

**T.C.  
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ERİŞKİN ERKEK SIÇANLARDA KİSSPEPTİNİN  
SPERMATOGENEZİS VE APOPTOZİSE ETKİSİNİN  
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL, IŞIK ve ELEKTRON  
MİKROSKOPİK OLARAK İNCELENMESİ**

**Nilüfer ULAŞ**

**Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Yönetmeliğinin Histoloji ve Embriyoloji Programı İçin Öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.**

**BOLU  
2011**

**T.C.**  
**ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ERİŞKİN ERKEK SIÇANLARDA KİSSPEPTİNİN**  
**SPERMATOGENEZİS VE APOPTOZİSE ETKİSİNİN**  
**İMMÜNOHİSTOKİMYASAL, IŞIK ve ELEKTRON**  
**MİKROSKOPİK OLARAK İNCELENMESİ**

**Nilüfer ULAŞ**

**Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**  
**Yönetmeliğinin Histoloji ve Embriyoloji Programı İçin Öngördüğü**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Aysel KÜKNER**

**ORTAK TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Bayram YILMAZ**

**BOLU**

**2011**Bu çalışma Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir [Proje numarası: 2010.08.01.348 ].

Abant İzzet Baysal Üniversitesi,  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Nilüfer ULAŞ tarafından hazırlanan ve..8./8./2011. tarihinde savunulan “Erişkin Erkek Sıçanlarda Kisspeptinin Spermatogenezis ve Apoptozise Etkisinin İmmünohistokimyasal, Işık ve Elektron Mikroskopik Olarak İncelenmesi” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Aysel KÜKNER  
(AİBÜ)

(imza)

Üye

Prof.Dr.Meryem ÇAM  
(Düzce Üniversitesi)

(imza)

Üye

Doç.Dr. Fatma TÖRE  
(AİBÜ)

(imza)

ONAY:

Bu tez, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’na belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Yönetim Kurulu’nun kararıyla kabul edilmiştir.

Doç.Dr.Serap KÖYBAŞI SANAL  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirdiğim yüksek lisans eğitimim süresince tez konumun seçimi, yürütülmesi ve değerlendirilmesinde desteğini ve sabrını esirgemeyen, hayatımın her aşamasında hem eğitici yönünü hem de insancıl tavırlarını kendime örnek alacağım, emeğini ve desteğini de unutamayacağım danışman hocam Prof. Dr. Aysel KÜKNER'e, desteği ve yardımı için Prof. Dr. A. Şahap KÜKNER'e, tez çalışmamın deneysel bölümünde yardımını esirgemeyen ortak tez danışman hocam Prof. Dr. Bayram YILMAZ'a ve YÜDETAM ekibine, Boludaki hayatımı yaşanılabilir kılan ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ablam Uzman Dr. Tülin FIRAT ve ailesine, yardımları için abim Uzman Dr. Elçin Hakan TERZİ'ye, tez öncesi ve tez yazım süresince aklıma takılan karışık sorulara büyük bir sabırla cevap vererek bilgilerini ve tecrübelerini paylaşmaktan çekinmeyen hocam Doç. Dr. Fatma TÖRE'ye, çalışmalarım süresinde varlığını yanımda hissettirdiği için Yrd. Doç. Dr. Aysu KIYAN'a, elektron mikroskopik değerlendirmede yardımcı olan Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL'a, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bölümü laboratuvar teknik cihazlarından faydalanmamıza olanak veren Yrd. Doç. Dr. Esra TUĞ, Yrd. Doç. Dr. Selma DÜZENLİ GEPDİREMEN ve Bio. Ebru KAPLAN'a, teknik laboratuvar alt yapılarını kullanmam için yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Fahri YILMAZ'a ve tüm patoloji bölümü asistanları ve teknisyenlerine, manevi destekçim Dr. Berna GÖKTAŞ'a, akademik hayata başladığım ilk günden itibaren ortak bir amaç için başladığımız bu yolda tez yazım süresince yardımcı olan asistan arkadaşlarım Sevda ER'e, İlyas ÖZÇİÇEK'e, Neşe AYŞİT'e ve hocam Yrd. Doç. Dr. Esra ÇIKLER'e, büyük fedakarlıklar göstererek yetişmemde katkıları olan ve bugünlere gelmemi sağlayan, hayatım boyunca yürüdüğüm ve yürümeye devam edeceğim bu yolda daima destekçilerim olacaklarına inandığım HERŞEYİM olan canım Annem ve Babam'a, kardeşlerim Nergiz'ime, Çiğdem'ime ve Ümit Fikri'me teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen Mebrure-İlhan BAĞIŞGİL'e ve Mustafa YAMAN'a minnetle teşekkürlerimi sunarım.

Nilüfer ULAŞ

2011

## ÖZET

Bu çalışmada, erişkin sıçanlara akut ve kronik uygulanan kisspeptinin testis dokusundaki etkilerinin ışık ve elektron mikroskopik ve biyokimyasal olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Hipofizden LH ve FSH salgılanmasını uyaran çok güçlü bir nöropeptit olan kisspeptin, bu etkisini GnRH düzeylerini artırarak yapmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ergenliğe geçişte kimyasal öpücük olarak tanımlanan kisspeptinin üreme işlevlerine etkili olduğu bildirilmektedir.

Çalışmada, 1 gün serum fizyolojik (SF), 5 gün SF, 13 gün SF, 1 gün Kisspeptin-10, 5 gün Kisspeptin-10, 13 gün Kisspeptin-10, 13 gün Kisspeptin-10 uygulamasının ardından 7 gün uygulama yapılmadan bekletilen olmak üzere toplam 7 grup oluşturuldu. Aynı olan SF grupları tek bir kontrol grubu olarak değerlendirildi. 1 ve 5 günlük uygulamalar akut, 13 günlük uygulama kronik olarak kabul edildi. Kisspeptin-10, 50nmol dozunda intraperitoneal (i.p.) olarak günde 1 defa uygulandı. Kisspeptin ve GPR54'ün testis dokusundaki ekspresyonu immünofluoresan mikroskopunda incelendi. Işık mikroskopik incelemeler için Hematoksilen-Eozin, PAS (+), Masson Trikrom boyaması, proliferasyonu tanımlamak için Ki 67, apoptotik hücreleri tanımlamak için TUNEL immün boyamaları yapıldı, serumda testosteron düzeyleri ELISA ile ölçüldü. Testis dokusunun ince yapısı değerlendirildi. Kontrol grubuna göre akut dönemde testosteron seviyesi artarken, kronik uygulamada bu seviye azaldı. Spermatogenetik hücrelerde Ki-67 (+) hücre sayısı kontrol grubuna göre tüm gruplarda artış göstermesine rağmen, bekletilen grupta azaldı. TUNEL yöntemi ile belirlenen apoptotik hücre sayısı, kontrol grubuna göre akut dönemde azalma gösterirken, kronik dönem uygulamalarında anlamlı olarak artmıştı. Testis ağırlığı ve tübül çaplarında anlamlı farklılık gözlenmedi. Elektron mikroskopik incelemelerde, kontrol grubunda seminifer tübül epiteli normal görünümde saptandı. Akut uygulama gruplarında (1-5) seminifer tübül epitelinde, bazal membran üzerinde apoptotik hücreler, Sertoli hücre ve spermatogonium sitoplazmasında krista yapılarında erime olan mitokondriyonlar tespit edildi. Kiss (5) grubunda, spermatik kord hücre serileri arasındaki bağlantı birimlerinde oluşan dejenerasyon sonucu spermatogenetik hücreler arasında açıklıklar görüldü. Kiss (13) grubunda ise seminifer tübül epitelinin bazal bölgesinde apoptotik hücreler gözlemlendi. Kiss (13+7) grubunda tübül hücreleri genellikle normal yapıda gözlenirken, bazalde yer alan bazı koyu spermatogonyumların sitoplazmasında vakuolizasyon görüldü. Tüm deney gruplarında intertisyel dokuda aktif Leydig hücreleri saptandı. Sonuç olarak, yapılan bu deneysel çalışmada kisspeptin-10'un seminifer tübüllerde akut ve kronik uygulama dönemlerinde hücre proliferasyonunu artırdığı, kisspeptinin kesilmesiyle birlikte proliferasyonun ve testosteron seviyesinin azaldığı, apoptozisin arttığı tespit edilmiştir.

**ANAHTAR SÖZCÜKLER:** Kisspeptin, Testis, Spermatogenesisiz, Apoptozis

## ABSTRACT

In this study, it is intended to investigate the effects of acute and chronic administration of Kisspeptin on testis tissue by biochemical methods, light and electron microscopy.

Kisspeptin is a very strong neuropeptide inducing the LH and FSH secretion from the hypophysis and shows this effect by increasing the level of GnRH. In the recent studies, Kisspeptin known as a “chemical kiss” has been reported to be effective about the reaching puberty.

In this research, seven groups were formed as 1 day saline (SF), 5 days SF, 13 days SF, 1 day Kisspeptin-10(Kiss-10), 5 days Kiss-10, 13 days Kiss-10, 7 days waiting period after 13 days. The different SF groups were assessed as a control group, both 1 and 5 days administration as acute group, 13 days as chronic group. 50 nmol Kiss-10 was treated intraperitoneal (i.p.) one time in a day. Expression of Kisspeptin and GPR54 in the testis tissue was examined with immunofluorescence microscope. Hematoxyline- Eosine, PAS (+), Masson Trichrome staining, Ki-67 immunohistochemistry staining for defining proliferation, TUNEL immunoreaction for apoptosis staining were performed for light microscopical evaluations. The level of testosterone was measured in serum by ELISA. The ultrastructure of testis tissues were evaluated.

In the Kisspeptin group, the level of testosterone increased in acute period, decreased in chronic period compared to controls. Although the spermatogenic cells stained with Ki-67 increased according to control group, these decreased in (13+7) group. The number of apoptotic cells defined with TUNEL decreased in acute group according to control, increased in chronic period. There was no differences about testis weight and diameter of tubules. In electron microscopic observation, seminifer tubule epithelium was normal appearance in control groups. In acute groups (1-5 days), apoptotic cells on the basement membrane and epithelium of the seminifer tubule and also mitochondrial cristallisation in Sertoli cells and spermatogonium cytoplasm were determined. In 5 days Kiss group, the spaces among the spermatogenic cells caused by degeneration of the connection units of spermatogenic cord cell line were observed. In 13 days Kiss group, apoptotic cells were determined at the basal region of the seminifer tubule epithelium. In (13+7) group, as the tubule cells were observed in normal structure, vacuolization was determined in the cytoplasm of the dark spermatogonium placed in basal. In all experiment groups, active Leydig cells were situated in interstitial tissue.

As a result, Kisspeptin-10 used in this study increased proliferation in seminifer tubule in acute and chronic administration groups. When it gave up, testosterone level and proliferation decreased, apoptosis increased.

**KEY WORDS:** Kisspeptin, Testis, Spermatogenesis, Apoptosis

## İÇİNDEKİLER

. ONAY SAYFASI	iii
. TEŞEKKÜRLER	iv
. ÖZET	v
. ABSTRACT	vi
. İÇİNDEKİLER	vii
. SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
. ŞEKİLLER	xi
. TABLOLAR	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Testis Anatomisi	4
2.2. Testis Embriyolojisi	7
2.2.1. Testislerin gelişimi	9
2.3. Testis Histolojisi	12
2.3.1. Spermatogenezis	13
2.3.2. Spermioyenezis	14
2.3.2.1. Golgi dönemi	15
2.3.2.2. Kep dönemi	15
2.3.2.3. Akrozom dönemi	15
2.3.2.4. Olgunlaşma dönemi	16
2.3.3. Sertoli Hücreleri	17
2.3.4. Leydig Hücreleri ve İnterstisyel Doku	19
2.4. Testis Histofizyolojisi	20
2.5. Kan-Testis Bariyeri	21
2.6. Kisspeptin (Kiss-1) ve GPR-54 (Kiss-1r)	22
3. GEREÇ ve YÖNTEM	28
3.1. Testis Ağırlığı	29
3.2. Biyokimyasal İnceleme	29
3.3. Işık Mikroskopik İnceleme	29
3.3.1. Parafin Blok Hazırlama Prosedürü	29
3.3.2. Hematoksilen-Eozin Boyaması	30

3.3.3. Periyodik Asid Schiff ( PAS) Boyaması	31
3.3.4. Masson Trikrom Boyaması	32
3.4. İmmunhistokimyasal İnceleme	32
3.4.1. Ki-67 immünboyaması	33
3.4.2. TUNEL boyaması	34
3.5. Kiss ve GPR 54 İmmunofloresans Boyama	35
3.6. Elektron mikroskopik blok hazırlanması	36
3.7. İstatistiksel Değerlendirme	38
<b>4. BULGULAR</b>	39
4.1. Testis Ağırlığı	39
4.2. Tübül Çapları	40
4.3. İmmun Boyama Bulguları	40
4.3.1. Ki-67 İmmun Boyaması	40
4.3.2. TUNEL İmmun Boyaması	41
4.4. Biyokimyasal Bulgular	43
4.5. Işık Mikroskopik Bulgular	43
4.6. İmmünfluerosan Mikroskopik Bulgular	45
4.7. Elektron Mikroskopik Bulgular	45
<b>5. TARTIŞMA</b>	68
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	73
<b>7. KAYNAKLAR</b>	74
<b>8. EKLER</b>	80

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>ABP:</b>	Androjen bağlayıcı protein
<b>AMH:</b>	Antimüllerian hormon
<b>CPP:</b>	Central precocious puberty
<b>DAPI:</b>	4',6-diamidino-2-phenylindole
<b>DER:</b>	Düz endoplazmik retikulumu
<b>DNA:</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>FSH:</b>	Folikül uyarıcı hormon
<b>GER:</b>	Granüllü endoplazmik retikulumu
<b>GnRH:</b>	Gonadotrop salgılatıcı hormon
<b>GPR54:</b>	G-protein-coupled receptor-54
<b>GPR54-/- :</b>	GPR54 eksikliği
<b>GSİ:</b>	Gonadosomatik indeks yüzdesi
<b>GTN:</b>	Gestasyonel trofoblastik neoplazma
<b>hCG:</b>	İnsan koryonik gonadotropin
<b>HCl:</b>	Hidroklorik asit
<b>HPG aksı:</b>	Hipotalamik-Pituiter-Gonadal aksı
<b>i.c :</b>	İntraserebral
<b>i.c.v :</b>	İntraserebroventriküler
<b>i.p :</b>	İntraperitoneal, karın içi
<b>i.v :</b>	İntravenöz, damar içi
<b>Kiss-1:</b>	Kisspeptin
<b>Kiss-1r:</b>	Kisspeptin reseptörü, GPR54
<b>Kiss-10:</b>	Kisspeptin-10
<b>Kiss(1) grup:</b>	1 gün Kisspeptin-10 uygulanan grup
<b>Kiss(5) grup:</b>	5 gün Kisspeptin-10 uygulanan grup
<b>Kiss(13) grup:</b>	13 gün Kisspeptin-10 uygulanan grup
<b>Kiss(13+7) grup:</b>	13 gün Kisspeptin-10 uygulandıktan sonra 7 gün uygulama yapılmayan grup
<b>LH:</b>	Luteinleştirici hormon
<b>MIS:</b>	Müllerian inhibitör madde

<b>MSS:</b>	Merkezi Sinir Sistemi
<b>OsO<sub>4</sub>:</b>	Osmiyum tetroksit
<b>PAS:</b>	Periodik asit Schiff
<b>PBS:</b>	Phosphate <b>Buffered Saline</b>
<b>PCR:</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>s.c :</b>	Subkutan, deri altı
<b>SRY:</b>	Sex determining region
<b>SSS:</b>	Santral sinir sistemi
<b>TBF:</b>	Testis belirleyici faktör
<b>TDF:</b>	Testis determining factor
<b>TdT:</b>	Terminal deoksinukleotidil transferaz

## ŞEKİLLER

- Şekil 2.1:** SRY protein yapısı.
- Şekil 2.2:** Farklılaşmamış gonadların şematik gösterimi.
- Şekil 2.3.1:** Testis ve genital kanalların şematik gösterimi.
- Şekil 2.3.2.1:** Spermiyogenezin şematik gösterimi.
- Şekil 2.3.3.1:** Seminifer tubul ve interstisyel bağ dokusunun şematik görünümü.
- Şekil 4.1.1:** Gruplara ait testis ağırlıkları.
- Şekil 4.2.1:** Gruplara ait tübül çapları.
- Şekil 4.3.1.1:** Ki-67 (+) boyanan hücrelerin gruplara göre dağılımı.
- Şekil 4.3.2.1:** TUNEL (+) boyanan hücrelerin gruplara göre dağılımı.
- Şekil 4.4.1:** Serum testosteron düzeylerinin gruplara göre dağılımı.
- Şekil 4.5.1:** Kontrol grubu testis dokusu, HE, bar: 500 µm.
- Şekil 4.5.2:** Kiss (1) grubuna ait testis dokusu, HE, bar: 500 µm.
- Şekil 4.5.3:** Kiss (5) grubuna ait testis dokusu, HE, bar: 500 µm.
- Şekil 4.5.4:** Kiss (13) grubuna ait testis dokusu, HE, bar: 500 µm.
- Şekil 4.5.5:** Kiss (13+7) grubuna ait testis dokusu, HE, bar: 500 µm.
- Şekil 4.5.6:** Kiss (13+7) grubuna ait testis dokusu, HE, bar: 100 µm.
- Şekil 4.5.7:** Kontrol grubu testis dokusu, Masson Trikrom boyaması, bar: 100 µm.
- Şekil 4.5.8:** Kiss (1) grubuna ait testis dokusu, Masson Trikrom boyaması, bar: 100 µm.
- Şekil 4.5.9:** Kiss (13) grubuna ait testis dokusu, Masson Trikrom boyaması, bar: 100 µm.
- Şekil 4.5.10:** Kiss (13+7) grubuna ait testis dokusu, Masson Trikrom boyaması, bar: 100 µm.
- Şekil 4.5.11:** Kontrol grubuna ait seminifer tübülleri, PAS (+) boyaması, bar: 100 µm.
- Şekil 4.5.12:** Kiss (1) grubuna ait testis dokusu, PAS (+) boyaması, bar: 100 µm.
- Şekil 4.5.13:** Kiss (5) grubuna ait seminifer tübül yapıları, PAS (+) boyaması, bar: 100 µm.
- Şekil 4.5.14:** Kiss (13) grubuna ait testis dokuları, PAS (+) boyaması, bar: 100 µm.

- Şekil 4.5.15:** Kiss (13+7) grubuna ait testis dokuları, PAS (+) boyaması, bar: 100 µm.
- Şekil 4.5.16:** Kontrol grubuna ait testis dokusunun yarı ince kesiti. Toluidin mavisi, bar: 10 µm.
- Şekil 4.5.17:** Kontrol grubuna ait testis dokusunun yarı ince kesiti. Toluidin mavisi, bar: 100 µm.
- Şekil 4.5.18:** Kiss (1) grubuna ait seminifer tübüller, yarı ince kesit, toluidin mavisi, bar: 100 µm.
- Şekil 4.5.19:** Kiss (1) grubuna ait testis dokusu, yarı ince kesit, toluidin mavisi, bar: 10 µm.
- Şekil 4.5.20:** Kiss (1) grubuna ait testis dokusu, yarı ince kesit, toluidin mavisi, bar: 10 µm.
- Şekil 4.5.21:** Kiss(5) grubuna ait testis dokusu, yarı ince kesit, toluidin mavisi, bar: 10 µm.
- Şekil 4.5.22:** Kiss (13) grubuna ait Leydig hücreleri, yarı ince kesit, toluidin mavisi, bar: 10 µm.
- Şekil 4.5.23:** Kiss (13+7) grubuna ait testis dokusu, yarı ince kesit, toluidin mavisi, bar: 10 µm.
- Şekil 4.5.24:** Kontrol grubuna ait testis dokusu, Ki-67 immun boyaması, bar: 100µm.
- Şekil 4.5.25:** Kiss (1) grubuna ait testis dokusu, Ki-67 immun boyaması, bar: 100µm.
- Şekil 4.5.26:** Kiss (5) grubuna ait testis dokusu, Ki-67 immün boyaması, Bar: 100µm.
- Şekil 4.5.27:** Kiss (5) grubuna ait testis dokusu, Ki-67 immun boyaması, 10X.
- Şekil 4.5.28:** Kiss(13) grubuna ait Ki-67 (+) boyanan hücreler, Bar: 100 µm.
- Şekil 4.5.29:** Kiss (13+7) grubunda Ki-67 (+) boyanan hücreler, Bar: 100 µm.
- Şekil 4.5.30:** Kontrol grubunda TUNEL (+) boyanan hücreler. Bar: 100 µm.
- Şekil 4.5.31:** Kiss (1) grubunda TUNEL (+) boyanan hücreler. X40.
- Şekil 4.5.32:** Kiss (5) grubunda TUNEL (+) boyanan hücreler. Bar: 100 µm.
- Şekil 4.5.33:** Kiss (13) grubunda, TUNEL (+) boyanan hücreler. Bar 100µm.
- Şekil 4.5.34:** Kiss (13+7) grubunda TUNEL (+) boyanan hücreler. Bar: 100 µm.

**Şekil 4.6.1:** Kontrol grubuna ait testis dokusuna ait immunfloresan boyama. 10X, DAPI.

**Şekil 4.6.2:** Kiss (13) grubuna ait testis dokusuna ait immunfloresan boyama. 10X, DAPI.

**Şekil 4.6.3:** Kiss (13) grubuna ait testis dokusuna ait immunfloresan boyama. 20X, DAPI.

**Şekil 4.7.1:** Kontrol grubuna ait elektron mikroskopik görüntü.

**Şekil 4.7.2:** Kontrol grubuna ait elektron mikroskopik görüntü.

**Şekil 4.7.3:** Kiss (1) grubuna ait elektron mikroskopik görüntü.

**Şekil 4.7.4:** Kiss (5) grubuna ait elektron mikroskopik görüntü.

**Şekil 4.7.5:** Kiss (13) grubuna ait elektron mikroskopik görüntü.

**Şekil 4.7.6:** Kiss (13+7) grubuna ait elektron mikroskopik görüntü.

## TABLÖLAR

**Tablo 2.1:** Erkek embriyodaki ürogenital yapıların yetiskindeki oluşumları ve kalıntıları.

**Tablo 2.3.3.1:** Sertoli hücrelerinin görevleri.

## 1. GİRİŞ

Kisspeptinler, KISS-1 geni (1q32) tarafından kodlanan bir nöropeptid ailesidir. Bu genin ürünü öncül kisspeptin, 145 amino asit içeren Kiss-1 proteindir. *Kiss* sözcüğündeki “ss” takısı supresör diziyi (suppressor sequence) ifade etmektedir ve bu gen bölgesi Hershey, Pensilvanya’da keşfedildiği için bu yörenin meşhur *Kiss* çikolatasına ithafen “Ki” öneki getirilerek gene Kiss-1 geni adı verilmiştir (Lee ve ark., 1996; Lee ve Welch, 1997; Lee ve ark., 1999). Kisspeptin hipotalamusta arkuat nükleus ve anteroventral periventriküler çekirdekte yer alan nöronlardan gonodotropların etkisi altında sentezlenmektedir. Kisspeptin henüz tam olarak tanımlanmamış homeostatik ve nöroendokrin fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Mikkelsen ve ark., 2009). Kisspeptinin bilinen Kisspeptin-10, Kisspeptin-13, Kisspeptin-14, Kisspeptin-52, Kisspeptin-54 türevleri bulunmaktadır (Thompson ve ark., 2006). C- terminal dekapeptidini içeren bütün bu formlarından biri olan kisspeptin-10 kültüre edilmiş insan trofoblast hücrelerinden salınmaktadır (Bilban ve ark., 2004). Reseptörü ise G Protein Coupled Receptor-54 (GPR54)’dür, genellikle KISS-1/GPR54 sistemi olarak tanımlanmaktadır (Shahed ve Young, 2009). Metastin olarak da bilinen KISS-1, ilk olarak meme kanserinde ve melanom hücrelerinde tumor baskılayıcı gen olarak tanımlanmıştır (Lee ve ark., 1996). Kisspeptin’in fizyolojik koşullarda santral sinir sistemi (SSS) ile birlikte testis, ovaryum, pankreas, barsaklar, karaciğer, kalp, akciğer, kas, böbrek ve en yoğun olarak da plasentada sentezlendiği gösterilmiştir (Kuohung ve ark., 2006; Yılmaz B., 2006). GPR54 ise sıçan ve insanın MSS ile periferik dokularında eksprese olur (Muir ve ark., 2001, Lee ve ark., 1999), GPR54 mRNA ise en fazla hipotalamus ve amigdalada olmak üzere sıçan beyinde eksprese olmaktadır. Hipotalamusta arkuate nükleusta, lateral hipotalamik alanda ve dorsomedial nükleusta yoğun olduğu gözlenmiştir (Lee ve ark., 1999). Periferde ise, en fazla hipofiz, plasenta ve pankreasta eksprese olur (Kotani ve ark., 2001; Muir ve ark., 2001).

PCR çalışmaları ile GPR54’ün hipofiz bezinde varlığı gösterilmiştir ve kisspeptin adenohipofiz hücrelerine etki etmek için hipofizal portal kana salınmaktadır (Kotani ve ark., 2001; Muir ve ark., 2001). Kisspeptinler hipofizden

LH ve FSH salgılanmasını uyararak çok güçlü bir nöropeptittir ve bu etkisini GnRH üzerinden yapmaktadır (Mikkelsen ve ark., 2009). Gonodotropinler vertebralılardaki seksüel olgunlaşma ve üremeden sorumlu ana düzenleyici hormondur (Hofmann, 2006). GnRH sekresyonunu yapan nöronların aktivasyonu ergenlik döneminde başlamaktadır. Hipotalamusta sentezlenen bu hormon, Hipofizden FSH (folikül stimulan hormon) ve LH (luteinizan hormon) salgılanmasını uyarmakta ve gonadları aktifleştirmektedir (Kuohung ve ark., 2006). Dişilerde FSH, overlerde ovarian follüküllerin gelişimini ve follüküler hücrelerden östrojen salgılanmasını uyarırken, LH sekonder oositte I. mayotik bölünmenin tamamlanmasını, ovulasyonun tetiklenmesini ve oluşan korpus luteumdan progesteron salgılanmasını sağlamaktadır (Vicdan ve Işık, 1999). Erkeklerde ise LH, Leydig hücrelerini uyararak testosteron sekresyonunu artırır. FSH ise Sertoli hücrelerinden Androjen Bağlayıcı protein (ABP) ve İnhibin salgılanmasını uyararak spermatogenezisi etkilemektedir (Köseoğlu, 2005). Bu yol birçok memeli türünde iyi bir şekilde tanımlanmış olmasına rağmen ön beyindeki bu işlevi başlatan moleküler ve hücreyel olaylar, henüz tam olarak bilinmemektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ergenliğe geçişte kimyasal öpücük olarak tanımlanan Kisspeptinin etkili olduğu bildirilmektedir

(<http://www.guardian.co.uk/life/science/story/0,12996,1539767,00.html>). Seminara ve ark., farelerdeki *Gpr54* geninin delesyonu sonucunda farelerin ergenliğe geçemediğini göstermişlerdir (Seminara ve ark., 2003). *Kiss-1* geni bulunmayan knockout farelerde, hipogonadizm tespit edilmiştir. GPR54 knockout farelerde (GPR54<sup>-/-</sup>) anormal seksual gelişim ve dolaşımda gonadotropinin düşük konsantrasyonlarda olduğu gözlenmiştir (Funes ve ark., 2003; Seminara ve ark., 2003). GPR54 sinyalinin kesilmesi kemirgenlerde ve erkeklerde hipogonadotropik hipogonadizme sebep olurken (Seminara ve ark., 2003; Funes ve ark., 2003; Kinoshita ve ark., 2005; Semple ve ark., 2005) ve endojen hipotalamik kisspeptin sinyallerinin engellenmesi de proestrus LH dalgasını önler ve östrus siklusunu inhibe eder (Kinoshita ve ark., 2005). Bu bulgular, farelerde ve insanlarda GPR54 reseptörünün üreme fonksiyonunda esansiyel bir rolünün olduğunu ve ergenliğe geçişte moleküler bir koridor gibi davrandığını göstermektedir (Vicdan ve Işık, 1999; Tena-Sempere, 2006).

Bu bilgiler ışığında, farklı sürelerde intraperitoneal uygulanmasının testis dokusunda spermatogenezis, Leydig hücreleri üzerindeki etkileri ışık ve elektron mikroskop düzeyinde incelenmesi amaçlanmıştır. Testis dokusunda kisspeptinin (Kiss-1) ve reseptörünün (Kiss-1r-GPR54) ekspresyonu, hücrelerdeki proliferasyona ve apoptozise etkileri konusunda elde edilecek sonuçlar kisspeptin-üreme ilişkisine ait bilgilere katkı sağlayacaktır, spermatogenezis bozukluklarının tedavisine yönelik yapılacak çalışmalara kaynak oluşturacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Testis Anatomisi

Funiculus spermaticus'a asılı durumda bulunan testis'ler, sağlı sollu bir çift olup, scrotum'un içinde bulunurlar. Testisler, uzun eksenleri yukarıdan aşağıya olup, yanlardan hafif basık ovoid organlardır. Beyaz görünümlü ve kendine özgü bir sertliğe sahip olan testislerin büyüklükleri kişiden kişiye değişmekle birlikte, ortalama 4-5 cm uzunluğunda, 2-3 cm genişliğinde, 2-3 cm kalınlığında ve 20-30 gr ağırlığındadır. Testisler yaklaşık aynı büyüklükte olmalarına karşın, yapısal olarak sol testis sağdakine göre biraz daha aşağıda yer alır. Ayrıca sağ testis sola göre % 10 daha ağırdır. Sıcaklıkları vücut sıcaklığından 3- 4°C daha düşüktür (Ozan, 2004; Snell, 1998).

Testisin **facies medialis** ve **facies lateralis** olmak üzere iki yüzü; **margo anterior** ve **margo posterior** olmak üzere iki kenarı; **extremitas superior** ve **extremitas inferior** olmak üzere iki ucu vardır. Testislerin uzun eksenleri tam vertikal yönde bulunmaz. Üst ucu biraz önde ve dışta, alt ucu ise biraz arkada ve içte bulunur. Konveks ön kenarı biraz da dışa-aşağı doğru, daha düzce olan arka kenarı da, biraz yukarı-içe doğru bakar. Buna göre uzun eksenini yukarıdan-aşağıya, dıştan-içe ve önden-arkaya doğru meyilli olarak bulunur. Testisin ön kenarı, her iki yüzü ve uçları düz ve konveks olup, visseral periton(epiorchium) ile kaplıdır. Arka kenarının sadece lateral kısmı peritonla örtülüdür. Peritonsuz olan medial bölümüne, epididimis tutunur ve buradan damar-sinirleri ve kanalları geçer (Ozan, 2004; Snell, 1998).

**Yapısı:** Testis **lamina visceralis (epiorchium)**, **tunica albuginea** ve **tunica vasculosa** olmak üzere üç tabaka ile sarılmıştır:

**Tunica vaginalis testis**, fascia spermatica internanın iç, testisin dış yüzünü saran seröz zardır (peritoneum). Embriyolojik dönemde karın boşluğunu döşeyen parietal periton scrotuma doğru bir cep şeklinde çıkıntı gönderir. **Saccus vaginalis** denilen bu çıkıntı, scrotumun tabakalarından en içte bulunan fascia spermatica internaya gevşek olarak yapışır. Daha sonra periton kesesinin dışında scrotuma inen testis, saccus vaginalise arka tarafından gömülerek peritonla kaplanır. Böylece saccus vaginalisin, bir testisi örten **lamina visceralis (epiorchium)** kısmı, bir de

fascia spermatica internaya yapışan **lamina parietalis (periorchium)** kısmı oluşur. Erişkinlerde bu iki yaprağa **tunica vaginalis testis** denilir. Saccus vaginalisin testisin üst ucundan anulus inguinalis profundusa kadar olan bölümü, kapanarak bir kordon şeklini alır ve karın boşluğu ile arasında kalan kılcal aralığa ise **cavum serosum scroti** denilir ve içinde eklem sıvısına benzer, bir miktar kaygan sıvı bulunur (Ozan, 2004; Snell, 1998).

**Lamina visceralis (epiorchium)**, epididimisin büyük kısmı ile arka kenarının medial bölümü hariç, testisi örter ve bu iki oluşumu birbirine bağlar. Testis ve epididimisin arka kenarlarından, lamina parietalis olarak fascia spermatica internanın iç yüzüne geçer. Epididimisin baş kısmını testisin üst ucuna bağlayan tunica vaginalis bölümüne **lig. epididymis superius**, kuyruk kısmını testisin alt ucuna bağlayan tunica vaginalis bölümüne ise **lig. epididymis inferius** denilir (Ozan, 2004; Snell, 1998).

**Lamina parietalis (periorchium )**, peritoneumun fascia spermatica internayı döşeyen kısmıdır. Funiculus spermaticusun ön ve iç kısmında yukarıya doğru biraz uzar. Bu nedenle lamina visceralisten daha geniştir. Lamina parietalisin iç yüzü düzdür ve mezotel ile kaplıdır (Ozan, 2004; Snell, 1998).

Saccus vaginalisin oblitere olan üst bölümü, genellikle gevşek bağ dokusu içinde bir kordon şeklinde görülür. Bazen karın boşluğunu döşeyen peritonu, tunica vaginalis testise bağlayan bir bant şeklinde görülür. Bazen de, yavaş yavaş kaybolur. Bazen oblitere olmaz ve bunun sonucu olarak, karın boşluğu ile cavum stroti birbirleriyle bağlantılı olur. Bu gibi durumlarda bir nevi indirekt fıtık olmuş sayılır (Ozan, 2004; Snell, 1998).

**Tunica albuginea:** Testisi saran mavimsi-beyaz renkli, sıkı yapılı fibröz bir tabakadır. Bu tabakayı oluşturan beyaz fibröz demetler, farklı yönlerde uzanarak birbiri içine girerler. Tunica albugineayı, arka kenarı hariç olmak üzere, dıştan tunica vaginalis testisin lamina visceralisi (epiorchium) örter. Peritonun bulunmadığı arka kenara epididimis tutunur ve buradan testisin damar sinirleri girip çıkar. Tunica albuginea, arka kenarda testisin içine doğru kalın ve vertikal yarım bir bölme şeklinde uzantı gönderir. Bu bölmeye **mediastinum testis (corpus Highmori)** denilir. Yarım bölme şeklindeki bu yapı, testisin üst ucundan alt ucuna kadar uzanır ve yukarı kısmı daha geniştir. Mediastinum testisin ön ve yan kısımlarından çıkan

bölmeler, testisi saran tunica albugineaya tutunurlar. **Septula testis** denilen bu bölmeler testisi piramit şeklinde boşluklara ayırır. Tabanı periferik, tepesi ise mediastinum testise bakan bu boşluklarda **tubuli seminiferi contorti** ve **tubuli seminiferi recti** denilen tüp şeklindeki bezler bulunur. Mediastinum testisten damarlar ve kanallar girip çıkarlar (Ozan, 2004; Snell, 1998).

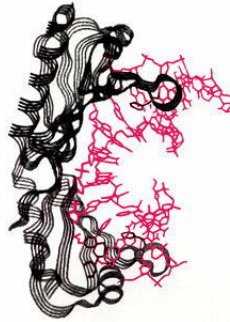
**Tunica vasculosa:** Tunica albugineanın iç yüzünde bulunan damar ağı tabakasıdır. Damarlar arasında kalan aralıkları da gevşek bağ dokusu doldurur. Tunica vasculosa tunica albugineanın iç yüzünü ve tüm bölmelerin yüzlerini döşer. Böylece, testisin içindeki tüm lobuli testisi de sarmış olur. Sayıları 200-300 arasında değişen ve **lobuli testis** denilen bez kümelerinin büyüklükleri, buldukları yere göre farklıdır. Testisin ortasında bulunanlar daha büyük ve uzundurlar. Her bir lobçuk, 1 ile 3 veya daha fazla kıvrıntılı seyirli tubuli **seminiferi contorti tübüllerini** içerir. Bu tüpler kör bir uçla başlar ve tüpler arasında gevşek bağ dokusu bulunur. Bu tüpler, bir testiste yaklaşık olarak 400-600 tanedir, uzunlukları 70 ile 80cm, çapları da 0,1 ile 0,3mm kadardır. Lobçukların mediastinum testise bakan tepe kısımlarında bu boruların seyri gittikçe düzleşir ve birbirleriyle birleşerek sayıları 20 ile 30'a iner. **Tubuli seminiferi recti** denilen bu tüplerin, çapları da genişleyerek 0,5mm olur. Tubuli seminiferi rectiler mediastinum testisin fibroz dokusu içine girerek arkaya ve yukarı doğru uzanır. Bu kanallar seyri esnasında birbirleriyle anastomoz yaparak **rete testis (Haller ağı)** denilen ağı oluştururlar. Rete testis, mediastinum testisin üst bölümünde sayıları 12 ile 15 arasında değişen kanallar şekline dönüşür. **Ductuli efferentes testis** denilen bu kanallar, testisin arka kenarının üst kısmında, tunica albugineayı delerek dışarı çıkarlar. Dışarı çıkan kanallar önce düz olarak uzanır, daha sonra kalınlaşarak kıvrıntılı bir seyirle lobçukları oluştururlar. **Lobuli coni epididymidis** denilen bu lobçukların yükseklikleri yaklaşık 1cm dir. Bunların tepe kısımları testise, taban kısımları ise epididimise bakar. Her bir lobçuk açıldığı zaman boyu 15-20cm yi bulan tek bir kanaldan oluştuğu görülür (Bazen 1 ile 3 veya daha fazla kanaldan oluşabilir). Caput epididimisi, sayıları 12 ile 15 arasında değişen **lobuli coni epididymidis** ve bunların açıldığı **ductus epididymidis**in başlangıç kısmı oluşturur. Açıldığı zaman yaklaşık 6m uzunluğunda olan ductus epididymidis, testisin arka kenarında kümeler oluşturarak corpus epididymidis ve cauda epididymidis'i oluşturur. Epididimisin kıvrımlarını gevşek bağ dokusu, birbirine

bağlar. Epididimis’de, spermiumlar depo edilir ve olgunlaşmasının son safhasını tamamlar (Ozan, 2004; Snell, 1998).

Testis ve epididimis, aorta’nın dalı olan a. testicularis’den beslenirler. Testis ve epididimisin venleri ise, önce funiculus spermaticusu saran bir ağ şeklinde plexus pampiniformisi, daha sonra da birbirleriyle birleşerek, v. testicularisi oluştururlar. Bunların da sağ taraftaki v. cava inferiora, sol taraftaki v. renalis sinistraya açılır. Lenfatik drenajı yüzeysel ve derin olmak üzere iki grupta toplanır. Yüzeyde olanlar tunica vaginalis’in yüzeyinde, derindeki ise epididimis ve testisin içinde bulunur. Bunlar 4 ile 8 damar şeklinde funiculus spermaticus ile birlikte karın boşluğuna girerler. V. testicularisi takip ederek aortanın ön ve yan tarafındaki lenf nodüllerine açılırlar. Sinirlendirilmesi, T10.-11. medulla spinalis segmentlerinden kaynaklanan simpatik lifler, damarlarının çevresindeki pleksuslar aracılığı ile sağlanır (Ozan, 2004; Snell, 1998).

## 2.2. Testis Embriyolojisi

Embriyonun genetik ve kromozomal cinsiyeti, fertilizasyon sırasında belirlenmiş olmasına rağmen, erkek ve dişi morfolojik karakteristikleri, embriyonik 7. haftaya kadar gelişime başlamazlar. Cinsiyetin ikiye ayrılmasındaki esas anahtar, cinsiyeti belirleyen bölgesinde (**sex determining region=SRY**) testis belirleyici faktör (**testis determining factor=TDF**) genini taşıyan kromozomudur (Şekil 2.1). Bu faktörün varlığı veya yokluğu, gonad farklılaşması üzerinde doğrudan etkilidir (Sadler, 1996).



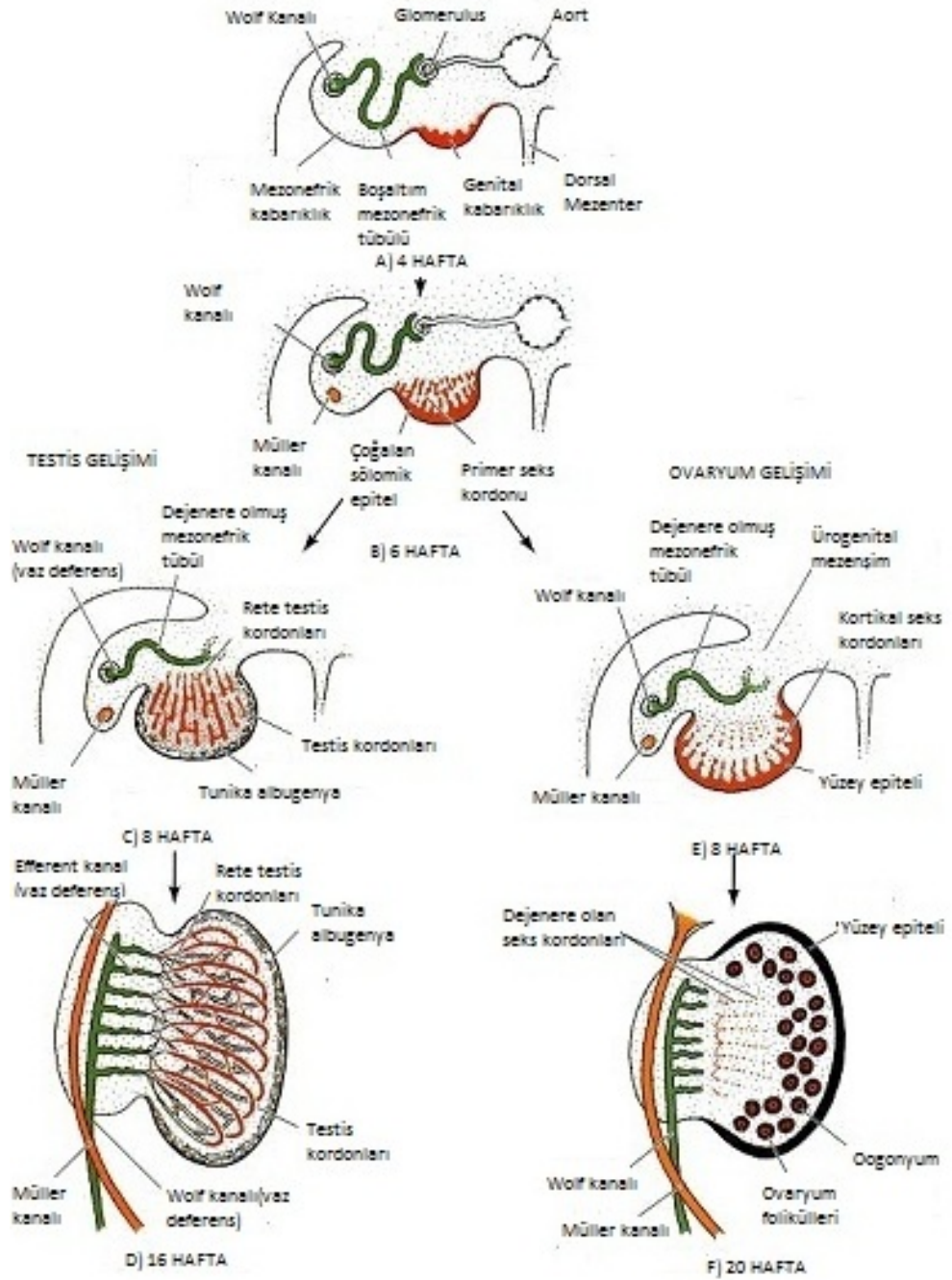
Şekil 2.1: SRY proteiniyle DNA'nın birleşmesi DNA'nın 70-80 derecelik kıvrılmasına sebep olabilir. Siyah yapı SRY proteininin HMG box'ını gösterir. Kırmızı sarmal SRY tarafından sarılmış DNA ikili heliksidir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9967/>, erişim tarihi 01.07.2011).

Genital sistem erken dönemde her iki cinsten birbirine benzer, bu nedenle genital sistemin gelişiminin başlangıç evresi “seksüel gelişimin farklanmamış safhası” olarak adlandırılır. Gonadlar (testisler ve overler) üç kaynaktan köken alırlar (Şekil 2.2);

- Posterior abdominal duvarın mezotel dösesi (mezodermal epitel)
- Altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu)
- Primordial germ hücreleri

5. haftada ortaya çıkan gonadal gelişimin ilk safhaları ile birlikte, mezonefrozun medialinde, mezotelde bir kalınlaşma meydana gelir. Bu epitelin ve altındaki mezenşimin yoğunlaşması ile mezonefrozun medialinde gonadal kabarıklık (genital) oluşur. Parmak şeklindeki primer seks kordonları denilen epitelial kordonlar, alttaki mezenşim içerisine doğru kısa sürede büyürler. Farklanmamış gonad artık, dışta yer alan bir korteks ve içte yer alan bir medulladan oluşmaktadır. Eğer embriyo XY seks kromozomunu içermekteyse, medulla testise farklanır; korteks bir takım kalıntıları dışında geriler dejenere olur. Embriyo XX seks kromozomuna sahip ise farklanmamış gonadın korteksi overe farklılaşır medullası geriler (Moore ve Persaud, 2008).

Gelişimin 6. haftasına kadar genital kabarıklıklar içinde germ hücreleri mevcut değildir. Primordial germ hücreleri, insan embriyosunda gelişimin erken evrelerinde, vitellus kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında ortaya çıkarlar. Ameboid hareketlerle, son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerleyerek 5. haftanın başında primitif gonadlara ulaşır ve 6. haftada primordial germ hücreleri altındaki mezenşim içerisine girerler ve primer seks kordonlarına dahil olurlar. Kabarıklıklara ulaşamadıkları takdirde, gonadlar gelişemez. Gonadların over veya testise farklanmasında, primordiyal germ hücrelerinin indükleyici etkisi vardır (Sadler, 1996; Moore ve Persaud, 2008).



Şekil 2.2: Farklılaşmamış gonadların şematik gösterimi (Gilbert, 2000).

### 2.2.1. Testislerin gelişimi

Testis belirleyici faktör (TBF) kodlayan Y kromozomunun etkisiyle, primitif cinsiyet kordonları çoğalmaya devam ederler, **testis veya medullar kordonları** oluşturmak üzere, medullanın iç kesimlerine doğru ilerlerler, kordonlar burada dallanarak birbirleriyle anastomoz yaparlar ve böylece **rete testis** oluşur. Yedinci haftada örtücü epitel ile kordonlar arasında mezenşim kalınlaşması meydana gelir.

Bu tabaka, ileride **tunica albuginea**' yı yapacaktır. Seks kordonlarının [seminifer (testiküler) kordonların] kalın bir fibröz kapsül olan tunika albuginea geliştikten sonra, yüzey epiteli ile ilişkilerini kaybederler ve gonadın içini tamamen doldururlar. Tunica albugineenin 12. haftada gelişimi, fötusta testiküler gelişim için oldukça karakteristiktir. Genişleyen testis aşamalı olarak dejenere olan mezonefrozdun ayrılır ve kendi mezenteri olan mesorchium ile asılı hale geçer. Seminifer kordonlar, seminifer tübüllere, tubuli rekti ve rete testise farklılıklar (Sadler, 1996; Moore ve Persaud, 2008).

Seminifer tübüller, interstisyel hücreler olan Leydig hücrelerinden mezenşim doku ile ayrılırlar. 8. haftadan itibaren Leydig hücreleri, androjenik hormonları testosteron ve androstenedione salgılamaya başlarlar, bu hormonlar mezonefrik duktusların ve dış genitalerin erkek yönünde farklılaşmasını uyarır. Testosteron üretimini insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu stimüle eder, hormonun miktarı 8-12 haftalık evrede en yüksek değerine ulaşmıştır. Fetus testislerden glikoprotein bir hormon olan antimüllerian hormon (AMH) veya müllerian inhibitör madde (MIS) salgılamaktadır. Antimüllerian hormon (AMH), Sertoli hücreleri tarafından salgılanır, hormonun salınması puberteye kadar devam eder, daha sonra ise seviyesi azalır. AMH, paramezonefrik (Müllerian) duktusların gelişimini baskılar (Moore ve Persaud, 2008; Sadler, 2000).

Seminifer tübüller, puberteye kadar solid halde kalırlar yani lümenleri yoktur. Puberteden itibaren lümen gelişir ve seminifer tübülüsleri oluştururlar. Seminifer tübül duvarında 2 tip hücre bulunur (Moore ve Persaud, 2008; Sadler, 2000):

- Sertoli hücreleri testisin yüzey epitelinden gelişir.
- Spermatogonia, primordial sperm hücreleri olan bu hücreler ise primordial germ hücrelerinden farklılıklar.

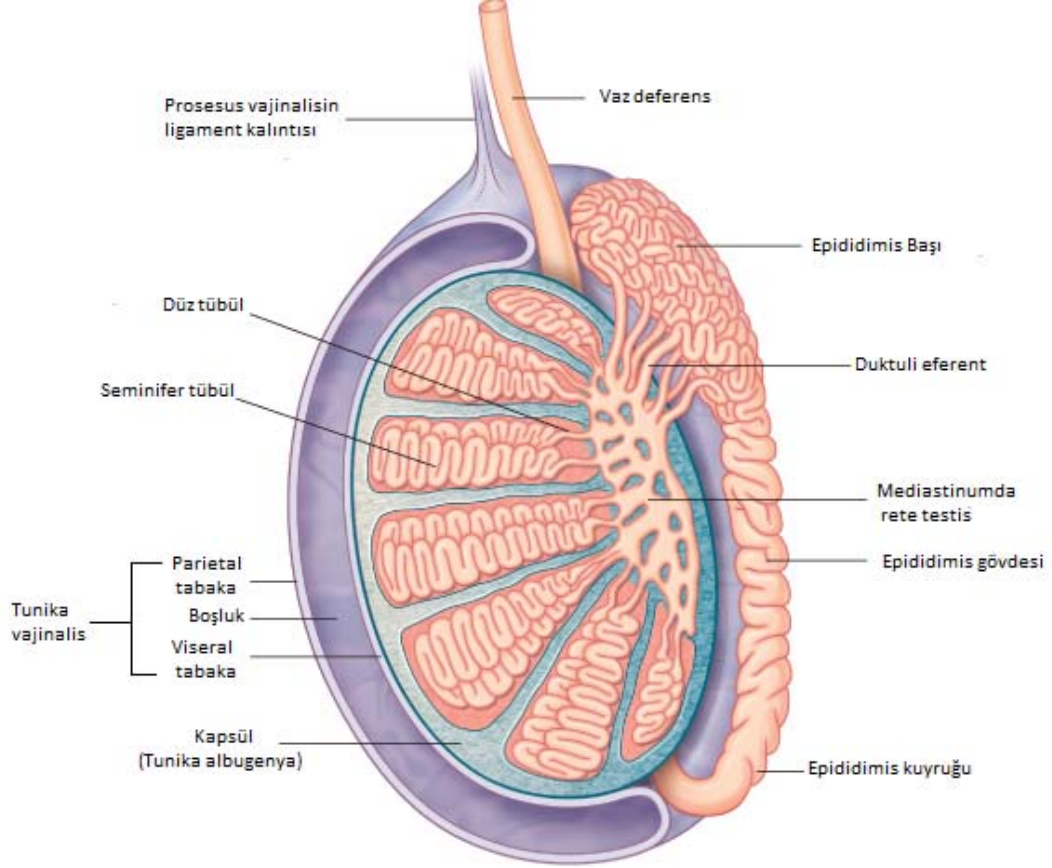
Fötal testislerde seminifer tübüllerde Sertoli hücreleri çoğunluğu oluşturur. Daha sonraki gelişme sırasında, testisin yüzey epiteli düzleşir ve yetişkin testisin dış yüzeyindeki mezoteli oluşturur. Rete testis, duktuli efferentes oluşturan 15-20 adet mezonefrik tübüller ile devam eder. Bu duktuliler, duktus epididimisi oluşturan mezonefrik duktus ile bağlanırlar (Moore ve Persaud, 2008; Sadler, 2000).

Tablo 2.1: Erkek embriyodaki ürogenital yapıların yetiskindeki oluşumları ve kalıntıları Moore ve Persaud tarafından gösterilmiştir (Moore ve Persaud, 2008).

<b>Gelismis yapı</b>	<b>Embriyonik yapı</b>
Testis	Farklanmamış gonad
Seminifer tübül	Korteks
Rete testis	Medulla
Gubernakulum testis	Gubernakulum
Duktuli efferentes Paradidimis	Mezonefrik tübül
Epididimis appendiks Epididimis kanalı Duktus deferens Üreter, pelvis, kaliks,toplayıcı tübüller Ejekulat kanalı, seminal vezikül	Mezonefrik kanal
Testis appendiks	Paramezonefrik kanal
Mesane Üretra Prostatik tomurcuk Prostat Bulboüretral bezler	Ürogenital sinus
Seminal kollikulus	Sinüs tüberkülü
Penis Glans penis Korpus kavernozum penis Korpus spongiosum penis	Fallus
Penisin ventral görünümü	Ürogenital katlantılar
Skrotum	Labioskrotal şişkinlikler

### 2.3. Testis Histolojisi

Testisler, erkek üreme hücresi spermatozoonun üretildiği ve cinsiyet hormonu testosteronun üretilip salgılandığı hem ekzokrin hem endokrin islevi olan yapılardır. Spermatogenezisin olduğu her bir seminifer tübül yaklaşık 150-250 µm çapında ve 30-70 cm uzunluğundadır (Ovalle ve Nahirney, 2009).



Şekil 2.3.1: Testis ve genital kanalların şematik gösterimi (Drake ve ark., 2007).

Seminifer tübüller bir fibröz bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve kompleks bir germinal veya seminifer epitelden oluşur (Şekil 2.3.1). Bu tübülü saran birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur. Bazal laminaya dışındaki tabakada düz kas özelliği gösteren yassılaştırmış miyoid hücreler bulunur (Ovalle ve Nahirney, 2009).

Seminifer epitelinin, **destek hücreleri** olarak bilinen **sertoli hücreleri** ve **spermatogenetik hücreler** oluşturur. Spermatogenetik hücreler, bazal lamina ve tübül lümeni arasında dolduracak 4-8 tabaka halinde düzenlenmiştir. Belirli sayıda

bölünme geçirdikten sonra bu hücreler farklılaşırlar ve spermatozoayı oluştururlar. Bunlar erkek germ hücrelerinin sürekli farklılaşma sürecindeki çeşitli evrelerini temsil ederler. Başlangıçtan bitişe kadar gerçekleşen bu olay spermatogenezis olarak bilinir ve 3 evreye ayrılır (Ovalle ve Nahirney, 2009):

- 1- Spermatogenesis; Spermatogonyanın bölünme esnasında spermatocytogenesis (Yunanca, Sperma; tohum+ kytos+genesis) olarak adlandırılan evre, bu bölünmeler sonucunda spermatositler oluşur.
- 2- Mayoz; Spermatositlerin arka arkaya 2 bölünme geçirerek kromozom sayılarının ve DNA miktarlarının eşit olarak her hücrede ikiye ayrılması ile oluşan ve spermatidlerin oluşmasını sağlayan evredir.
- 3- Spermiogenesis; bu evrede ise, spermatidlerin özenli bir hücre farklılaşması geçirerek spermatozoaları (spermiyumları) oluşturduğu safhadır.

### 2.3.1. Spermatogenezis

Seminifer tübüllerin enine kesitinde spermatogenetik hücreler bazı özellikleri ile birbirlerinden ayırt edilebilirler. İnsanlarda spermatogenezis ve spermiyogenezis yaklaşık 9 haftada tamamlanır. Herhangi bir tübülde bu dönemde yaşanan bütün aşamaları genellikle görmek mümkün olmaz. Spermatogenez, bazal laminanın hemen üstüne yerleşmiş spermatogonyum ile başlar. Bu hücre, yaklaşık 12 µm çapında, çekirdeği soluk boyanan kromatin içerir. Seksüel olgunlaşma sırasında, bu hücreler mitoz serisi geçirirler ve yeni oluşan hücreler iki yol izleyebilir (Janqueira ve ark., 1993):

- 1- Bir ya da daha fazla mitotik bölünmeden sonra farklılaşmamış kök hücreler olan tip A spermatogonyumlar (sperma+Yun, gone, nesil) olarak devam ederler, ya da
- 2- Süregelen mitotik sikluslar boyunca farklılaşarak tip B spermatogonyumları oluştururlar.

Spermatogonyum A'lar spermatogenik serinin kök hücreleri olarak tanımlanırlar. Primer spermatositlerden farklılaşan öncül (progenitör) hücreler ise Tip B spermatogonyumlardır. Bu hücreler oluşmalarından hemen sonra birinci mayotik bölünmenin profazına girerler. Bu sırada primer spermatosit 46 (44+XY)

kromozoma sahiptir ve DNA'sı da  $4N$ 'dir.  $N$ , haploid kromozom sayısını (insanlarda 23 adettir) ya da bu kromozomlardaki DNA miktarını belirtmektedir. Bu profaz safhasında, hücreler leptoten, zigoten, pakiten ve diploten şeklinde dört faz geçirerek diakinez safhasına ulaşırlar ve sonuçta kromozomlar ayrılır. Mayozun bu evresinde genler arasında "crossing-over" oluşur. Daha sonra hücre metafaza girer ve metafazı takip eden anafaz safhasında, kromozomlar her bir kutba doğru çekilirler. Bu bölünmede, profazın yaklaşık 22 gün gibi bir süre alması nedeniyle incelenen hücrelerin büyük çoğunluğu bu fazda görülürler. Spermatogenez seride en büyük olarak görülen hücreler primer spermatositlerdir, bunlar çekirdeklerinde kangal yapma sürecinin değişik safhalarında kromozomların bulunması ile tanınırlar (Janqueira ve ark, 1993).

İlk mayoz bölünmeden sonra sekonder spermatosit denilen ve yalnızca 23 kromozom ( $22+X$  veya  $22+Y$ ) içeren daha küçük hücreler oluşur. Bu sayı azalma ( $46$ 'dan  $23$ 'e) her hücredeki DNA miktarının eksilmesi ( $4N$ 'den  $2N$ 'e) ile birlikte olur. Sekonder spermatositlerin testis kesitlerinde gözlenmesi zordur, çünkü bunlar çabucak ikinci mayoz bölünmeye giren ve interfazda kısa süre kalan hücrelerdir. Sekonder spermatositlerin bölünmesi spermatidlerin oluşmasına yol açar; spermatidler 23 kromozom ( $1n$ ) ve normalin yarısı DNA'ya ( $1n$ ) sahip hücrelerdir. Birinci ve ikinci mayoz bölünmeler arasında spermatositlerde S fazı (DNA sentezi) görülmediği için ikinci bölünmeden sonra her bir hücredeki DNA miktarı yarıya iner ve haploid ( $1N$ ) hücreler meydana gelir. Yuvarlak veya poligonal şekilli, yoğun çekirdekli olan spermatidler, spermiyogenez olarak bilinen değişim dönemine girerler. Bu hücrelerin normal diploid sayıya dönmeleri fertilizasyon ile gerçekleşir. Hücre bölünmesindeki indirgeyici işlev sebebiyle mayoz bölünme süreci, kromozom sayısının türler için sabit olarak belirli bir miktarda kalmasını sağlar (Janqueira ve ark., 1993).

### **2.3.2. Spermiyogenezis**

Spermiyogenez olarak bilinen bu değişim döneminde, spermatidlerin çekirdekleri küçülür, yoğunlaşır. Hücreler kuyruk oluşturarak spermatozoonlara dönüşürler. Spermatid özelliğini kazanan hücreler bir daha bölünme geçirmezler. Olgunlaşarak yine haploid sayıda kromozoma sahip spermiumlara dönüşürler (Şekil

2.3.2.1). Spermiyogenezde spermatogenetik hücreler gibi seminifer tübüllerde yer alan Sertoli hücreleri önemli role sahiptirler. Değişim süresince, spermatidler Sertoli hücre zarına bağlı kalırlar. Spermiyogenezde hücrelerin yeni özellikler kazanarak değişmesi dört dönemde incelenir (Eşrefoğlu, 2009).

**2.3.2.1. Golgi dönemi:** Çok sayıdaki Golgi kompleksinin bulunduğu bölgede PAS (+) granüllerin birikmesi ile karakterize bir dönemdir. Glikoproteinden zengin içerikli bu proakrozomal granüller çekirdek zarı yakınındaki membranla sınırlı akrozomal veziküllerle birleşirler. Akrozomla veziküllerin bulunduğu bölge gelişen spermin ön kutbunu belirler. Bu dönemde sentriyoller de arka kutba doğru hareket ederler. Burada sperm kuyruğunun aksonemini oluşturacak olan mikrotubuller sentriyollerden başlayarak yapılırlar (Eşrefoğlu, 2009).

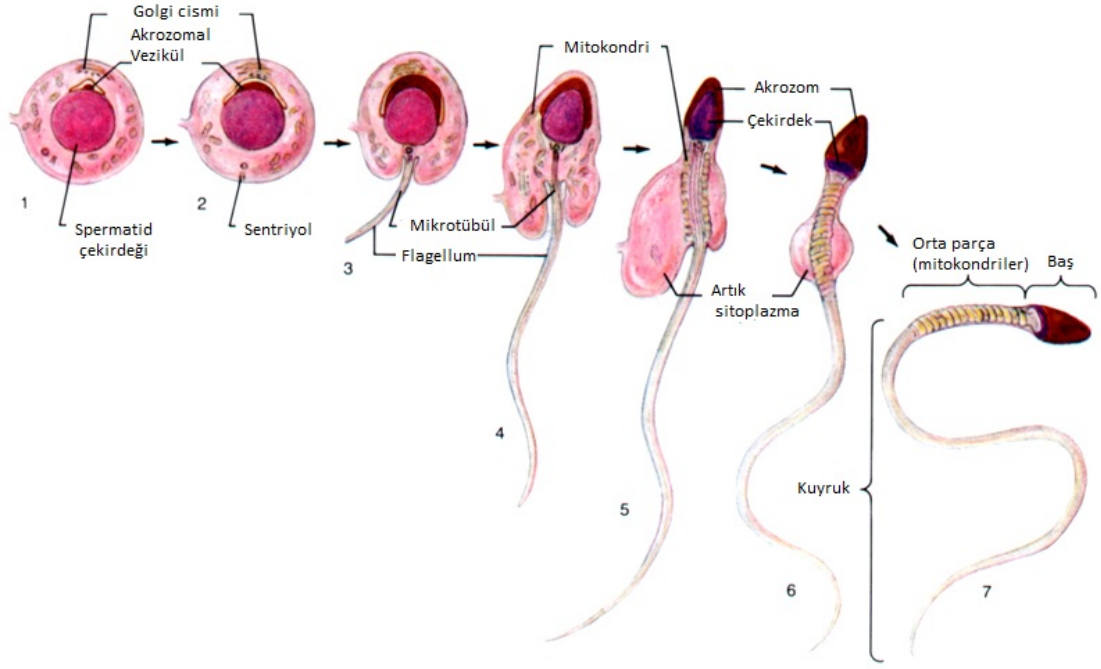
**2.3.2.2. Kep dönemi:** Akrozomal vezikül çekirdeğin ön bölümünü kaplayacak şekilde genişleyip şapka gibi bu bölümü örter (akrozomal kep). Çekirdek zarının buraya bakan bölümünde porlar kaybolur, zar kalınlaşır ve çekirdek yoğunlaşır (Eşrefoğlu, 2009).

**2.3.2.3. Akrozom dönemi:** Bu dönemde belirgin şekil değişikliği yaşanır. Sperm başı Sertoli hücrelerinin sitoplazmasının derinlerine gömülür. Kuyruk flajellumu iyice uzayarak lümende belirgin olarak görülmeye başlar. Yoğunlaşmış çekirdek yassılaşıp uzar. Akrozom, apikal plazma zarına iyice yaklaşır. Sitoplazmik mikrotubuller akrozomun arka yüzünde spermatidin arka kutbuna uzanan silindirik bir kılıf şeklinde organize olurlar. Sentrioller, immatur sentriollerin çekirdeğe tutunduğu çekirdek arka yüzüne göç ederek gelişmekte olan spermin **boyun** veya **birleştirici parçasını** oluşturmak üzere değişime uğrarlar. Nukleusa bağlı olan sentriyolden kaynaklanan 9 adet kalın lif aksonemin mikrotubullerinin periferinde yer alan **dış yoğun lifler** olarak kuyruk içinde uzanır. Bu lifler çekirdek ve flajellumu birleştirdiklerinden dolayı **bağlayıcı parça** olarak isimlendirilirler. Plazma zarı flajellum yüzeyini kaplamak üzere arkaya doğru uzarken, silindirik mikrotubul kılıfı kaybolur, mitokondriyonlar sitoplazmanın geri kalan bölümlerine göç ederek boyun bölümünün geniş liflerini sıkı bir kılıf şeklinde sarmalarlar. Bu bölge spermiyumun

kuyruğunun **orta parçasıdır**. Orta parçanın distalinde iki longitudinal fibroz kolon ve çok sayıda bağlayıcı halka içeren **fibröz kılıf** esas parçanın 9 longitudinal lifini çevreleyerek flajellumun neredeyse ucuna kadar ilerler. Fibröz kılıfın distalinde kalan bu kısa bölüm **son parça** olarak isimlendirilir (Eşrefoğlu, 2009).

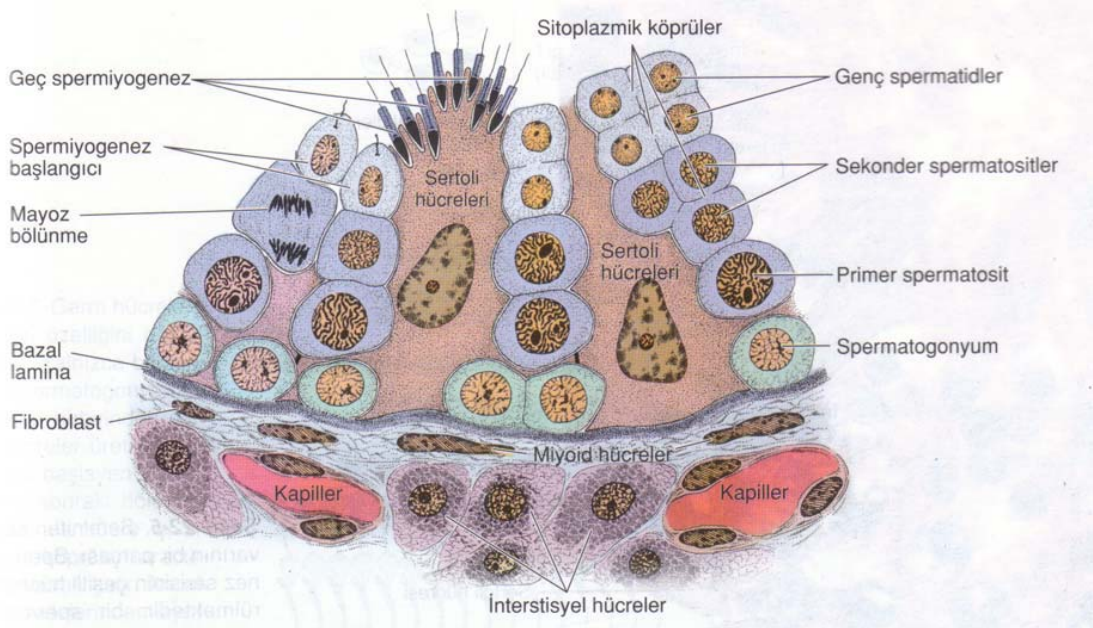
**2.3.2.4. Olgunlaşma dönemi:** Sitoplazma miktarının azaldığı son dönemdir. Fazla sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosit edilmek ortadan kaldırılır. Spermatidler birbirleri ile olan bağlantılarını kaybederler, Sertoli hücrelerinden ayrılarak lümeneye düşerler (Eşrefoğlu, 2009).

Gönüllüler üzerinde yapılan araştırmalarda, testislere deneysel <sup>3</sup>H-timidin enjeksiyonu ile insanda spermatogonyum safhası ile spermatozoon oluşumu arasındaki sürenin yaklaşık 64 gün olduğu gösterilmiştir. Yavaş bir süreç geçirmesine rağmen, spermatogenez, eş zamanlı olarak her seminifer tübülde aynı anda gerçekleşmez; bu olay bir dalgalanma biçiminde olur. Böylece, spermatogenez her bölgede farklı bir safha izleyerek, düzensiz bir görünüm alır. Bu olay da, seminifer tübüllerin bazı bölgelerinde spermatozoonlar bulunurken, diğer bölgelerinde sadece spermatidlerin bulunduğunu açıklamaktadır. Seminifer epitel siklusu germinal epitelde belli bir hücre evresinin ardışık iki görünümü arasında oluşan matürasyon değişiklikler dizisini ifade eder. İnsanda her bir siklus yaklaşık  $16 \pm 1$  gün sürer ve spermatogenez 4 siklustan sonra biter ( $64 \pm 4.5$  gün) (Gartner ve Hiatt, 2001; Janqueira ve Carneiro, 2006).



Şekil 2.3.2.1: Spermiyogenezin şematik gösterimi (<http://www.e-stork.com.tw/picture/200402260004.jpg>- erişim tarihi 15.06.2011)

### 2.3.3. Sertoli Hücreleri:



Şekil 2.3.3.1: Seminifer tubul ve interstisyel bağ dokusunun şematik görünümü (Janqueira ve Carneiro, 2006).

Sertoli hücreleri spermatozoonların desteklenmesinde ve olgunlaşmasında çok önemli rol oynar. Puberteden sonra seminifer tübül epitelindeki hücrelerin yaklaşık % 10'unu Sertoli hücreleri oluşturur. Sınırları güçlükle ayırt edilen bu prizmatik hücreler **bazal membrandan seminifer tübül** epiteline kadar uzanır (Şekil 2.3.3.1). Tepe kısımlarında yeni oluşan spermatozoonlar lümene bırakılıncaya kadar spermatidlerin yerleştiği kriptaya benzer girintiler bulunur. Her hücrenin sınırları düzgün olamayan ökromatik bir **çekirdeği** ve belirgin bir çekirdekçiği bulunur. Sitoplazmada mikrotübüller ve ara filamanlardan oluşan gelişmiş bir hücre iskeletinin yanı sıra, yassı mitokondriyonlar, çok belirgin olmayan bir düz endoplazmik retikulum, çok sayıda lipid damlacığı ve lipofuksin içeren lizozomlar bulunur. Bitişik hücreler taban ve yan yüzeylerindeki **sıkı bağlantı** kompleksleriyle birbirine tutunur. Bu tutunma kompleksleri epiteli bazal ve adluminal bölmelere ayırır. Bazal kompartman; spermatogonyum ve genç spermatositleri içerirken, Adluminal kompartman, genç spermatositleri ve spermatidleri içerir. Buna bağlı olarak oluşan **kan-testis bariyeri** spermatogonyumlarla primer spermatositleri daha tepedeki sekonder spermatositler ve spermatidlerden ayırır. Bu seminifer tübül lümeninin içindeki yapılar dolaşım sistemindeki antijenlerden yalıtılır, dolayısıyla spermatositler ve spermatidleri otoimmün bağışıklık reaksiyonlarından ve kanda bulunan maddelerden korur. Sertoli hücreleri spermatid artıklarını *fagosite eder* ve spermin yaşaması için mutlaka gerekli olan androjen bağlayıcı protein gibi pek çok maddeyi ve sıvıyı salgılar. Hücre bağlantıları ektoplazmik özelleşmeler olarak adlandırılan bölgelerde aktin filamanları ve endoplazmik retikulumuyla sıkı bir ilişki gösterir. Bu özelleşmeler spermatozoonların lümene doğru hareketi sırasında bağlantının yapısındaki değişikliklere uyumu sağlayan yapılar olabilir. Sertoli hücrelerinin yaygın hücre iskeleti ağı spermatozoonların hareketinin sağlanmasına yardımcı olur (Tablo 2.3.3.1) (Ovalle ve Nahirney, 2009).

Sertoli hücreleri insanlarda ve diğer hayvanlarda üreme periyodu süresince bölünmezler. Bunlar özellikle enfeksiyona, kötü beslenmeye, X ışını irradiasyonu gibi kötü koşullara dayanıklıdırlar ve yaralanmalarda diğer spermatogenetik serisi hücrelere göre daha çok hayatta kalırlar (Janqueira ve ark., 1993).

Memelilerde spermatozoa salınımı muhtemelen hücrel hareketlerin bir sonucudur, bu hareket Sertoli hücre apeksinde bulunan mikrotubullerin ve mikrofilamentlerin katılımı ile oluşur (Janqueira ve ark., 1993).

Tablo 2.3.3.1: Sertoli hücrelerinin görevleri

1- Gelisen tohum hücrelerinin beslenmesi ve desteklenmesi
2- Spermiyogenez sırasında ortaya çıkan sitoplazma fazlalıklarının fagositozu
3- Kan-testis bariyerinin oluşturulması
4- ABP üretimi ve salgılanması
5- Embriyogenez sırasında AMH salgılanması
6- İnhibin, Aktivin üretimi ve salgılanması
7- Testiküler transferrin üretimi ve salgılanması
8- Früktozdan zengin, spermatozoonları besleyici ve taşınmasını kolaylaştırıcı sıvının salgılanması

#### 2.3.4. Leydig Hücresi ve İnterstisyel Doku

Seminifer tübüllerin arasındaki gevşek bağ dokusunda eozinofilik Leydig hücreleri yer alır. Bu hücrelerin sitoplazmasının köpüksü görünümü *testosteron* sentezi için depolanan kolesterole bağlı olarak yüksek düzeyde lipid içermesinden kaynaklanır. Büyük, çok yüzeyle olan bu hücrelerde merkezin dışında yer alan ve bir ya da iki çekirdekçiği bulunan bir **çekirdek** mevcuttur. Hücre yüzeyinde çok sayıda mikrovillus yer alır. Bu hücreler çoğunlukla **pencereli kapillerlere** ve küçük lenf damarlarına yakın konumda yerleşmiştir. Sitoplazmalarında steroid salgılayan hücrelere özgü bir özellik olan yoğun, sıkı paketlenmiş **düz endoplazmik retikulumu** (DER) bulunur. Ayrıca, nispeten daha az sayıda ribozom ve granüllü endoplazmik retikulumu (GER), çok sayıda **tübüloveziküler kristalleri** bulunan dağınık durumda **mitokondriyon**, çekirdeğin hemen yanında büyük bir Golgi kompleksi ve değişken boylarda çok sayıda yuvarlak **lipid damlacığı** bulunur. İnsanlardaki Leydig hücrelerinde, birbirine dik açılı çizgiler şeklinde çok düzenli bir biçimde dizilmiş kristalloid inklüzyonlar (Reinke kristalleri) da görülür ancak işlevleri bilinmemektedir. Bu inklüzyonlar puberteden önce görülmez ve yaş

ilerledikçe sayıları artar. Lizozomlarla ilişkili lipofuksin pigmentinin miktarı da ileri yaşlarda artar (Ovalle ve Nahirney, 2009).

Leydig hücrelerindeki organellerin ve inklüzyonların çoğu testosteron sentezini ve salgısını düzenler, ancak en fazla DER bulunur. Testosteron, öncülü olan kolesterolden türer. Kolesterol ya doğrudan DER zarlarında sentezlenmekte ya da dolaşımdaki düşük yoğunluklu lipoprotein moleküllerinden türemektedir. Zarla sarılı olmayan lipid damlacıklarında gerektiğinde kullanılmak üzere kolesterol depolanır. Taşıyıcı proteinler kolesterolü mitokondriyonun iç zarına aktardıktan sonra mitokondriyonlar luteinizan hormonun etkisi ile kolesterolü pregnanolona çevirir. Sentezlenen pregnanolon mitokondriyon zarından DER'e aktarılır. DER üzerindeki enzimler pregnanolon üzerinde başka değişiklikler gerçekleştirerek testosterona çevirirler. Bu hücreler tarafından aralıksız sentezlenen testosteron mikrovilluslarla yüzey alanı artırılan hücre zarından difüzyonla geçer. Hücre dışı aralığa salınan testosteron hızla dolaşımdaki steroid bağlayıcı proteinlere bağlanır (Ovalle ve Nahirney, 2009).

#### **2.4. Testis Histofizyolojisi**

Vücut içi sıcaklığı olan 37°C altındaki sıcaklıklarda oluşan spermatogenezin düzenlenmesinde ısı çok önemlidir. Testiküler ısı 35°C'dir, bu durum birkaç mekanizma ile kontrol edilir. Zengin bir venöz pleksus (pampiniform pleksus) her bir testiküler arterin etrafını sarar, testiküler ısının sürdürülmesinde önemli olan bir karşı ısı akımı sağlar. Diğer faktörler; skrotumda oluşan terin buharlaşması ile ısı kaybı ve spermatik kordondaki krameter kaslarının kasılması ile testislerin daha düşük bir ısıda kalabileceği inguinal kanallara çekilmesidir (Janqueira ve ark.; 1993).

Testisin inişindeki bozukluk olan kriptorşidizmde (Yun. kryptos, gizli + orchis, testis), testisler 37°C'de kalır ve spermatogenez inhibe olur. Çok ileri olmayan vakalarda testisler cerrahi operasyon ile skrotuma indirildikleri durumda spermatogenez normal olarak devam edebilir. Testis karın içinde kalırsa, bu ortamdaki sıcaklıkta germ hücrelerinin çoğalması inhibe olur; ancak testosteron sentezi devam eder. Bu da insanların kriptorşid oldukları halde neden kısır olduklarını ve halen sekonder seks karakterlerini geliştirebildiklerini ve ereksiyonu başarabildiklerini açıklar (Janqueira ve ark., 1993).

Kötü beslenme, alkolizm ve bazı ilaçların etkisi ile spermatogonyumlarda değişiklikler ve spermatozoa yapımında bir azalma ortaya çıkar. X-ısını ve kadmiyum tuzları spermatogenik seriye ait hücrelerde oldukça toksiktirler ve bu hücrelerin ölümüne sebep olarak hayvanda kısırlığa sebep olurlar. Bisülfan germinal hücreler üzerinde etkilidir, hamile sıçanlara verildiği zaman, bunların erkek yavrularının germinal hücrelerini öldürür. Bu nedenle yavru steril kalır ve seminifer tübüleri sadece Sertoli hücrelerini içerir. Androjen-üreten interstisyel hücre tümörleri de erkeklerde erken puberteye yol açabilir (Janqueira ve ark., 1993).

Bununla birlikte spermatogenez üzerinde en önemli etkiyi hiç şüphesiz endokrin faktörler oluşturur. Spermatogenez, hipofizin folikül stimülan hormon (FSH) ve luteinizan hormonlarının (LH) testiküler hücreler üzerindeki ettilerine bağlıdır. LH, Leydig hücreler üzerine etki ederek spermatogenik seri hücrelerinin normal gelişimi için gerekli olan testosteron yapımını uyarır. FSH'nın Sertoli hücrelerine etki ederek adenital siklaz yapımını stimüle ettiği ve sonuçta cAMP'nin artmasına sebep olduğu ve aynı zamanda da **androjen-bağlayıcı proteinin (ABP)** sentez ve salgılanmasını sağladığı bilinmektedir. Bu protein testosteron ile bağlanır ve bunu seminifer tübüllerin lümenine tasır. Testosteron spermatogenesisi uyarır ve östrojenler ve progesteronlarla inhibe edilir (Janqueira ve ark., 1993).

Spermatozoonlar epididimise, uygun bir medyum olan testiküler sıvı içinde taşınırlar. Testiküler sıvı Sertoli hücreleri ve rete testis tarafından üretilir; bu sıvı steroidler, proteinler, iyonlar ve testosteronla birleşmiş androjen-bağlayıcı protein içerir. Spermatogonial hücrelerin farklılaşması sperme özgü proteinlerin ortaya çıkmasına yol açar (Janqueira ve ark., 1993).

### **2.5. Kan-Testis Bariyeri**

Bu bariyerden Sertoli hücrelerinin arasındaki sıkı bağlantılar (occluding junctions) sorumludurlar ve erkek germ hücrelerini kandan gelen zehirli ajanlara karşı korumak için gereklidirler. Seksüel olgunlaşmanın, immünolojik yeteneğinin gelişmesinden uzun bir süre sonra ortaya çıkması sebebiyle farklılaşmakta olan sperm hücreleri yabancı olarak algılanabilir ve germ hücrelerinin ölümüne sebep olabilecek bir immun yanıt oluşmasına neden olabilirler. Kan-testis bariyeri, gelişen spermler ve immun sistem arasında oluşabilecek herhangi bir etkileşimi ortadan

kaldıracaktır. Bu bariyer seminifer tübüllere immunglobulinlerin geçmesini önler ve bu sayede serumlarında çok yüksek düzeylerde sperm antikorları bulunan hastalarda herhangi bir fertilitate bozukluğu görülmez. Sertoli hücre bariyeri, seminifer epiteli bir otoimmün reaksiyonda korumuş olur (Janqueira ve ark., 1993).

## 2.6. Kisspeptin (Kiss-1) ve GPR-54 (Kiss-1r)

Kisspeptinler, Kiss-1 geni (1q32) tarafından kodlanan bir nöropeptid ailesidir. Bu genin ürünü öncül kisspeptin, 145 amino asit içeren Kiss-1 proteindir. *Kiss* sözcüğündeki “ss” takısı supresör diziyi (suppressor sequence) ifade etmektedir ve bu gen bölgesi ilk olarak ABD’nin Pennsylvania Eyaleti’nin Hershey şehrindeki bilim adamları tarafından keşfedildi, Pensilvanya’da keşfedildiği için bu yörenin meşhur *Kiss* çikolatasına ithafen “Ki” öneki getirilerek gene Kiss-1 geni adı verilmiştir (Lee ve ark., 1996, 1997; Lee ve ark., 1999). Kiss-1 geni ilk olarak anti-metastaz geni olarak keşfedildi. İnsanlarda meme kanseri metastazını baskılar ve Kiss-1 ekspresyonu gestasyonel trofoblastik neoplazmada (GTN) kanser gelişmesini içeren bir çok tümörde artan metastaz ile ters orantılıdır. Bu nedenle, Kiss-1 geni belli kanser formlarını metastatik olmayan formlardan ayırabilmek için potansiyel belirleyici olarak belirtilir (Dhillon ve ark., 2007b).

Kisspeptin geni, kisspeptinler olarak adlandırılan peptid ailesine proteolitik olarak dahil olan 145 aminoasitlik bir peptid habercisini kodlar. *In vivo* koşullarda kisspeptinin en etkili türü 54 aminoasitlik protein olan kisspeptin-54’dür (Thompson ve ark., 2006). Kiss-1 geni tarafından kodlanan 145 amino asitli protein, 54, 14, 13 veya 10 amino asitli daha kısa peptidlere parçalanır (Kotani ve ark., 2001). Kisspeptin olarak bilinen bu peptidler G-protein-coupled receptor-54’ün (GPR54) agonistidir (Lee ve ark., 1996; Kotani ve ark., 2001). Reseptör aktivasyonu için gerekli olan minimum dizi (sequence) nin bulunduğu Kisspeptin-10 ‘un da dahil olduğu tüm kisspeptin formlarında genel olan COOH- terminal dekapeptid ucu ortaktır (Kotani ve ark., 2001; Muir ve ark., 2001; Ohtaki ve ark., 2001).

Olgunlaşan bir hayvanda üremenin başlaması karışık bir işlemdir, önbeyin, hipofiz ve gonadların etkileşimini gerektirir. Kisspeptin, puberteyi başlatan nöroendokrin olayları düzenleyen başlıca peptid olarak kabul edilir (Dungan ve ark.,

2006). Kisspeptin salgılanmasını ve dolaylı olarak GnRH salgılanmasını birçok internal ve eksternal faktörler düzenlerler (Popa ve ark., 2008). Ergenliğin başlangıcı GnRH üreten hipotalamustaki nöronların aktivasyonu ile tetiklenir. Buna ek olarak, Kisspeptinin santral yolla kronik uygulanmasının dişi sıçanlarda pubertenin birkaç gün erken başlamasına sebep olduğu rapor edilerek (Navarro ve ark., 2004a) pubertenin dişilerde daha erken görülmesinde önemli bir rol oynayabilir; fakat erkek hayvanlarda da prekoks puberteye neden olup olmadığı bilinmemektedir. Böylece, kisspeptin-GPR54 sinyal gücündeki artışın puberteyi başlatması kuvvetle muhtemeldir. Nitekim puberte dönemlerinde, hayvan çalışmalarında kisspeptin nöronlarının aktivitelerinde artış olduğuyla ilgili bulgular elde edilmiştir (Navarro ve ark., 2004a; Han ve ark., 2005). Clarkson ve Herbison (2006), dişi farelerin hipotalamusunda, anteroventral ve preoptik periventriküler çekirdeklerinde erkeklerinkine göre yaklaşık 10 kat daha fazla Kiss-1 nöronu kapsadığını göstermiştir.

GnRH'nın güçlendirilmiş salgılanması, gonadların gelişimini uyararak LH (Luteinleştirici Hormon) ve FSH (Folikül Uyarıcı Hormon) salınımına sebep olur (Plant ve Barker-Gibb, 2004; Ramzan ve Qureshi, 2011). Kisspeptinin *in vivo* koşullarda uygulanması fare, sıçan, maymun ve koyunları içeren birkaç türde plazma LH seviyesini artırdığı gösterilmiştir. Kisspeptin intraserebroventriküler, intravenöz (damar içi), intraperitoneal (karın içi), ya da subkutan (deri altı) yollar ile uygulandığı zaman, LH salınımını uyardığı gözlenmiştir (Smith ve ark., 2006). Birçok memeli türünde bu kaskat (cascade) tanımlanmasına rağmen, bu işlemi asıl başlatan santral seviyede hücre ve moleküler olaylar hala bilinmemektedir.

Hem kisspeptin hem de GPR54 (Kiss1r, Oakley ve ark., 2009) transkriptleri plasenta, beyin birkaç bölgesi, spinal kord, testis, ovaryum, karaciğer, ince bağırsak, pankreas, kalp, böbrek ve uterus dokularında ekspres edilir (Roa ve ark., 2008). GPR54 hipofizde de ekspres edilir (Kotani ve ark., 2001; Muir ve ark., 2001; Kinoshita ve ark., 2005).

*In vitro* yapılan çalışmalarda, kültür edilmiş sıçan hipofiz hücrelerinden gonadotropin salınımına kisspeptinin doğrudan etkisi olduğu bildirilmiştir (Navarro ve ark., 2005a,b). Hem erkek hem de dişi sıçan ve farelerde (Gottsch ve ark., 2004), prepubertal ve erişkin sıçanlarda (Navarro ve ark., 2004a,b), ayrıca juvenil gonadal

erkek maymunlarda (Shahab ve ark., 2005) kisspeptinlerin LH salınımını uyardığı gösterilmiştir. Fakat, diğer çalışmalar, *in vitro*da hipofiz parçalarından ya da kültüre edilmiş sıçan hipofiz hücrelerinden gonadotropin salınımına kisspeptinin doğrudan etkisinin olmadığını göstermişlerdir (Matsui ve ark., 2004; Thompson ve ark., 2004). Smith ve arkadaşları (2008), hipofizde işlevsel kisspeptin reseptörünün varlığı ve ovin hipofizyal portal kanından kisspeptin salınımının gonadotropin salınımını ayarlamak için kisspeptinin hipofiz üzerine doğrudan etkisinin olabildiğini önererek koyunlar üzerinde deney yaparken kisspeptinin hipofiz hücre kültüründen gonadotropilerden LH salgılanmasına katkıda bulunabildiğini, fakat *in vivo* ortamda, ovariectomy edilerek hipotalamus-hipofiz ilişkisi kesilmiş koyunlarda GnRH değiştirilmesi kullanılarak östrojenle indüklenmiş LH artması sırasında ya da normal koşullar altında LH seviyelerine kisspeptinin hiçbir etkisini bulamadıklarından dolayı böyle bir etkisi olmadığını göstermişlerdir. Bu nedenle, hipofiz üzerine kisspeptinin doğrudan etkisinin fizyolojik ilişkisi şimdilik bilinmemektedir.

Hem Kiss1 hem de GPR54 ekspresyonu, gelişimsel olarak hipotalamusta hormonal şekilde, hem erkek hem de dişi sıçanlarda prepubertal yaşta keskin bir artışla, erişkin dişilerde östrus siklusu boyunca değişir ve gonadektomiden sonra artar; bu etki seks steroid yer değiştirmesiyle önlenir (Navarro ve ark., 2004a; Irwig ve ark., 2004). Kisspeptin-Kiss1r sinyalinin dağılımı ve fizyolojisi birçok türde araştırılmıştır. Gelişim ve lokasyon süresi ile ekspresyon durumlarının türler arasında farklı olmasına rağmen, sıçanlarda (Thompson ve ark., 2006), erişkin maymunlarda (Seminaro ve ark., 2006), sürekli kisspeptin uygulamasının yapıldığı erişkin ve agonadal juvenil maymunlarda (Ramaswamy ve ark., 2007) LH salınımında azalmayla ve testiküler dejenerasyonla sonuçlanmasına neden olan Kiss1r' yi duyarsızlaştıran bazı kanıtlar vardır. Elde edilen Kisspeptin antagonistleri (Roseweir ve ark., 2009); kontraseptif olarak ya da üreme hastalıklarını tedavi etmede kullanıldığı zaman, Kiss1r nin duyarsızlığının kisspeptin analogları ve antagonistlerinin etkililiği üzerine önemli bir etkisi vardır. Kisspeptin ve GPR54 (G-protein-coupled receptor), Hipotalamik-Pitüiter-Gonadal (HPG) aksının merkezi düzenlemesinde önemli rol oynar. GPR54 normal pubertal gelişim ve üreme fonksiyonu için önemlidir. Son zamanlarda, GPR54'ü kodlayan gendeki delesyonel ve disfonksiyonel mutasyonların hipogonadotropik hipogonadizme ve puberte

gecikmesine sebep olduğu ve işlevsel GPR54 ya da Kiss-1r gen eksikliği olan insanlar ve farelerde de pubertal gelişimin olmadığı bildirilmiştir (Funes ve ark., 2003; de Roux ve ark., 2003; Seminara ve ark., 2003; Semple ve ark., 2005; d'Anglemon de Tassigny ve ark., 2007; Lapatto ve ark., 2007). GPR54 eksikliği (GPR54<sup>-/-</sup>) olan farelerde anormal seksüel gelişim ve düşük seviyede gonadotropin konsantrasyonları vardır; ayrıca, üreyemezler (Funes ve ark., 2003). Kiss1 geninin bir ürünü, GPR54'ün endojen ligandı olarak bulunmuştur (Seminara ve ark., 2003; Plant ve ark., 2006). GPR54'e *in vitro* olarak tüm kisspeptinlerin benzer ilgisi ve tesiri vardır (Kotani ve ark., 2001). Ancak son zamanlarda, *in vivo* olarak, kisspeptinin farklı formlarının HPG aksını uyarmada farklı etki gösterdikleri tespit edilmiştir (Murphy, 2005).

Kisspeptin-54 /Kisspeptin-10 un akut şekilde kemirgen ya da primatlara santral veya periferel olarak ve insanlara periferel olarak uygulanması HPG aksını uyarmaktadır (Tena-Sempere, 2006; Mead ve ark., 2007; Dhillon ve ark., 2005; Gottsch ve ark., 2004; Navarro ve ark., 2004a, 2005b, Thompson ve ark., 2004). Bu etki, hipotalamik gonadotropin salgılatıcı hormonu (GnRH) sisteminin aracılığı ile gerçekleşir (Gottsch ve ark., 2004; Irwig ve ark., 2004; Matsui ve ark., 2004; Thompson ve ark., 2004; Kinoshita ve ark., 2005; Messenger ve ark., 2005; Shahab ve ark., 2005; Lee ve ark., 1999). İlginç olarak, kemirgenlere ve maymunlara kisspeptinin periferel yolla sürekli olarak uygulanması HPG aksının desensitizasyonuna sebep olur (Seminara ve ark., 2006; Thompson ve ark., 2006; Ramaswamy ve ark., 2007). Kisspeptinin periferel ya da santral uygulanması hipotalamik GnRH nöronlarını aktive eder (Irwig ve ark., 2004; Matsui ve ark., 2004), bunların çoğu GPR54'ü eksprese eder (Irwig ve ark., 2004; Kinoshita ve ark., 2005; Messenger ve ark., 2005). Kisspeptin-10 *in vivo* ve *in vitro* olarak GnRH salınımını uyarır (Messenger ve ark., 2005; Thompson ve ark., 2004), Bu çalışmalar toplu olarak, kisspeptinlerin GnRH/gonadotropin salınımının en güçlü sağlayıcıları olduğunu gösterirler (Roa ve ark., 2008; Tena-Sempere, 2010).

Erişkin sıçanlara uzun süreli kronik olarak subkutan kisspeptin-54 uygulaması testislerde, hem germ hücrelerinin hem de Sertoli hücrelerinin kaybı ile belirgin dejenerasyona sebep olmuştur (Thompson ve ark.,2006). Kronik olarak kisspeptin-54'ün sebep olduğu testiküler dejenerasyonunun mekanizması

bilinmemektedir. Testiküler dejenerasyonu indükleyen kisspeptin-54'ün mekanizmasını anlamak için kisspeptinlerin insanlardaki üreme aksını düzenlemede kullanılıp kullanılmayacağı önemlidir. Spermatogenezis ve testiküler doku üzerine kisspeptinin etkileri az bilinmektedir. Thompson ve arkadaşları (2006, 2009), kisspeptinin kronik olarak erişkin erkek sıçanlara uygulanmasının testiküler dejenerasyona sebep olduğunu, bu etkinin bir GnRH antagonisti olan cetorelixin önce uygulanması ile *in vivo* olarak HPG aksı üzerine kisspeptinin etkisinin önlenilebilirliğini göstermişlerdir (Gottsch ve ark., 2004; Irwig ve ark., 2004; Matsui ve ark., 2004; Shahab ve ark., 2005). Bu özellik, bu peptidi gonadotropik aksın kontrolünde önemli rol oynamakla birlikte, üreme fonksiyonlarının farmakolojik müdahaleleri için uygun bir hedef haline getirir. HPG aksına kisspeptinin akut uygulanmasının etkisi iyi bilinmesine rağmen, sürekli-devamlı- kronik kisspeptin uygulaması kapsamlı olarak araştırılmamıştır. Kisspeptinin 6 gün süre ile günde iki kere intraserebroventriküler (i.c.v.) uygulaması immatur-gelişmemiş dişi sıçanlarda vajinal açılmayı uyarır (Navarro ve ark., 2004b) ve yetersiz beslenmiş dişi sıçanlarda vajinal açılmayı iyileştirir (Castellano ve ark., 2005). Ergen erkek sıçanlarda, 7 gün boyunca, kisspeptinin günde 2 kere (i.c.v.) uygulamasının hipotalamik/preoptik alanda GnRH mRNA ekspresyonunu değiştirmediği gözlenmiştir (Navarro ve ark., 2004b).

Kisspeptin-GPR54 sistemi, üreme aksını ve üreme hastalıklarını tedavi etmede kullanılan ilaçlar için varsayılan bir hedefdir. İnsanlara kisspeptinin uygulanması HPG aksını kuvvetli uyarır. Bu nedenle, kisspeptinler, erişkin infertilitesini tedavide ve ergenliğe girmesi gecikmiş olan gençlerin ergenliğini başlatmada yararlıdır. GPR54 agonistleri gecikmiş ergenlik tedavilerinde ergenliği başlatmak için potansiyel tedavi edici ve ovulasyon olmayan hastalarda ovulasyonu uyarıcı etkisi vardır (Dhillon ve ark., 2005; 2007a). İlginç olarak, aralıksız olarak (8 yada 30 saat) i.v. kisspeptin uygulaması mevsimsel anöstrus olan koyunlarda, hayvanların %80 inde (% 20 si kontrol ile karşılaştırıldığında) ovulasyon görölmüş (Caraty ve ark., 2007). Kisspeptin uygulamasının tip ve dozları arasındaki farklılıklardan dolayı ya da diğer türlerle karşılaştırılan sürekli kisspeptin uygulamasına cevap olarak, bu bulguların koyunlarda bir fark oluşturup oluşturmadığı açık değildir. GPR54 antagonistleri puberte prekoksun tedavisinde ve

kontraseptif etken olarak faydalı olabilir. GnRH agonistinin sürekli uygulanması, kısa süreli bir uyarıdan sonra paradoksal olarak HPG aksını baskılar ve uzun süreli uygulamaları takiben testislerde histolojik değişimlere sebep olabilir (Ward ve ark., 1989). Hipotalamik kisspeptin, sıçanlarda puberte prekoksya sebep olan GnRH' nin öncü (advance) pulsatil salınımına dahil olarak (Sun ve ark., 2007), kisspeptinin baskılanması prekoks puberte için tedavi edici olarak kullanılabilir. İnsanlarda olduğu gibi, kisspeptin seviyesi CPP (santral sebepli puberte prekoks) li kızlarda aynı yaştaki puberte öncesi kontrollerinden belirgin olarak daha yüksektir (de Vries ve ark., 2009) ve, olan GPR54 reseptörünü inaktife edici mutasyonları 8 yaşındaki bir kız çocuğunda prekoks puberteye neden olan reseptörün sürekli sinyaline belirgin olarak sebep oldu (Teles ve ark., 2008). Hormona bağlı tümörler ve prekoks puberte gibi hormonal duyarlı klinik bozuklukların çeşitliliğinin tedavisinde GnRH agonistleri kullanılmaktadır (Thompson ve ark., 2009; Partsch ve Sippell, 2002). Prekoks pubertede, çocuklarda anormal erken seksüel olgunlaşmaya fayda sağlamak için erken GnRH salınımının mekanizması gelecek çalışmalarda ortaya çıkabilecektir.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda, Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden (YÜDETAM) temin edilen Wistar-Albino cinsi (200-230gr), erişkin erkek sıçan kullanıldı. Tüm denekler 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda normal oda sıcaklığında ( $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) tutuldu. Tüm denekler standart palet sıçan yemi (210kcal/100gr/gün) ile ad libitum beslenip, musluk suyu içip düzenli olarak kafes bakımları yapıldı. Deneyde toplam 7 grup aşağıdaki gibi oluşturuldu:

	Gruplar (n=6)	Doz / gün (intraperitonal)	Uygulama Süresi
1	Kontrol	Çözücü (Serum Fiziyojik-SF)	1 gün
2	Kontrol	Çözücü- (SF)	5 gün
3	Kontrol	Çözücü- (SF)	13 gün
4	Kisspeptin -10	50 nmol/sıçan	1 gün
5	Kisspeptin -10	50 nmol/sıçan	5 gün
6	Kisspeptin -10	50 nmol/sıçan	13 gün
7	Kisspeptin -10	50 nmol/sıçan	13gün + 7 gün bekleme

Çalışmanın deney kısmı Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yapıldı. Sıçanlar deney bitişinde tartıldı. Deneyler son uygulamadan 24 saat sonra sonlandırıldı ve kan örnekleri alındı. Alınan testisler tartıldıktan sonra, bir bölümü Kiss-10 ve GPR54 ekspresyonunu immünfloresan mikroskopta incelemek için  $-96^{\circ}\text{C}$ 'de donduruldu. Dokuların bir bölümü ışık mikroskopik tetkikler için %10'luk formaldehit ile tespit edildi. Dokulardan 4-5 $\mu\text{m}$  kesitler alınarak yapısal değerlendirme için rutin hematoksilen-eosin, PAS ve Masson Trikrom boyamaları yapıldı. İmmünohistokimyasal olarak Ki-67 parafin kesitlerde işaretlendi. Apoptotik indeks için testis kesitlerine TUNEL boyaması uygulandı. Elektron mikroskopik incelemeler için dokulara %2,5 gluteraldehit ile birinci tespit, osmiyum tetraoksit ile ikinci tespit yapıldı. Dereceli alkol serilerinden geçirilen dokulardan epoksi bloklar

hazırlandı. Hazırlanmış olan bloklardan yarı ince ve ince kesitler alınarak elektron mikroskopta (Gazi üniversitesi Tıp Fakültesi Elektron Mikroskop Ünitesi) incelendi.

### **3.1. Testis Ağırlığı**

Testisler çıkarıldı ve tartıldı. Gonadosomatik indeks yüzdesi,

$GSI\% = \text{Testis ağırlığı} / \text{vücut ağırlığı} \times 100$ , şeklinde hesaplandı (Ramzan ve ark., 2011) ;

### **3.2. Biyokimyasal İnceleme**

Deney sonunda alınan kan örnekleri 1000xG olmak üzere 20 dk santrijüje edilerek elde edilen serumlar -20 C°'de çalışılacağı güne kadar saklandı. Sıçan testosteron seviyesi için ELISA Kit (Uscn Life Science Inc. Wuhan, E90458Ra, L101101379, P.R.China) kullanıldı. Kit içindeki uygulama prosedürü dikkate alınarak testosteron düzeyleri belirlendi.

### **3.3. Işık Mikroskopik İnceleme:**

#### **3.3.1. Parafin Blok Hazırlama Prosedürü**

1. Alınan doku örnekleri düzgün şekilde trimlenerek %10'luk formaldehit ve alkol-formol solüsyonlarında, solüsyonlar değiştirilerek 48 saat süre ile tespit edildi.
2. %10'luk formaldehit ile tespit edilen doku örnekleri akan musluk altında 3-4 saat süre ile yıkandı. Alkol-Formol tespiti yapılan dokulara yıkama işlemi yapılmadı.
3. % 70'lık alkolde iki saat bekletildi.
4. % 80'lık alkolde iki saat bekletildi.
5. % 96'lık alkolde bir saat bekletildi. Bu aşamadan itibaren alkol-formol tespiti yapılan doku örnekleri'de takibe alındı.
6. % 96'lık alkolde bir saat bekletildi.
7. % 100'lık alkolde bir saat bekletildi.
8. % 100'lık alkolde bir saat bekletildi.
9. Ksilol I'de bir saat bekletildi.
10. Ksilol II'de bir saat bekletildi.
11. Eşit miktarlarda hazırlanmış Ksilol - parafin karışımında 64°C de etüvde 30 dakika bekletildi.

12. Parafin I'de 64°C de etüvde iki-üç saat bekletildi.
13. Parafin II'de 64°C de etüvde iki-üç saat bekletildi.
14. Takip edilen dokular kauçuk bloklama kaplarına gömülerek etiketlendi ve sertleşmesi için buzdolabına konularak parafin bloklar hazırlanmış oldu.

Buzlukta yeterince sertleşen parafin bloklardan Leica® RM 2125 RT mikrotom cihazı ve Leica marka mikrotom bıçakları kullanılarak 4-5 µm kalınlığındaki parafin kesitler alındı. Bu kesitlere genel dokuyu değerlendirme için hematoxilen-eozin, bağ dokusu bileşenlerini göstermek için Masson'un Trikrom boyası ve basal membran değerlendirmesi için Periodik asit Schiff (PAS) boyası uygulandı.

### **3.3.2. Hematoksilen-Eozin Boyaması**

4-5 µm kalınlığındaki parafin kesitler bir saat 60°C de etüvde bekletildi.

1. Ksilol I'de 2 dak. bekletildi.
2. Ksilol II'de 2 dak. bekletildi.
4. %100'lük alkolde 1 dak. bekletildi (iki kere).
5. %96'lük alkolde 1 dak. bekletildi (iki kere).
6. Akan suda yıkandı.
7. Hematoksilen de 3 dak. Bekletildi.
8. Akan suda yıkandı.
9. Asit alkole iki kez daldırıldı.
10. Akan suda yıkandı.
11. Amonyaklı suda 10-15 saniye bekletildi.
12. Akan suda yıkandı.
13. %80'lük alkolde 1 dak bekletildi.
14. Eozin'de 1 dak. bekletildi.
15. %96'lük alkolde 2 dak. bekletildi (iki kere).
16. %100'lük alkolde 2 dak. bekletildi (iki kere)
17. Ksilolde 10 dak. bekletildi ve lamel ile kapatıldı.

### 3.3.3. Periyodik Asid Schiff (PAS) Boyaması

1. 4-5 µm kalınlığındaki parafin kesitler bir saat 60°C de etüvde bekletildi.
2. Ksilol I'de 15 dak. bekletildi.
3. Ksilol II'de 15dak. bekletildi.
4. 2 dakika %100'lük alkolde bekletildi.
5. 2 dakika %96'lük alkolde bekletildi.
6. 2 dakika %70' ik alkolde bekletildi.
7. Distile su ile yıkandı.
8. %0,5 lik periyodik asid solüsyonunda 7 dak. bekletildi.

#### **%0.5 lik periyodik asid solüsyonu hazırlanışı:**

Periyodik asid	0,5 ml
Distile su	100 ml.

9. Distile su ile yıkandı.
10. Coleman'ın Schiff solüsyonunda 20 dak. bekletildi.

#### **Coleman'ın Schiff solüsyonu hazırlanışı.**

1 gr bazik fuksin, 60°C de 200 ml distile su ile karıştırıldı ve kaynama noktasına kadar ısıtılıp soğutuldu. Sonra 2 gr potasyum metabisülfid ve 1 N HCl ilave edilerek 24 saat bekletildi ve 0.5 gr aktif karbon ilave edilerek çalkalandı ve filtre edilerek buzdolabında saklandı.

#### **1 N HCl Hazırlanışı:**

Hidroklorik asit % 37'lik(HCl)	83.5 ml
Distile su	916.5 ml

11. 15 dakika akan suda yıkandı.
12. Mayer' in hematoksileni damlatıldı ve 1 dak. bekletildi.
13. 15 dakika akan suda yıkandı.
14. %95'lük alkol'de iki dak bekletildi.
15. %100'lük alkol'de iki dak bekletildi.
16. Ksilol I'de 10 dak. bekletildi.
17. Ksilol II'de10 dak. bekletildi.
18. Lamel ile kapatıldı.

### **3.3.4. Masson Trikrom Boyaması (Masson Trichrome with aniline blue, 04-010802)**

1. 5 µm kalınlığındaki parafin kesitler bir saat 60°C de etüvde bekletildi.
2. Ksilol I’de 15 dak. bekletildi.
3. Ksilol II’de 15dak. bekletildi.
4. 2 dakika %100’lük alkolde bekletildi.
5. 2 dakika %96’lık alkolde bekletildi.
6. 2 dakika %70’ ik alkolde bekletildi.
7. Distile su ile yıkandı.
8. Kesitler üzerine 3 damla A solüsyonundan (Weigert’in demir hematoksileni), 3 damla B solüsyonundan (Weigert’in demir hematoksileni) damlatılarak 10 dk bekletildi.
9. Yıkamadan lamların üzerindeki sıvı akıtılarak, 5 damla C solüsyonundan (Pikrik asit alkolik solüsyonu) damlatıldı, 4 dk bekletildi.
10. 3-4 sn hızlıca distile suda yıkandı ve 5 damla D solüsyonu (Mallory’e göre Ponceau asit fuksin) damlatılarak 4 dk bekletildi.
11. Distile suda yıkandı. 5 damla E solüsyonu (Fosfomolibdik asit solüsyonu) damlatılarak 10 dk bekletildi.
12. Yıkamadan lamların üzerindeki sıvı akıtılarak, 5 damla F solüsyonu (Masson anilin mavisi) damlatılarak 5 dk bekletildi.
13. Distile suda yıkanarak, artan dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidre edildi. Son olan % 100 lük alkolde 1 dk bekletildi.
14. Ksilenden geçirilerek, entellan ile kapatıldı.

### **3.4. İmmunhistokimyasal İnceleme**

Hazırlanan parafin bloklardan polizinli lamlara (Menzel Glaser) 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Testis dokularında apoptotik hücreleri göstermek için ApopTag Plus Peroksidase In Situ Apoptosis Detection Kit, S7101 Lot: PSO1736498 (Chemicon International, a serologicals Company) kullanılarak immun işaretleme yapıldı. Hücrelerdeki proliferasyonu belirlemek için Ki-67 (9106S1003B, Thermo Scientific, USA) primer antikoru kullanıldı. Kiss-1 [(C-20), goat polyclonal IgG, #H1910, Santa Cruz Biotechnology, Inc., California] antikoru ve GPR54 reseptör

[(M-20), goat polyclonal IgG, #E1309, Santa Cruz Biotechnology, Inc., California] antikoru kullanılarak testis dokusunda immunofloresans inceleme ile Kisspeptin ve GPR54 ekspresyonu incelendi.

#### **3.4.1. Ki-67 immünboyaması:**

Tümörlerin prognozunu göstermede kullanılan proliferasyon belirleyicisi olan Ki-67 çoğalan hücrelerde eksprese edilir. Bu antikor, özellikle siklusun G1, S, G2 ve M fazlarındaki hücrelerin çekirdeğinde yer alan bir antijen olan Ki-67 epitopuna karşı gelişir. Ki-67 (+) boyanan hücrelerin sayımı X40 büyütme ile her deneğe ait testis kesitinde 10 adet ayrı alanda yapılmıştır.

##### **• Ki-67 (+) İmmunohistokimya Boyama Aşamaları**

1. Kesitler deparafine edilerek, rehidre edildi.
2. Endojen peroksidazdan dolayı, nonspesifik arka zemin boyamalarını azaltmak için, kesitle *Hydrogen Perokside Block* ile 10-15 dk inkübe edildi.
3. PBS ile 2 defa yıkandı.
4. Lamlar, içinde 200 ml. 0.1M sitrat buffer pH 6.0 olan dayanıklı plastik kaba konarak 350 W'ta 5 dakika mikrodalgada kaynatıldı.
5. PBS ile 4 defa yıkandı.
6. Spesifik olmayan zemin boyamalarını engellemek için *Ultra V Block* uygulandı ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.
7. Suda hafifçe yıkandı (Rinse).
8. 1:100 oranında Ki-67 primer antikor uygulandı ve oda sıcaklığında 20 dk inkübe edildi.
9. PBS ile 4 defa yıkandı.
10. *Biotinylated Goat Anti-Polyvalent* uygulandı ve oda sıcaklığında 10 dk ünkübe edildi.
11. PBS ile 4 defa yıkandı.
12. *Streptavidin Peroxidase* uygulandı ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.
13. PBS ile 4 defa hafifçe yıkandı.

14. 2 mL *DAB Plus Substrate* içine 1 damla (40 µl) *DAB Plus Chromogen* eklendi, karıştırıldı ve kesitlere uygulandı. İstenilen boyama yoğunluğuna bağlı olarak 5-15 dk inkübe edildi.

15. Distile su ile 3 defa yıkandı.

16. *Mayer's Hematoksilen* zıt boyama yapıldı.

17. Distile su ve musluk suyunda bekletildi.

18. Alkol ve ksilende bekletildi.

19. Entellan damlatılarak lamelle kapatıldı.

### **3.4.2. TUNEL boyaması**

Apoptotik sinyaller DNA üzerinde kırıklar oluşturmaktadır. Açığa çıkan DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına terminal deoksinukleotidil transferaz (TdT) aracılığı ile biotin ile işaretlenmiş ve işaretlenmemiş deoksinukleotidler eklenir. Daha sonra biotin ile işaretlenmiş nükleotidler, streptavidin-horseradish peroksidaz konjugatı ile tespit edilir. Diaminobenzidine, işaretlenmiş örnek ile tepkimeye girerek DNA kırığı bölgesinde çözünemeyen bir substrat oluşturur. Metil yeşili ile ters boyama yapılarak deney sonlandırılır.

Her deneğe ait testis dokusunda x 40 büyütme ile 10 ayrı alanda (+) boyanan hücreler sayıldı.

#### **• ApopTag Plus Peroksidase In Situ Apoptosis Detection**

1. Kesitler 60 °C de 2 saat bekletilerek deparafine edildi.

2. 3 defa 5'er dk ksilolde bekletildi.

3. 2 defa 5'er dk %100 lük alkolde bekletildi.

4. 3 dk % 95 lik alkolde bekletildi.

5. 3 dk % 70 lik alkolde bekletildi.

6. 5dk PBS ile yıkandı.

7. 15 dk *Proteinaz K* ile oda ısısında inkübe edildi.

(stoktan 50 mikrolitre *Proteinaz K*+ 50 ml PBS)

8. 2 defa 2' şer dk distile su ile yıkandı.

9. 5 dk *H2O2* de oda ısısında bekletildi. (% 3 lük *H2O2*) (3ml *H2O2* + 27 ml PBS veya kullanıma hazır *H2O2* ).

10. Dokuların çevresini kuruladıktan sonra 50 mikrolitre *1X Dengeleyici Buffer* uygulandı. Plastik lamelle kapatıldı. 30 dk oda ısısında bekletildi.
11. *TdT karışımı* bir doku üzerine 50 mikrolitre gelecek şekilde düzenlenerek nemli kap içinde 37° C de 1 saat bekletildi.  
(3 kesit için; 33 mikrolitre Tdt Enzimi + 77 mikrolitre Reaksiyon Buffer)  
negatif kontrol için TdT yerine distile su damlatıldı.
12. *Yıkama/ durdurma tampon solüsyonunda* oda ısısında 10 dk bekletildi.  
1ml wash buffer+ 34 ml Distile su
13. 3 defa 5'er dk PBS ile yıkandı.
14. Her kesit üzerine 50 mikrolitre *Anti-Digoksijenin Peroksidaz* damlatıldı. 30 dk oda ısısında bekletildi.
15. 3 defa 5'er dk PBS ile yıkandı.
16. Hazırlanan *DAB solüsyonu* her kesit üzerine 50 mikrolitre olarak damlatıldı. 5 dk oda ısısında bekletildi.  
(3 kesit için; 3 mikrolitre DAB+ 147 mikrolitre DAB dilusyon Buffer)
17. 3 defa 1'er dk distile su ile yıkandı.
18. % 0.5 lik *MethylGreen* damlatıldı. 30 sn bekletildi.
19. 30 sn distile su ile yıkandı.
20. 30 sn % 95 lik alkolde bekletildi.
21. 2 defa 10'ar sn % 100 lük alkolde bekletildi.
22. 1 dk ksilende bekletildi.
23. Kapatma solüsyonu ile kapatıldı.

### **3.5. Kiss ve GPR 54 İmmunofloresans Boyama**

1. Kuru buzda testis dokuları donduruldu. Bloklar kesit almadan önce – 20 °C de bekletildi.
2. Polylyzinli lamlara 15-20µm kalınlığında cryostat (LEİCA CM 1850) kesitleri alındı. Fiksasyon ve boyama öncesinde oda sıcaklığında yapışması beklendi.
3. Preparatlar soğuk asetonda 10 dk +4 °C de bekletildi.
4. PBS de 3 değişimli olarak yıkandı.
5. Her basamaktan sonra doku çevresinde kalan sıvılar uzaklaştırıldı. Örneklerin üzerleri yeterli miktarda (1 örnek için yaklaşık 100-150 µl) reagent ile kaplandı.

6. Non-spesifik IgG bağlanmasını baskılamak için % 10 luk normal blok serum (PBS içinde) ile 20 dk inkübe edildi.
7. PBS de yıkandı.
8. Primer antikor (KISS-1 (C-20): sc-18134, GPR54 (M-20): sc-48218, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) ile 60 dk inkübe edildi (Primer antikor, % 1.5 luk normal blok serumlu PBS içinde 0.5-5.0 µg/ml olacak şekilde belirlendi).
9. 5 dk PBS ile yıkandı (3X5dk).
10. Fluorochrome konjugat sekonder antikor (anti-goat IgG-FITC: sc-2024, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) ile 45 dk karanlık ortamda inkübe edildi (Sekonder antikor, % 1.5-3 lük normal blok serumlu PBS içinde 1-5 µg/ml olacak şekilde belirlendi).
11. 5 dk PBS ile yıkandı (3X5dk).
12. Kesitler, DAPI çalışma solüsyonu ile oda sıcaklığında 5 dk karanlık ortamda boyandı.
13. 5 dk PBS ile yıkandı.
14. PBS içinde % 90 gliserol çözeltisi ile kesitler kapatıldı.
15. Uygun filtrelerle birlikte floresans mikroskop (Olympus BX51) kullanılarak inceleme yapıldı.

### **3.6. Elektron mikroskopik blok hazırlanması**

1. Alınan testis dokusu trimlenerek küçük parçalara ayrıldı.
2. Glutaraldehit solüsyonunda (%2,5, pH: 7,25) 24-48 saat buzdolabında dokular tespit edildi.
3. Dokular tespit sonrası A+B solüsyonu ile 4 defa yıkandı.

#### ***Sodyum fosfat tamponun hazırlanması:***

##### **A Solüsyonu:**

Sodyum monobazik fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	1,186 gr.
Distile su	100 ml.

##### **B Solüsyonu:**

Mono potasyum fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0,907 gr.
Distile su	100 ml.

ile karıştırıldı. A solüsyonundan 20 ml. B solüsyonundan 80 ml. alıp 100 ml. ye tamamlandı. Bu solüsyondan 8 ml. atılarak yerine 8 ml. glutaraldehit (Merck) koyuldu. Bu yeni karışımın pH değeri 7.2-7.4 arasında olacak şekilde 7,25 bulundu.

4. Hazırlanan % 1'lik osmiyum tetroksitten bir ölçü, A+B solüsyonundan bir ölçü alınıp hazırlanan solüsyon içinde ikinci kez tespit için buzdolabında 1 saat karanlık ortamda bekletildi.

***Osmiyum tetroksit hazırlanışı:***

100 mg. Osmiyum tetroksit ( $OsO_4$ ) (Merck) içeren ampul kırılarak 5 ml. distile su içinde hava ve ışık almayacak şekilde koyu renkli cam şişede çözüldü. Bu karışım 1 gece buzdolabında bekletildi.

5. A+B ile 2 kez yıkandı.

6. Etil alkol serilerinde tutuldu.

%50 alkolde 15 dakika bekletildi.

%60 alkolde 15 dakika bekletildi.

%70 alkolde 15 dakika bekletildi.

%80 alkolde 15 dakika bekletildi.

%90 alkolde 15 dakika bekletildi.

%96 alkolde 15 dakika bekletildi.

%96 alkolde 15 dakika bekletildi.

%100 alkolde 30 dakika bekletildi.

%100 alkolde 30 dakika bekletildi.

7. Dokular propilen oksit içinde 10 dakika bekletildi.

8. Gömme materyalinde 1 gece bekletildi.

***Gömme materyali:*** 2,5 ml. Araldit 2,5 ml. DDSA yarı yarıya karıştırıldı. Aynı yönde bagetle 15 dakika köpürtmeden karıştırılıp hazırlandı.

9. Ertesi gün, taze hazırlanmış araldit karışımına dokular konarak 2 saat oda ısısında, 2 saat 40°C'lik etüvde bekletildi.

10. Araldit karışımı olan jelatin kapsüllere dokular gömüldü, bloklama yapıldı.

### ***Araldit karışımının hazırlanışı:***

Araldit CY212	5 ml.
2-Dodecenyl succinic anhidrit (DDSA), sertleştirici	5 ml.
Benzil dimetil amin (BDMA) , hızlandırıcı	0,2 ml.
Dibütilfitalat, plastikleştirici	0,2 ml.

11. 40°C'lik etüvde 24 saat

12. 60°C'lik etüvde 48 saat bekletildi, etüv kapağı etüv soğumadan açılmadı.

Hazırlanan araldit bloklardan 1µm kalınlığında yarı ince kesitler ultratomda alınarak Toluidin Mavisi-Pironin ile boyandı. Işık mikroskopta incelenerek uygun alanlar işaretlendi. 300-800 A<sup>0</sup> kalınlığında ince kesitler gridler üzerine alındı. İnce kesitler kurşun sitrat-uranil asetat ile boyandı. Kesitler Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Zeiss 9 EM elektron mikroskobunda incelendi.

### **3.7. İstatistiksel Değerlendirme**

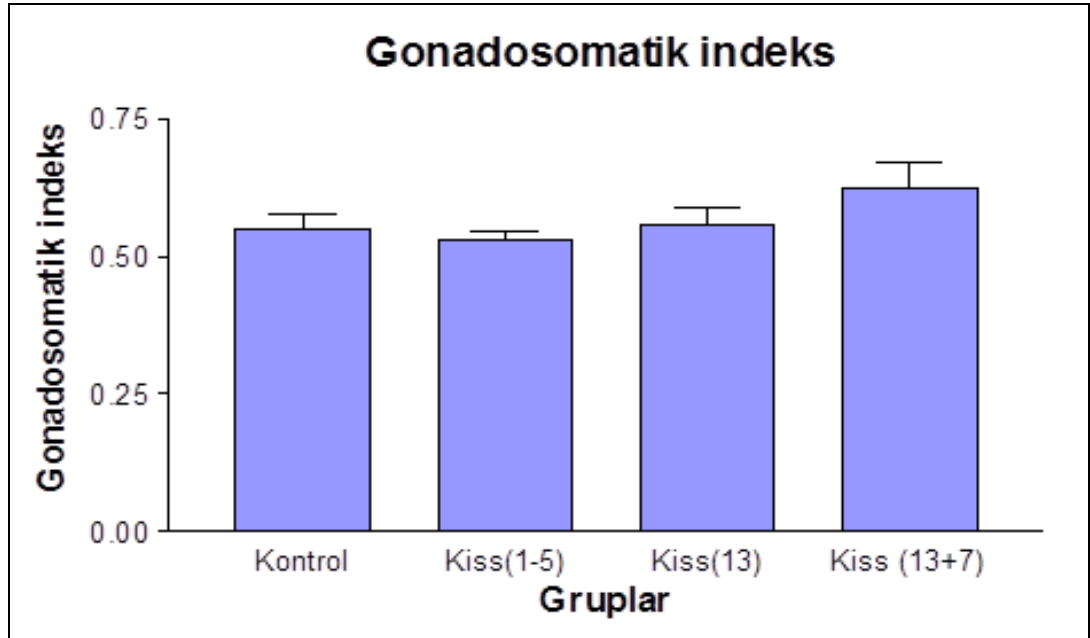
Yapılan çalışma sonrası elde edilen veriler, Graphpad 3.0 istatistik programı ile değerlendirildi. Apoptotik hücre sayısı, Ki67(+) hücre sayısı ve tübül çapları (µm) değerlendirilmesinde nonparametrik olarak, gruplar arası farklılık değerlendirilmesi Kruskal Wallis testi ile grup içi karşılaştırmalar Dunn's çoklu karşılaştırma testi ile yapıldı. Testosteron düzeyi ve testis ağırlıkları (gonadosomatik indeks-GSI%) değerlendirilmesinde Mann Whitney U testi kullanıldı. Biyokimyasal veriler One Way Anova Testi ve grup içi karşılaştırmalar Tukey testi ile analiz yapıldı. Veriler, ortalama (mean), ± standart hata olarak verildi.

## 4. BULGULAR

Kontrol ( 1, 5 ve 13 gün) deneklerine ait testis dokuları karşılaştırıldığında testis ağırlıklarında, tübül çaplarında ve yapısal olarak herhangi bir farklılık tanımlanmadı. İstatistik değerlendirmede kontrol grubuna ait verilerin ortalaması alındı. Gruplar; kontrol, akut, kronik ve 13+7 olarak düzenlenerek testosteron seviyesi, apoptotik hücre sayısı, Ki-67 (+) hücre sayısı, tübül çapları ve testis ağırlıkları yönünden istatistiksel olarak değerlendirildi. 1 ve 5 günlük kisspeptin grupları [Kiss (1-5)] akut etki olarak birlikte değerlendirilirken, 13 günlük kisspeptin uygulaması [Kiss (13)] kronik etki olarak değerlendirildi. Deney sonlandırılmadan önce hayvan ağırlıkları, deney sonlandırıldıktan sonra da çıkarılan testis ağırlıkları ölçüldü.

### 4.1. Testis Ağırlığı

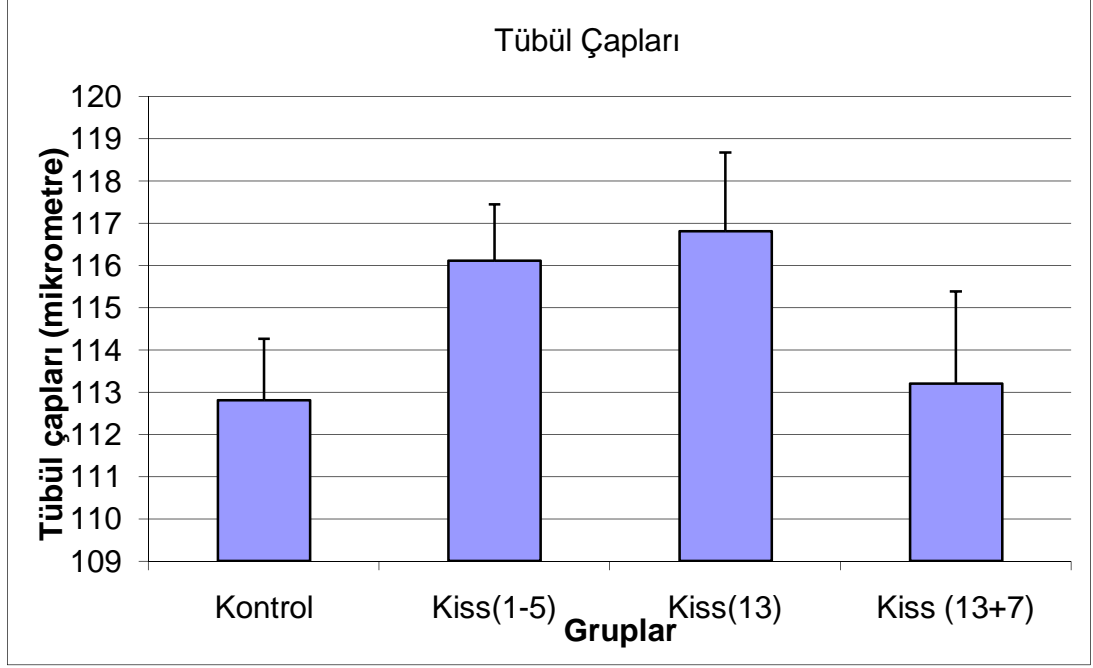
Gonadosomatik İndeks yüzdesi (GSI%) kullanılarak hesaplanan testis ağırlıklarında gruplar arasında anlamlı olarak bir farklılık gözlenmedi (Şekil 4.1.1).



Şekil 4.1.1: Gruplara ait testis ağırlıkları.

## 4.2. Tübul Çapları

Kiss (1-5) ve Kiss (13) gruplarında tübül çapları kontrollere göre daha geniş bulundu. Ancak, gruplar arasında tübül çapları karşılaştırıldığında bu fark anlamlı bulunmadı (Şekil 4.2.1).

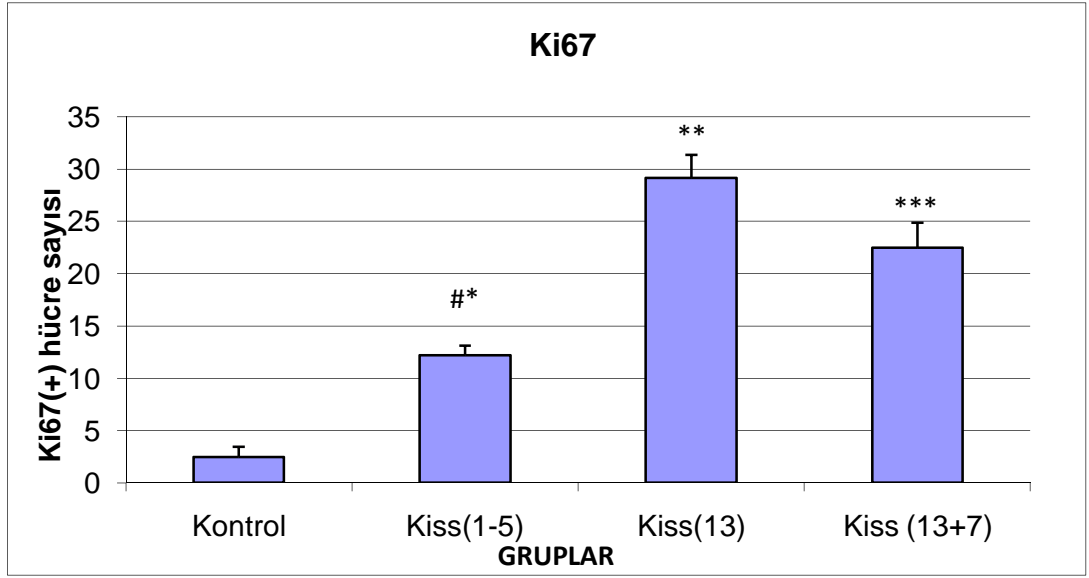


Şekil 4.2.1: Gruplara ait tübül çapları.

## 4.3. İmmün Boyama Bulguları

### 4.3.1. Ki-67 İmmün Boyaması

Kontrol gruplarında, seminifer tübül epitel hücrelerindeki mitotik aktiviteyi göstermek için uygulanan Ki-67 immün boyanmasının az sayıda hücrede olduğu görüldü. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında akut dönem ve kronik dönem gruplarında boyanmış hücre sayısı istatistiksel olarak artmıştı (Şekil 4.3.1.1). Kiss (1-5) grubu ve kontrol grubuna göre de, Ki-67 (+) hücre sayısı Kiss (13) grubunda anlamlı olarak artış gösterdi ( $p < 0.001$ ). Boyanan hücreler en fazla Kiss (13) grubunda tespit edildi. Onüç gün kisspeptin uygulanıp 7 gün bekletilen grupta boyanan hücre sayısı, kontrol ve Kiss (1-5) grubuna göre anlamlı artış (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ) gösterirken, Kiss (13) grubuna göre azalmıştı. Ancak Kiss (13) grubu ile Kiss (13+7) grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.3.1.1). Gruplarda, Leydig hücrelerinde immün boyanma saptanmadı.

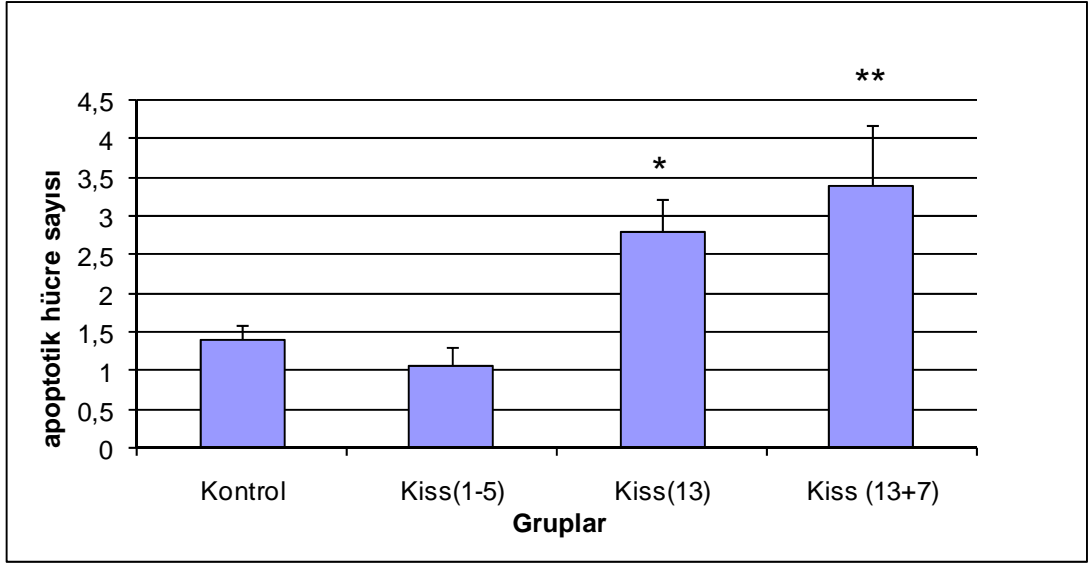


Şekil 4.3.1.1: Ki-67 (+) boyanan hücrelerin gruplara göre dağılımı.

- \* Kontrol ile Kiss (1-5) grubu karşılaştırıldığında  $p < 0.001$ ,
- \*\* Kontrol ile Kiss (13) grubu karşılaştırıldığında  $p < 0.001$ ,
- \*\*\* Kontrol ile Kiss (13+7) grubu karşılaştırıldığında  $p < 0.001$ ,
- # Kiss(1-5) ile Kiss (13) ve grubu karşılaştırıldığında  $p < 0.001$ .
- # Kiss (1-5) ile Kiss (13+7) grubu karşılaştırıldığında  $p < 0.01$ ,

#### 4.3.2. TUNEL İmmun Boyaması

Seminifer tübüllerdeki apoptotik hücreleri tanımlamak için TUNEL boyaması yapıldı. Tüm gruplarda TUNEL (+) boyanan spermatogenetik hücreler tanımlandı. Kontrol grubuna göre Kiss (1-5) grubunda TUNEL (+) hücre sayısının azaldığı ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. Kiss 13 ve Kiss 13+7 gruplarındaki TUNEL (+) boyanan apoptotik hücreler, kontrol grubuna ( $p < 0.05$ ) ve Kiss (1-5) grubuna ( $p < 0.001$ ) göre anlamlı olarak artmıştı (Şekil 4.3.2.1). Leydig ve sertoli hücrelerinde TUNEL (+) boyanma görülmedi.

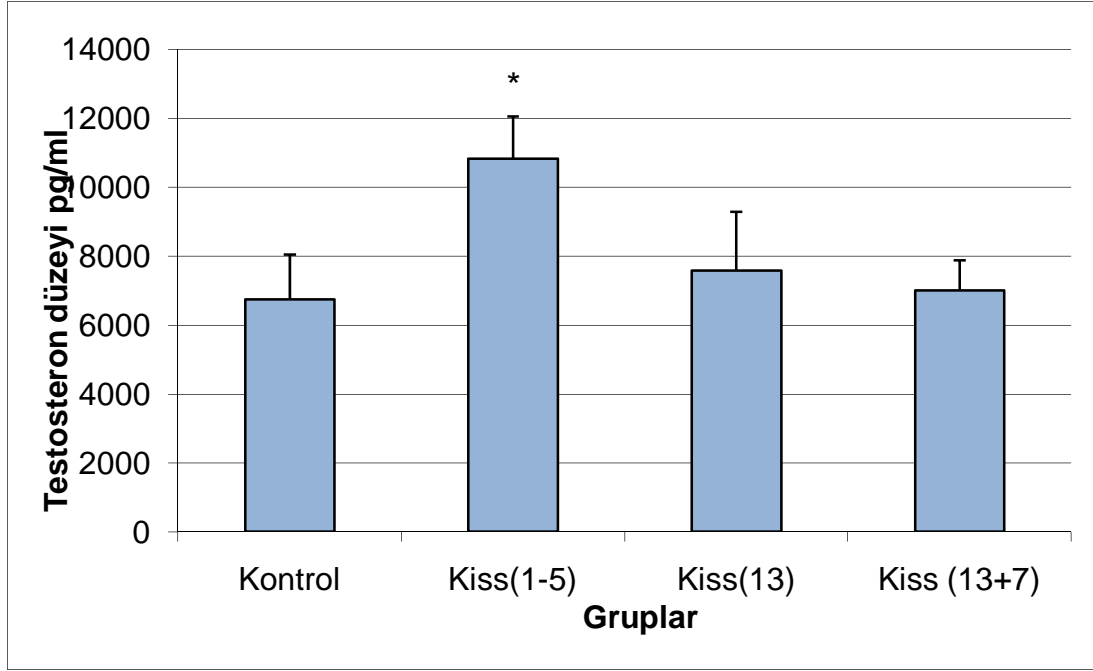


Şekil 4.3.2.1: TUNEL (+) boyanan hücrelerin gruplara göre dağılımı.

- \* Kontrol ile Kiss (13) grubu karşılaştırıldığında  $p < 0.05$ ,
- \*\* Kontrol ile Kiss (13+7) grubu karşılaştırıldığında  $p < 0.05$ ,
- \* Kiss (1-5) ile Kiss (13) grubu karşılaştırıldığında  $p < 0.001$ ,
- \*\* Kiss (1-5) ile Kiss (13+7) grubu karşılaştırıldığında  $p < 0.001$ ,

#### 4.4. Biyokimyasal Bulgular

Deney süreleri sonunda alınan kan örneklerinden elde edilen serumlarda testosteron düzeyleri ELISA yöntemi ile değerlendirildi. Elde edilen değerler Şekil 4.4.1'de gösterilmektedir.



Şekil 4.4.1: Serum testosteron düzeylerinin gruplara göre dağılımı.

\* Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında  $p < 0.03$ ,

1-5 gün kisspeptin uygulamasının serum testosteron seviyesinde, kontrol grubuna göre anlamlı ( $p < 0.03$ ) artışa neden olduğu görüldü. 13 gün kisspeptin uygulanan grupta ise serum testosteron düzeyi akut uygulamaya göre azalmıştı. Kiss (13+7) grubunda ise azalma devam etmekteydi ancak kontrol değerlerine inmemişti.

#### 4.5. Işık Mikroskopik Bulgular

Hematoksilen eozin ile boyanmış kontrol grubuna ait testis dokularında herhangi bir yapısal bozukluk görülmedi (Şekil 4.5.1). Kiss (1), Kiss (5), Kiss (13) ve Kiss (13+7) grubunda seminifer tübüllerin genel olarak yapısı kontrol grubuna benzemektedir (Şekil 4.5.2, 4.5.3, 4.5.4, 4.5.5). Kiss (5) grubuna ait testislerde bazı seminifer tübül lümenlerinde hücresel dökülmeler dikkat çekti (Şekil 4.5.3). 13 gün kisspeptin uygulanıp, 7 gün beklenen grupta, bir sıçan testis dokusunda seminifer

tübüllerin bir bölümünün bozulmuş olduğu, spermatogenetik hücrelerin azaldığı, atrofik bir görünüm kazandığı görüldü (Şekil 4.5.6).

Masson Trikrom boyaması uygulanmış gruplara ait testis dokularında, seminifer tübüller arasında bağ dokusu artışı olmadığı, gruplarının birbirine benzediği görüldü. (Şekil 4.5.7, 4.5.8, 4.5.9, 4.5.10).

PAS boyaması uygulanmış gruplara ait testis dokularında seminifer tübüllerin bazal membran yapılarında bir bozulma ve kalınlaşmanın olmadığı, düzgün görüldüğü tespit edildi. Boyanma şiddeti benzemekteydi (Şekil 4.5.11, 4.5.12, 4.5.13, 4.5.14, 4.5.15).

Yarı ince kesitlerde, kontrol grubuna ait testis dokusunda Sertoli hücreleri, Leydig hücreleri, spermatogonyumlar, primer spermatositler, spermatidler, şekillenmekte olan akrozom başlığı ve spermiyumlar normal görünümde tanımlandı (Şekil 4.5.16). İntertisyel dokuda damarların çevresinde Leydig hücreleri yer almaktadır (Şekil 4.5.17). Kiss (1) grubunda özellikle seminifer tübüllerin arasında intertisyel dokunun belirgin olduğu gözlemlendi (Şekil 4.5.18). Bu grupta büyük büyütmelemlerde seminifer tübül bazal bölgesinde yer alan hücrelerde ve damarlar çevresinde yoğun bir şekilde yer alan Leydig hücrelerinde belirgin vakuolizasyon görüldü (Şekil 4.5.19, 4.5.20). Kiss (5) grubunda da Leydig hücreleri belirgindi (Şekil 4.5.21). Kiss (13) ve Kiss (13+7) grubunda Leydig hücrelerindeki vakuolizasyonun devam ettiği, bazı deneklerde artmış olduğu tespit edildi (Şekil 4.5.22, 4.5.23).

Ki-67 immün boyaması yapılan gruplarda seminifer tübüllerde değişik sayılarda boyanmış hücreler izlendi (Şekil 4.5.24, 4.5.25, 4.5.26, 4.5.27, 4.5.28, 4.5.29). Boyanan hücreler genellikle spermatogoniumlar olarak tespit edildi. Leydig hücrelerinde immün boyanma görülmedi. Mitotik aktivite en az kontrol grubunda en fazla Kiss (13) grubunda gözlemlendi. Kiss (5) grubunda bazı seminifer tübüllerde spermatogenetik hücre serisinde bozulma, dejenerasyon olduğu görüldü (Şekil 4.5.27).

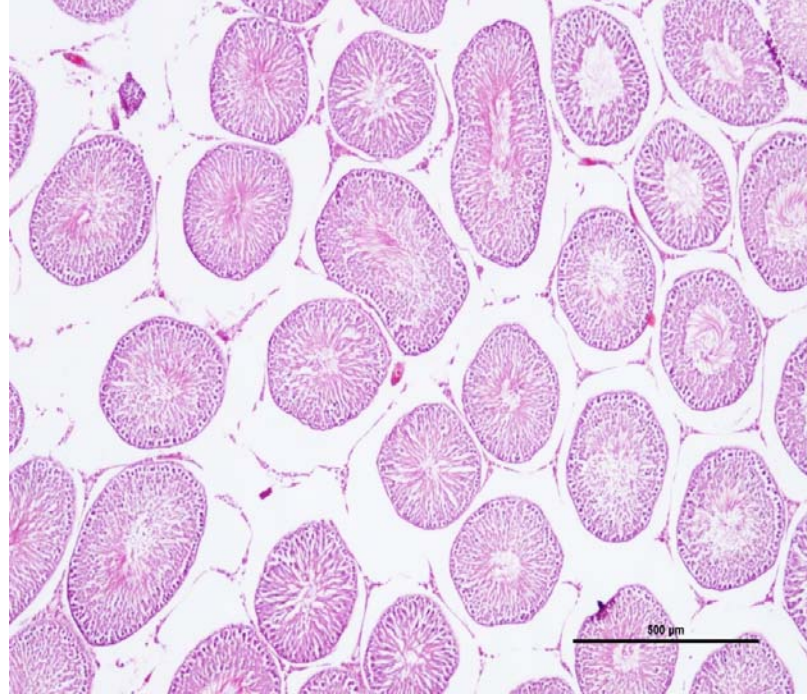
Apoptotik hücreleri belirlemek için yapılan TUNEL immün boyaması ile tüm gruplarda apoptotik hücre tespit edildi (Şekil 4.5.30, 4.5.31, 4.5.32, 4.5.33, 4.5.34). Gruplar arası anlamlı olarak farklılıklar gözlemlendi. Sertoli ve Leydig hücrelerinde TUNEL immün boyanması saptanmadı.

#### **4.6. İmmünflüerosan Mikroskopik Bulgular**

Kisspeptin-10 ve GPR54 immün işaretlemesi yapılan gruplara ait testis dokularında *Kiss* geni ve GPR54 (*Kiss1r*) gen ekspresyonu tespit edilmedi (Şekil 4.6.1, 4.6.2, 4.6.3).

#### **4.7. Elektron Mikroskopik Bulgular**

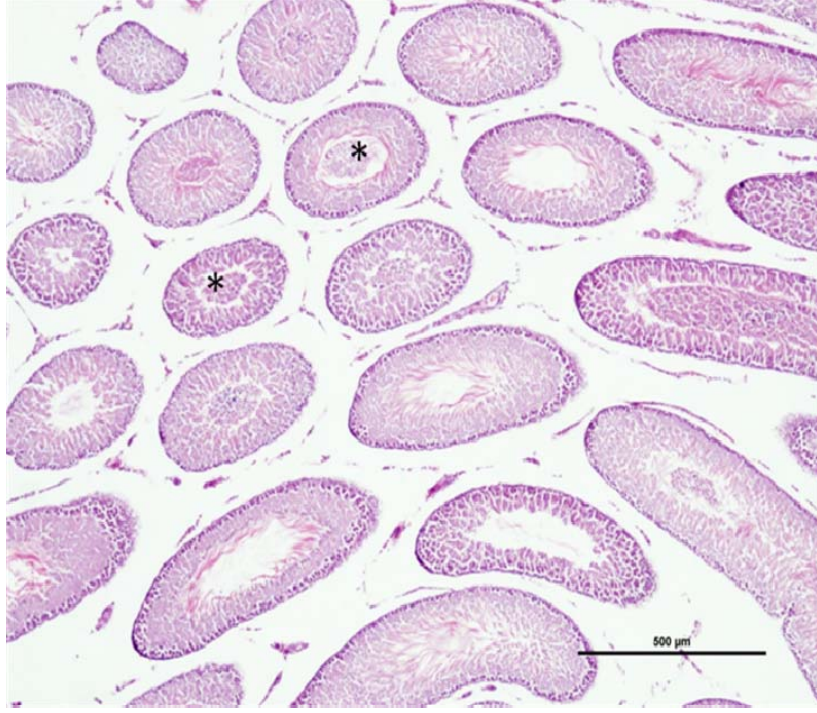
Kontrol grubuna ait ince kesitlerde seminifer tübül epitelinin bazal bölgesinde erken spermatogenik hücreler, Sertoli hücreleri, Spermatisitler, erken spermatidler, geç spermatidler normal görünümde saptandı (Şekil 4.7.1, 4.7.2). Kiss (1) grubuna ait seminifer tübül epitelinde, bazal membran üzerinde apoptotik hücre, Sertoli hücre sitoplazmasında mitokondriyonların krista yapılarında erime (kristalizis) tespit edildi (Şekil 4.7.3). Kiss (5) grubunda, spermatik kord hücre serileri arasındaki bağlantı birimlerinde oluşan dejenerasyon sonucu spermatogenetik hücreler arasında açıklıklar izlendi (Şekil 4.7.4). Kiss (13) grubunda ise seminifer tübül epitelinin bazal bölgesinde apoptotik spermatogonyal hücreler gözlemlendi (Şekil 4.7.5). Kiss (13+7) grubunda bazalde yer alan bazı spermatogonyumların sitoplazmasında vakuolizasyon izlendi (Şekil 4.7.6). Kiss 13 ve 13+7 günlük gruplarda seminifer tübül yapılarında spermatogenetik hücreler arası açıklıklar daha az oranda tespit edildi. Sertoli ve Leydig hücrelerinde apoptozis gözlemlenmedi.



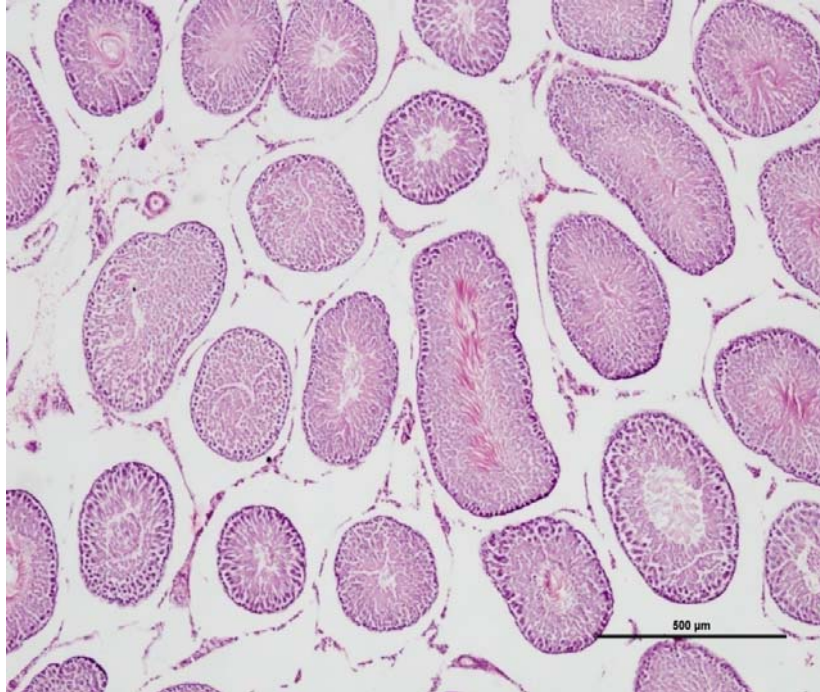
Şekil 4.5.1: Kontrol grubu testis dokusu görülmektedir. HE, bar: 500 µm.



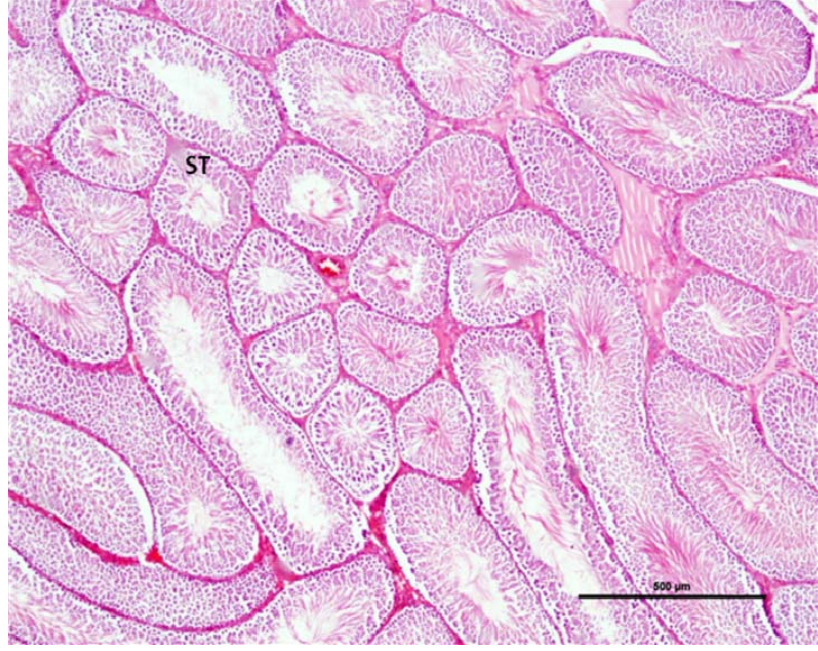
Şekil 4.5.2: Kiss (1) grubuna ait testis dokusu. HE, bar: 500 µm.



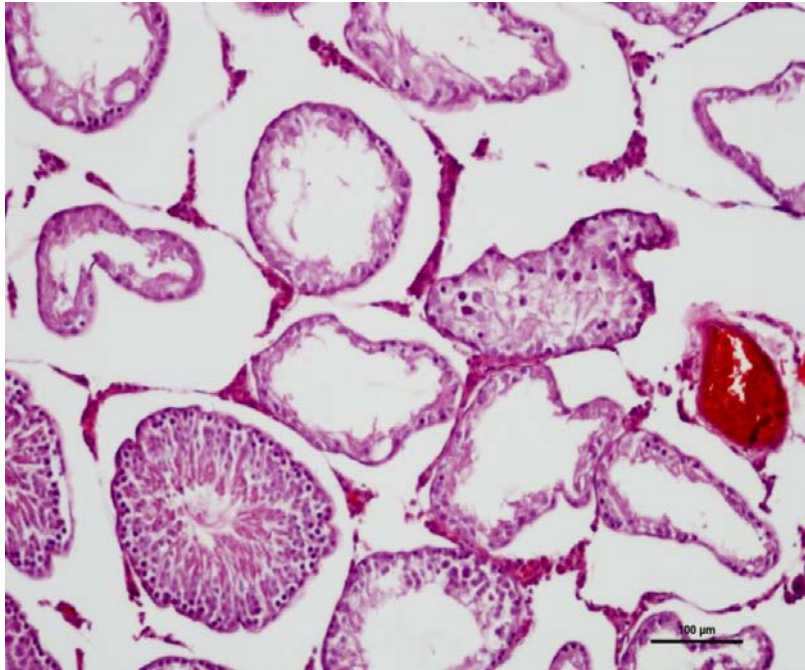
Şekil 4.5.3: Kiss (5) grubunda bazı seminifer tübül lümenlerinde dökülmüş hücre toplulukları (\*) görülmektedir. HE, bar: 500 µm.



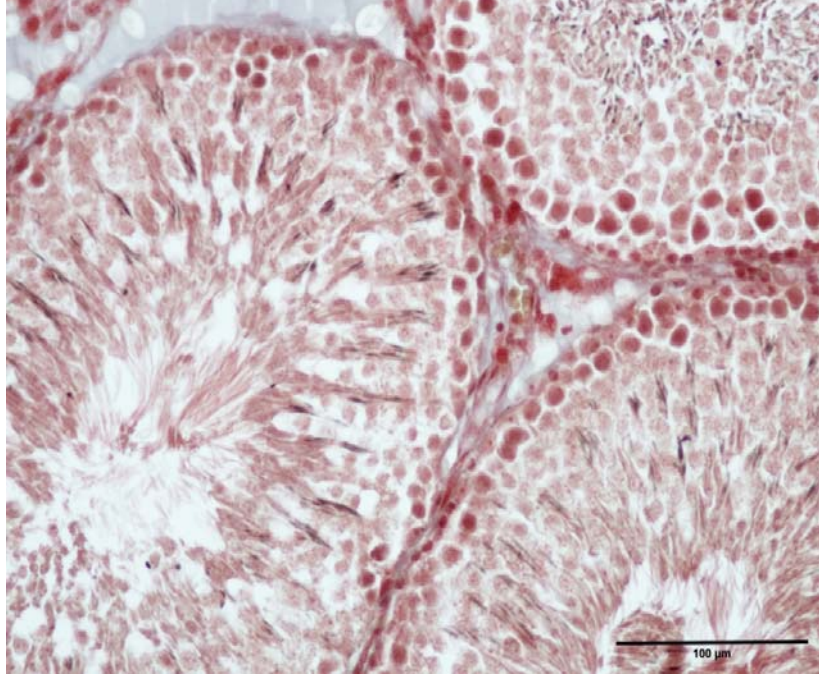
Şekil 4.5.4: Kiss (13) grubunda seminifer tübüller ve intertisyel doku görülmektedir. HE, bar: 500 µm.



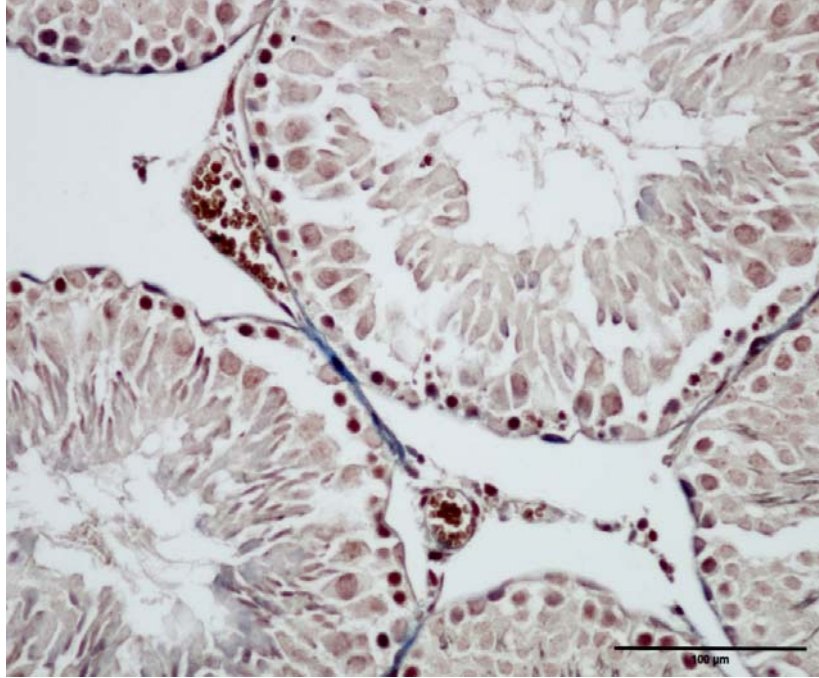
Şekil 4.5.5: Kiss (13+7) grubunda normal görünömlü seminifer tüböl yapıları (ST). HE, bar: 500 µm.



Şekil 4.5.6: Kiss (13+7) grubunda bir deneğın testis dokusunda çok sayıda seminifer tüböl yapısının bozulmuş olduğu, spermatogenetik hücrelerin azaldığı, atrofik bir görünüm kazandığı görölmektedir. HE, bar: 100 µm.



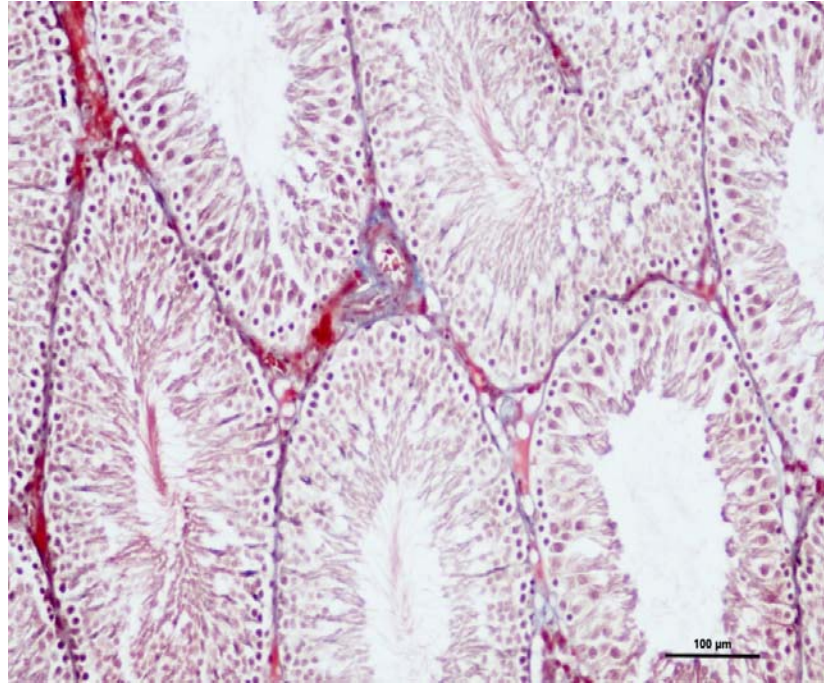
Şekil 4.5.7: Kontrol grubu testis dokusunun Masson trikrom boyaması görülmektedir, bar: 100 µm.



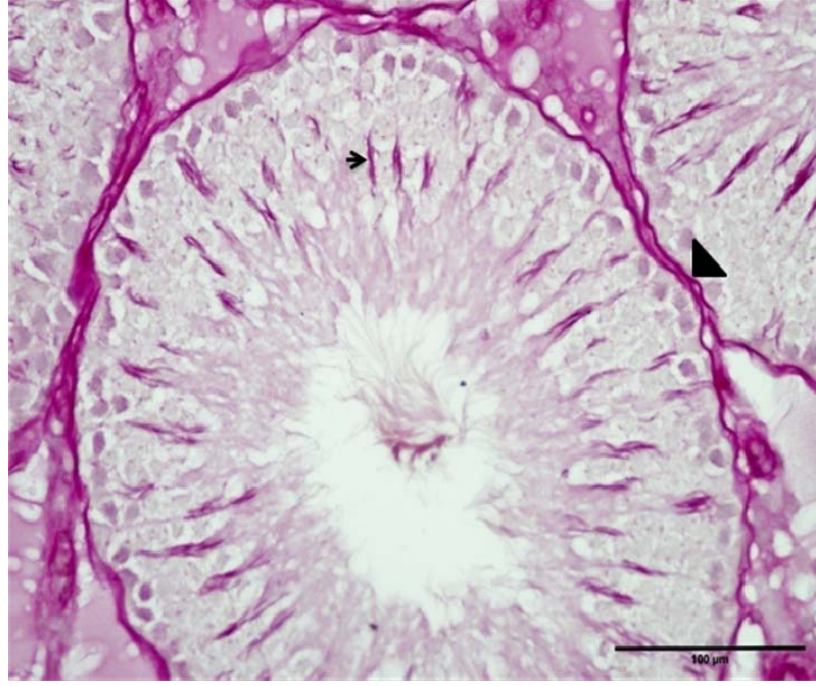
Şekil 4.5.8: Kiss (1) grubunda ara bağ dokusunun kontrol grubuna benzediği görülmektedir. Masson Trikrom boyaması, bar: 100 µm.



Şekil 4.5.9: Kiss (13) grubuna ait testis dokusunun Masson Trikröm boyaması görülmektedir, bar: 100  $\mu\text{m}$ .



Şekil 4.5.10: Kiss (13+7) grubuna ait testis dokusunda Masson Trikröm boyamasının diğer gruplara benzediği görülmektedir, bar: 100  $\mu\text{m}$ .



Şekil 4.5.11: Kontrol grubuna ait seminifer tübüllerin bazal mambranları (▲) düzgün görünümündedir ve sperm akrozom başlıkları (→) belirgindir. PAS (+) boyaması, bar: 100 µm.



Şekil 4.5.12: Kiss (1) grubuna ait testis dokusunda bazal membran yapılarının kontrol grubuna benzediği görülmektedir. PAS (+) boyaması, bar: 100 µm.



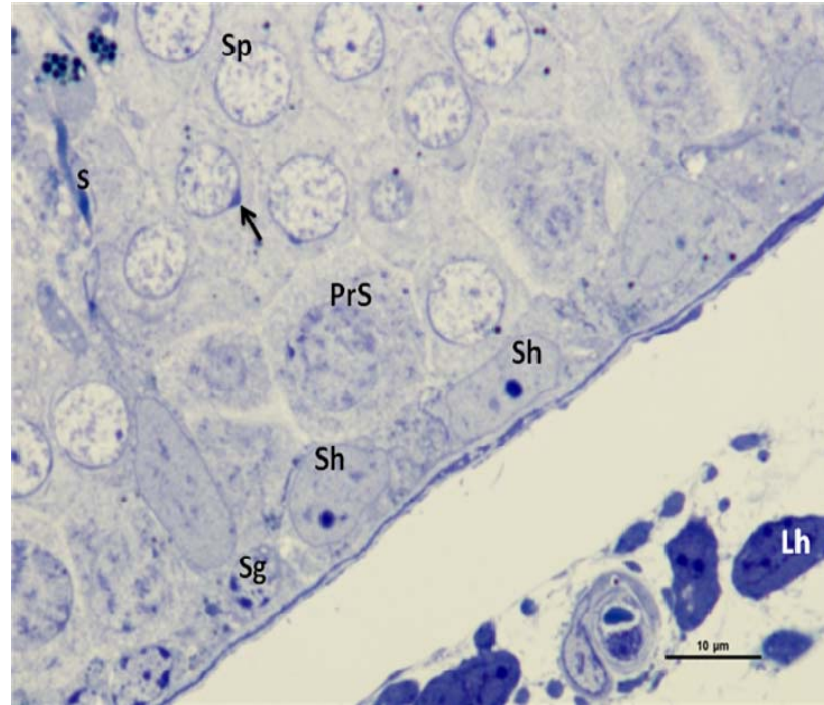
Şekil 4.5.13: Kiss (5) grubunda seminifer tübül bazal membran yapılarının bozulmadığı görülmektedir. PAS (+) boyaması, bar: 100 µm.



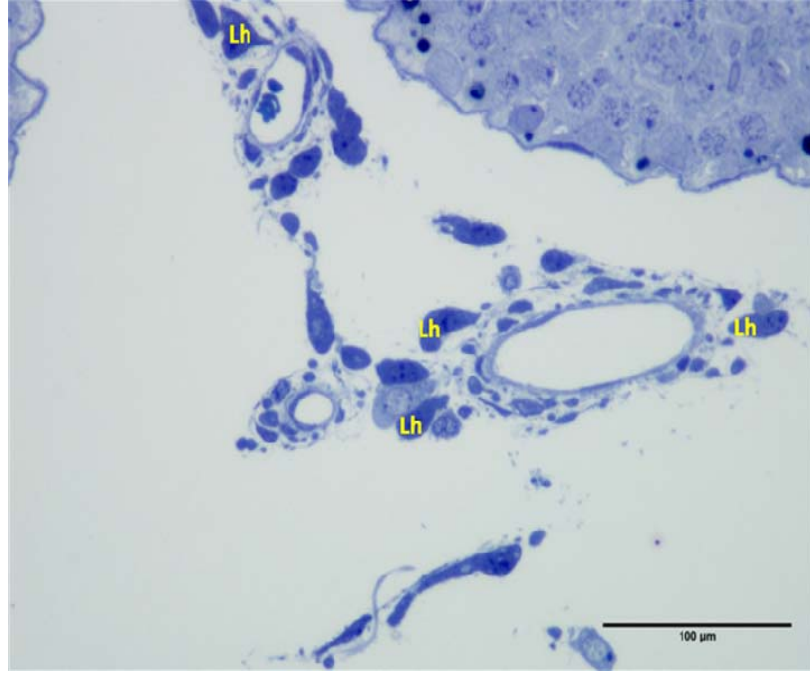
Şekil 4.5.14: Kiss (13) grubuna ait testis dokularında seminifer tübül çevresindeki bazal membran (←) sınırları düzgün ve belirgindir, tübüller arasındaki bağ doku sıvısı (\*)görülmektedir. PAS (+) boyaması, bar: 100 µm.



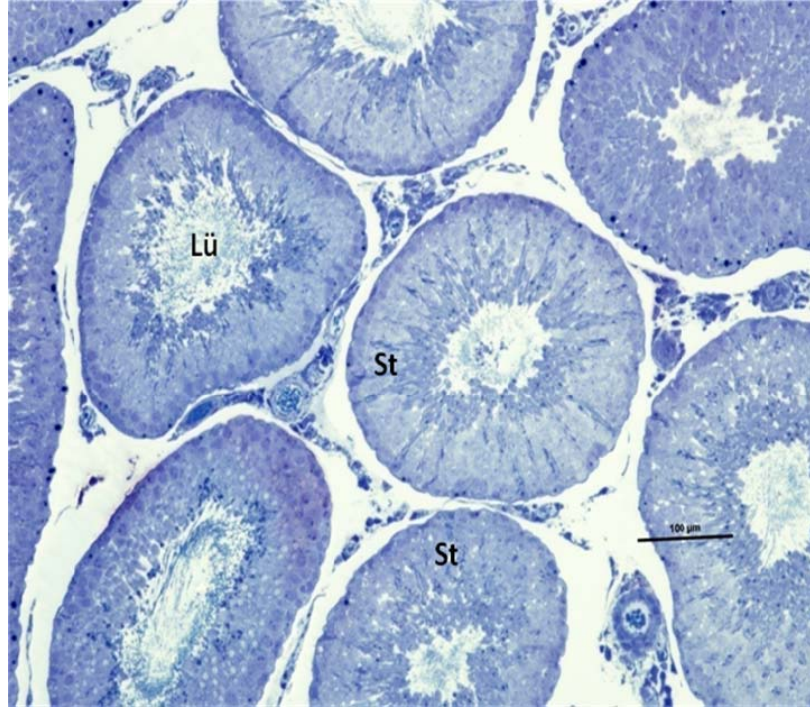
Şekil 4.5.15: Kiss (13+7) grubuna ait testis dokularında PAS (+) boyamasının diğer gruplara benzediği görülmektedir, bar: 100 μm.



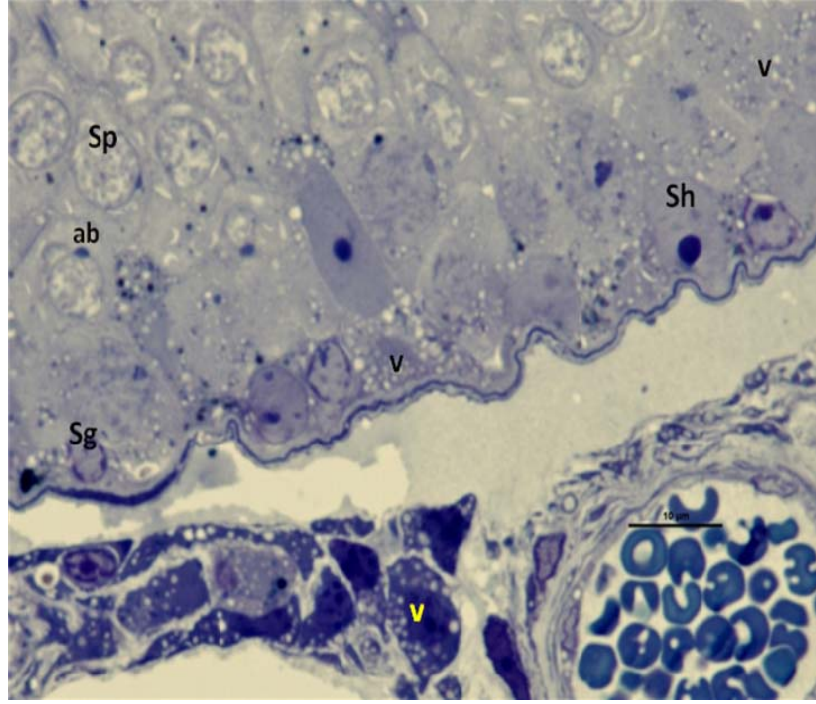
Şekil 4.5.16: Kontrol grubuna ait testis dokusunun yarı ince kesiti. Normal görümlü Sertoli hücreleri (Sh), Leydig hücreleri (Lh) , spermatogonyumlar (Sg), primer spermatositler(PrS), spermatidler(Sp), şekillenmekte olan akrozom başlığı (←) ve spermiumlar (s) görülmektedir. Toluidine blue, bar: 10 μm.



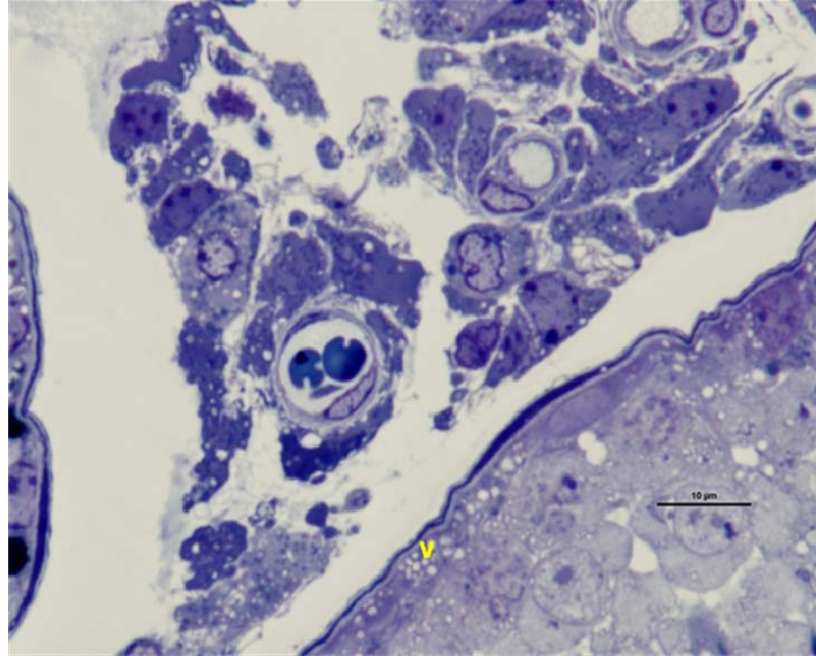
Şekil 4.5.17: Kontrol grubunda intertisyel dokuda damarların çevresinde yer alan Leydig hücreleri (Lh) görülmektedir. Toluidin mavisi, bar: 100 µm.



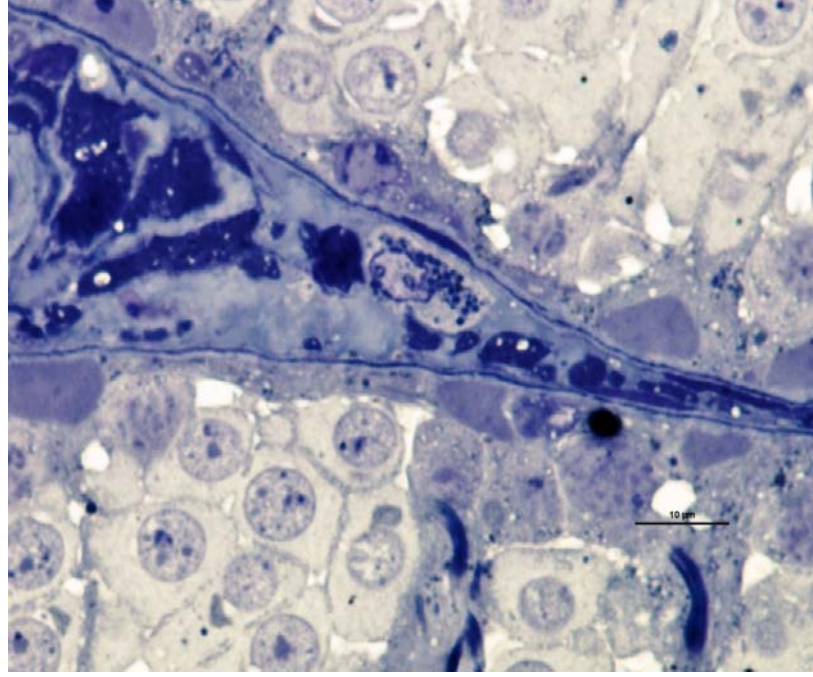
Şekil 4.5.18: Kiss (1) grubunda seminifer tübüller (St) ve belirgin intertisyel doku görülmektedir. Lümen (Lü). Toluidine mavisi, bar: 100 µm.



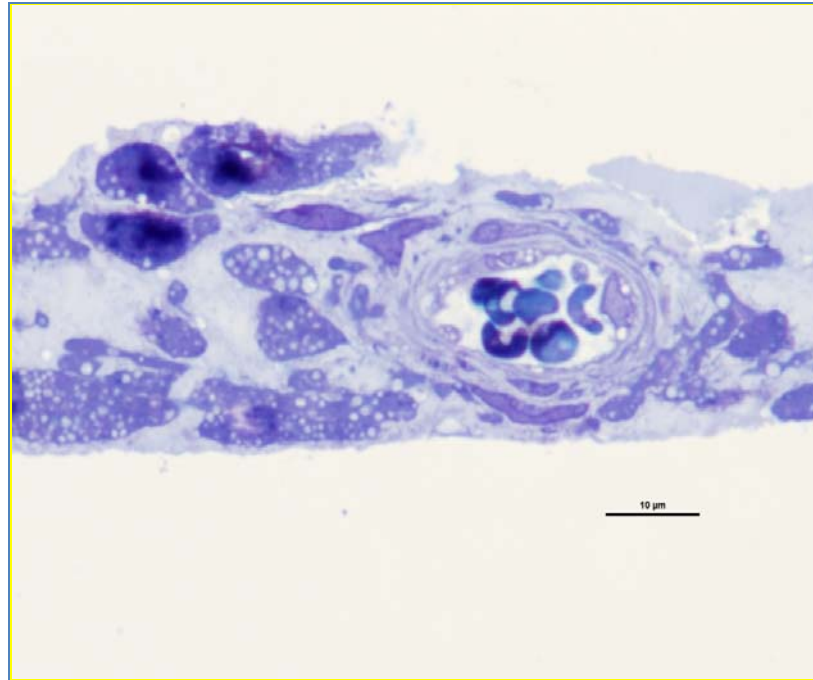
Şekil 4.5.19: Kiss (1) grubunda Sertoli hücreleri (Sh), spermatogonyumlar (Sg) ve spermatid hücreleri (Sp) görülmektedir. Özellikle seminifer tübül bazal bölgede yer alan hücrelerde ve Leydig hücrelerinde vakuolizasyon (V) izlenmektedir. ab: akrozom başlık. Toluidin mavisi, bar: 10 µm.



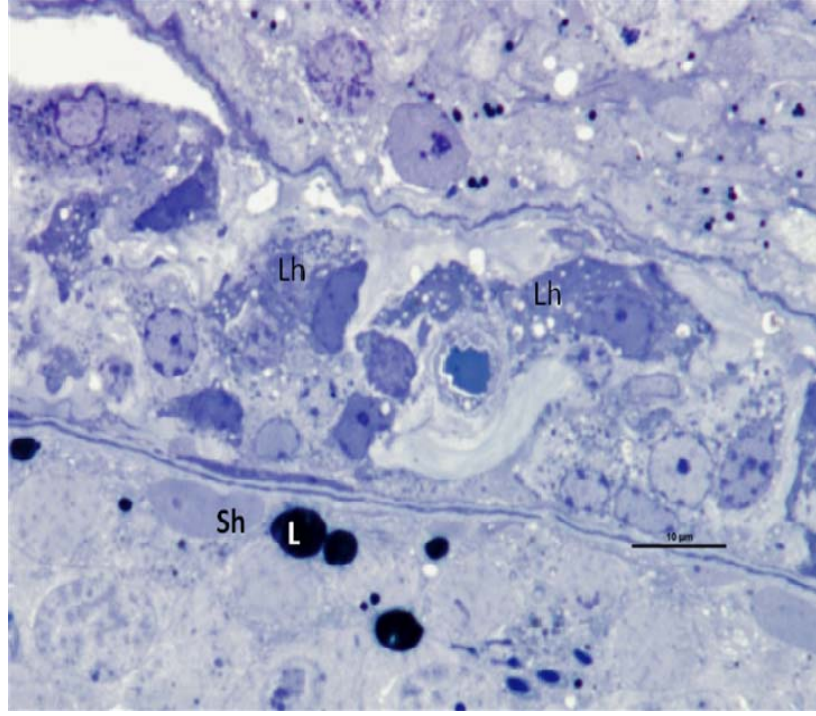
Şekil 4.5.20: Kiss (1) grubuna ait bir diğer görüntüde seminifer tübüllerdeki vakuolizasyonun (v) belirgin olarak seçildiği, damarlar çevresindeki yoğun Leydig hücrelerinin yer aldığı görülmektedir. Toluidin mavisi, bar: 10 µm.



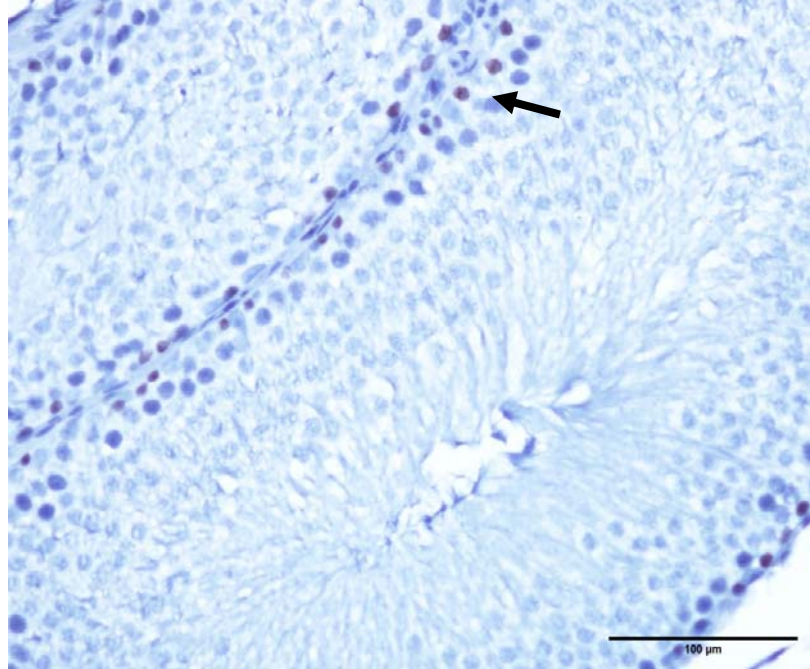
Şekil 4.5.21: Kiss(5) grubunda intertisyal dokuda Leydig hücreleri ve seminifer tübül içinde sertoli ve spermatogenetik hücreler ve aralarında açık alanlar görülmektedir. Toluidin mavisi, bar: 10 µm.



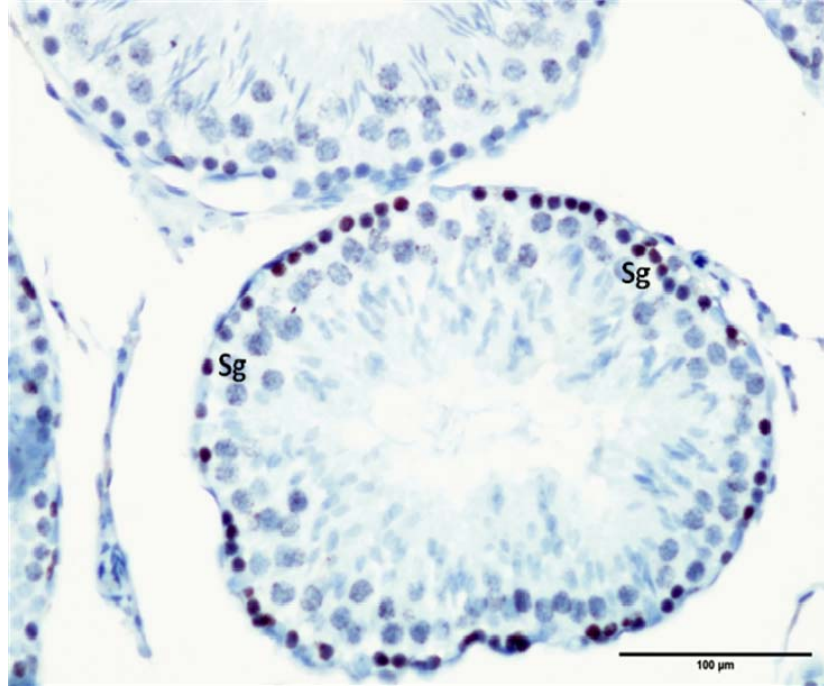
Şekil 4.5.22: Kiss (13) grubunda vakuolize Leydig hücreleri görülmektedir. Toluidin Mavisi, bar 10µm.



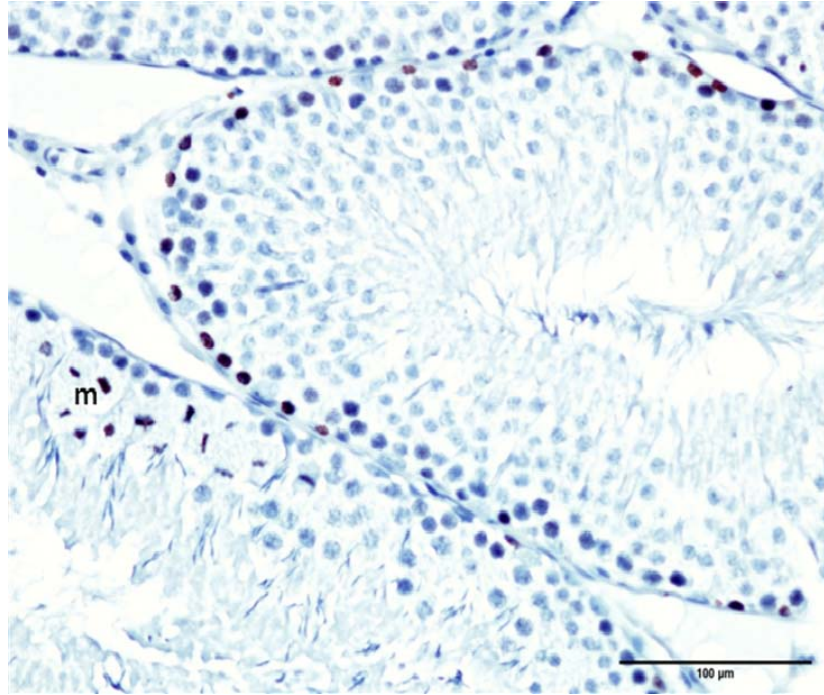
Şekil 4.5.23: Kiss (13+7) grubunda Leydig hücrelerindeki (Lh) vakuolizasyonun azalmış olduğu görülmektedir. Sertoli hücresi (Sh), lipid damlacığı (L). Toluidin mavisi, bar: 10 µm.



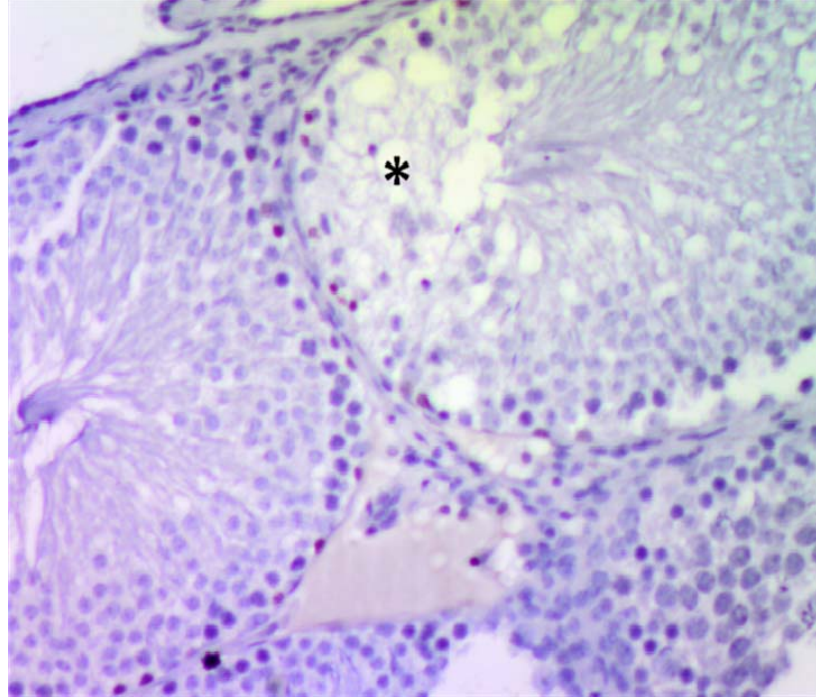
Şekil 4.5.24: Kontrol grubunda seminifer tübüllerde diğer gruplara göre az sayıda Ki-67 (+) boyanmış hücre (←) görülmektedir. Ki-67 immun boyaması, bar: 100µm.



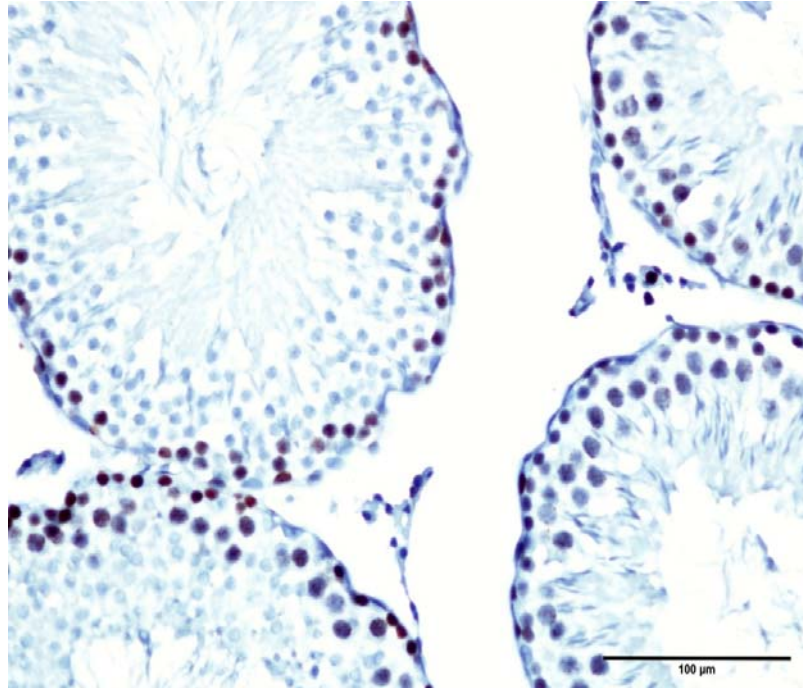
Şekil 4.5.25: Kiss (1) grubunda Ki-67 (+) boyanan spermatogonyum hücrelerinin (Sg) kontrol grubuna göre artmış olduğu görülmektedir. Ki-67 immün boyaması, bar: 100 µm.



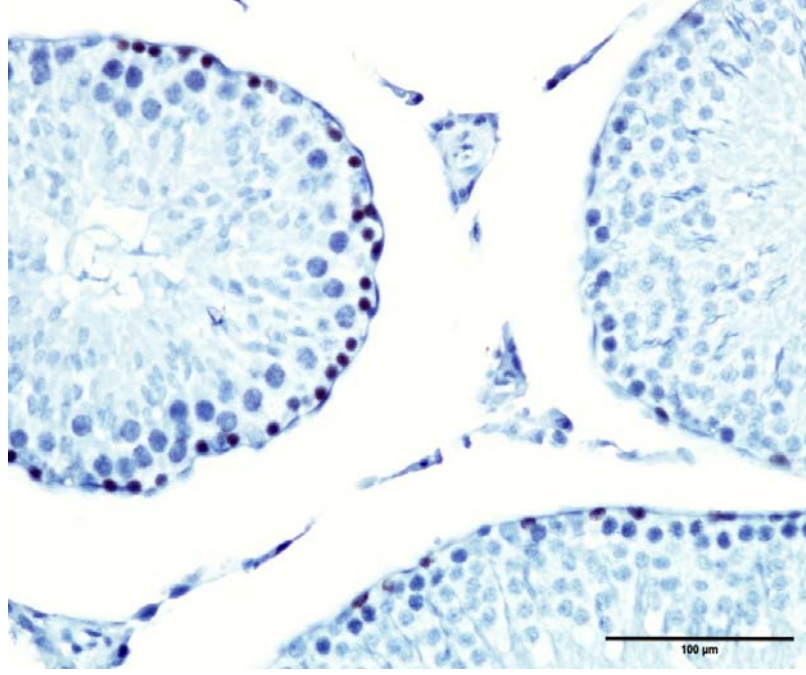
Şekil 4.5.26: Kiss (5) grubuna ait Ki-67 immün boyanmasının Kiss(1) grubuna benzediği görülmektedir. Mitotik figür (m), bar: 100 µm.



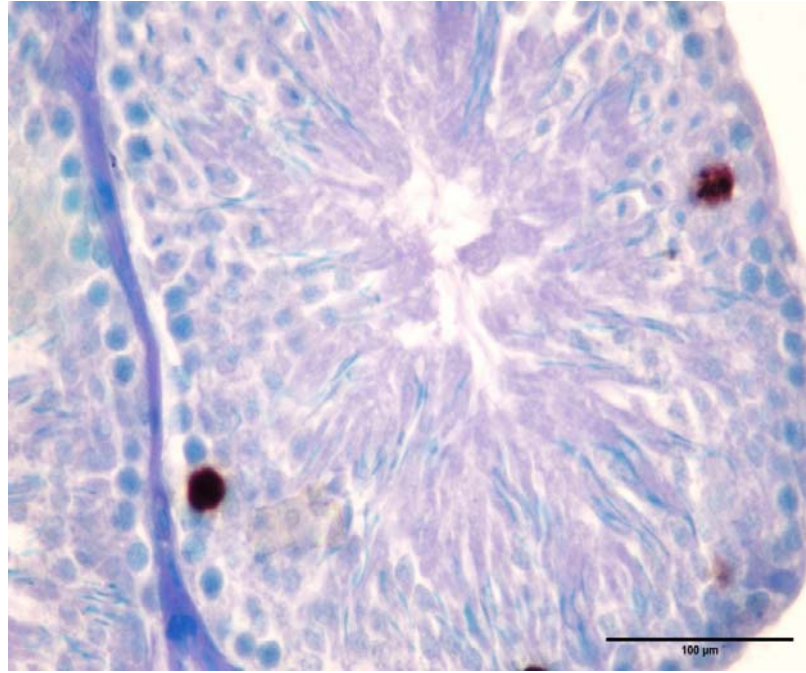
Şekil 4.5.27: Kiss (5) grubunda bazı seminifer tübüllerde spermatogenetik hücre serisinde fokal bozulmalar (\*) görülmektedir. Ki-67 İmmun Boyaması, 10X.



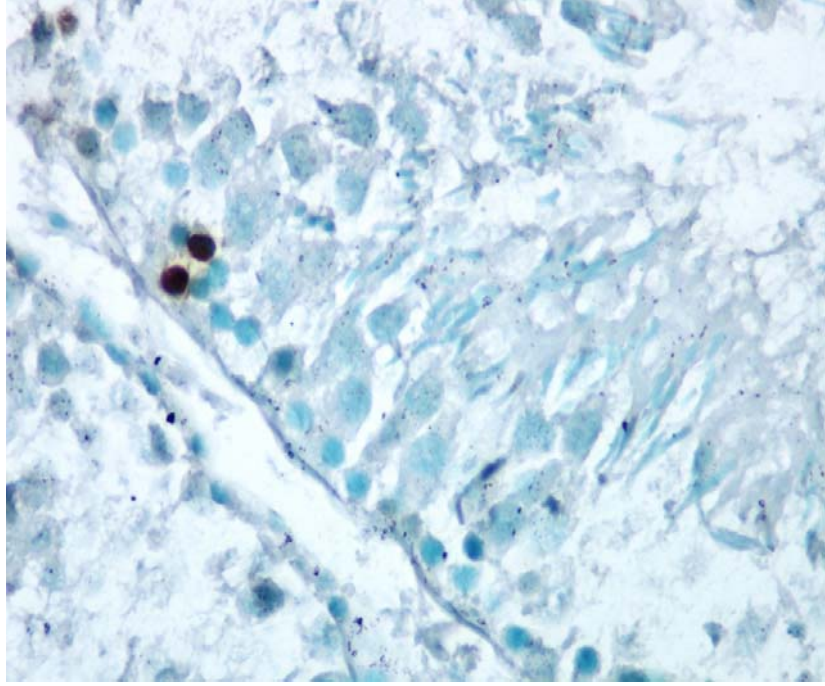
Şekil 4.5.28: Kiss(13) grubunda seminifer tübül hücrelerindeki Ki-67 (+) boyanan hücrelerin Kiss(1) ve Kiss(5) grubunda artmış olduğu görülmektedir, bar: 100 µm.



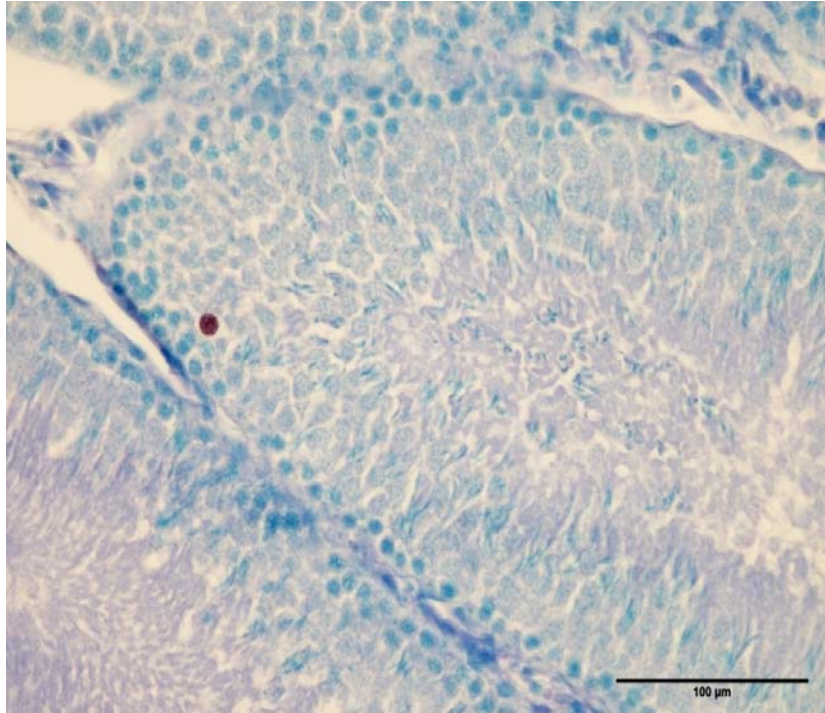
Şekil 4.5.29: Kiss (13+7) grubunda ise Ki-67 (+) boyanan hücrelerin Kiss (13) grubuna göre azalmış olduğu görülmektedir, bar: 100 µm.



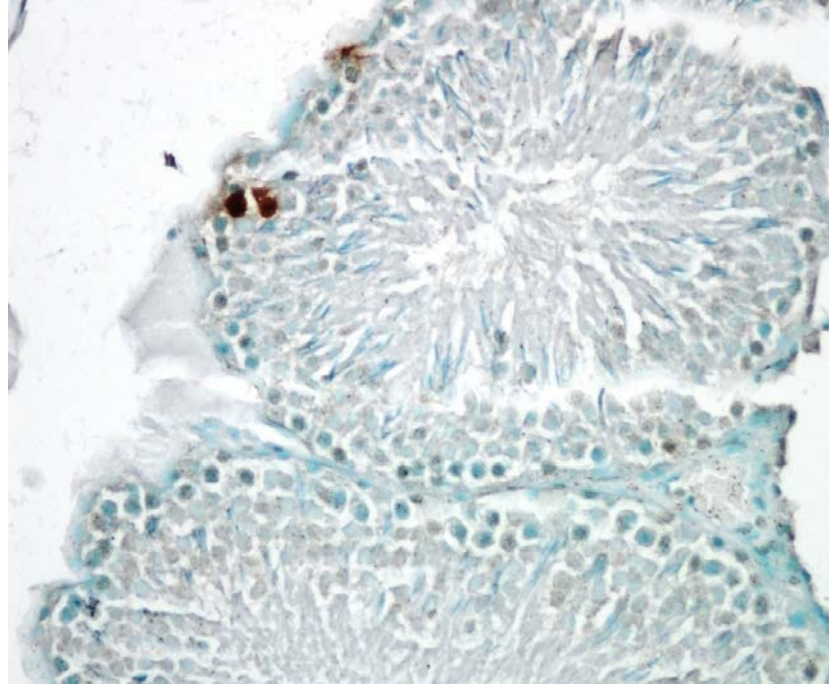
Şekil 4.5.30: Kontrol grubunda TUNEL (+) boyanan hücreler görülmektedir, bar: 100 µm.



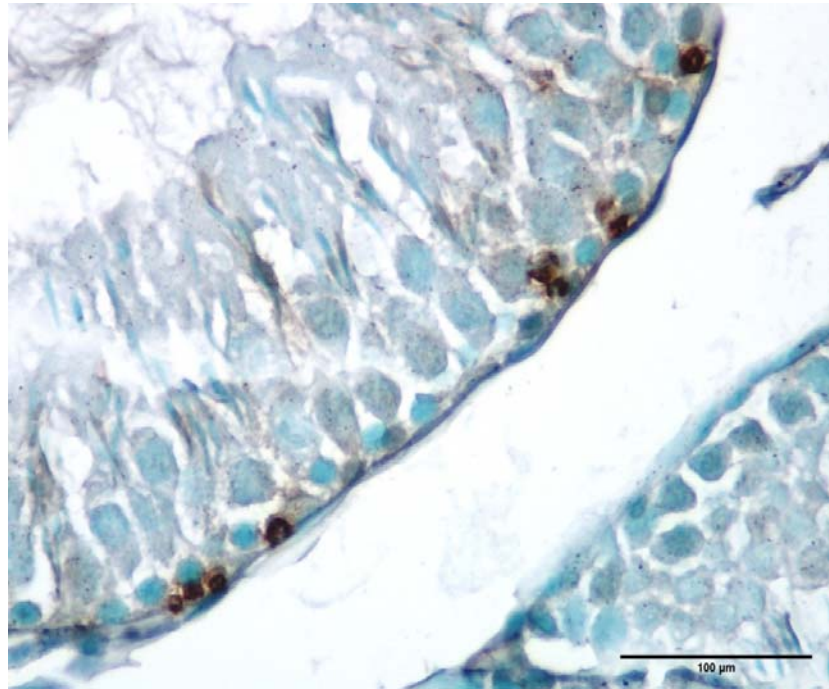
Şekil 4.5.31: Kiss (1) grubunda TUNEL (+) boyanmış hücreler görülmektedir, X40.



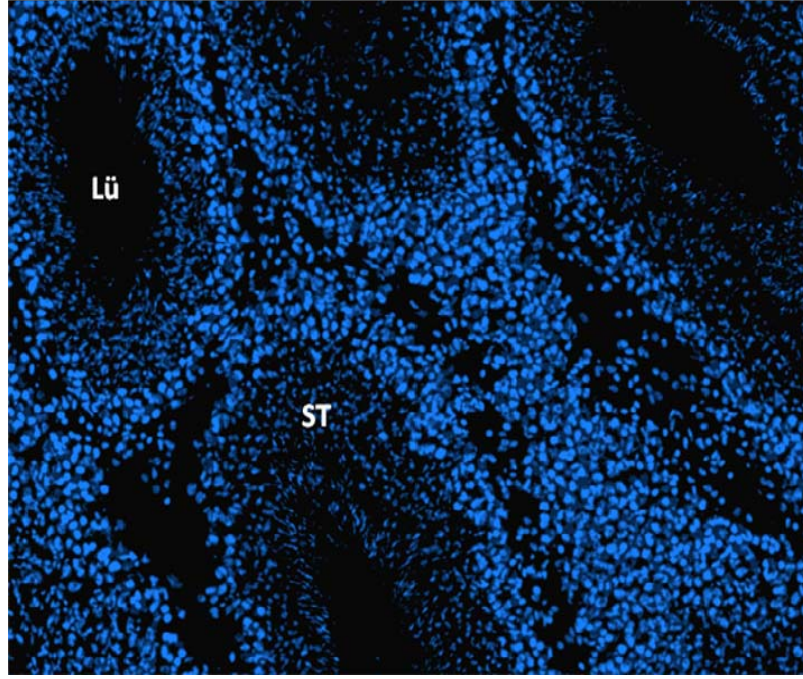
Şekil 4.5.32: Kiss (5) grubunda TUNEL (+) boyanmış hücre görülmektedir, bar: 100 µm.



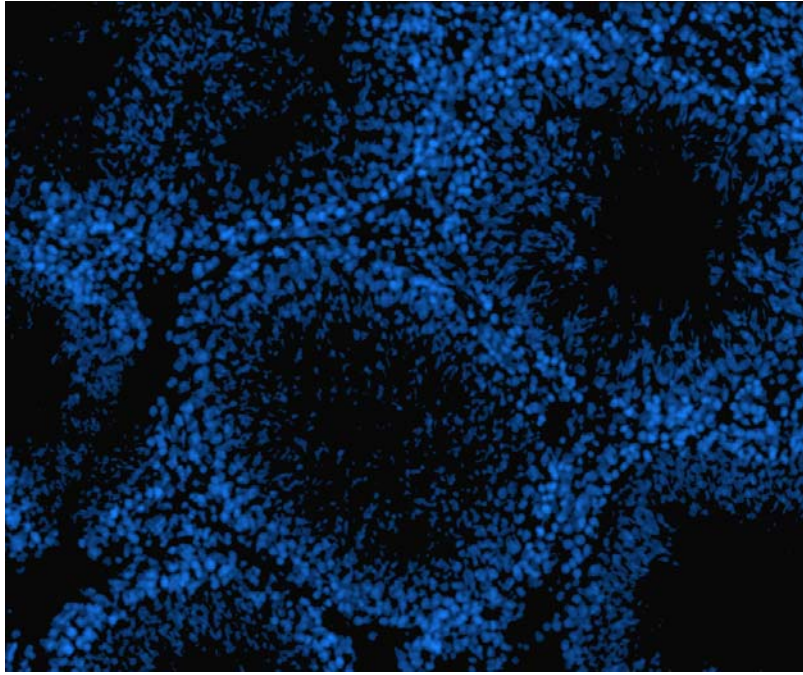
Şekil 4.5.33: Kiss (13) grubunda, TUNEL (+) boyanan hücreler görülmektedir, bar 100µm.



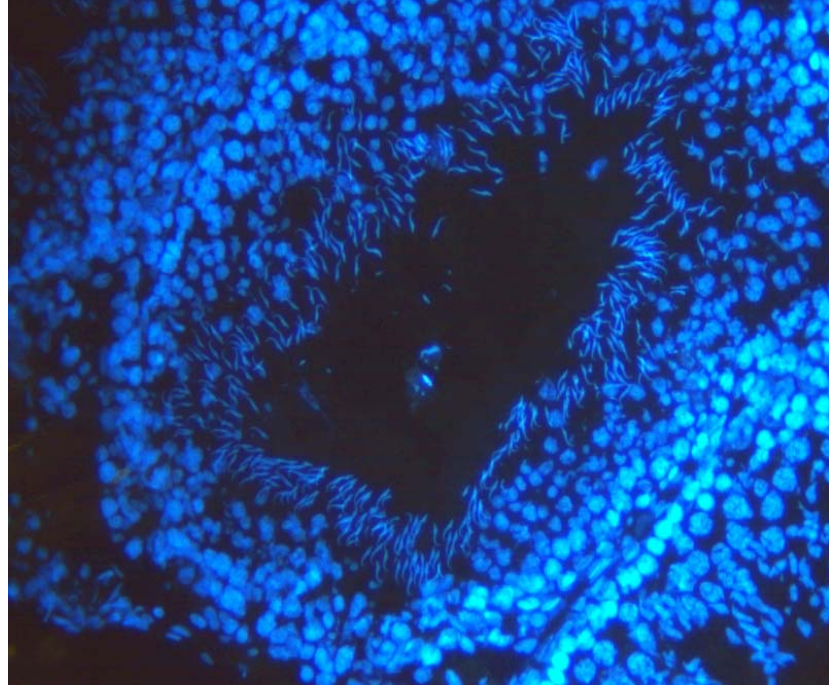
Şekil 4.5.34: Kiss (13+7) grubunda TUNEL (+) boyanmış hücreler görülmektedir, bar: 100 µm.



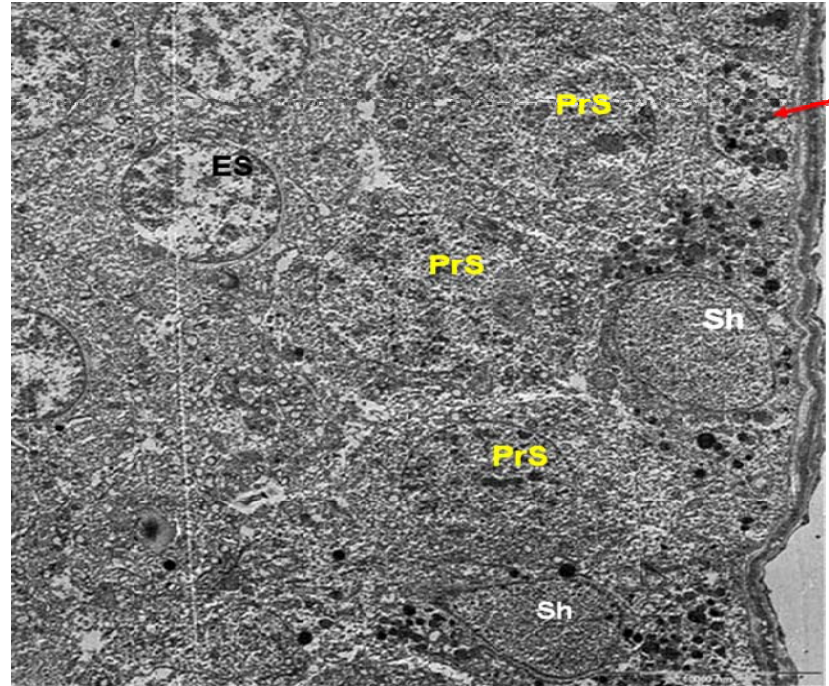
Şekil 4.6.1: Kontrol grubuna ait testis dokusunda seminifer tübül ve Leydig hücrelerinde Kisspeptin ekspresyonu görülmemektedir. 10X, DAPI.



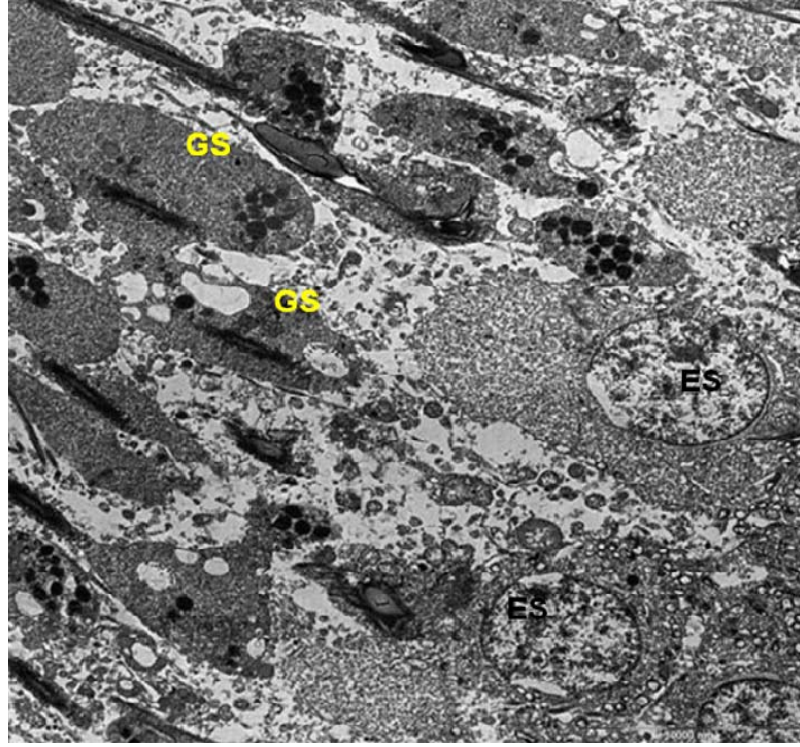
Şekil 4.6.2: Kiss (13) grubuna ait testis dokusunda seminifer tübül ve Leydig hücrelerinde Kisspeptin ekspresyonu görülmemektedir. 10X, DAPI.



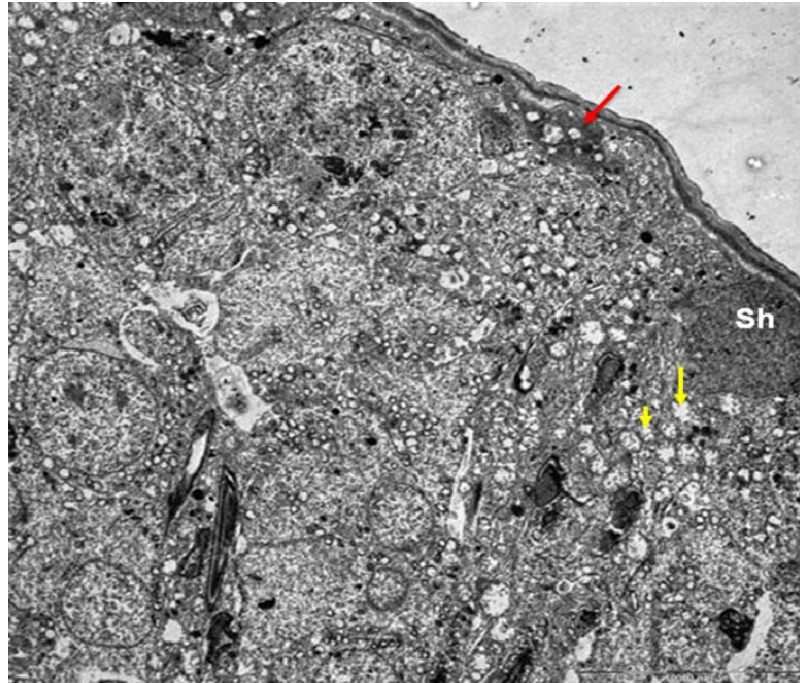
Şekil 4.6.3: Kiss (13) grubuna ait testis dokusundaki hücrelerde GPR54(Kiss-1r) ekspresyonu görülmemektedir. 20X, DAPI.



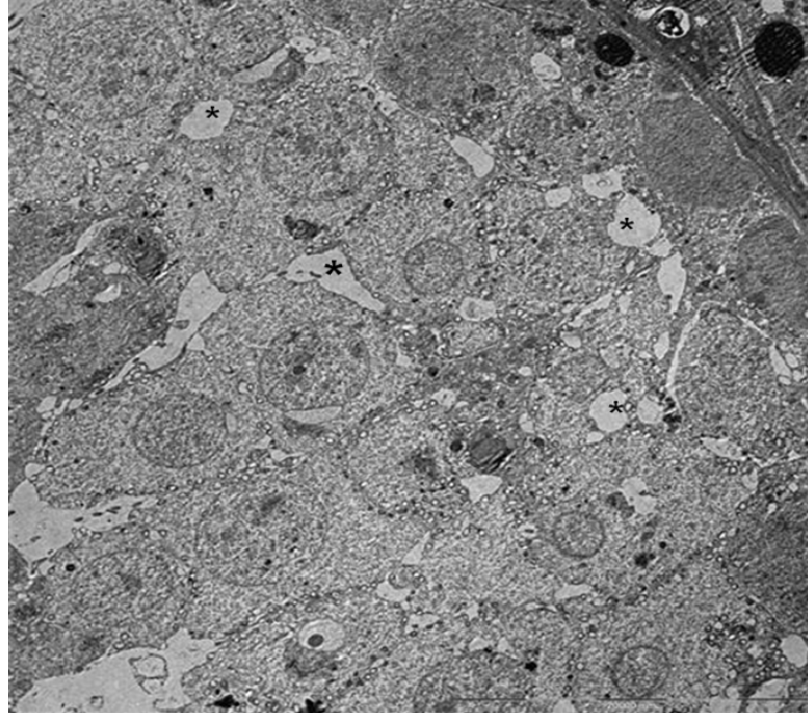
Şekil 4.7.1: Kontrol grubuna ait ince kesitlerde seminifer tübül epitelinin bazal bölgesinde erken spermatogenik hücre (kırmızı ok), Sertoli hücreleri (Sh), Primer Spermatositler (PrS), Erken Spermatidler (ES) normal görünümündedir.



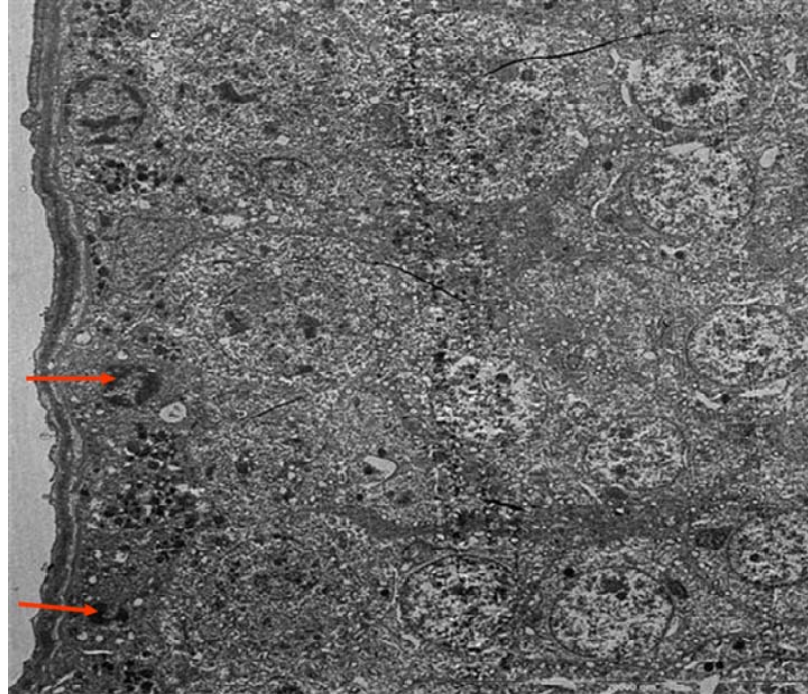
Şekil 4.7.2: Kontrol grubuna ait ince kesitlerde seminifer tübül epiteli, Erken Spermatidler (ES), Geç Spermatidler (GS) normal görünümündedir.



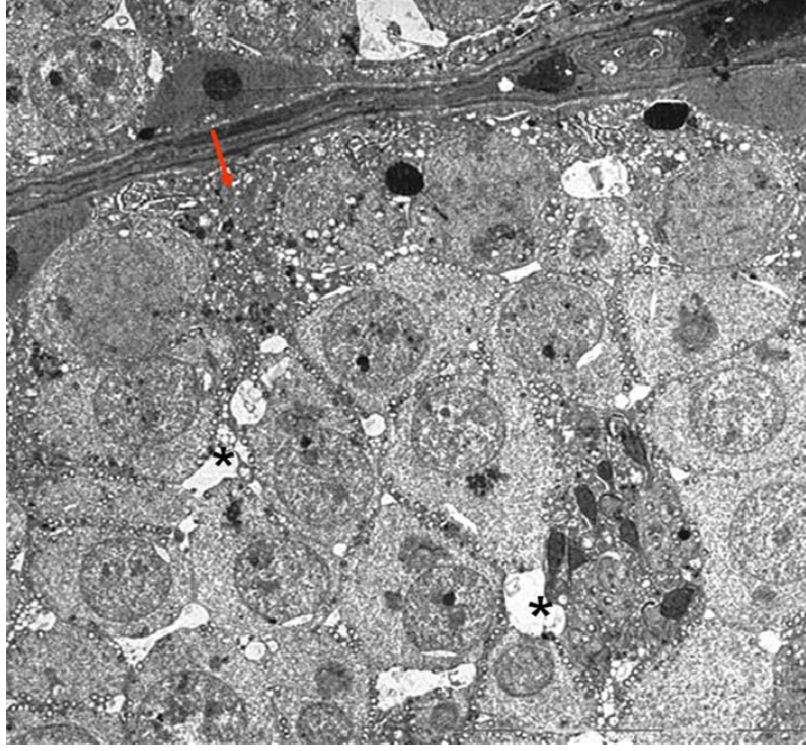
Şekil 4.7.3: Kiss (1) grubuna ait seminifer tübül epitelinde, bazal membran üzerinde apoptotik cisim (kırmızı ok), Sertoli hücrelerinde mitokondrial kristalizis (sarı ok) görülmektedir.



Şekil 4.7.4: Kiss (5) grubuna ait ince kesitlerde spermatik kord hücre serileri arasındaki bağlantı birimlerinde oluşan dejenerasyon sonucu adluminal kompartmanda dejeneratif açıklıklar (\*) görülmektedir.



Şekil 4.7.5: Kiss (13) grubuna ait ince kesitlerde bazal bölgede apoptotik spermatogonial hücreler (kırmızı oklar) görülmektedir.



Şekil 4.7.6: Kiss (13+7) grubunda bazalde yer alan bazı spermatogoniumların sitoplazmasında vakuolizasyon (kırmızı ok) görülürken, spermatogenetik hücreler arasındaki açıklıklar (\*) bulunmaktadır.

## 5. TARTIŞMA

Kisspeptin üreme ile ilgili bir peptid olup, pubertenin başlaması için moleküler bir düğme gibi davranır. Son birkaç yıldır, memelilerin üremesi üzerine kisspeptinin rolü yoğun olarak çalışılmaktadır. Kisspeptin üretimindeki değişiklikler anormal gonadal fonksiyonlara yol açar (Oakley ve ark., 2009). Bu bilgilerden yola çıkarak yapılan bu çalışmada, erişkin erkek sıçanlara akut ve kronik uygulanan kisspeptinin spermatogenezise, Leydig hücrelerine yapısal ve biyokimyasal etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Sıçanlara günde tek doz 50 nmol kisspeptin-10 (i.p.) uygulanan çalışma sonucunda, akut ve kronik dönemde kisspeptinin spermatogenezisi etkilediği görülmüştür. Çalışmamızda kisspeptin-10'u seçmemizin nedeni, reseptöre bağlanması ve aktivasyonu için gerekli olan minimum diziyi içermesidir (Kotani ve ark., 2001; Ohtaki ve ark., 2001).

Son zamanlarda kisspeptin, HPG aksının anahtar düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır. Kisspeptinlerin, intraserebral (i.c.), intraserebroventriküler (i.c.v.), intrahipotalamik (i.h.), sistemik intravenöz (i.v.), intraperitoneal (i.p.) ve subkutan (s.c.) gibi farklı yollarla verildiğinde LH salgılanmasında değişikliklere yol açmaktadır (Matsui ve ark., 2004; Navarro ve ark., 2004a, 2005; Patterson ve ark., 2006; Tovar ve ark., 2006; Mikkelsen ve ark., 2009). Santral ve periferik olarak uygulanan kisspeptinin akut etkilerinin keşfedilmesine rağmen, uzun süreli uygulamasının etkileri daha az araştırılmıştır. Erişkin erkek sıçanlara 13 gün süreyle deri altı uygulanan kisspeptin-54'ün (50 nmol/gün) testiküler dejenerasyona, dolaşımdaki inhibin B seviyesinin ve testis ağırlıklarının anlamlı olarak azalmasına yol açmıştır. Ayrıca plazmadaki total ve serbest testosteron seviyelerinin sınırdan olduğu gözlenmiştir. Daha kısa sürelerde kisspeptin-54 ün verilmesi sonucunda, plazma LH ve serbest testosteron seviyelerinde uygulamadan 1 gün sonra arttığı gösterilmiştir. Bu etki kisspeptin uygulamasından 2 gün sonra kaybolmuştur. Erişkin erkek sıçanlarda, 1 günlük kisspeptin-54 (50 nmol/gün) ün subkutan olarak uygulanmasının plazma LH ve testosteron seviyesine uyarıcı bir etki oluşturduğu gösterilmiş ve bu etki sürekli uygulamanın 2. gününde ortadan kalkmıştır. Bu da göstermektedir ki, kisspeptinin sürekli uygulanması bu uygulamaya cevap olarak HPG aksının desensitizasyonuna sebep olmuştur (Thompson ve ark., 2006).

Araştırmacılar, primatlarda kisspeptine karşı HPG aksının desensitizasyonunun hipotalamik GPR54'ün desensitizasyonu olduğunu öne sürmüşlerdir (Seminara ve ark., 2006). HPG aksı üzerinde Kisspeptin-10, -14, ve -54'ün akut etkileri konusunda yapılan çalışma sonucunda farklı biyoetkilerin ortaya çıktığı görülmüştür. *In vitro* ortamda, Kisspeptin-10, -14, ve -54'ün, Kiss reseptörü olan GPR54 ile etkileşiminin benzediği bildirilmiştir (Kotani ve ark., 2001). Ayrıca, kisspeptin-10 ya da kisspeptin-54'ün, *in vivo* olarak ventrikül içine uygulanmasıyla, gonadotropin salgılanmasının uyarılmasında benzer etkiye yol açtığı tespit edilmiştir (Gottsch ve ark., 2004). Kisspeptin-10 ve -14 gibi daha kısa formlarının, subkutan uygulanması sonucunda akut dönemde plazma LH seviyesini artırırken, kronik dönemde artışın anlamlı olmadığı, kisspeptin-14'ün plazma total testosteron seviyesini önemli ölçüde artırdığı saptanmıştır (Thompson ve ark., 2006). Bir başka çalışmada ise kisspeptinin testosteron seviyesini düşürdüğü, bu olayın LH salgılanmasındaki düşüşten daha çok testis dejenerasyonundan kaynaklı olabileceği Ramzan ve Qureshi (2011) tarafından öne sürülmüştür.

Bizim çalışmamızın sonucunda da daha kısa bir form olan kisspeptin-10'un, 1 ve 5 günlük uygulanması sonucunda serum testosteron düzeyinin arttığı, fakat kronik uygulama süresi sonunda bu etkinin azaldığı, 13 günlük uygulama sonrasında 7 gün uygulama yapmadan bekleyen grupta ise testosteron düzeyinin daha da azalarak kontrol değerlerine yaklaştığı saptanmıştır. Deney gruplarında Leydig hücrelerinde çok sayıda vakuolizasyon olması hücrede aktivasyonunun artışı olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlarımız, erişkin erkek sıçan kullanma ve testosteron seviyesinin 13 günlük sürede azalması açısından değerlendirildiğinde, erişkin erkek sıçanlara kronik olarak s.c. kisspeptin-54'ün (50 nmol/gün) 13 günlük uygulamasındaki Thompson ve arkadaşları (2006) nın sonuçlarına benzerdir.

Thompson ve ark., (2006) s.c. olarak kisspeptin-54 ün sürekli uygulanmasının kisspeptine karşı HPG aksında bir desensitizasyona sebep olmasına rağmen, dolaşımdaki gonadotropinlerin baskılanmasına neden olmadığını rapor etmişlerdir. Ramzan ve Qureshi ise puberte öncesi erkek sıçanlarda kisspeptinin sürekli verilmesi, FSH seviyesini değiştirmezken LH salgılanmasında azalmasına neden olduğu, bunun HPG aksının duyarlılığının azalması ile ilişkili olmadığı bildirilmiştir. Thompson ve ark. (2009) Kisspeptin-54' ün indüklediği testis dejenerasyonunun

gonadotropinler aracılığı ile olduğu hipotezini daha fazla desteklemek için, kisspeptin-54'ün (5 nmol) bir kez i.c.v. yüksek doz enjeksiyonunun testiküler dejenerasyona sebep olduğunu göstermişlerdir. Kisspeptin-54'ün bu dozu testosteron salınımı ve gonadotropinin maksimum stimülasyonu için gerekli olan dozdan daha yüksektir (Thompson ve ark., 2004; Navarro ve ark., 2005a,b; Patterson ve ark., 2006). Bundan dolayı, testisler üzerine kisspeptin-54 ün doğrudan etkisinden çok, kisspeptin-54' ün testiküler dejenerasyona santral yolla sebep olduğu gözükmektedir. Önceden uygulanan GnRH-R antagonistiyle, yüksek doz kisspeptin-54 uygulamasının ardından görülen HPG aksının aşırı uyarılmasının sonucu olan testiküler dejenerasyon tamamen önlenmiştir. Subkutan kisspeptin-54 uygulaması vaz deferens, prostat, epididimis bezlerinde dejeneratif değişikliklere neden olmamıştır (Thompson ve ark., 2009).

Bu çalışmada kullandığımız Kisspeptin-10'un intraperitonel olarak günde bir kez 50 nmol dozunda verilmesi sonucunda, akut ve kronik uygulamada, seminifer tübüllerde belirgin bir dejenerasyona yol açmamıştır. Gonadosomatik indeks yüzdesi (GSI %) olarak değerlendirilen testis ağırlığı ve seminifer tübül çaplarında da anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Akut dönem ve bekleme dönemine ait gruplarda birer denekte seminifer tübüllerin dejenere olduğu, spermatogenetik hücre serisinin bozulduğu, bazı tübüllerde çok belirgin atrofik değişikliklerin olduğu görülmüştür. Yarı ince kesitlerde seminifer tübüllerin bazal bölgesinde vakuolizasyon gözlenmiştir. Kisspeptinin dozu ve uygulama süresi, etkinin ortaya çıkmasında belirleyici olabileceğinden Kisspeptinin bu kısa formunun testis dejenerasyonuna sebep olup olmadığını anlayabilmek için santral yolla aynı dozda denenmesi ile karşılaştırma yapılabilir.

Ramzan ve Qureshi (2011), farklı dozlardaki kisspeptin-10' un testis dokusuna etkilerini elektron mikroskopik olarak inceleyerek, 10 pg kisspeptin uygulamasında, seminifer tübüllerde anormal spermatogonyumlar, pakiten spermatozoid ve spermatidleri tanımlamışlardır, fakat yapıyı kontrol testis morfolojisine yakın bulmuşlardır. 1 ng kisspeptin uygulandığında, seminifer tübüllerde çok fazla hücresel anormallikler olduğunu ve primer spermatozoidlerin sitoplazmasında geniş hücre içi boşlukların oluştuğu, bazal laminanın katlarının belirgin olmadığı ve kalınlaştığını saptamışlardır. Seminifer tübüllerin ve germ

hücrelerinin bütün yapılarında belirgin dejenerasyon olduğunu göstermişlerdir. Spermadlerde, parçalanmış ve katlanmış çekirdek zarları ve anormal akrozomal vezikülleri gözlenmiştir. Daha yüksek kisspeptin dozunda (1µg ) ise seminifer tübüllerdeki germinal hücrelerde dejeneratif değişiklikler ve çok fazla fokal spermatogenetik hücrelerinin olduğu, germ hücrelerinde şekil bozukluğu oluştuğunu, Sertoli hücreleri ile spermatogonyumlarda büyük sitoplazmik vakuolleşmelerin ve aşırı hücrel dejenerasyonun olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmanın ultrastrüktürel incelemelerinde ise, kontrol grubuna ait testis dokularındaki seminifer tübüllerinin tüm spermatogenik hücre serilerinin morfolojilerinin normal görünümde olduğu saptanmıştır. 1 günlük tek doz kisspeptin-10 uygulaması bazı sertoli hücrelerinde ve spermatogonyal hücrelerde mitokondrial kristalizise neden olmuştur. Ayrıca, bu grubun yarı ince kesitlerinde gözlemlenen sitoplazmik vakuollerin elektron mikroskobu ile mitokondrial kristalizisten kaynaklandığı belirlenmiştir. Yine bu grupta, seminifer tübül epitelindeki bazal membran üzerinde gözlenen apoptotik cisimler TUNEL yöntemiyle belirlenen DNA fragmentasyonlu hücreler ultrastrüktürel olarak tespit edilmiştir. 5 günlük kisspeptin-10 uygulaması adluminal kompartmanda yer alan spermatogenetik hücreler arasındaki bağlantı birimlerinde oluşan dejenerasyonlar iri ekstrasellüler vakuol görünümüne neden olmuş ve bu görünüm yarı ince kesitlerde söz edilen vakuolizasyonun dejeneratif açıklıklar olduğunu ortaya koymuştur. Kiss (13+7) grubunda ise bazı spermatogonyal hücrelerde vakuolizasyonu saptanmıştır. Sertoli hücrelerinde apoptozis görülmemiştir. Gruplarımızda spermatogenetik hücreler arasında yer yer açıklıklar, hücre sitoplazmalarında vakuolizasyon, mitokondrial kristalizis saptanmışsa da bu değişiklikler yaygın görülmemiştir.

Kisspeptin reseptörü olan GPR54 mRNA'nın testisteki kan damarlarında ekspresyonu araştırılmamıştır. Bir çalışma göstermiştir ki, kantitatif reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu ile insan testisinde kisspeptin mRNA tespit edilmiştir (Ohtaki ve ark., 2001), ancak sıçan testisinde tespit edilmemiştir (Terao ve ark., 2004). Kisspeptinler testislerde daha çok otokrin ve parakrin etki yapmaktadırlar. GPR54 ekspresyonu vaz deferens, prostat ve epididimiste görülmemiştir (Thompson ve ark., 2009). Bazı çalışmalarda testislerde GPR54'ün

eksprese edildiği ancak hangi hücrede olduğu tanımlanamamıştır (Kotani ve ark., 2001; Ohtaki ve ark., 2001; Funes ve ark., 2003; Terao ve ark., 2004).

Bu çalışmada kontrol ve deney grubu deneklerin immün flouresan yöntemiyle incelenen testis dokularında GPR54 ve Kisspeptin ekspresyonu gözlenememiştir.

Kisspeptin uygulamasından sonra testiküler kan akışında değişikliklerin de testiküler dejenerasyonun oluşmasında etkili olabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle spermatogenezdeki bozukluk ve seminifer tübüllerdeki fokal hasarlara sebep olan kan akışındaki uzun süreli azalmalar ile akıştaki kısa süreli düşüşler spermatogonyumlar ve erken spermatositlerde apoptosis ile sonuçlanır (Thompson ve ark., 2006, 2009; Markey ve ark., 1994; Bergh ve Soder, 2001).

Yapılan bu çalışmada tüm gruplara ait seminifer tübüllerde değişen sayıda TUNEL (+) apoptotik hücre saptandı. Apoptotik hücreler akut dönemde kontrole göre azalmış, kronik dönemde artmış olarak bulunmuştur. Kisspeptin kesildikten 7 gün sonraki grupta apoptotik hücre sayısının arttığı ancak 13. güne göre anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Proliferasyon yönünden değerlendirildiğinde, Ki-67 (+) boyanan hücrelerin artışı apoptozis değerlerine benzemektedir. Akut dönemde Ki-67 (+) boyanan hücre sayısının artmış olması testosteron düzeyinin artışı ile paralellik göstermiştir. Ancak, kronik dönemde testosteron azalmasına rağmen proliferasyonun artışı devam etmiştir. Aynı dönemde artmış olan hücre sayısını dengelemek için apoptozisin artışı saptanmıştır. Kisspeptin uygulaması bittikten 7 gün sonraki dönemde testosteronun azalması devam etmiştir, apoptozis artmıştır, proliferasyon azalmıştır. Apoptozis artışı hücre sayısının normal sınırlara gelmesi çabalarının göstergesi olarak yorumlanmıştır.

Sonuç olarak,

Yapılan bu deneysel çalışmada 50 nmol dozunda kisspeptin-10' un, seminifer tübüllerde akut ve kronik uygulama dönemlerinde hücre proliferasyonunu artırdığı saptanmıştır. Kisspeptinin kesilmesiyle birlikte proliferasyonun ve testosteronun azaldığı, apoptozisin arttığı tespit edilmiştir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kisspeptin, spermatogenezis ve HPG aksının uyarılması için kullanılabilen bir nöropeptid olarak tanımlanmaktadır. Kisspeptinin akut etkilerinin bilinmesine rağmen, uzun süreli uygulanmasının sonuçları ve üreme sistemi üzerindeki etkileri yönünden, yapısal değişiklikleri içeren mikroskopik çalışmalar yeterli sayıda bulunmamaktadır. Üreme çağında kisspeptin salınımını düzenleyen çevresel uyarılar ile uyarıcı ve engelleyici nörotransmitterlerin rolü araştırılmaktadır. Kisspeptin diğer değişkenlerle karşılaştırılıp, kisspeptin agonist ve antagonistleri kullanılarak infertilite vakalarının tedavisinde yeni yaklaşımlar elde edilecektir. Çalışmamızın sonucunda kisspeptinin seminifer tübüllerdeki spermatogenetik hücrelerde proliferasyonu artırmış olması infertilite tedavisi yönünden değerlendirilebilir. Ancak Kisspeptinin farklı formları ve dozlarının, farklı gelişim evrelerinde uygulanması, spermatogenezis ve apoptozis üzerindeki etkileri konusunda daha fazla verinin elde edilmesini sağlayacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

**d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Dixon JP, Day K, Leitch HG, Hendrick AG, Zahn D, Franceschin I, Caraty A, Carlton MBL, Aparicios SAJR, Colledge WH.** Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2007**; 104: 10714–10719.

**Bergh A, Soder O.** Studies of cryptorchidism in experimental animal models. *Acta Paediatr.* **2007**; 96: 617–621.

**Bilban M, Ghaffari-Tabrizi N, Hintermann E, Bauer S, Molzer S, Zoratti C, Malli R, Sharabi A, Hiden U, Graier W, Knofler M, Andreae F, Wagner O, Quaranta V, Desoye G.** Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastatin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. *J Cell Sci.* **2004**; 117: 1319–1328.

**Caraty A, Smith JT, Lomet D, Ben Saïd S, Morrissey A, Cognie J, ve ark.** Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology.* **2007**; 148:5258–67.

**Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Nogueiras R, Tovar S, Roa J, Vazquez MJ, Vigo E, Casanueva FF, Aguilar E, Pinilla L, Dieguez C, and Tena-Sempere M.** Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology.* **2005**; 146: 3917–3925.

**Clarkson J, Herbison AE.** Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus: sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology.* **2006**;147, 5817–25.

**De Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E.** Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2003**;100:10972–6.

**De Vries L, Shtaf B, Phillip M, Gat-Yablonski G.** Kisspeptin serum levels in girls with central precocious puberty. *Clin Endocrinol.* **2009**;71(4):524–8.

**Dhillon WS, Chaudhri OB, Patterson M, Thompson EL, Murphy KG, Badman MK, McGowan BM, Amber V, Patel S, Ghatei MA, Bloom SR.** Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab.* **2005**; 90: 6609–6615.

**Dhillon WS, Chaudhri OB, Thompson EL, Murphy KG, Patterson M, Ramachandran R, Nijher GK, Amber V, Kokkinos A, Donaldson M, Ghatei MA, Bloom SR.** Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. *J Clin Endocrinol Metab.* **2007a**; 92: 3958–3966.

**Dhillon WS, Murphy KG, Bloom SR.** The neuroendocrine physiology of kisspeptin in human. *Rev Endocr Metab Disord.* **2007b**; 8: 41–46

**Drake RL, Vogl W, Mitchell AWM.** Gray's Anatomı, Tıp Fakültesi Öğrencileri için. Yıldırım M (Çeviri Editörü), Ankara: Güneş Kitabevi, **2007**: 408.

**Dungan, H.M., Clifton, D. K., Steiner, R.A.** Minireview: Kisspeptin Neurons as Central Processors in the Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion. *Endocrinology.* **2006**; 147(3): 1154–8.

**Eşrefoğlu M.** Özel Histoloji. Malatya: Medipress Yayıncılık Tic. Ltd. Şti., **2009**: 254-258.

**Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A ve ark.** The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun.* **2003**; 312: 1357–1363.

**Gartner L, Hiatt JL.** Color Textbook of Histology. 2nd Edition, W.B. Saunders Company, **2001**: 487-498.

**Gilbert SF.** Developmental Biology. 6th edition. Sunderland (MA): [Sinauer Associates](#); **2000**.

**Gottsche ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, ve ark.** A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the Mouse. *Endocrinology.* **2004**;145:4073–7.

**Han S, Gottsch ML, Lee K, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, Clifton DK, Steiner RA, Herbison A.** Activation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *Journal of Neuroscience.* **2005**; 25(49), 11349 –56.

**Hofmann HA.** Gonadotropin-releasing hormone signaling in behavioral plasticity. *Curr Opin Neurobiol* **2006**; 16: 343–50.

**Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, ve ark.** Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology.* **2004**;80:264–72.

**Janqueira LC, Carneiro J, Kelley RO.** Temel histoloji, Aytekin Y, Solakoğlu S (Çeviri Editörleri),7. Baskı, İstanbul: Barış Kitapevi, **1993**: 498-508.

**Janqueira LC, Carneiro J.** Temel Histoloji, Aytekin Y, Solakoğlu S (Çeviri Editörleri),10. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, **2006**: 431-442.

**Kinoshita M, Tsukamura H, Adachi S, Matsui H, Uenoyama Y, Iwata K, Yamada S, Inoue K, Ohtaki T, Matsumoto H, and Maeda K.** Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology.* **2005**; 146: 4431–4436

**Kotani M, Dethoux M, Vandenberghe A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E ve ark.** The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem.* **2001**; 276: 34631–34636.

**Köseoğlu M.** Üremenin endokrin işlevi. In: Burtis CA, Ashwood ER. (Eds). Klinik kimyada temel ilkeler, Ankara: Palme yayıncılık; **2005**: 876-897

**Kuohung W, Kaiser UB.** GPR54 and KiSS-1: Role in the regulation of puberty and reproduction. *Rev Endocr Metab Disord.* **2006**;7(4):257-63

**Lapatto R, Pallais JC, Zhang D, Chan YM, Mahan A, Cerrato F ve ark.** Kiss1<sup>-/-</sup> mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54<sup>-/-</sup> mice. *Endocrinology.* **2007**;148: 4927–4936.

**Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, and Welch DR.** KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1731–1737.

**Lee JH, Welch DR.** Identification of highly expressed gene in metastasis-suppressed chromosome 6/human malignant melanoma hybrid cells using subtractive hybridization and differential display. *Int J Cancer.* **1997**;71:1035-41.

**Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD ve ark.** Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett.* **1999**; 446: 103–107.

**Markey CM, Jequier AM, Meyer GT, Martin GB.** Testicular morphology and androgen profiles following testicular ischaemia in rams. *J Reprod Fertil.* **1994**; 101: 643–650.

**Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T.** Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun.* **2004** ; 320: 383–388.

**Mead EJ, Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP.** Kisspeptins: a multifunctional peptide system with a role in reproduction, cancer and the cardiovascular system. *Br J Pharmacol.* **2007**; 151: 1143–1153.

**Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J ve ark.** Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2005**; 102: 1761–1766.

**Mikkelsen JD, Bentsen AH, Ansel L, Simonneaux V, Juul A.** Comparison of the effects of peripherally administered kisspeptins. *Regul Pept.* **2009**;152:95-100.

**Moore KL, Persaud TVN.** The Developing Human Clinically Oriented Embryology. 8th Edition, Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri, **2008**: 262-265.

**Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, ve ark.** AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem.* **2001**;276:28969–75.

**Murphy KG.** Kisspeptins: regulators of metastasis and the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol.* **2005**; 17: 519–525.

**Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE, ve ark.** Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology.* **2004a**;145:4565–74.

**Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Castellano JM, Roa J, Mayen A, Barreiro ML, ve ark.** Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. *J Physiol.* **2004b**; 561:379–86.

**Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Tovar S, Roa J, Mayen A ve ark.** Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology.* **2005a**; 146: 1689–1697.

**Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Tovar S, Roa J, Mayen A ve ark.** Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology.* **2005b**; 146: 156–163.

**Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA.** Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev.* **2009**; 30:713–43.

**Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K ve ark.** Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*. **2001**; 411: 613–617.

**Ovalle WK, Nahirney PC.** Netter Temel Histoloji. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P (Çeviri Editörleri), Ankara: Güneş Tıp Kitabevi, **2009**: 386-387.

**Ozan H.** Ozan Anatomi. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri, **2004**: 307-310.

**Partsch CJ and Sippell WG.** Treatment of central precocious puberty. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. **2002**; 16: 165–189.

**Patterson M, Murphy KG, Thompson EL, Patel S, Ghatei MA, Bloom SR.** Administration of kisspeptin-54 into discrete regions of the hypothalamus potently increases plasma luteinising hormone and testosterone in male adult rats. *J Neuroendocrinol*. **2006**; 18: 349–354.

**Plant TM, Barker-Gibb ML.** Neurobiological mechanisms of puberty in higher primates. *Hum Reprod Update*. **2004**;10:67–77.

**Plant TM, Ramaswamy S, DiPietro MJ.** Repetitive activation of hypothalamic G protein-coupled receptor 54 with intravenous pulses of kisspeptin in the juvenile monkey (*Macaca mulatta*) elicits a sustained train of gonadotropin-releasing hormone discharges. *Endocrinology*. **2006**; 147:1007–13.

**Popa SM, Clifton DK, Steiner RA.** The Role of Kisspeptins and GPR54 in the Neuroendocrine Regulation of Reproduction. *Annu Rev Physiol*. **2008**; 70, 213–38.

**Ramaswamy S, Seminara SB, Pohl CR, DiPietro MJ, Crowley Jr WF, Plant TM.** Effect of continuous intravenous administration of human metastin 45–54 on the neuroendocrine activity of the hypothalamic-pituitary-testicular axis in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology*. **2007**; 148:3364–70.

**Ramzan F, Qureshi IZ.** Intraperitoneal kisspeptin-10 administration induces dose-dependent degenerative changes in maturing rat testes. *Life sciences*. **2011**; 88: 246-256.

**Roa J, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M.** New frontiers in kisspeptin/ GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front Neuroendocrinol*. **2008**; 29:48–69.

**Roseweir AK, Kauffman AS, Smith JT, Guerriero KA, Morgan K, Pielecka-Fortuna J, ve ark.** Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. *J Neurosci*. **2009**; 29(12):3920–9.

**Sadler T W.** Langman’s Medikal Embriyoloji. Başaklar AC (Çeviri Editörü), 7. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 1996: 272-275.

**Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Shagoury JK, ve ark.** The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med*. **2003**; 349:1614–27.

**Seminara SB, DiPietro MJ, Ramaswamy S, Crowley Jr WF, Plant TM.** Continuous human metastin 45–54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin-releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male Rhesus monkey (*Macaca mulatta*): a finding with therapeutic implications. *Endocrinology*. **2006**; 147:2122–6.

**Semple RK, Achermann JC, Ellery J, Farooqi IS, Karet FE, Stanhope RG, O'Rahilly S, and Aparicio SA.** Two novel missense mutations in g protein-coupled receptor 54 in a patient with hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* **2005**; 90: 1849–1855.

**Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM.** Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2005**; 102:2129–34.

**Shahed A, Young KA.** Differential Ovarian Expression of KiSS-1 and GPR-54 During the Estrous Cycle and Photoperiod Induced Recrudescence in Siberian Hamsters (*Phodopus sungorus*) . *Molecular Reproduction & Development,* **2009**; 76:444–452.

**Smith JT, Clifton DK, Steiner RA.** Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. *Reproduction.* **2006**; 131 (4): 623-30.

**Smith JT, Rao A, Pereira A, Caraty A, Millar RP, Clarke IJ.** Kisspeptin is present in ovine hypophysial portal blood but does not increase during the preovulatory luteinizing hormone surge: evidence that gonadotropes are not direct targets of kisspeptin in vivo. *Endocrinology.* **2008**; 149:1951–9.

**Snell RS.** Tıp Fakültesi Öğrencileri için Klinik Anatomi, Yıldırım M (Çeviri Editörü),5. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti., **1998**: 151-152.

**Sun Y, Tian Z, Zhao H, Wong STC, Chen B.** Characteristic of hypothalamic kisspeptin expression in the pubertal development of precocious female rats. *Neurosci Lett.* **2007**; 420:12–7.

**Teles MG, Bianco SDC, Brito VN, Trarbach EB, Kuohung W, Xu S, ve ark.** A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med.* **2008**;358: 709–15.

**Tena-Sempere M.** GPR54 and kisspeptin in reproduction. *Hum Reprod Update.* **2006**; 12: 631–639.

**Tena-Sempere M.** Kisspeptin signaling in the brain: recent developments and future challenges. *Mol Cell Endocrinol.* **2010**; 314:164–9.

**Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Hattori M, Nishimura A, Ohtaki T ve ark.** Expression of KiSS-1, a metastasis suppressor gene, in trophoblast giant cells of the rat placenta. *Biochim Biophys Acta.* **2004**; 1678: 102–110.

**Thompson EL, Patterson M, Murphy KG, Smith KL, Dhillon WS Todd JF ve ark.** Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol.* **2004**; 16: 850–858.

**Thompson EL, Murphy KG, Patterson M, Bewick GA, Stamp GW, Curtis AE, Cooke JH, Jethwa PH, Todd JF, Ghatei MA, Bloom SR.** Chronic subcutaneous administration of kisspeptin-54 causes testicular degeneration in adult male rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2006**; 291: E1074–E1082

**Thompson EL, Amber V, Stamp GW, Patterson M, Curtis AE, Cooke JH, Appleby GF, Dhillon WS, Ghatei MA, Bloom SR, Murphy KG.** Kisspeptin-54 at high doses acutely induces testicular degeneration in adult male rats via central mechanisms. *Br J Pharmacol.* **2009**; 156:609–25.

**Tovar S, Vázquez MJ, Navarro VM, Fernández- Fernández R, Castellano JM, Vigo E ve ark.** Effects of single or repeated intravenous administration of kisspeptin upon dynamic LH secretion in conscious male rats. *Endocrinology.* **2006**; 147:2696–704.

**Vicdan K, Işık AZ.** İn vitro Fertilizasyon ve Mikromanipülasyon Uygulamalarında Laboratuvar. 1. Baskı, Ankara: Çağdaş Medikal Kitabevi, **1999**: 1-13.

**Ward JA, Furr BJ, Valcaccia B, Curry B, Bardin CW, Gonsalus GL, and Morris ID.** Prolonged suppression of rat testis function by a depot formulation of Zoladex, a GnRH agonist. *J Androl.* **1989**; 10: 478–486.

**Yılmaz B.** Kisspeptin: Yeni bir endokrin düzenleyici mi? Türk Fizyolojik Bilimler Derneği XXXII. Ulusal Kongresi Özet Kitabı. Denizli-Türkiye, 18-22 Eylül **2006**; 42.

<http://www.e-stork.com.tw/picture/200402260004.jpg>- erişim tarihi 15.06.2011

<http://www.guardian.co.uk/life/science/story/0,12996,1539767,00.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9967/> , erişim tarihi 01.07.2011

## **8. EKLER**

**EK 1: Etik Kurul Onayı**

**EK 2: 2 Adet CD**