



T.C.  
**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
TR, Balıkesir University, Institute of Health Sciences



**FARKLI FİKSATİFLERİN BAZI TESTİS  
HÜCRELERİNDEKİ AQP-9  
İMMUNOREAKTİVİTESİ ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HATİCE GÜL FAZLIOĞLU**

**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**Bilim Alan Kodu: 1033**



**BALIKESİR**

**2024**

T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI FİKSATİFLERİN BAZI TESTİS HÜCRELERİNDEKİ AQP-9  
İMMUNOREAKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
KARŞILAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATİCE GÜL FAZLIOĞLU

TEZ DANIŞMANI  
PROF. DR. ALİ BAYRAKDAR

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı  
Bilim Alan Kodu: 1033

Proje No: 2023/105 -Balıkesir Üniversitesi BAP

BALIKESİR  
2024



T.C.  
**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**TEZ KABUL VE ONAY**

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı  
çerçevesinde **Hatice Gül FAZLIOĞLU** tarafından yürütülmüş ve  
tamamlanmış olan

**“Farklı Fiksatiflerin Bazı Testis Hücrelerindeki AQP-9  
İmmünoreaktivitesi Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması”**

başlıklı tez çalışması,  
Balıkesir Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav  
Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca aşağıdaki jüri tarafından  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
olarak kabul edilmiştir.

**Tez Savunma Tarihi: 04/09/ 2024**

**TEZ SINAV JÜRİSİ**

Prof. Dr. Ali BAYRAKDAR  
Balıkesir Üniversitesi  
Üye (**Danışman**)(**Başkan**)

Dr. Öğr. Üyesi Fatma Bahar Sunay  
Balıkesir Üniversitesi  
Üye

Doç. Dr. Sema SERTER  
KOÇOĞLU  
Bursa Uludağ Üniversitesi  
Üye

Yukarıdaki Yüksek Lisans Tezi,  
sınav jüri üyeleri tarafından imzalanarak 06/09/2024 tarihinde teslim  
edilmiştir.

Prof. Dr. Şükrü Metin PANCARCI  
Enstitü Müdürü

## BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıpları kabullendiğimi **beyan ederim.**

04/09/2024

İmza

Hatice Gül Fazlıoğlu

## TEŐEKKÜR

Tez çalıőmam boyunca yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ali BAYRAKDAR'a, tezin istatistiksel çalışmalarında ve laboratuvar aőamasında desteğini aldığım Dr. Öğr. Üyesi Başak IŞILDAR'a, tez süresince fikirlerine başvurduğum Dr. Öğr. Üyesi Fatma Bahar SUNAY'a ve tüm değerli hocalarıma teőekkür ederim.

Yaőamım boyunca varlıklarını yanımda hissettiğim, yüksek lisans çalıőmam boyunca yaşadığım tüm zorluklara rağmen bana hayallerimi unutturmayan ve sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili aileme ve tüm hocalarıma sabırlarından dolayı teőekkürü bir borç bilirim.

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>i</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>TABLOLAR DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	
<b>2.1. Aquaporin (AQP)</b> .....	<b>1</b>
2.1.1. Aquaporin’lerin Keşfi .....	4
2.1.2. Aquaporin’lerin Yapısal Özellikleri .....	5
2.1.3. Aquaporin’lerin Sınıflandırılması .....	6
2.1.4. Aquaporin 9: Doku ve Organlardaki Dağılımı ve Önemi .....	9
<b>2.2. Testis Histolojisi</b> .....	<b>10</b>
2.2.1. Seminifer Tübüller .....	11
2.2.1.1.Sertoli Hücreleri .....	13
2.2.1.2.Spermatogenik Hücreler ve Spermatogenez .....	13
2.2.2. İnterstisyel Doku .....	20
2.2.3. Testis Hücrelerinde Aquaporin Ekspresyonu .....	21
<b>2.3. Fiksasyon.</b> .....	<b>24</b>
2.3.1. Formaldehit .....	25
2.3.2. Bouin Fiksatif.....	26
2.3.3. Modifiye Davidson Fiksatif .....	27
2.3.4. Stieve’s Fiksatif.....	27
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	
<b>3.1. Deney Hayvanları</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2. Kullanılan Gereçler</b> .....	<b>28</b>
3.2.1. Kimyasallar .....	28
3.2.2. Alet ve Teçhizat .....	28
3.2.3. Cihazlar .....	29
3.2.4. Yazılımlar .....	29

<b>3.3. Yöntem .....</b>	<b>29</b>
3.3.1. Deney Grupları.....	29
3.3.2. Fiksatiflerin Hazırlanması .....	30
3.3.3. Fiksasyon ve Doku Takibi .....	31
3.4. İmmünohistokimyasal İncelemeler .....	32
3.5. Görüntüleme ve Analiz.....	34
3.6. İstatiksel Analiz.....	35
<b>4. BULGULAR</b>	
<b>4.1. Seminifer Tübüllerin Histomorfometrik Analizi.....</b>	<b>36</b>
<b>4.2. İmmünohistokimyasal Analiz.....</b>	<b>38</b>
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>46</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>53</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	

## ÖZET

### FARKLI FİKSATİFLERİN BAZI TESTİS HÜCRELERİNDEKİ AQP-9 İMMUNOREAKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Fiksasyonu problemlili olmasından dolayı testisler ile yapılan histomorfolojik ve immunohistokimyasal çalışmalarda en uygun fiksatif belirlenme çalışmaları zaman zaman histopatolojinin konusu olmuştur. İmmunohistokimyasal analizlerde iyi bir fiksatiften beklenen en önemli özellik aranan proteini iyi koruması ve immunoreaktiviteyi güçlü bir şekilde ortaya çıkarmasıdır. Bu çalışmada, farklı fiksatiflerin sıçan testisleri üzerindeki histomorfolojik etkileri ve testis hücrelerindeki AQP-9 boyanma şiddetleri üzerindeki etkileri karşılaştırılmıştır.

Çalışmada histopatolojide rutin olarak kullanılan %10'luk nötral tamponlu formaldehit (%10'luk NTF), modifiye Davidson (mDF), Bouin (BF) ve Stieve's (SF) fiksatifleri kullanıldı. Çalışmada fiksatiflerin her biri için 6'şar adet, toplam 24 adet testis dokusu kullanıldı. Daha önce hazırlanan parafin bloklardan alınan kesitler rutin histolojik prosedürlerden geçirildi, immunohistokimyasal metot kullanılarak AQP-9 antikoru ile işaretlendi ve histomorfometrik ve immünohistokimyasal analizleri yapıldı.

Histomorfometrik ölçümlerimiz mDF ve SF fiksatiflerinin sıçan testisinin morfolojik bütünlüğünü birbirine yakın düzeyde iyi koruduğunu ve hücre detayları daha iyi ortaya çıkardığını gösterdi. Ayrıca morfolojik bütünlüğü koruma yönünden en kötü performans %10'luk NTF'ye aitti. İmmunohistokimyasal analizlerimiz BF'nin seminifer tübüllerin germ ve Sertoli hücrelerindeki AQP-9 ekspresyonunu açığa çıkarma yönünden en iyi performansa sahip fiksatif olduğunu, onu sırasıyla mDF ve SF'nin takip ettiğini gösterdi. SF'nin ise interstisyel alanın Leydig hücrelerindeki AQP-9 ekspresyonunu açığa çıkarma yönünden en iyi performansa sahip fiksatif olduğu, onu sırasıyla mDF ve BF'nin takip ettiğini görüldü. Ayrıca %10'luk NTF'nin her iki testis alanında da AQP-9 ekspresyonunu açığa çıkarma yönünden en kötü performansa sahip olduğu tespit edildi.

Ölçümlerimiz de göstermektedir ki, sıçan testis dokusunda bundan sonra yapılacak histomorfometrik çalışmalarda mDF ve SF'nin, AQP-9 ekspresyonuna



yönelik yapılacak immunohistokimyasal analizlerde birbirlerine yakın değerlere sahip olan SF, mDF ve BF testis fiksasyonu amacıyla tercih edilebilir.

*Anahtar kelimeler: Aquaporin-9, fiksatif, histomorfometri, immünohistokimya, testis.*

## **ABSTRACT**

### **EFFECTS OF DIFFERENT FIXATIVES ON AQP-9 IMMUNOOREACTIVITY IN SOME TESTICULAR CELLS**

Determining the most suitable fixative for histomorphological and immunohistochemical studies of testicular tissue has periodically been a subject of interest in histopathology due to fixation-related issues. In immunohistochemical analyses, a key characteristic expected of a good fixative is its ability to preserve the target protein effectively and to enhance immunoreactivity robustly. This study compares the histomorphological effects of different fixatives on rat testicular tissue and their impact on the staining intensity of AQP-9 in testicular cells.

In this study, fixatives routinely used in histopathology were employed: 10% neutral buffered formalin (10% NBF), modified Davidson's (mDF), Bouin's (BF), and Stieve's (SF). For each fixative, six tissue samples were analyzed, totaling 24 testicular tissue samples. Sections from previously prepared paraffin blocks were subjected to routine histological procedures, labeled with AQP-9 antibody using immunohistochemical methods, and analyzed through histomorphometric and immunohistochemical techniques.

Histomorphometric measurements indicated that mDF and SF fixatives preserved the morphological integrity of rat testicular tissue and cellular details at similar, high levels. The 10% NBF exhibited the poorest performance in maintaining morphological integrity. Immunohistochemical analyses revealed that BF was the most effective fixative for revealing AQP-9 expression in germ and Sertoli cells of the seminiferous tubules, followed by mDF and SF. SF was the most effective fixative for revealing AQP-9 expression in Leydig cells of the interstitial area, with mDF and BF following in effectiveness. Additionally, 10% NBF demonstrated the poorest performance in exposing AQP-9 expression in both testicular areas.

Our measurements suggest that for future histomorphometric studies of rat testicular tissue, mDF and SF should be preferred, while for immunohistochemical

analyses of AQP-9 expression, SF, mDF, and BF are the preferred fixatives with comparable performance.

*Keywords: Aquaporin-9, fixative, histomorphometry, immunohistochemistry, testis.*

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

AEC	: Aminoetil karbozol
AQP	: Aquaporin
BF	: Bouin Fiksatif
CHIP28	28 kDa'lık İntegral Membran Protein Kanalı
DNA	: Deoksiribonükleik Asit:
GLP	: Aquagliseroporin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen Peroksit
İHK	: İmmunohistokimya
KTB	: Kan-Testis Bariyer
MDF	: Modifiye Davidson Fiksatif
NPA	: Aparajin- Prolin- Alanin Motifi
NTF	: Nötral Tamponlu Formaldehit
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PFA	: Paraformaldehit
SF	: Stieve's Fiksatif
TUNEL	: TdT mediated dUTP Nick end Labeling

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. AQP Proteininin Yapısal Organizasyonu.....	6
Şekil 2.2. Türdeşliklerine ve Biyofiziksel Özelliklerine Göre AQP'lerin Sınıflandırılması.....	7
Şekil 2.3. İnsanda AQP Dağılımı.....	8
Şekil 2.4. Testisin Anatomik Yapısı.....	11
Şekil 2.5. Bir Seminifer Tübülün ve Onu Çevreleyen Dokunun Bir Bölümünün Şematik Görüntüsü.....	12
Şekil 2.6. Spermatogonyumlardan Germ Hücrelerinin Üretim Süreci.....	15
Şekil 2.7. Erişkin Bir Bireyin Testisindeki Sertoli Hücrelerini ve Spermatozoon Gelişimini Gösteren Bir Seminifer Tübül Kesiti.....	16
Şekil 2.8. Spermatozoon Kuyruğunun Ultrastrüktürel Şematik Gösterimi.....	20
Şekil 2.9. Erkek Üreme Sistemi AQP'leri ve Organlardaki Temsili Lokasyonları.....	22
Şekil 4.1. Fiksatif Gruplarının Ortalama Histomorfometrik Değerleri. ....	37
Şekil 4.2. Fiksatif Gruplarının Ortalama AQP-9 Seminifer Tübül Boyanma Şiddetleri.....	39
Şekil 4.3. Fiksatif Gruplarına Göre Seminifer Tübüllerin AQP-9 Boyanma Şiddetlerini Gösteren Resim Paneli. ....	40
Şekil 4.4. B Grubu Testislerde Seminifer Tübüllerdeki AQP-9 Antikoru ile Yapılan İmmun Boyamanın Görünümü.....	41
Şekil 4.5. Fiksatif gruplarının İnterstisyel Alan Ortalama AQP-9 Boyanma Şiddetleri. ....	42
Şekil 4.6. Fiksatif Gruplarının Göre İnterstisyel Alanların AQP-9 Boyanma Şiddetlerini Gösteren Resim Paneli.....	43
Şekil 4.7. S Grubu Testislerde Leydig Hücrelerinde AQP-9 Antikoru ile Yapılan İmmun Boyamanın Görünümü.....	44
Şekil 4.8. N grubu Testislerde Leydig Hücrelerinde AQP-9 Antikoru ile Yapılan İmmun Boyamanın Görünümü.....	45

## TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
<b>Tablo 3.1.</b> Doku takip protokolü.....	32

## 1. GİRİŞ

Su, hücrede en bol bulunan ve yaşam için zorunlu temel bir moleküldür. Hücre, kendisini çevreleyen ortamdan çift katlı fosfolipitten oluşan bir plazma membranı ile ayrılmaktadır. Hücrenin iç ortamının hücre dışından ayrılması ile birlikte hücrenin pH'ı, iyon bileşimi, inorganik iyon yoğunluğu gibi iç ortam bileşenlerinin optimum seviyeleri korunmaktadır. Çift katlı fosfolipit tabaka temel olarak küçük polar moleküllere karşı geçirgen olup su, basit difüzyonla çift tabakaya yavaş yavaş nüfuz etmektedir (Takata vd., 2004). Plazma membranı suya, küçük besinlere ve toksinlere karşı geçirgen olmakla birlikte, lipid bileşimi nedeniyle çift katlı membrandan oldukça yavaş geçmektedir. Hücre sağlığının ve fonksiyonunun sürdürülebilir olabilmesi için çeşitli moleküllerin (su, besinler, vb.) plazma membranından basit difüzyona göre çok daha hızlı bir yolla alınması gerekmektedir (Ribeiro vd., 2021).

Biyolojik membranlarda suyun hücrelere verimli bir şekilde nüfuz etmesini kolaylaştıran özel integral protein kanalları bulunmaktadır. Bu integral protein yapısındaki su kanalları başta bakteriler, bitkiler ve hayvanlar olmak üzere çeşitli organizmalarda gösterilmiştir (Takata vd., 2004). Su, alyuvarlarda olduğu gibi, pek çok hücre türünde aquaporin (AQP) olarak adlandırılan ve su kanalı olarak görev yapan pek çok integral membran proteinleri aracılığıyla, kolaylaştırılmış difüzyon yolu ile plazma membranından çok daha hızlı taşınmaktadır (Edashige, 2016).

Hücrelerin hacminin düzenlenmesinde, besinlerin hücrelere taşınmasında ve metabolik kalıntıların hücrelerden uzaklaştırılmasında AQP'lerin merkezi bir rolü bulunmaktadır (Yeste vd., 2017). AQP'ler erkek ve dişi üreme sistemleri de dahil olmak üzere doku ve organların faaliyetlerini gerçekleştirmesinde oldukça önemli görevler üstlenmektedir (Laforenza vd., 2016). Erkek ve dişi üreme hücrelerinin gelişimi, su taşınımının düzenlenmesi de dahil bazı karmaşık süreçleri kapsamaktadır. Spermatogenez ve sperm motilitesi için su homeostazı en önemli odak noktasını oluşturmaktadır (Ribeiro vd., 2021).

Testis, spermatogonyumlardan spermatozoonlara kadar, gelişim sürecindeki erkek germ hücrelerinin üretim, farklılaşma ve metamorfoz yeridir. Su, testislerde Sertoli hücreleri tarafından seminifer epitel boyunca hareket ettirilmekte ve spermin efferent kanallara taşınmasına aracılık etmektedir (Hermo ve Smith, 2011). AQP'lerin bir alt grubu olan ve AQP-9'u da içine alan aquagliseroporinler (GLP'ler) suyun yanında gliserol, üre, amonyak ve hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gibi molekülleri de taşımaktadır (Gomes vd., 2009). AQP-9 kanalları Sertoli ve Leydig hücreleri, spermatozoidler ve efferent kanallarını da kapsayan oldukça yaygın bir testiküler hücre dağılımına sahiptir (Bernardino vd., 2016).

Daha düşük protein içeriğinden ve seminifer epiteldeki bağlayıcı yapıların azlığından dolayı fiksasyon problemleri diğer organ ve dokulara göre testislerde daha çok görülmektedir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, doku işleme süreçlerinin daha kolay olmasından ve histomorfolojik ayrıntıları daha iyi korumalarından dolayı memeli testislerini fikse etmek için araştırmacılar genellikle %4'lük paraformaldehit (PFA), modifiye Davidson (mDF) ve Bouin (BF) solüsyonlarını kullanmışlardır (Wang vd., 2020).

Hematoksilen ve Eozin, immünohistokimya ve TdT mediated dUTP Nick end Labeling (TUNEL) yöntemleri, proteinlerin ekspresyonu ve lokalizasyonları ile apoptozun morfolojik incelemeleri için parafin doku kesitlerinde kullanılan histolojik görüntüleme analizleridir (Crowley vd., 2016). Rutin immünohistokimya (İHK) analizleri immünofenotipleme ve neoplastik hastalıkların seyrinin belirlenmesi, histolojik lezyonlarla ilişkili patojenlerin saptanması veya tanımlanması ve hücre karakterizasyonu çalışmalarında kullanılmaktadır. Proteinlerin dokulardaki ve hücrelerdeki lokalizasyonlarını gösterebilmesi İHK'nin diğer protein belirleme analizlerine göre en önemli avantajıdır. İmmünohistokimya, hastalıklı dokulardaki antijen ekspresyonunu ortaya koymakla birlikte, özgül antijenlerin belirlenmesine bağlı olarak özgül hücre tipleri veya histolojik lezyonlar arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesine de olanak vermektedir (Webster vd., 2009). Doku fiksatifleri başta olmak üzere, fiksasyon prosesleri ve antijen retrieval metotları proteinlerin lokalizasyonunu ve miktarını ortaya koyan immünohistokimyasal analizlerin duyarlılığını kolaylıkla etkileyebilmektedir (Wang vd., 2020).



İmmunohistokimya çalışmalarında antjenik reaksiyonun kalitesini azaltan tüm dış etkenlerin en aza indirilmesi çalışmanın sonucunun daha doğru değerlendirilmesi açısından oldukça önemlidir. Bu durumda immunohistokimyasal analizlerde doku fiksasyonu için doğru fiksatif seçimi oldukça önem kazanmaktadır. Çalışmamız fiksasyon için rutinde oldukça geniş kullanım alanları bulunan %10'luk nötral tamponlu formaldehit (%10 NTF), mDF, BF ve SF fiksatiflerinin, testislerde geniş bir hücrel dağılıma sahip AQP-9 plazma membranı proteinini koruma ve immunohistokimyasal analizlerde reaksiyonun duyarlılığı üzerine olası etkilerini belirlemek amacıyla yapıldı.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Aquaporin (AQP)

İnsan vücudunun yaklaşık %60'ını su oluşturmaktadır. Yaklaşık beş litrelik kandan pikolitre hacimlerdeki tekil hücelere kadar, organizmanın farklı bölmeleri arasındaki su geçişleri sıkı ve dinamik bir şekilde düzenlenmektedir. AQP, suyun tüm biyolojik membranlar üzerinden ozmotik veya hidrostatik basınç değişimleri kullanılarak pasif taşınmasını kolaylaştıran küçük integral membran proteini ailesidir (Markou vd., 2022). AQP su kanalları suyun taşınmasında ve proton geçirgenliğinin önlenmesinde oldukça etkilidir ve pek çok hastalık sürecine dahil olur (Hermo ve Smith, 2011). Her ne kadar AQP'ler buldukları membranların su geçirgenliğini arttırsalar da biyolojik membranların çoğunluğu, AQP'lerden bağımsız olarak, belirli düzeyde, içsel olarak su geçirgenliğine sahiptir (Markou vd., 2022).

Memelilerde, pek çok doku ve organda, böbrek su dengesinin korunması, beyin sıvısının homeostazisi, adipositler ile karaciğer arasındaki trigliserit döngüsü, lensin yapısal bütünlüğün ayarlanması gibi olaylara destek olan on üç adet AQP türdeşi bulunmaktadır. AQP'lerin işlevlerinin anlaşılması, sağlıklı yaşlanmanın yanı sıra felç veya kafa travmasını takiben beyin şişmesi, nefrojenik diyabetis inspidus, katarakt, obezite, tümör hücre proliferasyonu ve göçü ve tümör anjiyogenezi gibi pek çok hastalık durumunun başlangıcının araştırılması için oldukça önemlidir (Kitchen vd., 2015).

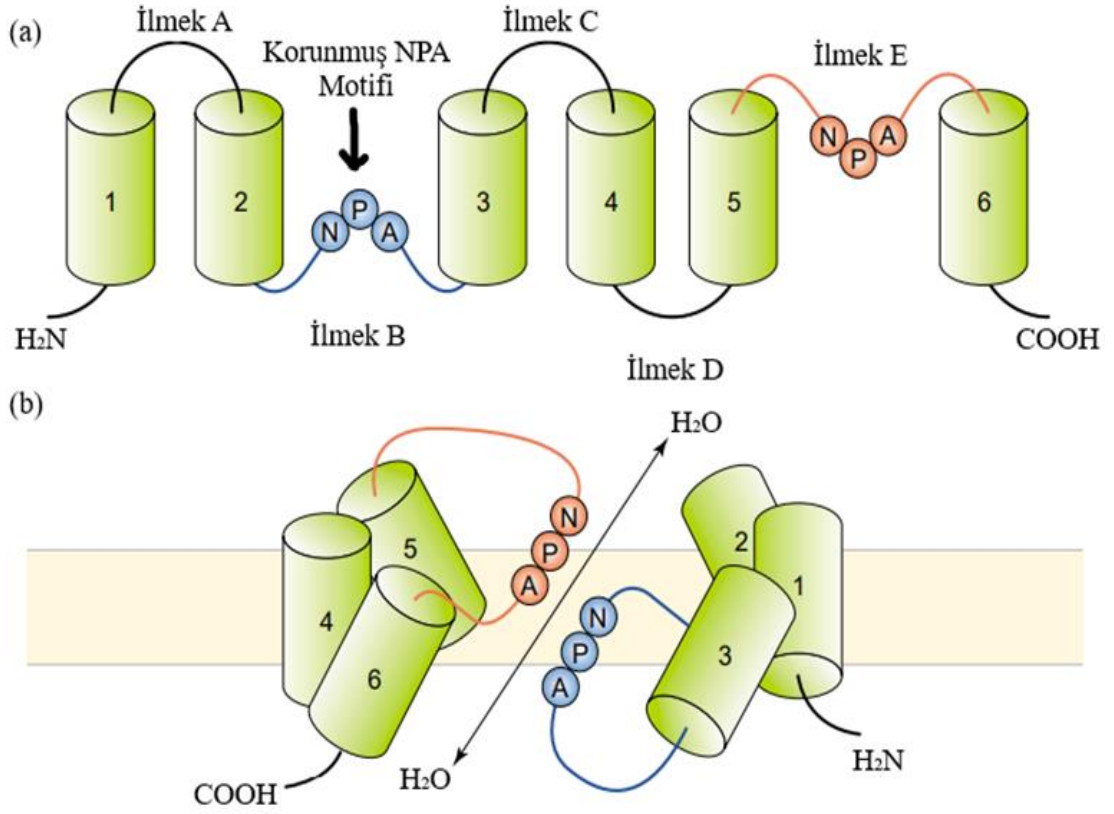
#### 2.1.1. AQP'lerin Keşfi

1985 yılında Romanya'da, alyuvar membranında, daha sonra AQP-1 olarak adlandırılacak olan ilk su kanalı proteini olan CHIP28 keşfedilmiş ve bu keşif 1986 yılında bilimsel bir makale ile raporlanmıştır (Benga, 2009). 1988 yılında, insan alyuvarı plazma membranında büyük miktarda (28-kDa) protein saflaştırıldığı bildirilmiştir (Denker vd., 1988). 1990'larda, mikroorganizmalar ve bitkilerin de dahil olduğu çeşitli canlı türlerinde bu membran proteinleri arasında türdeşlik belirlenmiş,

ancak moleküler yapıları tam olarak aydınlatılamamıştır (Sales vd., 2013). Bununla birlikte, bu proteinlerin çeşitli amino asit bölgelerindeki farklı fosforilasyon seviyelerine bağlı olarak, çözünen maddelere karşı özgül bir geçirgenlik sergilediği bildirilmiştir (Yeung, 2010).

### 2.1.2. AQP'lerin Yapısal Özellikleri

Günümüze kadar yapılan bilimsel çalışmalar AQP ailesinin biyolojik yapısını açık bir şekilde ortaya çıkarmıştır. AQP'ler insanlarda yaklaşık 300 amino asit kalıntısından oluşan, 27 ila 37 kDa molekül ağırlığına sahip çok geçişli transmembran proteinleridir. Bu proteinlerin beş ilmekle birbirine bağlanan altı adet transmembran alanı bulunmaktadır (Markou vd., 2022). AQP'ler küçük ve oldukça hidrofobiktir (Verkman ve Mitra, 2000). Daha önce dizi analizi sonucu ortaya atılan kum saati modeli, AQP'lerin üç boyutlu yapılarının keşfedilmesi ile birlikte doğrulanmıştır. Bilinen tüm AQP türdeşleri ortak bir homo tetramerik yapı sergilemektedir. Bir AQP monomeri, protein kanalın iskeletini oluşturan ve sağa eğimli sarmallı demet şeklinde düzenlenmiş altı adet transmembran alfa heliksten oluşmaktadır. Bu transmembran heliksler, beş adet ilmekle (A-E) birbirine bağlıdır (Şekil 2.1.). Hidrofilik terminal amino ve karboksil grupları her zaman hücre membranının sitoplazmik yüzüne dönük olacak şekilde yerleşmektedir. A, C ve E ilmekleri hücre membranının ekstraselüler yüzünde yerleşim gösterirken; B ve D ilmekleri sitoplazmik olarak bulunmaktadır. B ve E ilmekleri yüksek oranda korunmuş aparajin-prolin-alanin (NPA motifi) dizilerini içeren intraselüler ilmeklerdir. Hidrofilik yapıdaki B ve E ilmekleri boşlukta bükülerek iki adet NPA motifi içeren ve suya karşı geçirgen olan geçidi oluşturmaktadır (Jung vd., 1994).

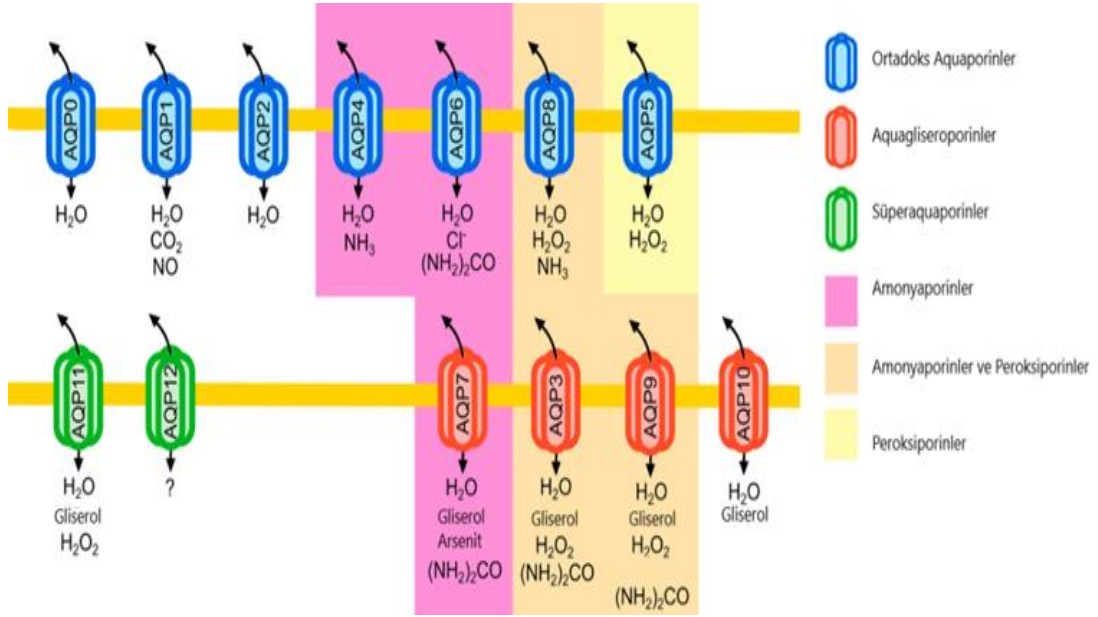


**Şekil 2.1.** AQP proteininin yapısal organizasyonu  
(Zeuthen, 2001).

### 2.1.3. AQP'lerin Sınıflandırılması

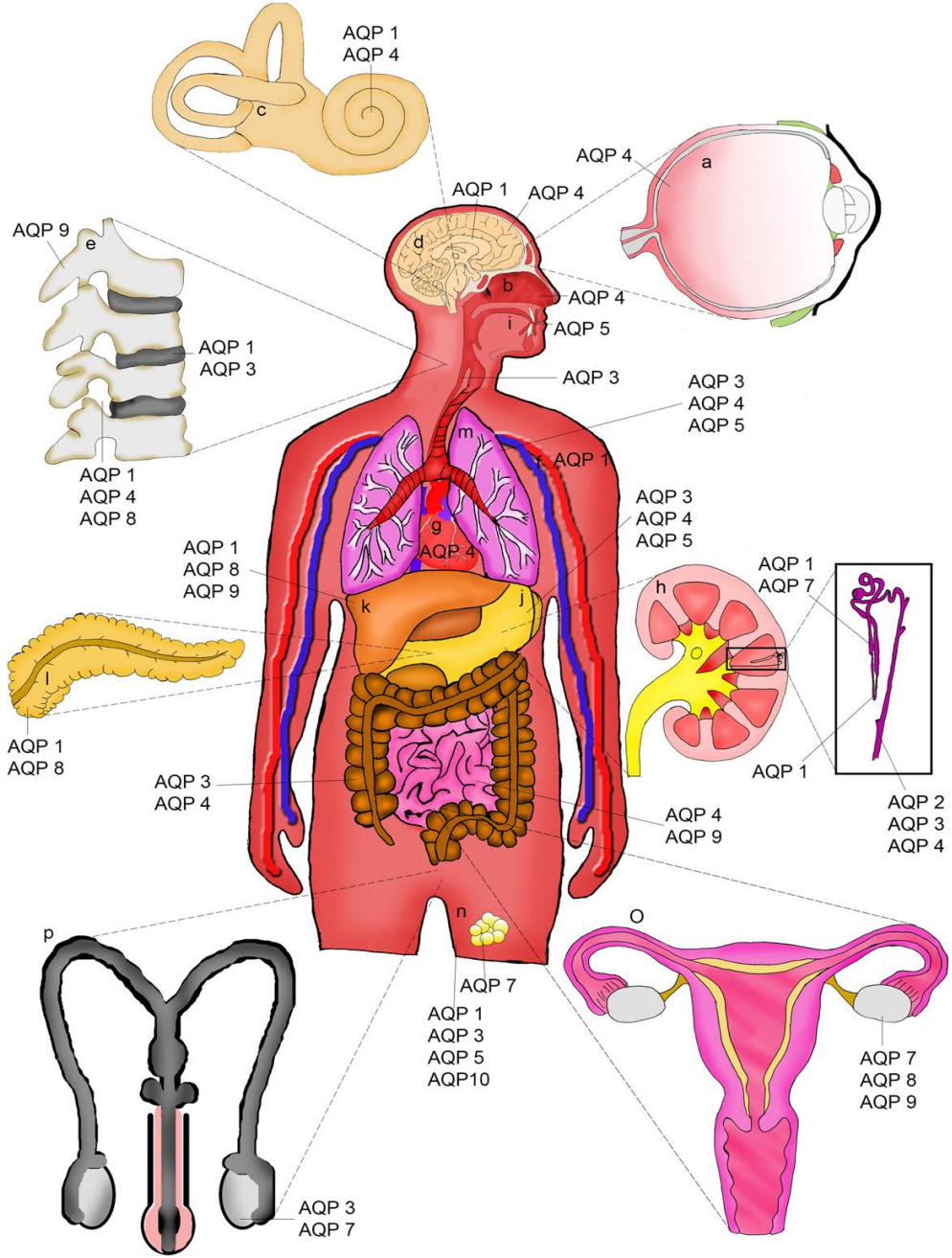
Bugüne kadar memeli hücrelerinde AQP-0'dan AQP-12'ye kadar alt gruplar halinde sınıflandırılan 13 farklı AQP türdeşi tanımlanmıştır (Şekil 2.2.). Birinci grubu oluşturan ortodoks AQP'lerin AQP-0, AQP-1, AQP-2, AQP-4, AQP-5, AQP-6 ve AQP-8 olmak üzere yedi farklı türdeşi bulunmaktadır. Ortodoks AQP'ler, diğer küçük moleküllere karşı daha az geçirgendir, buna karşın su için en geçirgen AQP'ler oldukları bildirilmiştir. İkinci grubu oluşturan GLP'lerin AQP-3, AQP-7, AQP-9 ve AQP-10 olmak üzere dört türdeşi içermektedir. GLP'ler daha geniş bir kanal çapına sahiptir ve gliserol, üre ve diğer küçük nötr solütlere karşı daha geçirgendir. Üçüncü grup ise süperaquaporinler olarak adlandırılır ve AQP-11 ile AQP-12'yi kapsamaktadır. Süperaquaporinler su ve nötr solütlerin hücre içi kompartımanlar arasındaki hareketinden sorumludur (Ribeiro vd., 2021).

Yapılan literatür taramalarında bazı AQP'ler için yeni terminolojilerin önerildiği de görülmektedir. Örneğin, amonyağı taşıyabilen AQP-3, AQP-4, AQP-6, AQP-7, AQP-8 ve AQP-9 kanalları amonyaporinler;  $H_2O_2$ 'yi taşıyabilen AQP-3, AQP-5, AQP-8, AQP-9 ve AQP-11 kanalları peroksiporinler olarak bilinmektedir (Ribeiro vd., 2021).



**Şekil 2.2.** Türdeşliklerine ve biyofiziksel özelliklerine göre AQP'lerin sınıflandırılması (Ribeiro vd., 2021).

AQP ekspresyonu, insanlarda oldukça geniş bir doku yelpazesine sahiptir (Şekil 2.3.) ve genellikle hücrelerin belirli bölgelerinde konumlanmaktadır (Day vd., 2014). Tüm AQP türdeşleri suyun taşınmasında ortak bir pasif mekanizma kullanırken, bunların düzenlenmesi ve hücresel dağılımı sistemler arasında önemli ölçüde farklılık göstermektedir (Conner vd., 2013).



**Şekil 2.3.** İnsanda AQP dağılımı. a) Retina: AQP-4, b) Koku epiteli: AQP-4, c) İç kulak: AQP-1 ve -4, d) Beyin: Astrosit AQP-4; Koroid pleksus AQP-1, e) Omurilik: AQP-1, -4 ve -8; Nükleus pulpozus hücreleri: AQP-1 ve -3; Osteoklast: AQP-9, f) Endotel: AQP-1, g) Kalp: AQP-4, h) Nefron: AQP-1, -2, -3, -4 ve -7, i) Tükürük bezleri: AQP-5, j) Gastrointestinal sistem: AQP-3, -4, -5 ve -9, k) Karaciğer: AQP-1, -8 ve -9, l) Pankreas: AQP-1 ve -8, m) Akciğer: AQP-3, -4, -5, n) Adiposit: AQP-7; Deri: AQP-1, -3, -5 ve -10, o) Kadın üreme sistemi: Yumurtalık AQP-7, -8 ve -9, p) Erkek üreme sistemi: Sperm hücresi AQP-3 ve -7.

(Day vd., 2014).

#### 2.1.4. AQP-9: Doku ve Organlardaki Dağılımı ve Önemi

İnsan lökositlerinde tanımlanmıştır ve birer GLP olan AQP-3 ve AQP-7 ile benzerlik göstermektedir. AQP-9, plazma membranından suyu ve çözünen maddeleri düzenli olarak taşımakta ve minimum düzeyde ozmotik bozulma ile metabolitlerin hızlı bir şekilde hücrenel girişine ve çıkışına izin vermektedir (Takata vd., 2004). AQP-9, hem suya hem de gliserol, üre, pürinler ve pirimidinler gibi yüksüz küçük çözünen maddelere karşı yüksek geçirgenlik göstermekte; ancak amino asitlere, siklik şekerlere veya inorganik iyonlara karşı geçirgenliği bulunmamaktadır. Diğer AQP'lerde olduğu gibi, AQP-9'un aktivitesi de civaya ve floretine karşı duyarlıdır. Benzer sonuçlar insanlarda da gözlenmiştir (Tsukaguchi vd., 1999; Takata vd., 2004).

AQP-9 ekspresyonu, özellikle sinüzoidal yüzeyde olmak üzere hepatositlerde gösterilmiştir. Açlık sonrasında adipositlerden plazmaya salınan gliserol, hepatositler tarafından alınarak glukoneogenezde substrat olarak kullanılmaktadır. Sıçanlarda 24-96 saatlik açlıktan sonra AQP-9 ekspresyonunun yirmi kata kadar arttığı tespit edilmiştir (Kitchen vd., 2015). Farelerde 18 saatlik açlıktan sonra hepatosit plazma membranında ölçülebilen AQP-9 ekspresyonunun on kat arttığı; hepatosit plazma membranı gliserol geçirgenliğinin ise iki kat arttığı ve bu artışın floretin ilavesiyle tersine çevrilebildiği gösterilmiştir (Fenton vd., 2004). Bu veriler, açlığın neden olduğu hipogliseminin hepatositler tarafından AQP-9 üzerinden gliserol alımının fizyolojik önemini desteklemektedir.

Üre, protein yıkımının nörotoksik bir ürünü olan amonyaktan karaciğerde üretilmektedir. Yetişkin bir insan idrarla birlikte günlük yaklaşık 25 g üre atmaktadır. Böbrekte üre taşınması, idrar konsantrasyon mekanizması için hayati öneme sahiptir. AQP'lerin üre taşınmasındaki fizyolojik önemi, su ve gliserol taşınmasındaki öneminden daha az bilinmektedir (Kitchen vd., 2015).

AQP-9 ekspresyonu hepatositler dışında, epididimal hücrelerde (Elkjær vd., 2000), nötrofiller, makrofajlar ve lenfositler gibi immün sistem hücrelerinde de (Da Silva ve Sovorel, 2021) tespit edilmiştir. Kemirgenlerde merkezi sinir sistemi (MSS) astrositlerinde, katekolaminerjik nöronlarda ve pia mater damarlarındaki endotel hücrelerinde AQP-9 ekspresyonu gösterilmiştir (Badaut vd., 2004). Buna karşılık,

insanların MSS’de AQP-9 ekspresyonu daha sınırlı düzeyde kalmaktadır (Lindskog vd., 2016). Gliserol ve laktik asit için geçirgendir (Tsukaguchi vd., 1999) ve bu yüzden su homeostazisine ek olarak beynin enerji metabolizmasında da rol aldığı düşünülmektedir (Badaut, 2010).

AQP-9, akut promiyelositik lösemi tedavisinde oldukça etkili bir antikanser ilacı olan arsenik trioksitin taşınmasına da aracılık etmektedir. Yapılan bir çalışmada ilaç yanıtı ile AQP-9 ekspresyon seviyesi ilişkilendirilmektedir (Leung vd., 2007).

Osteoklast farklılaşmasında, özellikle de tek çekirdekli öncül hücrelerin füzyon sürecinde daha yüksek AQP-9 mRNA seviyeleri rapor edilmiştir. Ayrıca, bir AQP-9 inhibitörü olan floretinin, osteoklast boyutunu ve osteoklast başına düşen çekirdek sayısını önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (Aharon ve Bar-Shavit, 2006).

## **2.2. Testis Histolojisi**

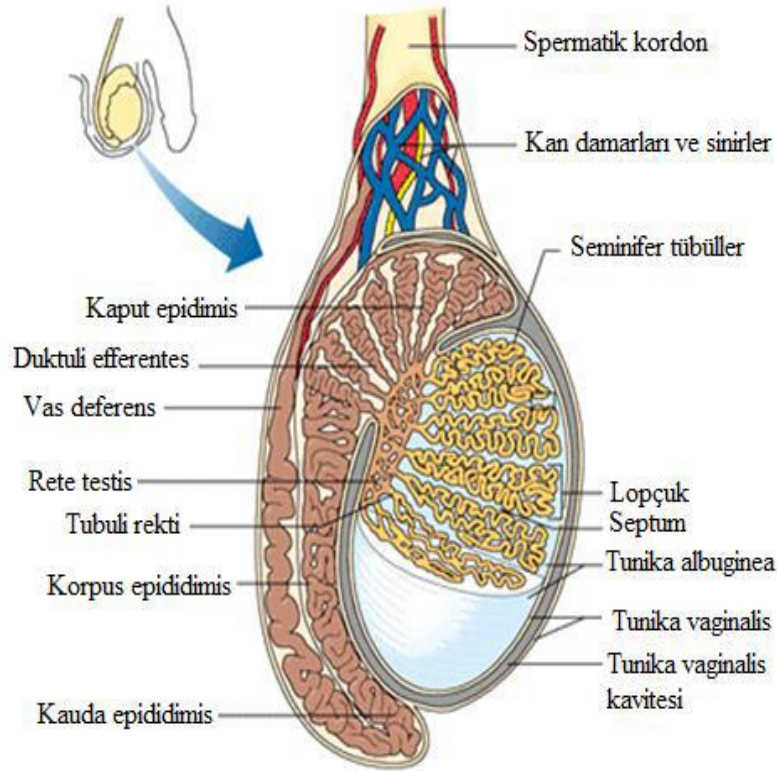
Erkek üreme sistemi testisler, genital kanallar, yardımcı bezler ve penisten oluşmaktadır. Testisin hormon salgılamak ve spermatozoon üretmek gibi iki yönlü görevi bulunmaktadır. Testiste üretilen başlıca hormon testosterondur, bununla birlikte erkek fizyolojisi için hem testosteron hem de metaboliti olan dihidrotestosteron gereklidir (Junqueira ve Carneiro, 2009).

Testisler tunika albuginea adı verilen sıkı bağ dokudan oluşan kalın bir kapsül ile kuşatılmıştır. Tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testis denilen yapıyı şekillendirmektedir. Testise mediastinumdan giren fibröz uzantılar (septum), testisi sayısı yaklaşık 250’yi bulan piramidal şekilli lobcuklara ayırmaktadır (Şekil 2.4.). Bu fibröz uzantılar kesintilidir ve genellikle lobcuklar birbirleriyle bağlantı kurar. Her lobcuk gevşek bağ doku ile sarıdır ve 1-4 adet seminifer tübül içermektedir. Seminifer tübülleri saran bağ doku içerisinde bol miktarda kan ve lenf damarı, sinirler ve Leydig hücreleri denilen interstisyel hücreler bulunmaktadır. Seminifer tübüller erkek üreme hücreleri olan spermatozoonları üretmekte, interstisyel hücreler ise testis androjenlerini salgılamaktadır (Junqueira ve Carneiro, 2009). Testisler, yapısal olarak seminifer tübüller ve interstisyel doku olmak üzere iki ana alana ayrılmaktadır (Ross ve Pawlina, 2014).



### 2.2.1. Seminifer Tübüller

İnsanda, her bir testiste 250-1.000 adet seminifer tübül bulunmakta ve yetişkin bir bireyin tüm seminifer tübüllerinde günlük yaklaşık  $2 \times 10^8$  spermatozoon üretilmektedir. Seminifer tübüllerin çapı 150-250  $\mu\text{m}$ , boyu 30-70 cm arasında değişmektedir. Bir testisteki tüm seminifer tübüllerin toplam uzunluğu yaklaşık 250 m'dir. Seminifer tübüller kıvrımlı seyretmekte olup uç kısımlarına doğru lümenleri daralmakta ve kısa boylu düz tübüllere (tubuli rekti) dönüşmektedir. Düz tübüller seminifer tübülleri, epitel ile örtülü kanalların oluşturduğu rete testis denilen labirente bağlamaktadır. Anastomozlaşan rete testis, 10-20 adet efferent kanal ile epididimin baş kısmına açılmaktadır (Şekil. 2.4.) (Junqueira ve Carneiro, 2009). Rete testis epiteli apikal silyumlara veya kısa mikrovilluslara sahiptir (Ross ve Pawlina, 2014).



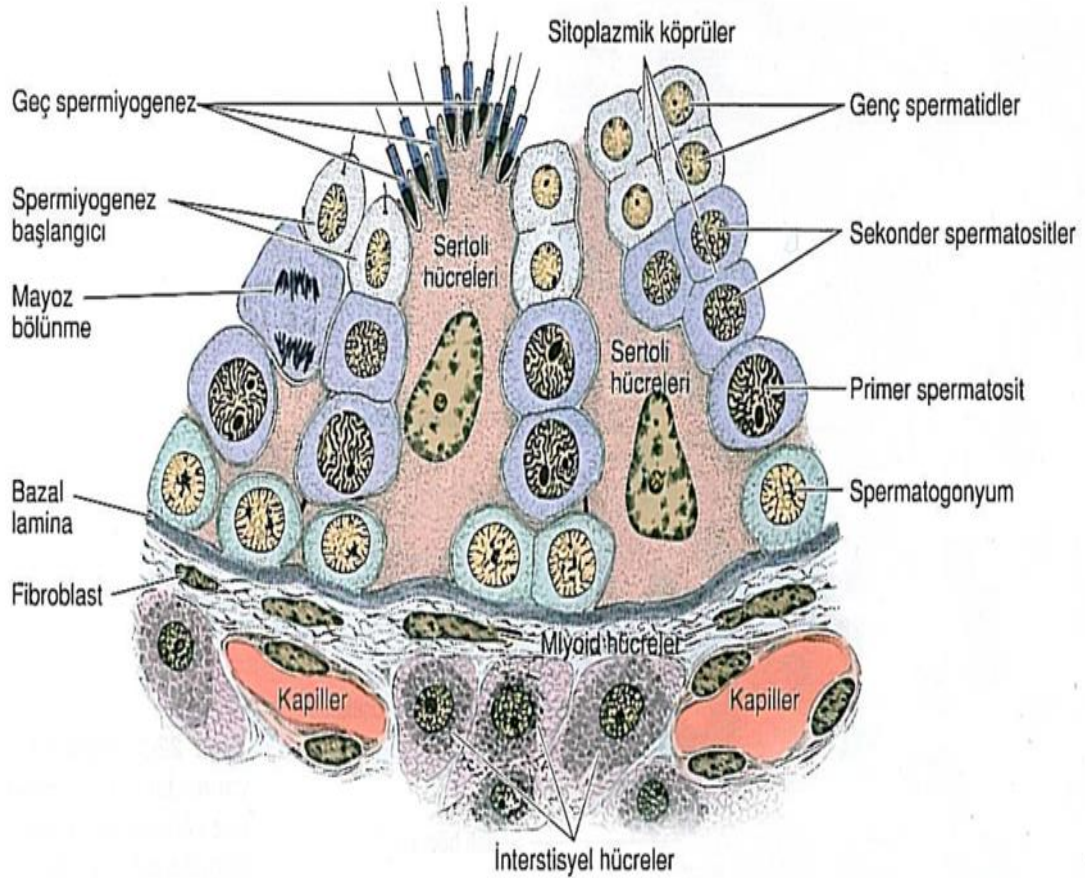
**Şekil 2.4.** Testisin anatomik yapısı

(Marieb, 2009; Şentürk, 2020).

Seminifer tübüller fibröz bir bağ doku kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir germinal veya seminifer epitelten oluşmaktadır. Seminifer tübülleri

çevreleyen fibröz tunika propriada birkaç tabaka halinde yerleşmiş fibroblast hücreleri, bazal laminaya yapışık konumlanan ve düz kas hücresi özelliği gösteren yassılaştırmış miyoid hücreleri bulunmaktadır. Seminifer tübüllerin arasındaki alanların büyük bölümünü interstisyel (Leydig) hücreler doldurmaktadır (Şekil 2.5.) (Junqueira ve Carneiro, 2009).

Seminifer tübüller merkezi bir lümene sahiptir ve duvarında özelleşmiş iki tip hücre topluluğu bulunur: Sertoli hücreleri ve spermatogenez hücreleri (Şekil 2.5.) (Gartner ve Hiatt, 2007).



**Şekil 2.5.** Bir seminifer tübülün ve onu çevreleyen dokunun bir bölümünün şematik görüntüsü (Junqueira ve Carneiro, 2009).

### **2.2.1.1. Sertoli Hücreleri**

Spermatogenetik hücreleri destekleyen ve olgunlaşmasında önemli görevleri bulunan hücrelerdir. Ergenliğe kadar seminifer tübül epitelinin baskın hücreleridir, ergenlikten sonra çoğalmazlar ve seminifer tübül hücrelerinin yaklaşık %10'unu oluştururlar (Ovalle ve Nahirney, 2007).

Sertoli hücreleri bazal membrandan seminifer tübül epiteline kadar uzanan, yaygın apikal ve lateral uzantılara sahip prizmatik hücrelerdir (Ross ve Pawlina, 2014). Taban kısımları bazal laminaya tutunmakta, tepe kısımları genellikle seminifer tübülün lümenine kadar uzanmaktadır. Spermatogenik seri hücrelerini çevreleyen çok sayıdaki lateral uzantıları nedeniyle Sertoli hücrelerinin sınırları ışık mikroskobu ile iyi tespit edilememektedir. Komşu Sertoli hücreleri arasında iyonları ve çeşitli kimyasalları taşıyan, adına gap junction da denilen aralık bağlantıları bulunmaktadır. Hücreler çok sayıda girinti, belirgin bir çekirdekçik ve az miktarda heterokromatin içeren, genellikle üçgen şeklinde ve uzamış bir çekirdek içermektedir (Junqueira ve Carneiro, 2009).

Komşu Sertoli hücreleri, bazolateral yüzlerindeki engelleyici sıkı bağlantılarla birbirlerine tutunarak kan-testis bariyerini (KTB) oluşturmaktadır. KTB' altında kalan bazal bölgede spermatogonyumlar bulunmaktadır. Spermatogenez sürecindeki spermatogonyumların bölünmesi sonucu oluşan hücreler bu sıkı bağlantılardan geçerek KTB'nin üzerindeki adluminal bölgeye ulaşmaktadır. Spermatozitler ve spermatidler, KTB'nin üzerindeki Sertoli hücrelerinin yan ve üst kenar uzantıları arasındaki girintilere yerleşmektedir. Spermatidlerin kamçı kuyrukları geliştikçe, Sertoli hücrelerinin üst uçlarından çıkan saçaklar halinde görünürler (Şekil 2.5.) (Junqueira ve Carneiro, 2009).

### **2.2.1.2. Spermatogenik Hücreler ve Spermatogenez**

Spermatogenetik hücreler, düzenli biçimde çoğalarak ve farklılaşarak olgun spermatozoonlara dönüşen hücrelerdir. Bu hücreler, testisin erken gelişimi sırasında yolk kesesinde oluşan ve gonad sırtlarında topluluk oluşturan primordiyal germ hücrelerinden gelişmektedir. Spermatogenetik hücreler, ileri gelişme evrelerinin zayıf tanımlanabilen tabakaları içinde, komşu Sertoli hücreleri arasında dizilmektedir. Bu

hücrelerden bazal kompartmanda yerleşenler spermatogonyumlar; adluminal kompartmanda yerleşenler ise primer spermatositler, sekonder spermatositler, spermatidler ve olgun spermatozoonlardır (Gartner ve Hiatt, 2007). Spermatogenik hücreler, komşu Sertoli hücreleri arasında ilerleyici bir gelişim göstermekte ve sınırları belirsiz tabakalar oluşturmaktadır (Ross ve Pawlina, 2014).

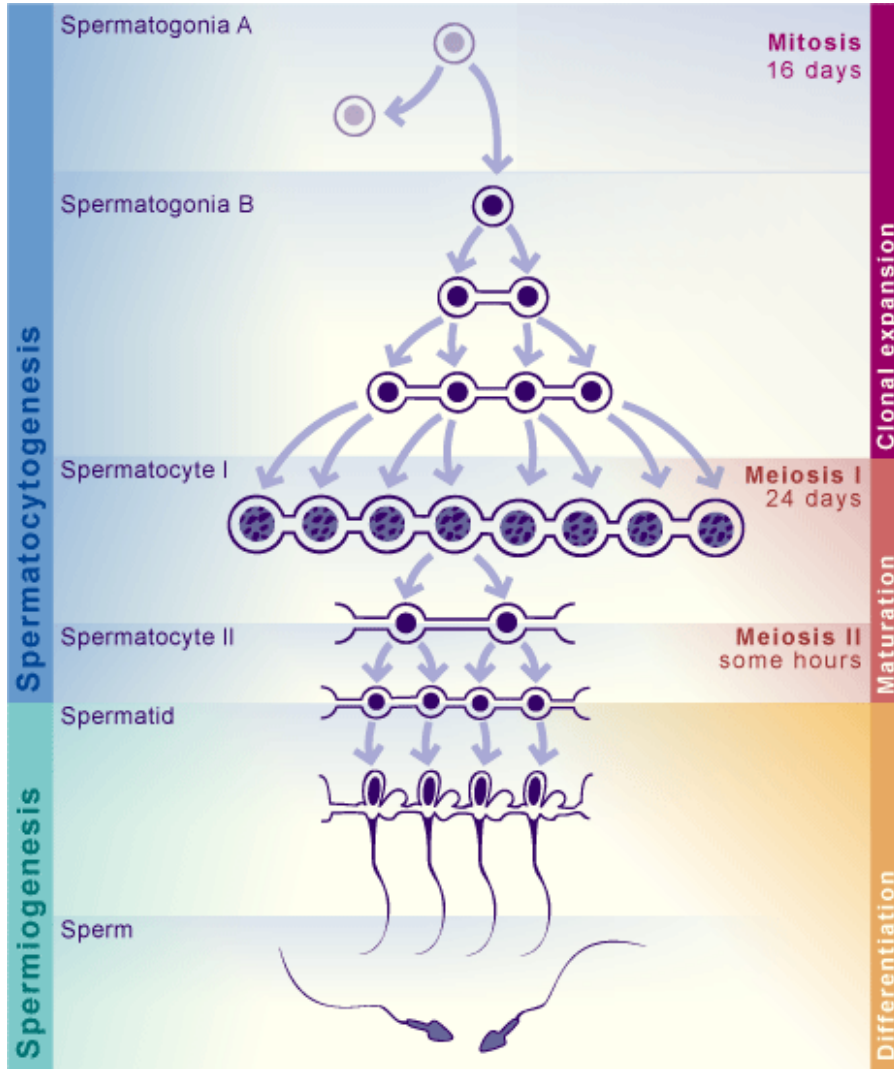
Spermatogenez, spermatogonyumlardan spermatozoon üretim sürecidir ve yaklaşık 12 µm çapındaki spermatogonyumların mitoz bölünme ile çoğalmaya başlaması ile başlamaktadır (Junqueira ve Carneiro, 2009). Spermatogonyumlar en ilkel germ hücreleridir ve seminifer tübülleri çevreleyen bazal laminanın hemen üzerine yerleşmektedir (Ross ve Pawlina, 2014).

Spermatogonyumlar sürekli çoğalarak yeni hücreleri meydana getirmektedir. Ergenlikten itibaren oluşan yeni hücreler iki yoldan birisini takip ederler: ya A tipi spermatogonyumlar olarak adlandırılan kök hücreler şeklinde bölünmeyi sürdürürler veya devam eden mitoz döngüleri boyunca farklılaşarak B tipi spermatogonyumları oluştururlar (Şekil 2. 6.). B tipi spermatogonyumlar primer spermatosit (spermatosit I) hücrelerine farklılaşan öncül (progenitör) hücrelerdir (Junqueira ve Carneiro, 2009).

Oluşmalarından hemen sonra primer spermatositler birinci mayoz bölünmenin profazına girmektedir. Birinci mayozun profazı yaklaşık 22 saat sürmesinden dolayı ışık mikroskopik kesitlerde görülen spermatositlerin büyük çoğunluğu primer spermatosit evresindedir. Primer spermatositler spermatogenez sürecinin en büyük hücreleridir ve çekirdeklerinde sarmallanma sürecinin değişik aşamalarındaki kromozomların bulunması ile tanınmaktadır (Şekil 2. 7.). Primer spermatositler 46 kromozomludur ve 4N (deoksiribonükleik asit) DNA içermektedir (Junqueira ve Carneiro, 2009).

Birinci mayoz bölünmenin bitiminde 23 kromozomlu primer spermatositlere göre daha küçük hücreler olan sekonder spermatositler meydana gelmektedir. Primer spermatositlerde 4N olan DNA miktarı, sekonder spermatositlerde 2N'ye düşmektedir. İnterfazda çok kısa süre kalarak hemen ikinci mayoza giren ve kısa ömürlü olmalarından dolayı sekonder spermatositlere testis kesitlerinde çok daha az rastlanmaktadır. İkinci mayozun bitiminde bir adet sekonder spermatositten iki adet

spermatid şekillenmektedir. Spermatozitlerde birinci ve ikinci mayoz bölünmeler arasında DNA sentezi görülmediği için, ikinci mayozdan sonra spermatiddeki DNA miktarı  $2N$ 'den  $1N$ 'e düşmektedir. Bölünmeler sonrasında haplooid sayıda kromozom ve  $1N$  miktarında DNA içeren spermatidler şekillenir (Junqueira ve Carneiro, 2009).



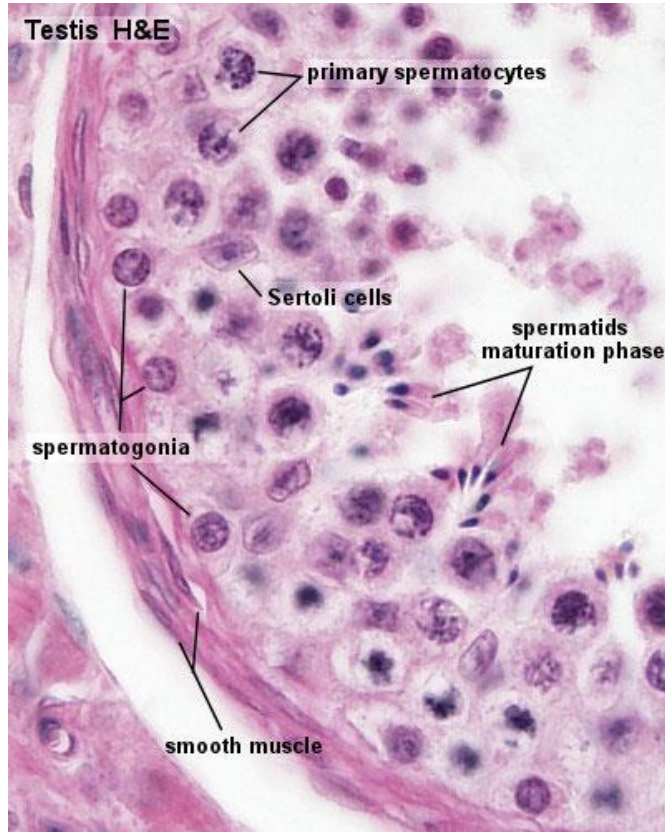
**Şekil 2. 6.** Spermatogonyumlardan sperm hücrelerinin üretim süreci

(<https://embryology.ch/en/>).

Spermatogonyumların mitoz ve spermatozitlerin mayoz bölünmelerindeki çekirdek bölünmesini tam bir sitoplazma bölünmesi takip etmez. Her hücre iki hücre oluşturmak üzere bölündüğünde, oluşan yeni hücreleri birbirine bağlı tutan sitoplazmik köprüler bulunmaktadır. Bu eksik bölünme biçimi birbirine bağlı spermatid sinsityumu oluşturmaktadır. Sitoplazma köprüleri, spermatogenetik

hücrelerin birbiriyle iletişimini sağlamakta ve aktivitelerini eş zamanlı olarak gerçekleştirmelerine olanak vermektedir (Şekil 2. 6.) (Gartner ve Hiatt, 2007). Spermatogonyumlardan spermatidlerin oluşumuna kadar geçen mitoz ve mayoz bölünme sürecine spermatositogenez denir (Şekil 2. 6.).

Spermatidlerin hareketli spermatozoonlara olgunlaştığı spermatogenezin son aşamasına spermiyogenez denir. Mayozun sona ermesinden sonra, haploid yuvarlak spermatidler, bir hücre iskeleti ağı ile küçük, non-polarize hücreler halinde spermiyogenezise girmektedir. Haploid spermatidler, yeniden yapılanmaya sürecinde, spermatozoonun fonksiyonunu destekleyen, benzersiz iskelet yapıları yeniden düzenlenmektedir (Kızılay ve Altay, 2019).



**Şekil 2. 7.** Erişkin bir bireyin testisindeki Sertoli hücrelerini ve spermatozoon gelişimini gösteren bir seminifer tübül kesiti (H & E boyama, X40)

(<https://embryology.med.unsw.edu.au/>)

Spermatidler, yaklaşık 8 µm çapında küçük ve yuvarlak şekilli hücrelerdir ve birbirlerine sitoplazmik köprülerle bağlanmaktadır (Şekil 2. 6.) ve küçük salkımlar oluşturmak suretiyle seminifer tübül lümenine doğru sarkmaktadır (Şekil 2. 7.). Sitoplazmaları kaba endoplazmik retikulum, mitokondri ve Golgi aygıtı yönünden zengindir. Spermatozoonlara farklılaşmaları sırasında, hidrolitik enzimler biriktirirler; organellerini yeniden düzenlerler ve sayılarını azaltırlar, kamçıyı ve ilişkili iskelet elemanlarını oluştururlar ve sitoplazmalarının bir kısmını atarlar. Bu farklılaşma olaylarını içeren sürece spermiyogenez denir (Şekil 2. 6.) (Ovalle ve Nahirney, 2007). Spermiyogenez birbirini takip eden dört alt evre halinde tanımlanmaktadır: Golgi Fazı, Akrozom Fazı, Kuyruk Oluşumu Fazı ve Olgunlaşma Fazı (Kızılay ve Altay, 2019).

#### ***a. Golgi Fazı***

Spermatidin Golgi aygıtında PAS (+) reaksiyon veren küçük proakrozomal granüller birikir. Proakrozomal granüller birleşerek zarla çevrili tek bir akrozom granülü oluşturur (Junqueira ve Carneiro, 2009). Simetrik ve yuvarlak şekilli olan spermatidler kutuplaşmaya başlar; bir uçta baş oluşur ve Golgi aygıtı yerleşerek akrozom enzimlerini üretir, diğer uçta mitokondri toplanır, distal sentriyol bir aksonem oluşturmaya başlar ve kalınlaşmış bir orta parça şekillenir. Spermatid DNA'sı yoğunlaşarak sıkıca paketlenir; paketlenen kromatin transkripsiyonel olarak inaktiftir (Kızılay ve Altay, 2019).

#### ***b. Akrozom Fazı***

Akrozom vezikülü ve granülü yoğunlaşan çekirdeğin ön yarısını kaplayacak şekilde yayılır ve akrozom adını alır. Akrozom hiyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve etkisi tripsine benzer bir proteaz gibi bazı hidrolitik enzimler içerir. Bu enzimler ovositleri çevreleyen korona radiata hücrelerini birbirinden ayırır ve zona pellusidayı sindirir. Spermatozoonlar bir oositle karşılaştığında, akrozomun dış zarı pek çok bölgede spermatozoonun plazma zarı ile kaynaşarak akrozom enzimlerinin hücre dışına boşalmasını sağlar. Bu hareket akrozom reaksiyonu olarak bilinmektedir (Junqueira ve Carneiro, 2009). Spermatozoonun ovosit-kümüls kompleksine penetrasyonu için apikal akrozom oluşumu gereklidir (Kızılay ve Altay, 2019).

### *c. Kuyruk (Kamçı) Oluşum Fazı*

Spermatidin baş kısmı seminifer tübülün tabanına doğru yönelir, aksonem lümenine doğru uzanır. Çekirdek uzar ve daha fazla yoğunlaşır. Sentriyollerden birisi gelişerek kamçıyı oluşturur. Mitokondriler kamçının proksimal kısmı etrafında toplanır ve kalınlaşmış bir bölüm olan orta parçayı meydana getirir. Burası spermatoon hareketlerinin enerji kaynağı olarak görev yapar (Junqueira ve Carneiro, 2009).

Kamçı modifiye bir silyumdur ve hareketlidir. Dış yoğun fibrilleri, bir mitokondrial kılıfı ve bir fibriler kılıfı ve uzunlamasına yerleşmiş 9 + 2 mikrotübül demeti ve bir aksonemi bulunur. Mikrotübüller, kamçının yapısını ve fonksiyonunu destekleyecek biçimde organize olur (Kızılay ve Altay, 2019).

### *d. Olgunlaşma Fazı*

Artık sitoplazma parçaları Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir ve spermatozoonlar seminifer tübülün lümenine bırakılır (Junqueira ve Carneiro, 2009).

## *Spermatozoonun Yapısal Özellikleri*

Spermatozoon baş ve kamçı (kuyruk) olmak üzere iki temel bölümden meydana gelmektedir.

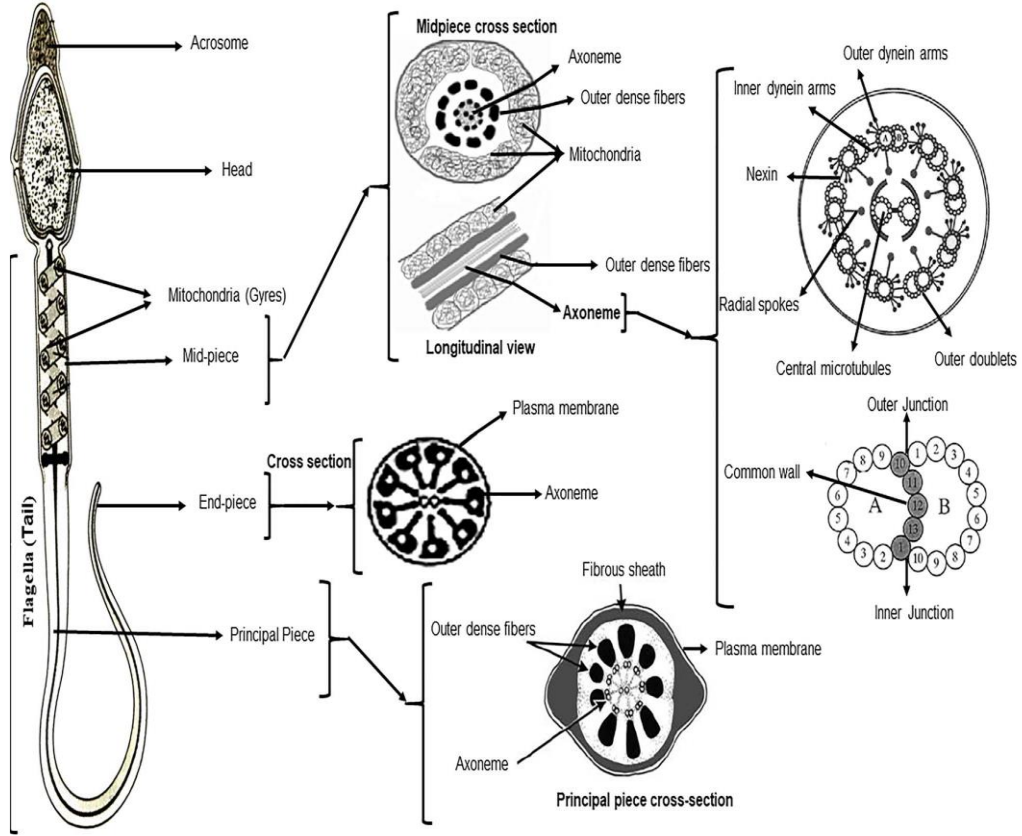
Baş, akrozom ile sarılmış çekirdekten oluşmaktadır (Şekil 2. 8.). Çekirdek yassılaştı ve yoğundur, ön yarımı akrozom ile örtülmektedir. Akrozom, ovositi kuşatan korona radiata hücrelerini ayıran ve zona pellisudayı eritebilen özellikteki hidrolitik enzimler içermektedir. (Özenci ve Akkoyunlu, 2006).

Spermatozoon kamçısı veya kuyruğu, 1000'den fazla protein içeren karmaşık yapıda özel bir silyum şeklindedir. Kuyruk dört bölümden oluşmaktadır; boyun, orta parça, ana parça ve son parça (Şekil 2. 8.). Son parça dışında, tüm uzunluğu boyunca yapısında aksonem ile periaxonemal yapılar bulunmaktadır. Son parça sadece plazma membranı ile çevrelenmiş aksonem içermektedir. Aksonem dışta dokuz çift ve merkezde bir çift mikrotübül demeti (9 + 2) içermektedir. Aksonemdeki dynein kollar



kuyruğun hareketinden sorumlu olup güç merkezi gibi görev yapmaktadır. Orta parçadaki periaksonemal yapılar, sarmallanmış mitokondriyal kılıftan oluşmaktadır. Orta parçanın bir diğer periaksonemal yapısı ise dış yoğun fibrillerdir. Dış yoğun fibriller, farklı türlerde boyundan başlayarak kuyruğun farklı noktalarında sonlanan dokuz sütundan meydana gelmektedir. Her bir sütun aşağı doğru incelenerek ana parçanın farklı noktalarında sonlanmaktadır. Dış yoğun fibriller spermatozoonları, epididimden taşınması sırasında ve ejakülasyonda çeşitli kuvvetlerin neden olabileceği hasarlara karşı korumaktadır. Bununla birlikte, spermatozoon hareketinde ve kapasitasyonda önemli roller de üstlenmektedir (Kumar ve Singh, 2021).

Ana parça, çevresel kafeslerle birbirine bağlanmış iki adet uzunlamasına seyirli sütundan oluşan bir fibröz kılıf ile çevrelenmektedir. En kalın uzunlamasına sütunlar ana parçanın ön kısmında bulunmakta olup, sütunlar geriye doğru giderek incelmektedir. Fibröz kılıf destekleme görevi yanında, glikoliz ve siklik adenosin monofosfat (cAMP) bağımlı sinyal iletimi sürecine katkıda bulunan proteinler için bir çatı görevi de görmektedir (Kumar ve Singh, 2021).



**Şekil 2. 8.** Spermatozoon kuyruğunun ultrastrüktürel şematik gösterimi. Orta parça, ana parça ve son parçanın enine ve uzunlamasına kesit görünümleri (Kumar ve Singh, 2021).

### 2.2.2. İnterstisyel Doku

Testisin seminifer tübüller dışındaki bölümlerini oluşturmakta ve çeşitli hücre tiplerini içeren interstisyel alanlardan meydana gelmektedir (Şekil 2. 5.). İnterstisyel alanlar ile seminifer tübüllerini birbirinden kollajen ve laminin içeren bir bazal membran ile peritübüler hücreler (genellikle peritübüler miyoid hücreleri olarak adlandırılır) ayırmaktadır (Heinrich ve DeFalco, 2020). İnterstisyel alanlardaki bağ doku içerisinde aynı zamanda sinirler, pencere tip kapiller damarlar ve lenf damarları bulunur (Junqueira ve Carneiro, 2009).

Hem insan hem de kemirgen testisinin interstisyel bölümünde peritübüler hücreler, vasküler endotelial hücreler, vasküler düz kas ve diğer perivasküler hücreler, Leydig hücreleri ve bunların farklılaşmamış mezenkimal öncülleri ile normal koşullar

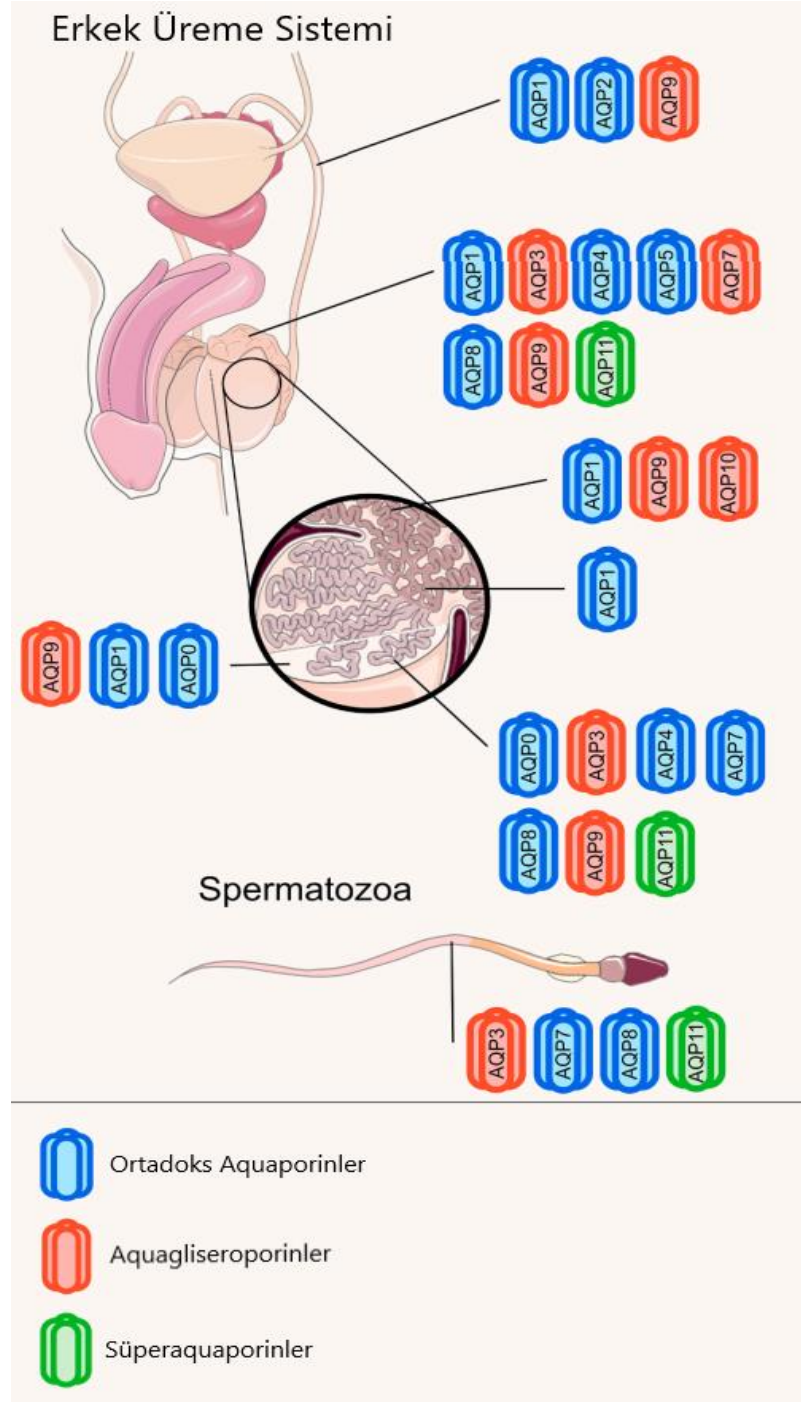
altında çoğunluğunu makrofajların oluşturduğu çeşitli bağışıklık sistemi hücreleri bulunmaktadır (Combes vd., 2009). Hücre topluluğunun %10-20'sini tek tek veya gruplar halinde bulunan Leydig hücreleri oluşturur (Bharath, 2017).

Leydig hücreleri büyük, yuvarlak veya çokgen şekillidir ve çekirdeği hücrenin merkezinde konumlanır. Eozinofilik boyanan sitoplazması küçük lipid damlacıklarından zengindir ve interstisyel hücreler olarak bilinirler. Leydig hücreleri erken fetal yaşamda farklılaşarak testosteron üretmeye başlamaktadır (Ross ve Pawlina, 2014). Mitokondrilerinde ve düz endoplazmik retikulumlarındaki enzimleri sayesinde erkeklik hormonu olan testosteronu üretmektedir. Testosteron spermatogenez, embriyonal ve fetal yaşam sırasındaki cinsiyet farklılaşması ve gonadotropin salgısının kontrolü açısından oldukça önemlidir. Testislerden az miktarda salgılanan ve testosteronun metaboliti olan dihidrotestosteron, bazı dokularda testosteronun enzimatik dönüştürümü ile üretilmektedir. Ergenlikten itibaren çoğu organ ve doku üzerine etki göstermektedir (Junqueira ve Carneiro, 2009).

### **2.2.3. Testis Hücrelerinde AQP-9 Ekspresyonu**

AQP-9'un hücreler, kan damarları ve interstisyel alanda su ve yüklü olmayan çözünen moleküllerin taşınmasına aracılık etmektedir. AQP-9 testisler başta olmak üzere erkek üreme sisteminde oldukça geniş bir hücre dağılım yelpazine sahiptir (Şekil 2.9.) (Ribeiro vd., 2021). AQP-9, erkek üreme sisteminde, özellikle de epididimde en çok çalışılan ve bol miktarda tespit edilen AQP'dir. Sürekli eklenen yeni kanıtlar, AQP-9'un temel fonksiyonunun geri emilim/sekresyon dinamikleri ve boşaltım kanalları boyunca çözünen maddelerin taşınması ile ilgili olduğunu onaylamaktadır (Da Silva vd., 2006).

Bilinen çoğu AQP izoformu testis ve erkek üreme kanallarında bulunduğu bildirilmiş olsa da, bu izoformlardan sadece AQP-0, AQP-4, AQP-8 ve AQP-9 gibi sadece birkaçı Sertoli hücrelerinde gösterilmiştir. Ancak bu veriler bazen tutarlılık göstermemektedir (Bernardino vd., 2016).



**Şekil 2.9.** Erkek üreme sistemi AQP'leri ve organlardaki temsili lokasyonları (Ribeiro vd., 2021).

İnsan Sertoli hücrelerinde AQP-9 ekspresyonu gösterilmiştir (Yeung vd., 2010). Fare Sertoli hücrelerinde gerçekleştirilen fonksiyonel çalışmalar östrojen tedavisinin gliserol taşınmasında azalmaya ve AQP-9 geninde downregülasyona neden

olduğunu bildirmiştir. Gliserol, spermatogenez ve testis morfolojisi için gerekli bir substrattır. Bu durum Sertoli hücrelerinde AQP'lerin ekspresyonunun erkek fertilitesi için gerekli olduğunu kanıtlamaktadır (Bernardino vd., 2018).

Varikoselli ergenlerin Sertoli hücrelerindeki AQP-9 ekspresyonu sağlıklı ergenlere göre azalmaktadır. Araştırmacılar, AQP-9'un Sertoli hücrelerinden germ hücrelerine laktat taşınmasında görev alabileceğini ve varikoselli hastaların germ hücrelerinde laktat eksikliğine neden olabileceğini öne sürmektedir. Laktat, gelişen germ hücrelerinde enerji üretimi için kullanılan bir substrattır ve germ hücrelerinde anti-apoptotik etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Varikoselli hastalarda bildirilen spermatogenik hızdaki yavaşlamanın AQP-9 downregülasyonuna bağlı gelişen laktat eksikliği ile açıklanabileceği düşünülmektedir (Bernardino vd., 2018).

Yapılan bir çalışmada, fare spermatozoonunda AQP-9 transkriptleri tespit edilmekle birlikte, antikor spesifik görünmediğinden immüno blotlama sonrasında AQP-9 varlığı doğrulanamamıştır (Yeung vd., 2009). Ayrıca Vicente-Carrillo vd. (2016), epididimal ve ejaküle domuz spermatozoonlarının baş bölümlerinde AQP-9 ekspresyonunu göstermişler ve bu proteinin soğutma, dondurma ve çözme prosedürlerinde önemli rol oynadığını ileri sürmüşlerdir.

Sıçanlar, koyunlar, domuzlar, kediler, köpekler ve atlar gibi canlı türlerinde, Leydig hücrelerinin plazma membranında, efferent kanallardaki silyasız hücrelerin mikrovilluslarında, tüm epididimal bölgelerdeki prensipal hücrelerin mikrovilluslarında ve prostat ve anterior prostatın epitel hücrelerinde AQP-9 ekspresyonu gösterilmiştir (Yeste vd., 2017). Yapılan immunohistokimyasal çalışmalarda, sıçan Leydig hücrelerinin plazma membranında ve sitoplazmasında AQP-9 varlığı tespit edilmiştir (Elkjær vd., 2000; Nihei vd., 2001). Leydig hücrelerinin plazma membranındaki AQP-9 varlığı immünoelektron mikroskopi ile de teyit edilmiş, ancak seminifer tübüllerde veya interstisyel damarlarda gösterilememiştir (Nihei vd., 2001). AQP-9'un köpek testislerinde eksprese edilemediğini bildiren Domeniconi vd. (2007)'nin bulgusu hariç tutulacak olursa, bazı araştırmacılar, insan (Arena vd., 2010) ve sıçan (Elkjær vd., 2000; Nicchia vd., 2001) Leydig hücrelerinde AQP-9 ekspresyonunu göstermişlerdir.

### 2.3. Fiksasyon

Bilim insanları doku işleminin ilk adımında dokunun görünen mikroanatomisini sabitlemek zorundadır. Fiksasyon, hücre içi ve hücre dışı bileşenleri "sabitlemek" için kullanılan bir sürecin adıdır. Fiksasyon, özellikle histokimyasal, in situ hibridizasyon ve immünohistokimya gibi mikroanatomiyi ve mikrofizyolojiyi destekleyen yöntemler ile uyumlu olmalıdır. Bunun için, doku veya organ canlı organizmadan çıkarıldıktan sonra, fiksasyondan dokunun organizasyonel yapısını ve kimyasal bileşimini oldukça iyi koruması ve meydana gelebilecek değişiklikleri en aza indirmesi beklenmelidir (Grizzle, 2009a).

Fiksasyon, doku işleme sürecinin en temel basamağıdır ve doku bileşenlerinin otolizini ve bozulmasını önlemek için gerçekleştirilmektedir. Fiksasyonu yapılan doku ve organlar kesit alındıktan sonra mikroskopik olarak gözlemlenebilir hale gelmektedir (Howat ve Wilson, 2014). Fiksasyonun avantajları yanında getirdiği bazı dezavantajlar da bulunmaktadır. Doku şişmesi veya büzüşmesi, histokimyasal ve immünohistokimyasal boyama kalitesinin düşmesi, biyokimyasal analiz sonuçlarında sapma bu dezavantajlardan bazılarıdır (Eltoum vd., 2001).

Dokuya nüfuz etme hızı, fiksatif sıcaklığı ve fiksatifte kalma süresi fiksasyonu etkileyen faktörlerdir ve doku işleme yöntemini belirleme üzerine etki etmektedir. Fiksatifin sıcaklığı fiksatifin dokuya nüfuz etme hızını etkilemektedir; sıcaklık artışı fiksasyonu hızlandırmakta, sıcaklık azalması fiksasyonu yavaşlatmaktadır (Howat ve Wilson, 2014).

Rutin doku fiksasyonu için çok çeşitli türde fiksatifler bulunmaktadır. Bunlardan bazıları sadece son on yıldır kullanılmakta olup, formaldehit hemen hemen bir asırdan fazla süredir doku fiksasyonu için kullanılmaktadır. Günümüzde rutinde kullanılan standart kimyasal fiksatifler genellikle “denatüre eden fiksatifler” ve “çapraz bağlar oluşturan fiksatifler” olmak üzere iki alt kategoriye ayrılmaktadır (Howat ve Wilson, 2014).

### 2.3.1. Formaldehit

Hiç şüphe yok ki etki mekanizması en çok araştırılan fiksatifdir. İlk olarak 1859'da keşfedilen formaldehitin uygulamalardaki kullanımını Ferdinand Blum'un çalışmalarıyla tanımlanmıştır (Howat ve Wilson, 2014).

Formaldehit, düşük moleküler ağırlığa (MA = 30) sahiptir ve gaz halinde bulunmaktadır. Genellikle formaldehit gazının doyma noktasına kadar su içerisinde kabarcıklar halinde geçirilmesiyle elde edilen %37'lik çözelti formunda bulunmaktadır. Formaldehitin %10'luk çözeltisi olan %4'lük formaldehit Histoloji laboratuvarlarında en yaygın kullanılan formaldehit formudur ve suda seyreltilerek (formalin) veya tamponlanmış çözelti (NTF) halinde kullanılmaktadır (Howat ve Wilson, 2014). Tamponsuz formaldehitin raf ömrü kısadır ve zamanla formik aside oksitlenmesi nedeniyle pH'ında düşüşler görülmektedir. Formik asit, asit formaldehit olan hematin ile reaksiyona girerek, kahverengi-siyah renkte artefakt pigmenti oluşturmaktadır (Rolls vd., 1994).

Formaldehit çözeltisinin aktif bileşeni, formaldehitin sulandırılmış formu olan metilen glikoldür ve bu iki kimyasal metilen glikolü destekleyen bir denge halinde çözelti içinde birlikte bulunmaktadır (Howat ve Wilson, 2014). Formaldehit fiksasyonunda, aldehitler doku proteinlerinin çapraz bağlanmasını sağlayarak metilen köprüleri oluşturmaktadır (Hewitson vd., 2010). Formaldehitin doku proteinlerine bağlanması nispeten hızlı, metilen köprülerinin oluşumu ise oldukça yavaş gerçekleşmektedir. Bu nedenle formalin fiksasyonu uzun zaman gerektirmektedir (Huang ve Yeung, 2005). Nüfuz etme hızı için genel kural olarak 1 mm/saatlik hız uygulanmakta olup NTF fiksasyonu için 24 saatlik bir fiksasyon süresi önerilmektedir. Formaldehitin nüfuz etme hızı ile fiksasyon hızı arasındaki paradoksun, metilen glikolün hızlı nüfuz etme ve formaldehitin yavaş fiksasyon hızından kaynaklanabileceği öne sürülmektedir (Howat ve Wilson, 2014).

Formaldehit dokuda molekül içi ve moleküller arası çapraz bağlar oluşturmak suretiyle etki göstermektedir. Başlıca çapraz bağlar, zamanla metilen köprülerinin oluşumuyla sonuçlanan lizinin yan zincirindeki amino grupları arasında gerçekleşmektedir. Formaldehit en çok lizin, arjinin, tirozin, asparajin, histidin,

glutamin ve serin amino asitlerini etkilemektedir (Howat ve Wilson, 2014). Formaldehit proteinleri korumakla birlikte, glikojen ve mukopolisakkaritler üzerine herhangi bir etkisi bulunmadığından karbonhidratları göstermek için tercih edilmemektedir (Mete, 2004). Formaldehit hücrenin diğer bileşenlerini hafifçe koagüle etmekle birlikte hücre proteinlerini çöktürmemektedir. Albümin gibi bazı hücre bileşenleri doku takibi sırasında kullanılan alkol serilerinin dokuyu sertleştirmesini engellemektedir (Prophet, 1992).

Depolamaya bağlı polimerleşmesini önlemek için formaldehit fiksatifine metanol ilave edilebilir. Uzun süreli depolamalarda formaldehit çözeltisinde formik asit oluşumuna rastlanmaktadır. Metanol ve formik asit dokularda olumsuz etkilere neden olabilir. Bu durumda fiksasyon için yeni formaldehit çözeltisi hazırlanmalıdır (Huang ve Yeung, 2005).

### **2.3.2. Bouin Fiksatif**

İlk kez 19. yüzyılın sonlarında Pol Andre Bouin tarafından tanımlanmıştır (Howat ve Wilson, 2014). BF %5 asetik asit, %9 formaldehit ve %1,5 pikrik asit içermektedir (Ellenburg vd., 2020). BF proteinleri hem koagüle ederek hem de proteinler arasında çapraz bağlar oluşturarak etki göstermektedir. Dokuya yavaş nüfuz eden pikrik asit proteinleri koagüle etmekle birlikte, proteinlere karşı bilinen bir kimyasal etkileşimi bulunmamaktadır. Buna karşın, asetik asit dokuya nispeten hızlı nüfuz etmekte ve pikrik asitin yol açtığı doku büzülmesini engellemektedir (Howat ve Wilson, 2014). BF eritrositleri kısmen veya tamamen parçalamaktadır. Demir ve kalsiyum depolarını tüketmesinden dolayı kollajende şişmeye yol açmakta, ancak glikojen ve bağ dokuyu iyi korumaktadır. BF sitoplazmik boyalar ile parlak renkte boyanmaya neden olmakta, bileşimindeki pikrik asitin sitoplazma bazofilikliğini zayıflatmasından dolayı çekirdek ve sitoplazmanın daha belirgin ayırt edilmesine olanak vermektedir. BF kromozomlarıyla birlikte çekirdeği iyi korumaktadır (Bancroft ve Gamble, 2019). Pikrik asit, nükleoproteinleri çöktürmekte, sitoplazmik boyalarla parlak boyanma sağlamaktadır (Tapul vd., 2012). BF ile fikse edilen dokularda, kusurlu boyamayı önlemek için pikrik asiti çıkarmak amacıyla birden fazla alkol serilerinden geçirilmelidir. Bileşimindeki pikrik asit mutajeniktir ve patlayıcı özellik göstermesinden dolayı güvenli kullanım alanı kısıtlıdır. (Ellenburg vd., 2020).



BF beyin ve embriyo gibi yumuşak dokular, küçük biyopsiler ve özellikle testis biyopsilerinin fiksasyonu için tercih edilmektedir (Tapul vd., 2012).

### **2.3.3. Modifiye Davidson Fiksatif**

BF'ye benzerlik göstermekle birlikte, BF'deki pikrik asitin yerine alkol kullanılmaktadır. Bileşiminde formalin, asetik asit ve alkol bulunmaktadır. Dokulara hızlı nüfuz etmekte, formalin prosedürlerine göre dokulara daha az zarar vermektedir (Kelder vd., 2008). mDF çekirdek detayını iyi göstermekte, ancak diğer fiksatiflerde olduğu gibi, mikroskopik yorumlamayı etkileyebilen bazı kusurlar da ortaya çıkarabilmektedir. Glasiyal asetik asit nükleik asitler için koagülatif, ancak sitoplazmik proteinler için koagülatif olmayan bir fiksatifdir. Proteinlere çok hızlı nüfuz etmekle birlikte proteinlerde şişme etkisi oluşturabilmektedir. Ancak bu şişme etkisi doku büzülmesine de neden olan, proteinleri denatüre eden koagülatif bir fiksatif olan alkol tarafından engellenebilmektedir (Carlson, 1996).

mDF kemik iliği örnekleri, jinekolojik materyaller, meme dokusu, tümörler, özellikle göz ve testis dokuları, lenf düğümleri ve biyopsi materyalleri gibi çeşitli dokuların fiksasyonu için iyi bir tercihtir. Bununla birlikte eritrositlerde lizise neden olabilmektedir. Doku büzülmesine yol açmaması ve formalin pigmentasyonunu asgari düzeyde tutması bu fiksatif için önemli bir avantajdır. Dokulardan kolay çıkarılabilmesinden dolayı, uzun süreli mDF fiksasyonundan sonra durulamaya ihtiyaç yoktur. mDF fiksasyonundan sonra yapılan immünohistokimyasal boyamalarda başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Eltoum vd., 2001; Latendresse vd., 2002).

### **2.3.4. Stieve's Fiksatif**

Formaldehit, distile su, merkürük klorit ve asetik asitten oluşan bir fiksatifdir. Cıvalı tespit solüsyonu olduğu için metal kullanılmadan hazırlanır (Turhan, 2019).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Deney Hayvanları

Bu tez çalışması, daha önce Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 20.10.2015 tarihli ve 2015-12/07 sayılı toplantısında alınan Etik Kurulu Onayı (bkz. EK-2) ile yapılan "Testisin stereolojik metotlar ile incelenmesinde farklı fiksatiflerin etkilerinin karşılaştırılması" (Turhan, 2019) adlı yüksek lisans tezinde kullanılan erkek Spague-Dawley cinsi sıçanlardan fiksatif dağılımı eşit olacak şekilde her grup için rastgele seçilmiş 6'şar adet testis dokusu kullanıldı.

#### 3.2. Kullanılan Gereçler

##### 3.2.1. Kimyasallar

- %10'luk nötral tamponlu formaldehit (%10'luk NTF)
- Bouin fiksativi (BF)
- Modifiye Davidson fiksatif (mDF)
- Stieve's fiksativi (SF)
- Ultra V Block (Thermo Scientific: TA-060-UB)
- Biotinylated Goat Anti-Polyvalent Plus (Thermo Scientific: TP-060-BNS)
- Streptavidin Peroxidase Plus (Thermo Scientific: TS-060-HRS)
- AQP-9 Antibody, 100 µg (Biorbyt: orb10127)
- AEC Kromojen Kiti, 60 ml (Thermo Scientific: TA-060-HA)
- Sitrat Buffer
- Hematoksilen
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Aqueous Mounting Medium

##### 3.2.2. Alet ve Teçhizat

- İnce uçlu pens
- Otomatik pipetör (Thermo Scientific: FinnpiPETTE)

- 1-10 µl'lik mikropipet (Eppendorf)
- 10-100 µl'lik mikropipet (Eppendorf)
- 10-200 µl'lik mikropipet (Eppendorf)
- 100-1000 µl'lik mikropipet (Eppendorf)
- 10 µl, 100 µl, 200 µl ve 1000 µl'lik mikropipet uçları
- Eppendorf tüp
- Lam (Isolab)
- Lamel (Isolab)

### **3.2.3. Cihazlar**

- İnkübatör
- Santrifüj
- Buzdolabı
- Hassas terazi
- Mikrodalga fırın
- Işık mikroskobu (Zeiss: Primo Star)
- Nikon Eclipse Ni Dik Mikroskop
- Humidity Chamber (Thermo Scientific)

### **3.2.4. Yazılımlar**

- Nikon Nis Elements AR
- ImageJ

## **3.3. Yöntem**

### **3.3.1. Deney Grupları**

Dokuların fiksasyonunda kullanılan fiksatif türü dikkate alınarak dört ayrı çalışma grubu oluşturuldu:

- BF (B),
- %10'luk NTF (N),
- mDF (MD),
- Stieve's (S).

### 3.3.2. Fiksatiflerin Hazırlanması (Turhan, 2019)

#### ***%10'luk Nötral Tamponlu Formaldehit (%10 NTF)***

Musluk suyu .....	900 ml
Formalin (%37'lik formaldehit solüsyonu).....	100 ml
Sodyum fosfat monobazik monohidrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ).....	4,0 gr
Sodyum fosfat dibazik anhidroz ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ).....	6.5 gr

900 ml musluk suyunda sodyum fosfat monobazik monohidrat ve sodyum fosfat dibazik anhidroz karıştırılarak eritildi ve 100 ml formalin ile karıştırılır.

#### ***Bouin Fiksatif (BF)***

Doymuş sulu pikrik asit solüsyonu .....	1500 ml
Formalin (%37'lik formaldehit solüsyonu) .....	500 ml
Glasiyel asetik asit .....	100 ml

Önce doymuş sulu pikrik asit hazırlanır. Distile su ile hazırlanan %2,1'lik pikrik asit doymuş bir solüsyon oluşturacaktır. 1500 ml doymuş pikrik asit solüsyonuna sırasıyla formalin ve glasiyel asetik asit eklenir.

#### ***Modifiye Davidson Fiksatif (mDF)***

Distile su .....	500 ml
Formalin (%37'lik formaldehit solüsyonu) .....	300 ml
Etanol .....	150 ml
Glasiyel asetik asit .....	50 ml

Tüm sıvılar belirtilen hacimlerde ve sırasıyla karıştırılarak çözelti hazırlanır.

#### ***Stieve's Fiksatif (SF)***

Distile su .....	760 ml
Merkürit klorit .....	50 gr
Formalin (%37'lik formaldehit solüsyonu) .....	200 ml
Glasiyel asetik asit .....	40 ml

Merkürüt klorit distile suda eritilir, üzerine formalin ve glasiyel asetik asit eklenir.

### 3.3.3. Fiksasyon ve Doku Takibi

Çalışmada kullanılan testislerin fiksasyonu aşağıdaki basamaklar sırasıyla takip edilerek gerçekleştirildi (Turhan, 2019).

- ***%10'luk Nötral Tamponlu Formaldehit Fiksasyonu:***
  - 6 adet testis dokusu %10'luk NTF fiksatifinde 48 saat bekletildi.
  - Dokular akan musluk suyunda 4 saat yıkandı.
  - Dokular sırasıyla %70'lik ve %90'lık etil alkollerde toplam 48 saat bekletildi ve doku takibine başlandı.
  
- ***Bouin Fiksasyonu:***
  - 6 adet testis dokusu BF'de 24 saat bekletildi.
  - Dokular %70'lik etil alkole alındı, 48 saat sonra %70'lik etil alkol değiştirildi. Dokular %70'lik etil alkolde toplam 120 saat bekletildi.
  - Dokular %90'lık etil alkole alındı ve doku takibine başlandı.
  
- ***Modifiye Davidson Fiksasyonu:***
  - 6 adet testis dokusu mDF'de 24 saat bekletildi.
  - Dokular %70'lik etil alkolde toplam 48 saat bekletildi.
  - Dokular %90'lık etil alkole alındı ve doku takibine başlandı.
  
- ***Stieve's Fiksasyonu:***
  - 6 adet testis dokusu SF'de 24 saat bekletildi.
  - Dokular %70'lik etil alkolde toplam 96 saatlik bekletildi.
  - Dokular %90'lık etil alkole alındı ve doku takibine başlandı.

Doku takibi için dokular sırasıyla artan derecedeki alkol serilerinden geçirildi, 30 dakika ksilende bekletildi. Dokular ksilenden sonra 1 saat 15 dakika parafinde

bekletilerek parafınle bloklama yapıldı. Son olarak Thermo Fisher Scientific Shandon Finesse 325 model mikrotom ile 5 µm'lik ince kesitler alındı. Doku takibi prosedüründeki basamaklar Tablo 3.2'de sırasıyla gösterilmiştir (Turhan, 2019).

**Tablo 3.1.** Doku takip protokolü (Turhan, 2019).

Gün	Saat	İşlem
1. Gün	09:00	%70'lik Alkol
	16:00	%90'lık Alkol
2. Gün	16:00	%96'lık Alkol I
3. Gün	09:00	%96'lık Alkol II
4. Gün	16:00	%100'lük Alkol I
5. Gün	09:00	%100'lük Alkol II
	10:00	%100'lük Alkol III
	11:00	Ksilen I
	11:15	Ksilen II
	11:30	Ksilen III
	11:45	Parafın I
	12:30	Parafın II
	13:00	Parafın III
	14:00	Bloklama

### 3.4. İmmünohistokimyasal İncelemeler

Fikse edilmiş testislerdeki AQP-9 proteininin lokalizasyonunu ve boyanma şiddetini belirlemek için testis kesitlerine AQP-9 antikoru ile immün işaretleme yapıldı. Anti AQP-9 antikoru (Biorbyt, orb10127) ile immün işaretleme yapmak için kesitlere uygulanan immünohistokimyasal işlem basamakları aşağıdaki sıra takip edilerek gerçekleştirildi (Işıldar vd., 2022):

1. Deparafinizasyon için kesitler 56°C'lik etüvde bir gece süreyle bekletildi.
2. Dehidrasyon için kesitler artan dereceki etil alkol serilerinden geçirildi:
  - %100'lük etil alkol (2 x 3 dakika),
  - %96'lık etil alkol (1 x 3 dakika),
  - %90'lık etil alkol (1 x 3 dakika),
  - %70'lik etil alkol (1 x 3 dakika),
  - %50'lik etil alkol (1 x 3 dakika).
3. Kesitler distile su ile yıkandı (5 dakika x 2).
4. Antijen iyileştirme için kesitler mikrodalga fırında, maksimum sıcaklıkta, Tween-20'li sitrat buffer (pH=6) ile 10 kez ön işlemde geçirildi. Her ön işlem ilk baloncuk oluşumunda durduruldu ve kesitler 2 dakika süre ile soğutuldu. Toplamda 10 kez baloncuk oluşumu takip edildi, 9 kez soğutma işlemi yapıldı.
5. Oda sıcaklığına düşürülen kesitler Tween'li phosphate buffer saline (PBS) [TBS] ile yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için kesitler %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içerisinde 10 dakika süre ile karanlık ortamda bekletildi.
6. Kesitler kurutuldu, PBS'e alındı ve etrafı hidrofobik kalemle çizilerek PBS ile yıkandı (3 x 5 dakika).
7. Nonspesifik antikor bağlanmalarını önlemek için kesitler 5 dakika süre ile blok solüsyonunda (Thermo Scientific Ultra V Block TA-060-UB) bekletildi.
8. Yıkaması yapılmayan kesitler 1:400 oranında sulandırılmış Anti-AQP9 (Biorbyt, orb10127) antikorunda +4 °C'de 1 gece bekletildi. Negatif kontrol gruplarına primer antikor uygulanmadı.
9. TBS ile 3'er kez 5'er dakikalık yıkama sonrasında kesitler antikor kiti protokolünde belirtildiği gibi 10 dakika süre ile biyotinlenmiş sekonder

antikor solüsyonunda (Thermo Scientific Biotinylated Goat Anti-Polyvalent Plus, TP-060-BNS) bekletildi.

10. TBS ile 3'er kez 5'er dakikalık yıkama sonrasında kesitler kit protokolünde belirtildiği gibi streptavidin peroksidaz (Thermo Scientific Streptavidin Peroxidase Plus TS-060-HRS) solüsyonunda 10 dakika süre ile bekletildi.
11. TBS ile 3'er kez 5'er dakikalık yıkama sonrasında kesitler yeterli reaksiyon elde edilinceye kadar Thermo Scientific (TA-060-HA) aminoetil karbazol (AEC) kromojen uygulamasına tabi tutuldu ve ardından distile suya alındı.
12. Çekirdek boyaması için kesitler 30 saniye süre ile 1:1 oranındaki hematoksilende bekletildi ve son olarak kesitler aqueous mounting solüsyonu kullanılarak kapatıldı.

### **3.5. Görüntüleme ve Analiz**

İşaretlenmiş kesitler Nikon Eclipse Ni ışık mikroskobu altında incelendi ve NIS-Elements BR programı ile görüntü analizi yapıldı. Analizde her fiksatif grubu için 6'şar adet testis dokusu kullanıldı. Her testis dokusu için 10'ar adet farklı mikrograf olacak şekilde 10'ar adet seminifer tübül ve çevresi incelendi. AQP-9 immün boyamanın şiddeti semikantitatif H-skor yöntemi ile değerlendirildi. Boyamanın şiddeti şu şekilde skorlandı; boyama görülmedi = “ - “; zayıf şiddette boyama = “ + ”; orta şiddette boyama = “ ++ ”; şiddetli boyama = “ +++ ”.

Görüntülerde seminifer tübül çapı, seminifer epitel yüksekliği ve seminifer tübül lümen çapı ImageJ yazılımındaki dijital cetvel aracı kullanılarak hesaplandı ve histomorfometrik olarak değerlendirildi.



### **3.6. İstatiksel Analiz**

Tüm istatiksel analizler SPSS kullanılarak yapıldı. Aritmetik ortalamalar ve standart hatalar (ortalama+SEM) hesaplandı. Gruplara ait verilerin normal dağılıma uygun olup olmadığı, Saphiro-Wilk normalite testi ile değerlendirildi. Normal dağılıma sahip, ikiden fazla grup ortalamasının karşılaştırılması parametrik Tek Yönlü Varyans (Tek Yönlü ANOVA) Analizi ile yapıldı. Anlamlı farklılık durumunda, gruplar arasındaki anlamlılık post-hoc Tukey HSD testi ile analizi edildi. Normal dağılım göstermeyen veriler arasındaki anlamlılık parametrik olmayan Kruskal-Wallis testi kullanılarak değerlendirildi.

## 4. BULGULAR

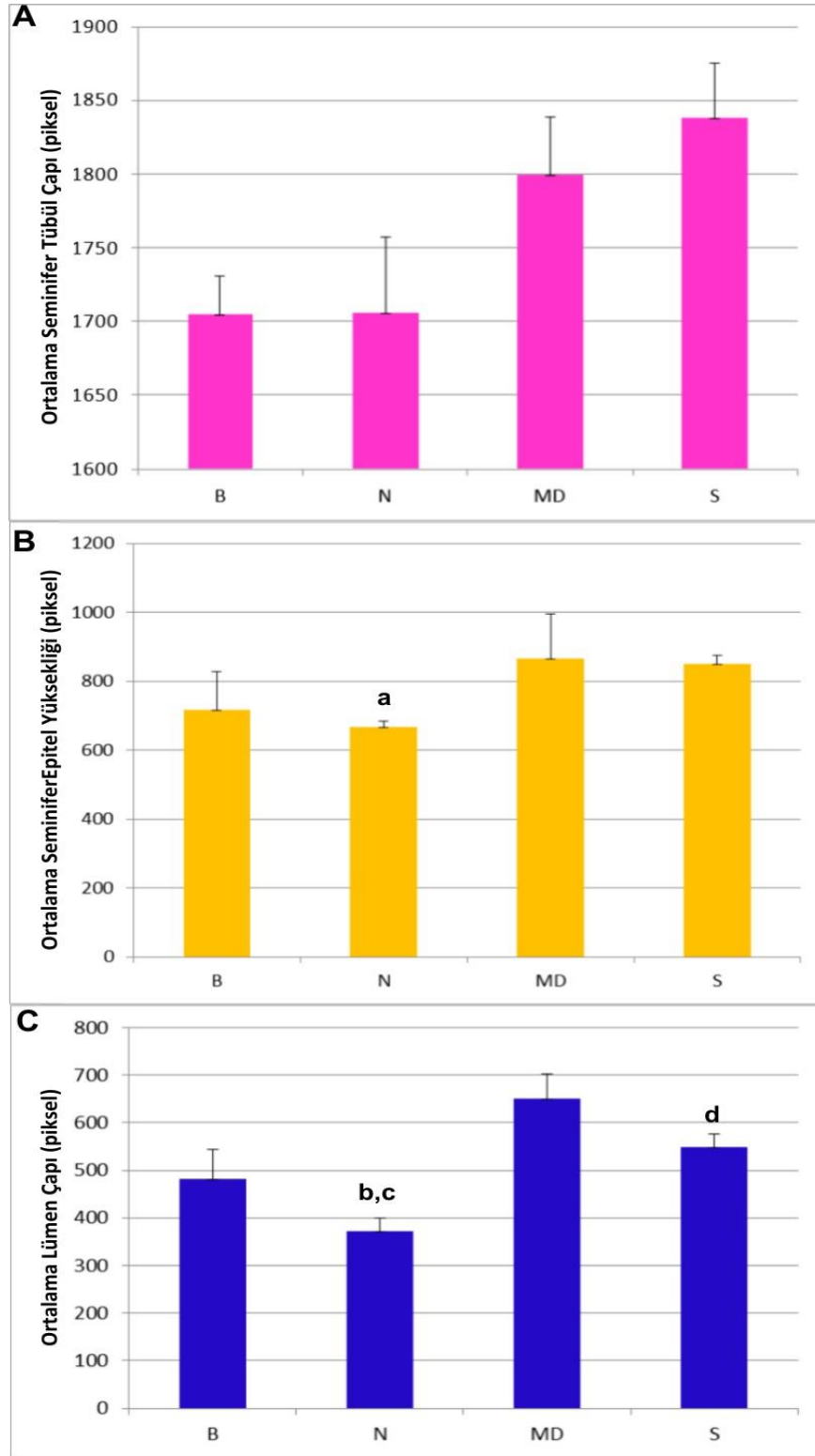
### 4.1. Seminifer Tübüllerin Histomorfometrik Analizi

Dört farklı fiksatif türü ile fikse edilen ve immünohistokimyasal boyamaları yapılan testis dokularının seminifer tübül çapı, seminifer epitel yüksekliği ve seminifer tübül lümen çapı için histomorfometrik analizler yapıldı. Fiksatif türlerine göre histomorfometrik verilerin ortalamaları Şekil 4. 1.'de verildi.

**Seminifer Tübül Çapı:** B, N, MD ve S fiksatif grupları için ölçülen ortalamalar sırasıyla;  $\bar{x}=1704+26$  piksel,  $\bar{x}=1706+51$  piksel,  $\bar{x}=1799+39$  piksel,  $\bar{x}=1838+37$  piksel olarak bulundu ve gruplar arasında anlamlı bir farklılık ( $p<0.05$ ) görülmedi.

**Seminifer Epitel Yüksekliği:** B, N, MD ve S fiksatif grupları için ölçülen ortalamalar sırasıyla;  $\bar{x}=716+111$  piksel,  $\bar{x}=666+17$  piksel,  $\bar{x}=865+130$  piksel,  $\bar{x}=849+25$  piksel olarak bulundu ve yalnızca N ile S grupları arasında anlamlı bir farklılık ( $p<0.05$ ) tespit edildi.

**Seminifer Tübül Lümen Çapı:** B, N, MD ve S fiksatif grupları için ölçülen ortalamalar sırasıyla;  $\bar{x}=482+60$  piksel,  $\bar{x}=371+28$  piksel,  $\bar{x}=650+51$  piksel,  $\bar{x}=549+27$  piksel olarak bulundu ve gruplar arasında anlamlı farklılık ( $p<0.05$ ) olduğu ve bu farklılığı oluşturan grupların N ile MD ( $p<0.05$ ) ve N ile S ( $p<0.05$ ) grupları arasında olduğu saptandı.

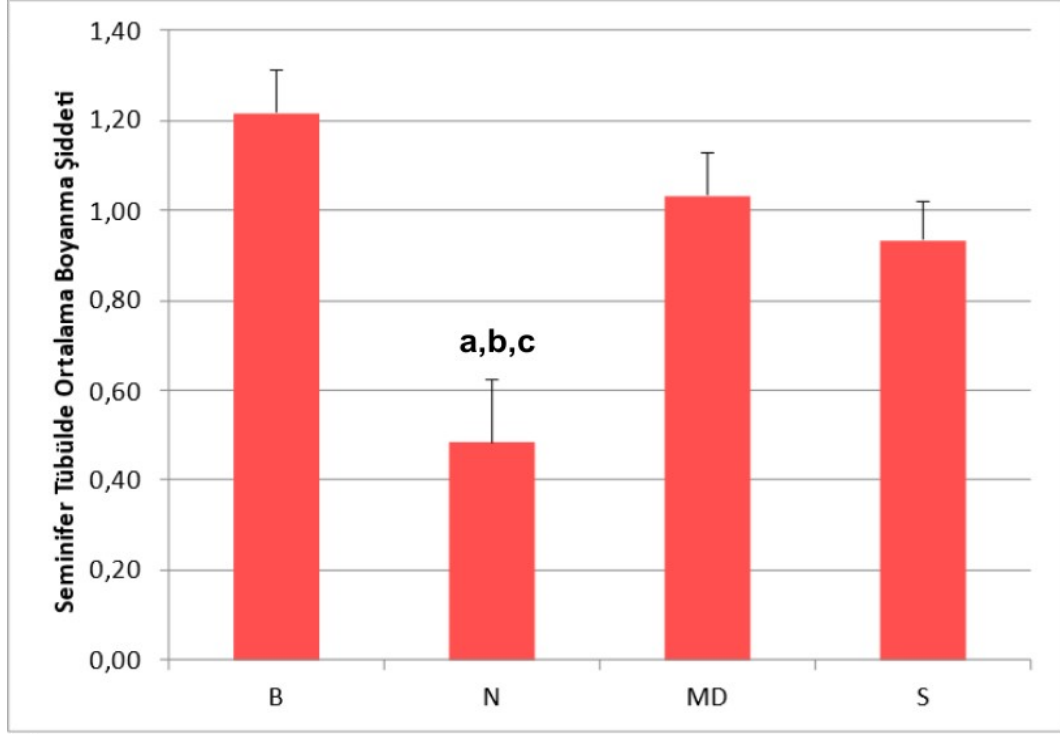


**Şekil 4. 1.** Fiksatif gruplarının ortalama histomorfometrik değerleri. A) Ortalama seminifer tübül çapı. B) Ortalama seminifer epitel yüksekliği. <sup>a</sup>p<0.05 S grubuna göre. C) Ortalama seminifer tübül lümen çapı. <sup>b</sup>p<0.05 MD grubuna göre, <sup>c</sup>p<0.05 S grubuna göre, <sup>d</sup>p< 0.05 N grubuna göre. B: BF, N: NTF, MD: mDF, S: SF.

## 4.2. İmmünohistokimyasal Analiz

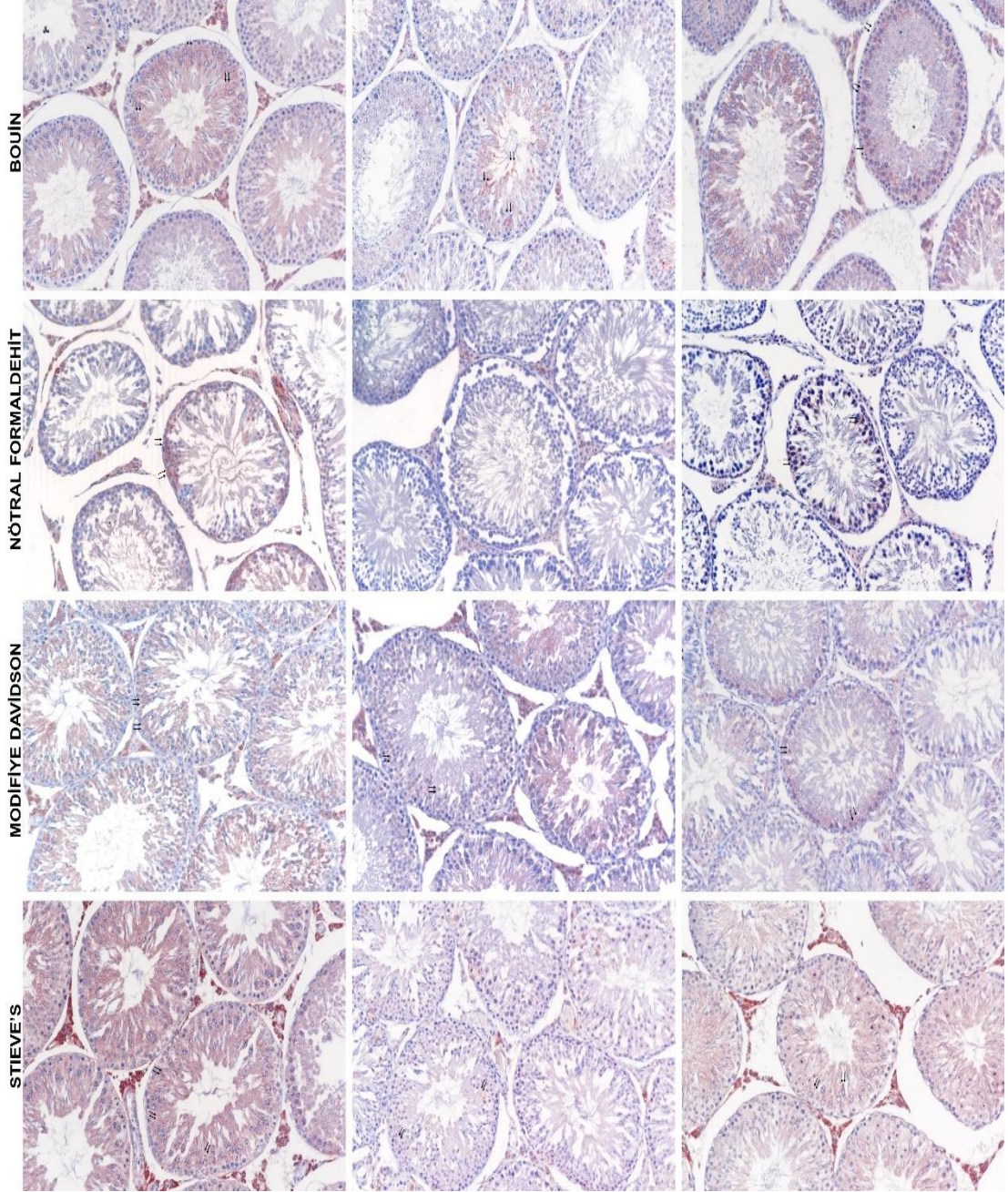
İmmünohistokimyasal yöntemle AQP-9 ekspresyon analizinde her fiksatif grubu için 6'şar adet testis kesiti ve her kesit için 10'ar adet seminifer tübül ve çevresi kullanıldı. Seminifer tübül ve interstisyel alan AQP-9 boyanma şiddetleri semikantitatif olarak değerlendirildi. İstatistiksel analiz için skorlar sayısal olarak şu şekilde puanlandı: - = "0"; + = "1"; ++ = "2"; +++ = "3".

**Seminifer Tübül Boyanma Şiddeti:** B, N, MD ve S fiksatif grupları için ölçülen ortalamalar sırasıyla;  $\bar{x}=1.22+0.09$  piksel,  $\bar{x}=0.48+0.14$  piksel,  $\bar{x}=1.03+0.09$  piksel,  $\bar{x}=0.93+0.84$  piksel olarak bulundu ve gruplar arasında anlamlı bir farklılık ( $p<0.001$ ) olduğu görüldü. Gruplarda negatif kontrolde herhangi bir reaksiyon gözlemlenmedi (gösterilmemiştir). Gruplar arası değerlendirmelerde anlamlı farklılığı oluşturan grupların; N grubuyla B, MD ve S ( $p<0.05$ ,  $p<0.05$ ,  $p<0.05$ ) grupları arasında olduğu saptandı. AQP-9 boyanma şiddetine ait verilerin fiksatif gruplarına göre ortalamaları Şekil 4. 2.'de verildi.



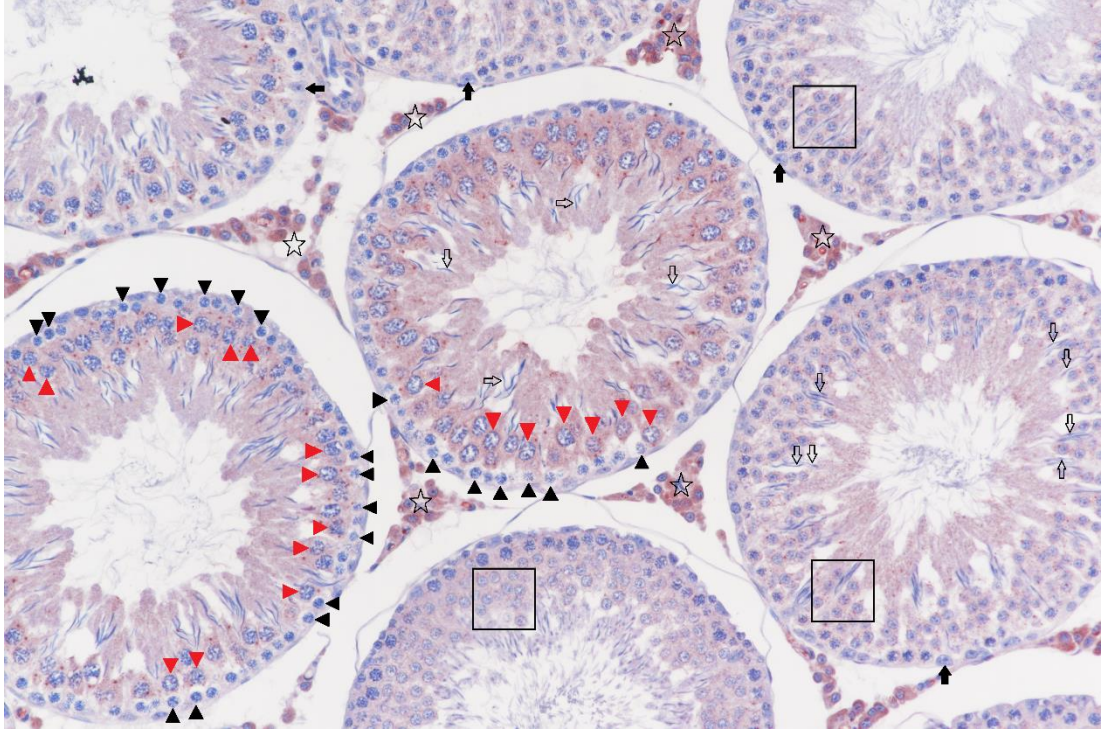
**Şekil 4. 2.** Fiksatif gruplarının ortalama AQP-9 seminifer tübül boyanma şiddetleri. Seminifer tübüllerde ortalama AQP-9 boyanma şiddeti. <sup>a</sup>p<0.001 B grubuna göre, <sup>b</sup>p<0.05 MD grubuna göre, <sup>c</sup>p<0.05 S grubuna göre. B: BF, N: NTF, MD: mDF, S: SF.

B, N, MD ve S fiksatif gruplarına göre seminifer tübüllerin AQP-9 boyanma görünümleri Şekil 4. 3. panelinde gösterildi.



**Şekil 4. 3.** Fiksatif gruplarına göre seminifer tübüllerin AQP-9 boyanma şiddetlerini gösteren resim paneli

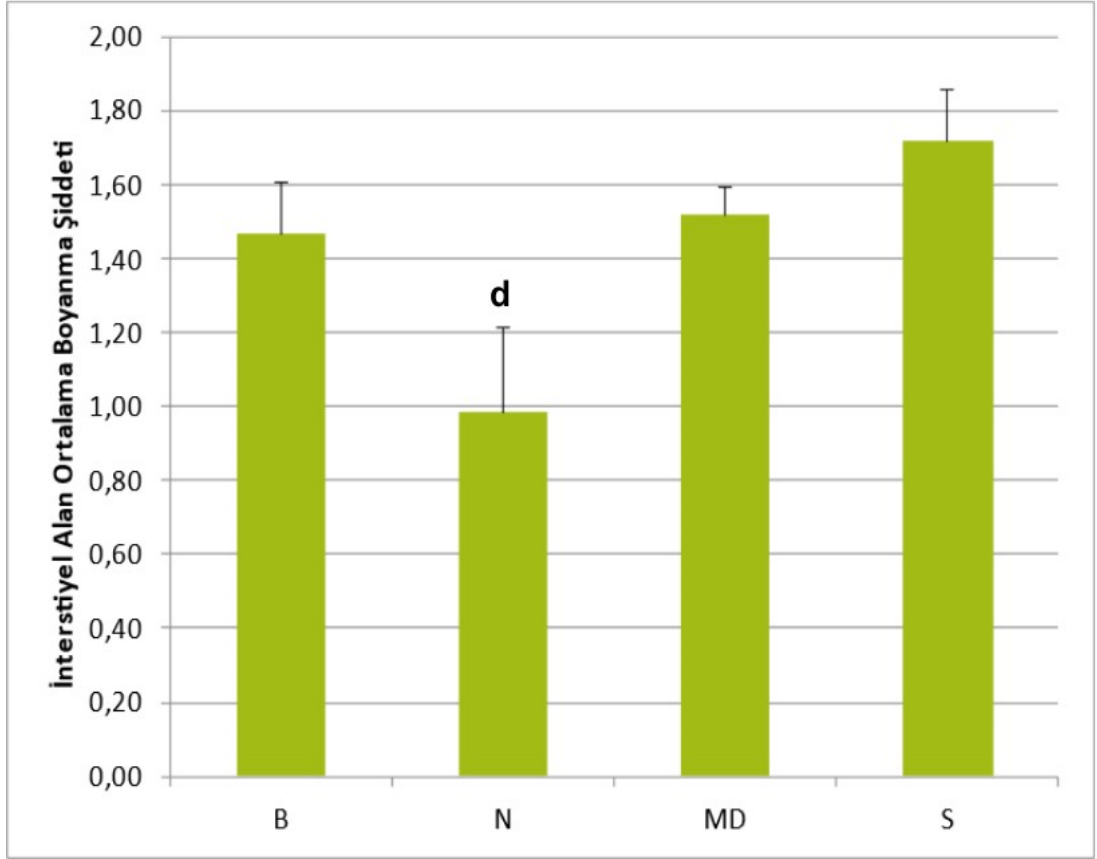
Seminifer túbüllerde B fiksatif grubunda primer spermatozitlerde daha şiddetli, sekonder spermatozitlerde ve yuvarlak spermatidlerde nispeten zayıf AQP-9 boyanması tespit edildi. Buna ek olarak, Sertoli hücrelerinde de nispeten zayıf AQP-9 boyanmasına rastlandı. Seminifer túbüllerin bazal bölgesindeki spermatogonyumlar ile adluminal bölgesindeki uzun spermatidler ve spermatozoonlarda AQP-9 ekspresyonu görülmedi (Şekil 4. 4).



**Şekil 4. 4.** B grubu testislerde seminifer túbüllerdeki AQP-9 antikoruna ile yapılan immun boyamanın görünümü: siyah ok; Sertoli hücreleri, siyah ok başı; spermatogonyumlar, kırmızı ok başı; primer spermatozitler, kare içi; sekonder spermatozitler ve yuvarlak spermatidler, içi boş oklar; uzun spermatidler ve spermatozoonlar içi boş yıldızlar; interstisyel alanlar.

Objektif Büyütme Oranı; x 20.

**İnterstisyel Alan Boyanma Şiddeti:** : B, N, MD ve S grupları için ölçülen ortalamalar sırasıyla;  $\bar{x}=1.47+0.13$  piksel,  $\bar{x}=0.98+0.23$  piksel,  $\bar{x}=1.51+0.07$  piksel,  $\bar{x}=1.71+0.14$  piksel olarak bulundu ve gruplar arasında anlamlı farklılık bulunurken ( $p<0.05$ ), bu farklılığı yaratan grupların sadece N ile S grupları olduğu görüldü ( $p<0.05$ ). Gruplarda negatif kontrolde herhangi bir reaksiyon gözlemlenmedi (gösterilmemiştir). İncelenen kesitlerin interstisyel alan ortalama AQP-9 boyanma şiddetlerine ait veriler Şekil 4. 5.'de verildi.

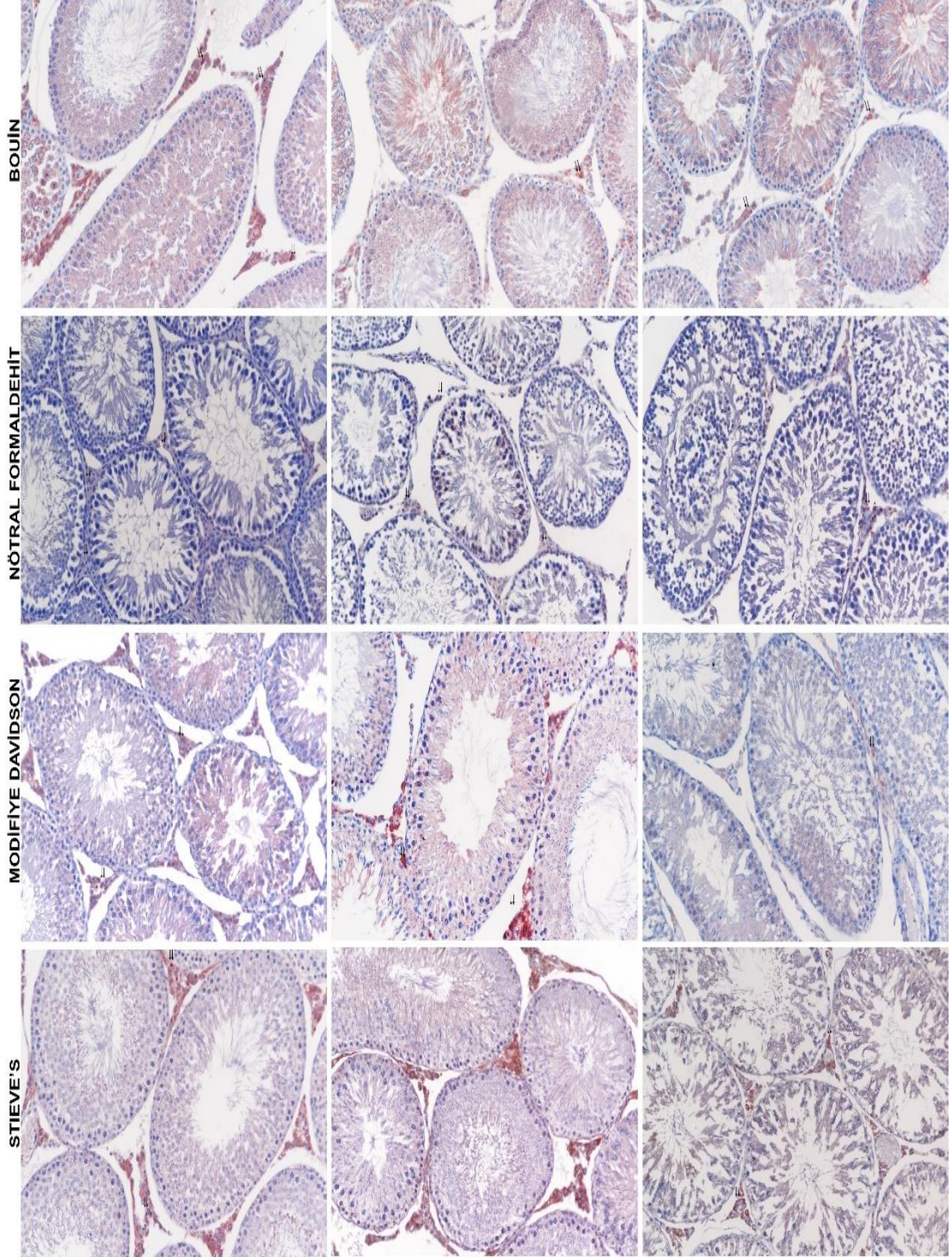


**Şekil 4. 5.** Fiksatif gruplarının interstisyel alan ortalama AQP-9 boyanma şiddetleri.

<sup>d</sup> $p<0.05$  S grubuna göre. B: BF, N: NTF, MD: mDF, S: SF.

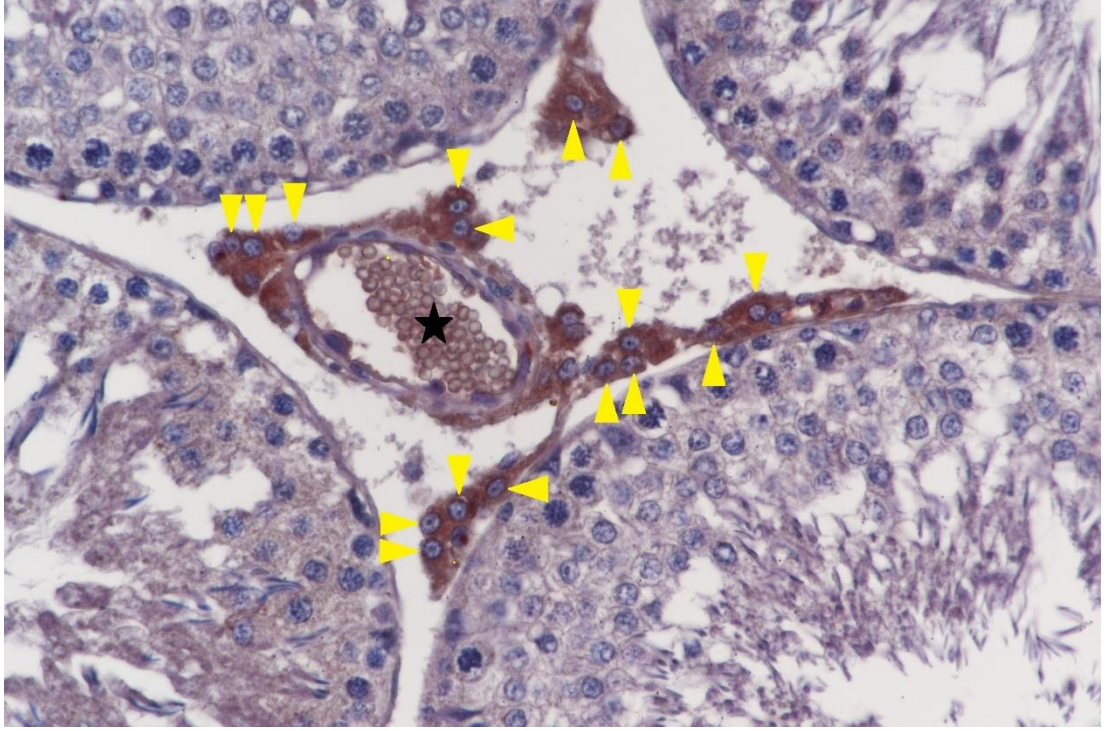


B, N, MD ve S fiksatif gruplarına göre interstisyel alanların AQP-9 boyanma görünümleri Şekil 4. 6. panelinde gösterildi.

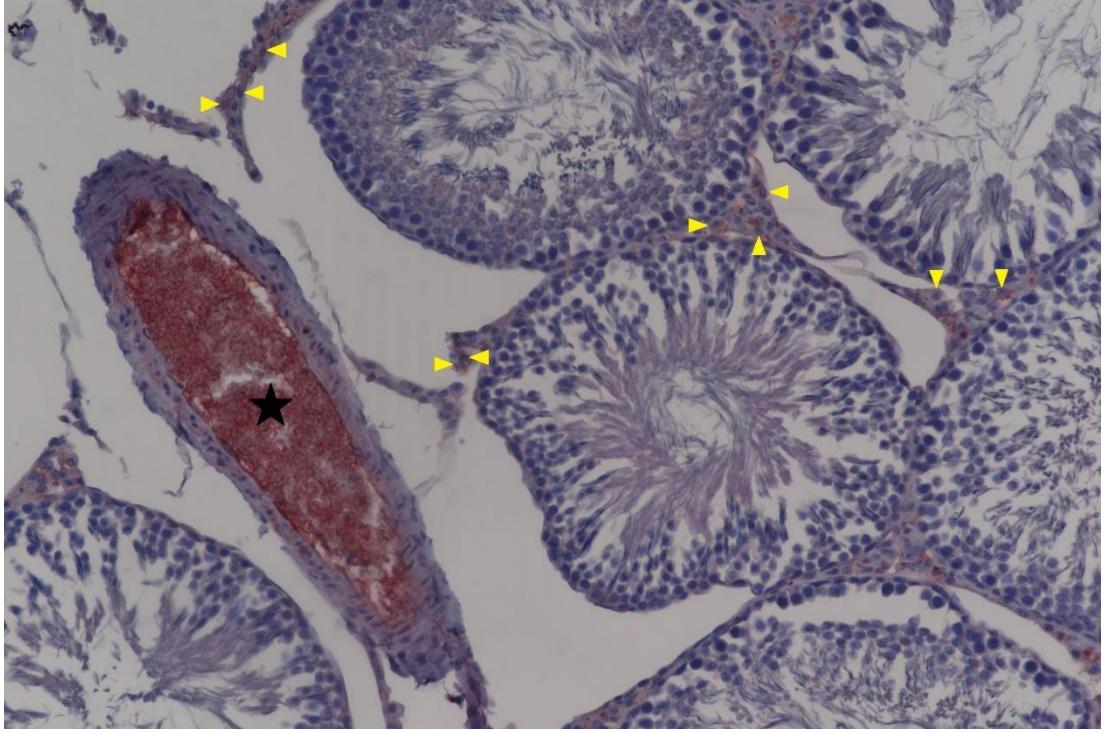


Şekil 4. 6. Fiksatif gruplarına göre interstisyel alanların AQP-9 boyanma şiddetlerini gösteren resim paneli.

İnterstisyel alan boyanma şiddetleri arasında anlamlı farklılık bulunan S ve N fiksatif grupları karşılaştırıldığında Leydig hücrelerinde S fiksatif grubunda (Şekil 4. 7.) şiddetli, N fiksatif grubunda (Şekil 4. 8.) zayıf şiddette AQP-9 boyanması görüldü. Buna ek olarak, interstisyel alan kan damarlarındaki eritrositlerde S (Şekil 4. 7.) fiksatif grubunda zayıf şiddette, N fiksatif grubunda (Şekil 4. 8.) ise şiddetli boyanma tespit edildi.



**Şekil 4. 7.** S grubu testislerde Leydig hücrelerinde AQP-9 antikoruna ile yapılan immun boyamanın görünümü: sarı ok başı ok; Leydig hücreleri, siyah yıldız; kan damarı içindeki eritrositler. Objektif Büyütme Oranı; x 40.



**Şekil 4. 8.** N grubu testislerde Leydig hücrelerinde AQP-9 antikoruna ile yapılan immun boyamanın görünümü: sarı ok başı ok; Leydig hücreleri, siyah yıldız; kan damarı içindeki eritrositler. Objektif Büyütme Oranı; x 20.

## 5. TARTIŞMA

Testis histomorfolojisi; laboratuvar hayvanlarının üreme patolojisi, büyümesi ve gelişimi ile ilgili araştırmaların önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Testis morfolojisi testis kanseri, Sertoli cell-only sendromu ve spermatogenez yetersizliği gibi üreme hastalıkları hakkında fikir vermektedir. Ayrıca erkek germ hücrelerindeki, Sertoli ve Leydig hücrelerindeki özgül antijen belirteçleri hayvanların gelişim süreçlerini ve hücrelerin fonksiyonlarını tanımlamak ve değerlendirmek için kullanılmaktadır. İyi bir testis histomorfolojisi için testisler mutlaka uygun bir fiksatifle fikse edilmelidir (Wang vd., 2020).

Testisin histomorfolojisi ve özgül antijenlerin testislerdeki hücresel dağılımı ve ekspresyon şiddeti hakkında tutarlı veriler elde edebilmek için şüphesiz doku bileşenleri ve immunohistokimyasal boyama metodu ile uyum sağlayacak en uygun fiksatif seçilmelidir. Bu çalışma histopatoloji araştırmalarında rutin olarak kullanılan %10'luk NTF, mDF, BF ve SF solüsyonlarının testis morfolojisine ve testis hücrelerindeki AQP-9'u sabitlemesi, immunohistokimyasal reaksiyon duyarlılığı, ekspresyon şiddeti ve kalitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi ve testiste AQP-9 ile yapılacak immunohistokimyasal çalışmalarda en uygun fiksatifin tespiti amacıyla yapıldı. Çalışmada kullanılan fiksatiflerin her biri için 6'şar adet, toplamda ise 24 adet testis dokusu kullanıldı. Daha önce hazırlanmış olan parafin bloklardan 5 µm'lik ince kesitler alındı ve deparafinize edildi, blok solüsyonunda bekletildi ve immunohistokimyasal metot kullanılarak AQP-9 antikoru ile işaretlendi. Aqueous mounting medium ile kapatılan doku kesitlerinin histomorfometrik ve immünohistokimyasal analizleri yapıldı. Her testis dokusu için 10'ar adet olacak şekilde her grup için toplam 60'ar adet, çalışma için ise toplam 240 adet seminifer tübül alanı ve çevresi incelendi.

Çalışmamızda elde ettiğimiz seminifer tübül çapı, seminifer epitel yüksekliği ve seminifer tübül lümen çapı ölçümlerimize göre, mDF solüsyonu seminifer tübülleri %10'luk NTF ve BF solüsyonlarına göre daha iyi korumakta ve morfolojik detayları daha iyi göstermektedir. Belirtilen histomorfometrik ölçümler karşılaştırıldığında

testis histomorfolojisi üzerine koruyucu etkisi en fazla olan fiksatiflerin birbirine yakın değerlere sahip olan mDF ve SF; en fazla doku büzülmesine neden olan fiksatiflerin ise sırasıyla %10'luk NTF ve BF olduğu gözlendi. Xiang domuz testisleri ile yapılan bir çalışmada %4'lk PFA'nın mDF'ye göre seminifer tübüllerde ve interstisyel alanlarda daha fazla küçülmeye neden olduğu gösterilmiştir (Wang vd., 2020). Tavuk testisinde histomorfolojik, immünohistokimyasal ve terminal transferaz dUTP nick end labeling (TUNEL) teknikleri için %4'lk PFA, mDF ve BF'nin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, %4 PFA ve BF'ye göre mDF fiksativi seminifer tübüllerde ve interstisyel alanlarda daha az doku bzlmelerine neden olduğu gözlenmiştir (Feng vd., 2021). Testis dokusu morfolojisi üzerine farklı fiksatiflerin etkilerinin karşılaştırıldığı çalışmalarda %4'lk PFA ve BF'ye göre mDF'nin dokuları daha iyi koruduğu; %4'lk PFA'nın ve BF'nin seminifer tübüllerde ve interstisyel alanlarda bzlmelere neden olduğu, ancak mDF ile fikse edilen testislerde belirgin düzeyde doku bzlmelerine rastlanmadığı bildirilmiştir. Üstelik morfolojik detayların mDF ile fikse edilen dokularda daha ayrıntılı gözlenildiği ne sürülmüştür (Latendresse vd., 2002; Tu vd., 2011). Sıçan testisinin farklı fiksatifler ile fikse edilmesinden sonra yapılan stereolojik ölçümlerde, %10'luk NTF'nin testis dokusunda aşırı büzüşmeye bağlı testis hacminde küçülmeye neden olduğu saptanmıştır (Turhan, 2019). Bizim yaptığımız seminifer tübül çapı, seminifer epitel yüksekliği ve seminifer tübül lümen çapı ölçümlerimizde en düşük değerlerin %10'luk NTF ile fikse edilen testislerde rastlanması Turhan (2019)'ın saptadığı testis dokusundaki hacim azalmasını desteklemektedir. Turhan (2019)'ın stereolojik çalışmasında mDF ve SF solüsyonlarının seminifer tübülleri ve morfolojik ayrıntıları %10'luk NTF ve BF solüsyonlarına göre daha iyi koruduğu ve daha az doku bzlmelerine yol açtığı rapor edilmiştir. Her ne kadar Wang vd. (2020)'nin sonuçları bizim sonuçlarımızı desteklemese de, Latendresse vd. (2002), Tu vd. (2011), Turhan (2019) ve Feng vd. (2021) bildirdikleri morfolojik tespitler ile bizim çalışmamızdaki histomorfometrik ölçümler arasında uyum olduğu görülmektedir. Ayrıca Toksikolojik Patoloji Derneği'nin, 2002 yılında, morfolojik ayrıntıları daha iyi koruduğu için testis fiksasyonunda mDF'nin kullanılmasını önermesi (Latendresse vd., 2002) de bizim sonuçlarımız ile uyumludur.

Biyobelirteçlerin immünohistokimyasal yolla tespiti erken tanıya yardımcı olmak, prognoz ve risk değerlendirmesini belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. Son

yıllarda, gen tedavisi gibi çeşitli tedavi türlerine karşı verilen yanıtların değerlendirilmesinde kullanılan biyobelirteçlerin tespitinde de İHK'den yararlanılmaktadır. Primer antikörlerin kalitesi ve aviditesi, sekonder tespit sistemlerinin kullanılması (Grizzle vd., 1998), özellikle aldehit bazlı fiksatiflerden sonra doku işleme ve antijen geri kazanım uygulamaları (Grizzle vd., 2001) gibi birbirine bağlı değişkenler immunohistokimyasal analizin kalitesini etkilenmektedir.

Spermatogenez için ihtiyaç duyulan su, gliserol ve diğer çözünen maddelerin taşınmasında üstlendiği görevlerin öneminin giderek daha çok anlaşılmasından beri, AQP-9 giderek daha çok araştırılmaktadır (Yeste vd., 2017). AQP-9'un erkek üreme sisteminde bulunan germ hücrelerindeki varlığı canlı türleri arasında değişiklik göstermektedir. AQP9 insan primer spermatositlerinde ve olgun spermatidlerde tespit edilirken, aygırlarda sadece spermatidlerde bulunmuştur (Boj vd., 2015). AQP-9, fare Sertoli hücrelerinde tespit edilen başlıca GLP olup su ve gliserolün taşınmasını düzenlemek için gereklidir (Yeung vd., 2009). Daha büyük kanal çapına sahip olmasından dolayı laktik asit ve asetik asit gibi monokarboksilik asitlere karşı da geçirgendir (Badault ve Regli, 2004). Laktat germ hücreleri ve spermatogenez için enerji içeren hayati öneme sahip bir substrattır. AQP-9'un Sertoli hücrelerindeki varlığı, laktatı Sertoli hücrelerinden tübüler sıvıya taşınmasında rol alabileceğini düşündürmektedir (Rato vd., 2012). Memeli Leydig hücrelerinde en çok araştırılan AQP izoformu AQP-9'dur. AQP-9'un Leydig hücrelerindeki varlığı, bu hücrelerin çözünen molekülleri plazma membranından bu kanal ile taşıdığını düşündürmektedir (Badran ve Hermo, 2002). Bununla birlikte, farklı canlı türlerinin testis dokuları ile yapılan immunohistokimyasal ve immunoelektron mikroskopi araştırma sonuçları arasında AQP-9'un hücresel dağılımı veya ekspresyon şiddeti bakımından taranan çalışma raporları arasında çelişkiler bulunmaktadır.

Çalışmamızda tüm fiksatif türleri ile fikse edilen testis dokusundaki AQP-9 ekspresyonunu şiddeti fiksatif türüne ve hücre tiplerine göre değişmekle birlikte seminifer tübüllerdeki primer ve sekonder spermatositlerde, yuvarlak spermatidlerde, Sertoli ve interstisyel Leydig hücrelerinde immunohistokimyasal yöntemle tespit ettik. AQP-9'un kemirgenlerin spermatozoonlarındaki hücresel varlığı tartışmalıdır. BF solüsyonu ile fikse edilmiş insan testisinde çok az sayıdaki bazı spermatositlerin ve/veya Sertoli hücrelerinin sitoplazmasında AQP-9 ekspresyonu tespit edilmiş olsa

bile diğerk erkek germ hücrelerinde ve ejaküle spermatozoonlarda bulunamamıştır (Yeung vd., 2010). Fare spermatozoonlarında AQP-9 transkriptleri tespit edilmişse bile bu veri immünoblotlama yöntemi ile doğrulanamamıştır (Yeung vd., 2009). Dondurulmuş yetişkin fare testislerinde yapılan immunofloresan çalışmada seminifer tübüllerin lümenindeki uzun spermatidlerin ve spermatozoonların kuyruklarında şiddetli AQP-9 ekspresyonu bildirilmiştir. Aynı çalışmada seminifer tübüllerin diğerk bazal ve adlüminal bölge hücrelerinde ve interstisyel Leydig hücrelerinde zayıf şiddette AQP-9 ekspresyonuna rastlanmıştır (Mohamed vd., 2022). İnsanlarda, sağlıklı ergen bireylerde, primer spermatositlerin, adluminal haploid germ hücrelerinin ve spermatozoonların plazma membranlarında ve sitoplazmalarında AQP-9 ekspresyonu yaygın olarak, Leydig hücrelerinde ise fokal düzeyde tespit edilmiş; ancak spermatogonyumlarda ve Sertoli hücrelerinde AQP-9 ekspresyonu tespit edilememiştir. Aynı çalışmada, ekspresyonu bildirilen hücrelerdeki AQP-9 ekspresyon şiddetinin varikoselli testislerde azaldığı gözlenmiştir. (Arena vd., 2010). Sırasıyla metil-Carnoy ve periodate-lizin-PFA fiksatifleri ile fikse edilen Wistar-Kyoto sıçan organlarının kullanıldığı immunohistokimyasal ve immunoelektron mikroskopik bir çalışmada on üç farklı organ arasından sadece karaciğerk hepatositlerinde ve testis interstisyel Leydig hücrelerinde özgül olarak ve belirgin düzeyde AQP-9 ekspresyonu gösterilmiştir. Aynı çalışmada seminifer tübül hücrelerinde ve interstisyel damarlarda AQP-9 ekspresyonuna rastlanmamıştır. Aynı araştırmacılar glutaraldehit fiksatifi ile daha önce yaptıkları başka bir immunoelektron mikroskopi çalışmasında hepatositlerde AQP-9 ekspresyonunu gösteremediklerini, ancak periodate-lizin-PFA'nın dokuların ultra yapısını iyi koruyamasada, AQP-9'un varlığını gösterdiklerini bildirmişlerdir (Nihei vd., 2001). Daha önce yapılan diğerk bazı çalışmalarda da sıçan Leydig hücrelerinde AQP-9 ekspresyonu gösterilmiştir (Pastor-Soler vd., 2001; Badran ve Hermo, 2002). Yapılan başka bir çalışmada, Leydig hücrelerinde ve Sertoli kültür hücrelerinde AQP-9 ekspresyonu tespit edilmiştir (Jesus vd. 2014). Ayrıca, AQP-9 mRNA ekspresyonu ribonükleaz koruma testi ile farelerin Sertoli hücrelerinde belirlenmiştir (Bernardino vd., 2018). Sıçan testisinde AQP-9'un hücre düzeyindeki ekspresyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda spermatositlerde, Sertoli ve Leydig hücrelerinde AQP-9 ekspresyonu gösterilmiş; ancak spermatogonyumlarda, spermatidlerde ve spermatozoonlarda kanıtlanamamıştır (Badran ve Hermo, 2002; Oliveira vd., 2005; Da Silva vd., 2006; Yeung ve Cooper, 2010; Jesus vd., 2014). Bu durumda spermatidlerde tespit ettiğimiz AQP-9 ekspresyonu hariç tutulacak olursa,

bizim bulgularımız ile sıçan testisinde AQP-9 ekspresyonunu araştıran hemen bir önceki cümlede bildirilen çalışmaların bulguları birbirine benzemektedir. Geçmişte insan ve diğer farklı canlı türlerinin kullanıldığı çalışma bulgularının hem birbirleri hem de bizim tespit ettiğimiz bulgular arasında görülen kısmi farklılıklar çalışılan hücrelerin canlı türleri arasındaki yapısal farklılıklarından, kullanılan fiksatif türünden ve/veya kullanılan primer antikorların kalitesinden kaynaklanabilir.

Formalinle fikse edilmiş ve parafinle bloklanmış dokuların İHK çalışmalarında kullanımı, taze veya taze dondurulmuş dokulara olan ihtiyacı ortadan kaldırmaktadır. Parafinle bloklanan ve arşivlenen dokular tanısal incelemelerde ve retrospektif çalışmalarda kolaylık sağlamaktadır (Webster vd., 2009). Bununla birlikte, morfolojik detaylar, antijenler ve nükleik asitler genellikle fiksasyon ve doku işleme uygulamaları sırasında hasar görmektedir (Panzacchi vd., 2019). İmmünohistokimya çalışmalarında kullanılacak doku örneklerinde doku morfolojisini ve görüntülenecek proteinleri en iyi koruyan en uygun fiksatif arayışı devam etmektedir.

Çalışmamızda %10'luk NTF, BF, mDF ve SF ile fikse edilen testislerin seminifer tübüllerinde ve interstisyel alanlarda fiksatif türüne göre değişen şiddetlerde AQP-9 ekspresyonu görüldü. En güçlü boyanma seminifer tübüllerde BF ile fikse edilen dokularda, interstisyel alanlarda ise SF ile fikse edilen dokularda görüldü. Her iki testis alanında da ikinci derece şiddetli boyanma mDF ile fikse edilen dokularda rastlandı. Mikroskopik incelememizde tüm fiksatif gruplarında seminifer tübüllerdeki hücreler içerisinde en güçlü boyanmanın primer spermatozitlerde olduğu gözlemlendi. Ayrıca interstisyel alanın boyanma yoğunluğunun seminifer tübüllere göre daha şiddetli olduğu tespit edildi. Yapılan bir çalışmada AQP-9 ekspresyonunun ejaküle insan spermatozoonlarında tespit edilemediği, BF ile fikse edilen testislerdeki Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında zayıf şiddette AQP-9 ekspresyonunun tespit edildiği bildirilmiştir (Yeung vd., 2010). BF ile fikse edilen yetişkin Sprague-Dawley sıçan testislerinde AQP-9 ekspresyonunun interstisyel Leydig hücrelerinde şiddetli boyanmaya neden olduğu, ancak diğer testis hücrelerinde AQP-9 ekspresyonunun tespit edilemediği bildirilmiştir (Badran ve Hermo, 2002).

Testislerdeki germ, Sertoli ve Leydig hücrelerini tanımlamak için aranan proteinlerin BF'ye göre mDF fiksatif ile daha iyi korunabileceği rapor edilmiştir



(Latendresse vd., 2002). Fare testislerinde histomorfolojiye ve TUNEL boyamalara farklı fiksatiflerin etkilerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada 24 veya 36 saat mDF ile fikse edilen testislerde iyi morfolojik detaylar elde edilmekle birlikte yanlış TUNEL pozitif boyanmanın arttığı tespit edilmiştir. 6 saat mDF ve ardından 18 saat PFA kullanılarak yapılan fiksasyonda ise ilginç bir şekilde, morfolojik detayların daha iyileştiği ve testislerde yanlış TUNEL pozitif hücelere nadiren rastlandığı bildirilmiştir. Fiksasyonda mDF ve PFA fiksatifleri birlikte kullanıldığında testislerde morfolojik detayların iyileştiği ve yanlış TUNEL pozitif hüceleri en aza indirdiği tespit edilmiştir (Wang vd., 2016). Bununla birlikte, Xiang domuz testisinde üç farklı antijenin (DDx4, 3 $\beta$ -HSD ve GATA4) arandığı bir çalışmada mDF'ye göre %4 PFA'nın germ, Sertoli ve Leydig hücrelerinde daha iyi immunohistokimyasal boyama performansı gösterdiği bildirilmiştir (Wang vd., 2020). Yapılan bir çalışmada GATA4 antikoru ile yapılan işaretlemelerde, mDF ve BF'ye göre %4 PFA fiksatif Sertoli hücrelerinde daha iyi immunohistokimyasal boyama göstermiştir. Ayrıca, yapılan TUNEL testinde, %4 PFA'ya göre mDF fiksatifinde daha fazla pozitif hücre görüldüğü rapor edilmiştir. Bildirilen çalışmaya göre tavuk testisindeki morfolojik incelemeler ve TUNEL boyama için mDF'nin, buna karşın immunohistokimyasal boyamalar için %4 PFA fiksatifinin daha uygun olduğu bildirilmiştir (Feng vd., 2021). Turhan (2019) TUNEL boyanma açısından %10'luk NTF, mDF, BF ve SF arasında fark bulamadıklarını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda seminifer tübüllerde ve interstisyel alanlarda AQP-9 antikoru ile en zayıf boyanma %10'luk NTF ile fikse edilen dokularda gözlemlendi. Formalin fiksasyonunun en önemli etkisi, immunohistokimya ve in situ hibridizasyon çalışmaları ile ilgilidir. Formalin, birçok monoklonal antikorun immünoreaktivitesini zayıflatmakta veya yok etmekte, dolayısıyla rutin İHK uygulamalarını zorlaştırmaktadır (Bogen vd., 2009). Formalin, bazı moleküllerin denatürasyonuna, immunohistokimya için gerekli epitoplara (antijenik belirleyiciler) maskelenmesine veya kaybına neden olmaktadır. Formalin fiksasyonunda aldehitler ile antijenler arasında çapraz bağlar oluşmakta ve epitoplara özgül antikorlar tarafından tanınmaz veya ulaşılamaz hale getirmektedir (Dapson 2007). Aldehitler epitoplara doğrudan bağlanarak hem epitoplara hem de proteinlerin yapısını değiştirmekte (Bogen vd. 2009) veya antikorların ve tespit sistemlerinin epitoplara bağlanmasını engellemektedir (Grizzle, 2009b). İmmunohistokimyanın temelini oluşturan

antijenlerin ve antikorların yapısal özellikleri üzerindeki formaldehitli fiksatiflerin olumsuz etkileri çalışmamızda seminifer tübüllerde ve interstisyel alanlarda ortaya çıkan en zayıf şiddetteki AQP-9 ekspresyonunun neden %10'luk NTF fiksasyonunda ortaya çıktığını kısmen açıklamaktadır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Histomorfometrik ölçümlerimiz mDF ve SF solüsyonlarının sıçan testisinin morfolojik bütünlüğünü birbirine yakın düzeyde iyi koruduğunu ve hücresel detayları daha iyi ortaya koyduğunu göstermektedir. %10'luk NTF solüsyonu morfolojik bütünlüğü koruma ve hücresel detayları göstermek açısından en kötü performansı göstermiştir.

İmmunohistokimyasal boyamalarımız testisin seminifer tübüllerindeki erkek germ ve Sertoli hücrelerindeki AQP-9 ekspresyonunu açığa çıkarma performansı açısından en iyi sonucu BF solüsyonunun verdiğini, onu sırasıyla mDF ve SF solüsyonlarının takip ettiğini göstermektedir. Testisin interstisyel alandaki Leydig hücrelerindeki AQP-9 ekspresyonunu açığa çıkarma performansı açısından en iyi sonucu SF solüsyonunun verdiğini, onu sırasıyla mDF ve BF solüsyonlarının takip ettiğini göstermektedir. Her iki testis alanda da AQP-9 ekspresyonunu açığa çıkarma açısından %10'luk NTF solüsyonunun en kötü immunohistokimyasal performansa sahip olduğu görülmektedir. Ölçümlerimiz neticesinde, sıçan testis dokusunda AQP-9 ekspresyonuna yönelik bundan sonra yapılacak immunohistokimyasal analizlerde birbirlerine yakın değerlere sahip olan SF, mDF ve BF solüsyonları doku fiksasyonu amacıyla kullanılabilir.

## KAYNAKLAR

- Aharon, R., and Bar-Shavit, Z. (2006). Involvement of aquaporin 9 in osteoclast differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 19305-19309.
- Arena, S., Arena, F., Maisano, D., Di Benedetto, V., Romeo, C., and Nicòtina, P. A. (2010). Aquaporin-9 immunohistochemistry in varicocele testes as a consequence of hypoxia in the sperm production site. *Andrologia*, 43, 34-37.
- Badaut, J., Petit, J. M., Brunet, J. F., Magistretti, P. J., Charriaut-Marlangue, C., and Regli, L. (2004). Distribution of aquaporin 9 in the adult rat brain: preferential expression in catecholaminergic neurons and in glial cells. *Neuroscience*, 128(1), 27-38.
- Badaut, J., and Regli, L. (2004). Distribution and possible roles of aquaporin 9 in the brain. *Neuroscience*, 129, 971-981.
- Badaut, J. (2010). Aquaglyceroporin 9 in brain pathologies. *Neuroscience*, 168(4), 1047-1057. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.10.030>
- Badran, H. H., and Hermo, L. S. (2002). Expression and regulation of aquaporins-1, -8, and -9 in the testis, efferent ducts, and epididymis of adult rats and during postnatal development. *Journal of Andrology*, 23(3), 358-373.
- Bancroft, J. D., and Gamble, M. (2019). *Theory and practice of histology techniques*. C Layton, JD Bancroft, SK Suvarna (Eds.) *Fixation of Tissues*, 8th Ed., pp. 40-63. Churchill Livingstone.
- Benga, G. (2009). Water channel proteins (later called aquaporins) and relatives: Past, present, and future. *IUBMB Life*, 61(2), 112-133.

- Bernardino, R. L., Marinelli, R. A., Maggio, A., Gena, P., Cataldo, I., Alves, M. G., Svelto, M., Oliveira, P. F., and Calamita, G. (2016). Hepatocyte and Sertoli cell aquaporins, recent advances and research trends. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1096. [doi:10.3390/ijms17071096](https://doi.org/10.3390/ijms17071096)
- Bernardino, R. L., Carrageta, D. F., Silva, A. M., Calamita, G., Alves, M. G., Soveral, G., and Oliveira, P. F. (2018). Estrogen modulates glycerol permeability in sertoli cells through downregulation of aquaporin-9. *Cells*, 7(10), 153.
- Bharath, R. (2017). *Physiology and Endocrinology of Spermatogenesis*. In: K Gunasekaran, N Pandiyan (Eds). *Male Infertility a Clinical Approach*. New Delhi, Springer India, 17-25.
- Bogen, S. A., Vani, K., and Sompuram, S. R. (2009). Molecular mechanisms of antigen retrieval: antigen retrieval reverses steric interference caused by formalin-induced cross-links. *Biotechnic and Histochemistry*, 84(5), 207-215.
- Boj, M., Chauvigne, F., and Cerda, J. (2015). Aquaporin biology of sprmatogenesis and sperm physiology in mammals and teleosts. *Biological Bulletin*, 229, 93-108.
- Carlson, F. L. (1996). *Histotechnology. A Self-Instructional Text*, 2nd Edition, 9-19.
- Combes, A. N., Wilhelm, D., Davidson, T., Dejana, E., Harley, V., Sinclair, A., and Koopman, P. (2009). Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Developmental Biology*, 326, 112-120.
- Conner, A. C., Bill, R. M., and Conner, M. T. (2013). An emerging consensus on aquaporin translocation as a regulatory mechanism, *Molecular Membrane Biology*, 30, 1-12.
- Crowley, L. C., Marfell, B. J., and Waterhouse, N. J. (2016). Detection of DNA fragmentation in apoptotic cells by TUNEL. *Cold Spring Harbor Protocols*, 10, 900-904.

- Dapson, R. W. (2007). Macromolecular changes caused by formalin fixation and antigen retrieval. *Biotechnic and Histochemistry*, 82, 133-140.
- Da Silva, N., Silberstein, C., Beaulieu, V., Piétrement, C., Van Hoek, A. N., Brown, D., and Breton, S. (2006). Postnatal expression of aquaporins in epithelial cells of the rat epididymis. *Biology of Reproduction*, 74(2), 427-438.
- Da Silva, I. V., and Soveral, G. (2021). Aquaporins in immune cells and inflammation: new targets for drug development. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1845. <https://doi.org/10.3390/ijms22041845>
- Day, R. E., Kitchen, P., Owen, D. S., Bland, C., Marshall, L., Conner, A. C., Bill, R. M., and Conner, M. T. (2014). Human aquaporins: regulatory of transcellular water flow. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840, 1492-1506.
- Denker, B. M., Smith, B. L., Kuhajda, F. P., and Agre, P. (1988). Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(30), 15634-42.
- Domeniconi, R. F., Orsi, A. M., Justulin Jr, L. A., Beu C. C. L., and Felisbino, S. L. (2007). Aquaporin 9 localization in the adult dog testis excurrent ducts by immunohistochemistry. *Anatomical Record (Hoboken)*, 290,1519-1525.
- Edashige, K. (2016). The movement of water and cryoprotectants across the plasma membrane of mammalian oocytes and embryos and its relevance to vitrification. *Journal of Reproduction and Development*, 62(4), 317-321.
- Elkjær, M. L., Vajda, Z., Nejsum, L. N., Kwon, T. H., Jensen, U. B., Amiry-Moghaddam, M., Frokiaer, J., and Nielsen, S. (2000). Immunolocalization of AQP-9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276(3), 1118-1128.

- Ellenburg, J. L., Kolettis, P., Drwiega, J. C., Posey, A. M., Goldberg, M., Mehrad, M., Giannico, G., and Gordetsky, J. (2020). Formalin versus Bouin Solution for testis biopsies: Which is the better fixative? *Clinical Pathology*, 13, 1-4.
- Eltoum, I., Fredenburgh, J., Myers, R. B., and Grizzle, W. E. (2001). Introduction to the theory and practice of fixation of tissues. *Journal of Histotechnology*, 24, 173-190.
- Feng, X. Z., Wang, W. Y., Gong, T., and Meng, L. J. (2021). Different fixatives influence morphology, antigen preservation, and TUNEL staining in chicken (*Gallus gallus*) testis. *Acta Histochemica*, 123, 151822.
- Fenton, R. A., Chou, C. L., Stewart, G. S., Smith, C. P., and Knepper, M. A. (2004). Urinary concentrating defect in mice with selective deletion of phloretin-sensitive urea transporters in the renal collecting duct. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 7469-7474.
- Gartner, L. P., and Hiatt, J. L. (2007). *Male Reproductive System*. In: Color Textbook of Histology (3th Ed.), Elsevier, USA, 592, 489-698.
- Gomes, D., Agasse, A., Thiébaud, P., Delrot, S., Gerós, H., and Chaumont, F. (2009). Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1788(6).
- Grizzle, W. E., Myers, R. B., Manne, U., Stockard, C. R., Harkins, L. E., and Srivastava, S. (1998). *Factors affecting immunohistochemical evaluation of biomarker expression in neoplasia*. *John Walker's Methods in Molecular Medicine-Tumor Marker Protocols*. Chapter 10, Vol. 14. Humana Press, Totowa, NJ. pp. 161-179.
- Grizzle W. E., Stockard, C., and Billings, P. (2001) The effects of tissue processing variables other than fixation on histochemical staining and immunohistochemical detection of antigens. *Journal of Histotechnology*, 24, 213-219.
- Grizzle, W. E. (2009a). Special symposium: fixation and tissue processing models. *Biotechnic and Histochemistry*, 84(5), 185-193.

Grizzle, W. E. (2009b) Special Symposium: fixation and tissue processing models. *Biotechnic and Histochemistry*, 84(5), 161-169.

Heinrich, A., and DeFalco, T. (2020). Essential roles of interstitial cells in testicular development and function. *Andrology*, 8, 903-914.

Hermo, L., and Smith, C. E. (2011). Thirsty business: cell, region and review membrane specificity of aquaporins in the testis, efferent ducts, and epididymis and factors regulating their expression. *Journal of Andrology* 32(6), 565-575.

Hewitson, T. D., Wing, B., and Becker, G. J. (2010). *Tissue Preparation for Histochemistry: Fixation, Embedding, and Antigen Retrieval for Light Microscopy*. TD Hewitson,, IA Darby (Eds.) Histology Protocols, Methods in Molecular Biology, 3-19. USA, Humana.

Howat, W. J., and Wilson, B. A. (2014). Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods*, 70, 12–19.

<https://embryology.ch/en/> (n. d.). Online course in embryology for medical students developed by the Universities of Fribourg, Lausanne and Bern (Switzerland). <https://embryology.ch/old/anglais/cgametogen/spermato03.html#entwicklung>. Erişim: 22.07.2024.

<https://embryology.med.unsw.edu.au/> (n. d.) UNSW Embryology, Mark, H., [https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Sertoli\\_cell#/media/File:Seminiferous-tubule-HEX40.jpg](https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Sertoli_cell#/media/File:Seminiferous-tubule-HEX40.jpg), Erişim: 22.07.2024.

Huang, B. Q., and Yeung, E. C. (2005). *Chemical and physical fixation of cells and tissues: an overview*. Springer International Publishing Switzerland, 23-32.

Isildar, B., Ozkan, S., Ercin, M., Gezginci-Oktayoglu, S., Oncul, M., and Koyuturk, M. (2022). 2D and 3D cultured human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell-conditioned medium has a dual effect in type 1 diabetes model in rats:



- immunomodulation and beta-cell regeneration. *Inflammation and Regeneration*, 42(1), 55.
- Jesus, T. T., Bernardino, R. L., Martins, A. D., Sa, R., Sousa, M., Alves, M. G., and Oliveira, P. F. (2014). Aquaporin-9 is expressed in rat Sertoli cells and interacts with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *IUBMB Life*, 66, 639-644.
- Jung, S. P., Preston, G. M., Smith, B. L., Guggino, W. B., and Agre, P. (1994). Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *Journal of Biological Chemistry*, 269(20), 14648-14654.
- Junqueira, L. C., ve Carneiro, J. (2009). *Temel Histoloji: Text ve Atlas*. Solakoğlu, S., Aytakin, Y. (Çev. Ed.), Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti., 418-434. ISBN: 978-975-420-699-9.
- Kelder, W., Inberg, B., Plukker, J. T. M., Groen, H., Baas, P. C., and Tiebosch, A. T. M. G. (2008). Effect of modified Davidson's fixative on examined number of lymph nodes and TNM-stage in colon carcinoma. *European Journal of Surgical Oncology*, 34(5), 525-530.
- Kızılay, F., ve Altay, B. (2019). Spermatogenez, spermiyogenez ve klinik yansımaları. *Androloji Bülteni*, 21, 177-184.
- Kitchen, P., Day, R. E., Salman, M. M., Conner, M. T., Bill, R. M., and Conner, A. C. (2015). Beyond water homeostasis: diverse functional roles of mammalian aquaporins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1850(12), 2410-2421.
- Kumar, N., and Singh, A. K. (2021). The anatomy, movement, and functions of human sperm tail: an evolving mystery. *Biology of Reproduction*, 104(3), 508-520.
- Laforenza, U., Bottino, C., and Gastaldi, G. (2016). Mammalian aquaglyceroporin function in metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1858(1), 1-11.

- Latendresse, J. R., Warbritton, A. R., Jonassen, H., and Creasy, D. M. (2002). Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicologic pathology*, 30, 524-533.
- Leung, J., Pang, A., Yuen, W. H., Kwong, Y. L., and Tse, E. W. (2007). Relationship of expression of aquaglyceroporin 9 with arsenic uptake and sensitivity in leukemia cells. *Blood*, 109, 740-746.
- Lindskog, C., Asplund, A., Catrina, A., Nielsen, S., and Rützler, M. (2016). A systematic characterization of Aquaporin-9 expression in human Normal and pathological tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 64(5), 287-300.
- Marieb, E. N. (2009). *The Reproductive System. In: Essentials of Human Anatomy and Physiology*. Pearson Education Inc., Publishing as Benjamin Cummings.
- Markou, A., Unger, L., Abir-Awan, M., Saadallah, A., Halsey, A., Balklava, Z., Conner, M., Törnroth-Horsefield, S., Greenhill, S. D., Conner, A., Bill, R. M., Salman, M. M., and Kitchen, P. (2022). Molecular mechanisms governing aquaporin relocalisation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1864(4), 183853.
- Mete, Ö. (2004). *Patolojide Temel Histopatolojik Laboratuvar Teknikleri*. Türk Patoloji Derneği Meslek İçi Eğitim Kursu, 3, 1-33.
- Mohamed, E. A., Im, J. W., Kim, D. H., and Bae, H. R. (2022). Differential expressions of aquaporin subtypes in the adult Mouse testis. *Development and Reproduction*, 26(2), 59-69.
- Nicchia, G. P., Frigeri, A., Nico, B., Ribatti, D., and Svelto, M. (2001). Tissue distribution and membrane localization of aquaporin-9 water channel: evidence for sex-linked differences in liver. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 49, 1547-1556.
- Nihei, K., Koyama, Y., Tani, T., Yaoita, E., Ohshiro, K., Adhikary, L. P., Kurosaki, I., Shirai, Y., Hatakeyama, K., and Yamamoto, T. (2001). Immunolocalization of aquaporin-9 in rat hepatocytes and leydig cells. *Archives of Histology and Cytology*, 64(1), 81-88.

- Oliveira, C. A., Carnes, K., Franc, L. R., Hermo, L., and Hess, R. A. (2005). Aquaporin-1 and -9 are differentially regulated by oestrogen in the efferent ductule epithelium and initial segment of the epididymis. *Biology of the Cell*, 97, 385-395.
- Ovalle, W. K., and Nahirney, P. C. (2009). *Netter's Essential Histology; Saunders Elsevier PA*. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P. (Çev. Ed.), Erkek Üreme Sistemi. In: Netter Temel Histoloji (1. Baskı). Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, 533, s:378-379.
- Özenci Ç. Ç., and Akkoyunlu, G. (2006). *Spermatogenez*. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş, R Demir, (Çev. Ed.). *Histology and Cell Biology*, AL Kierszenbaun, MD, PhD. Ankara, Palme Yayıncılık, 531-550.
- Panzacchi, S., Gnudi, F., Mandrioli, D., Montella, R., Strollo, V., Merrick, B. A., Belpoggi, F., and Tibaldi, E. (2019). Effects of short and long-term alcohol-based fixation on sprague-dawley rat tissue morphology, protein and nucleic acid preservation. *Acta Histochemica*, 121, 750-760.
- Pastor-Soler, N., Bagnis, C., Sabolic, I., Tyszkowski, R., McKee, M., Van Hoek, A., Breton, S., and Brown, D. (2001). Aquaporin 9 expression along the male reproductive tract. *Biology of Reproduction*, 65(2), 384-393.
- Prophet, E. B. (1992). *Fixation*. In: Prophet, E .B., Mills, B., Arrington, J. B., Sobin, L. H., *Laboratory Methods in Histotechnology*. Washington, Armed Forces Institute of Pathology, 25-28.
- Rato, L., Alves, M. G., Socorro, S., Duarte, A. I., Cavaco, J. E., and Oliveira, P. F. (2012). Metabolic regulation is important for spermatogenesis, *Nature Reviews Urology*, 9, 330-338.
- Ribeiro, J. C., Alves, M. G., Yeste, M., Cho, Y. S., Calamita, G., and Oliveira, P. F. (2021). Aquaporins and (in)fertility: More than just water transport. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1867, 166039.

- Rolls, G. O., Çiftçi, N. J., and Hall, J. B. (1994). *Histolojik ve Sitolojik Preparatlardaki Eserler*. A Woods, R Ellis, (Eds.). *Laboratuvar Histopatolojisi*, 5. baskı, s. 3-29. New York, Churchill Livingstone.
- Ross, M. H., and Pawlina. W. (2014). *Histology: A Text and Atlas. Correlated Cell and Molecular Biology*. (8th ed.), Lippincott Williams and Wilkins.
- Sales, A. D., Lobo, C. H., Carvalho, A. A., Moura, A. A., and Rodrigues, A. P. R. (2013). Structure, function, and localization of aquaporins: their possible implications on gamete cryopreservation. *Genetics and Molecular Research*, 12(4), 6718-6732.
- Şentürk, Ş. (2020). *Sisplatin uygulanan sıçanların testislerinde meydana gelen değişiklikler ve bu değişiklikler üzerine kurkuminin etkisi*. [Yayınlanmamış doktora tezi]. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi.
- Takata, K., Matsuzaki, T., and Tajika, Y. (2004). Aquaporins: water channel proteins of cell membrane. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*. 39, 1-83.
- Tapul, L., Akyüz, A., Albayrak, M., Aydın, İ., Gül, C., Özdemir, İ., Özdemir, Ü., ve Özyaman, S. (2012). *Histokimyasal Teknikler*. L Tapul (Ed.). *Genel Embriyoloji ve Histoloji Uygulama Kitabı*. Nobel Tıp Kitapevleri, s. 69-72, İstanbul.
- Tsakaguchi, H., Weremowicz. S., Morton, C. C., and Hediger, M. A. (1999). Functional and molecular characterization of the human neutral solute channel aquaporin-9. *American Journal Physiology*, 277, 685-696.
- Tu, L., Yu, L., and Zhang, H. (2011). Morphology of rat testis preserved in three different fixatives. *Journal of Huazhong University of Science and Technology-Medical Sciences*, 31(2), 178-180.
- Turhan, G. (2019). *Testisin stereolojik metodlar ile incelenmesinde farklı fiksatiflerin etkilerinin karşılaştırılması* [Yayınlanmamış yüksek lisans tezi]. Balıkesir Üniversitesi.

- Verkman, A. S., and Mitra, A. K. (2000). Structure and function of aquaporin water channels. *American Journal of Physiology, Renal Physiology*, 278(1), 13-28.
- Vicente-Carrillo, A., Ekwall, H., Álvarez-Rodríguez, M., and Rodríguez-Martínez, H. (2016). Membrane stress during thawing elicits redistribution of aquaporin 7 but not of aquaporin 9 in boar spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 51, 665-679.
- Wang, H., Yang, L. L., Ji, Y. L., Chen, Y. H., Hu, J., Zhang, C., Zhang, J., and Xu, D. X. (2016). Different fixative methods influence histological morphology and TUNEL staining in Mouse testes. *Reproductive Toxicology*, 60, 53-61.
- Wang, W. Y., Meng, L. J., Xu, Y. J., Gong, T., and Yang, Y. (2020). Effects of 4% paraformaldehyde and modified Davidson's fluid on the morphology and immunohistochemistry of Xiang pig testes. *Journal of Toxicologic Pathology*, 33(2), 97-104.
- Webster, J. D., Miller, M. A., Dusold, D., and Ramos-Vara, J. (2009). Effects of prolonged formalin fixation on diagnostic immunohistochemistry in domestic animals. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 57(8), 753-761.
- Yeste, M., Morato, R., Rodriguez-Gil, J. E., Bonet, S., and Prieto-Martinez, N. (2017). Aquaporins in the male reproductive tract and sperm: functional implications and cryobiology. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(4), 12-27.
- Yeung, C. H., Callies, C., Rojek, A., Nielsen, S., and Cooper, T. G. (2009). Aquaporin isoforms involved in physiological volume regulation of murine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 80, 350-357.
- Yeung, C. H. (2010). Aquaporins in spermatozoa and testicular germ cells: identification and potential role. *Asian Journal of Andrology*, 12, 490-499.
- Yeung, C. H., Callies, C., Tüttelmann, F., Kliesch, S., & Cooper, T. G. (2010). Aquaporins in the human testis and spermatozoa - Identification, involvement in sperm volume regulation and clinical relevance. *International Journal of Andrology*, 33(4), 629-641.

Yeung, C. H., and Cooper, T. G. (2010). Aquaporin AQP11 in the testis: Molecular identity and association with the processing of residual cytoplasm of elongated spermatids. *Reproduction*, 139(1), 209-216.

Zeuthen, T. (2001). How water molecules pass through aquaporins. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 26(2), 77-79.

## ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Hatice Gül FAZLIOĞLU
Eğitim	
Lise	Lüleburgaz DÜVENCİLER ANADOLU LİSESİ (2017)
Lisans	Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi (2017-2021)
Yüksek Lisans	Balıkesir Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı (2021-...)
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce	Orta derecede (Yökdil: 52, Eylül 2023)



Eğitimde, bilimde, sanatta çağdaş...