı olması durumunda düzeltmelerden sonra olmak üzere 2 kez TÇOR alınır.(400 sayfadan fazla olan tezler 400 ve katları şeklinde bölünerek Turnitin veri tabanına yüklenmesi gerekmektedir. Bu gibi durumlarda benzerlik oranının hesaplanmasına ilişkin detaylı forma, kütüphane web sayfasında bulunan Turnitin kullanım kılavuzlarının altından erişilebilir.)

3-TÇOR, tezin yalnızca Kapak Sayfası, Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan kısmının tek bir dosya olarak intihal tespit programına yüklenmesi ile alınır.

Programa yükleme yapılırken Dosya Başlığı (document title) olarak tez başlığının tamamı, Yazar Adı (author's first name) olarak öğrencinin adı, Yazar Soyadı (author's last name) olarak öğrencinin soyadı bilgisi yazılır.

4- TURNITIN İntihal tespit programına yüklenen dosyanın süreçlenmesinde, ilgili programdaki filtreleme seçenekleri aşağıdaki şekilde ayarlanır: - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 5 words)

5-İsteğe bağlı ayarlar kısmından; "Ödevleri şuraya gönder?" seçeneği mutlaka DEPO YOK şeklinde işaretlenmesi gerekmektedir; aksi durumda aynı tezin ikinci kez yüklenmesi durumunda benzerlik %100 çıkacaktır ve depodan tezi silmek çok uzun süreç gerektirecektir.

6- Raporlama işlemi tamamlandıktan sonra, kaydedilmiş olan ekranın görüntüsünü sağ üst köşesinde yüzdelik sayı olarak belirtilen "benzerlik oranı," raporlamaya tabi tutulmuş olan dosyanın "toplam sayfa sayısı" ve raporlama işleminin yapıldığı "tarih" bilgisi, "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu" formuna işlenir.

7- Benzerlik oranında tüm sorumluluk öğrenciye aittir.

8-Tez savunma sınavı sonrasında başarılı bulunan öğrenci, tez savunma sınavı tarihi sonrasında tezde yapılmış muhtemel değişiklikleri içeren dosya kullanılarak alınmış ikinci bir intihal raporundaki bilgiler kullanılarak hazırlanmış ve tez danışmanı tarafından onaylanarak imzalanmış ikinci bir "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu"nu Enstitüye teslim etmekle yükümlüdür.

9-Turnitin Hakkında Bilgiler: <http://kutuphane.cbu.edu.tr/turnitin.9370.tr.html>

11.ÖZGEÇMİŞ

Adı	SUNA	Soyadı	KARADENİZ SAYGILI
Doğum Yeri	GEBZE	Doğum Tarihi	14.01.1988
Uyruğu	T.C.	Tel	05536082149
E-mail	sun_a_saygili@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurum Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	Manisa Celal Bayar Üniversitesi	2020
Yüksek Lisans	Manisa Celal Bayar Üniversitesi	2016
Üniversite	Ege Üniversitesi	2010
Lise	Medine Tayfur Sökmen Lisesi	2004

İş Deneyimi

Görevi	Kurumu	Süre (Yıl-Yıl)
Araştırma Görevlisi	Dumlupınar Üniversitesi	2013- 2013
Araştırma Görevlisi	Manisa Celal Bayar Üniversitesi	2013- 2018
Araştırma Görevlisi	Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi	2018- Halen

Yabancı Dil

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu

Y	Ü	IE	YÖ	TO	TO	C	C	F
DS	DS	LTS	KDİL	EFL CBT	EFL PBT	AE	PE	CE
	6 6,25		79,2 5					

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office	İleri