

## Keçi (*Capra hircus*) Testislerinde Isı Şok Proteini 70 (HSP70)'in İmmunohistokimyasal Lokalizasyonu

Kenan ÇINAR\*<sup>1</sup>, Cansel DURAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 32260, Isparta

(Alınış / Received: 10.11.2017, Kabul / Accepted: 14.02.2018, Online Yayınlanma / Published Online: 22.03.2018)

### Anahtar Kelimeler

Testis,  
Keçi,  
İmmunohistokimya,  
HSP70

**Özet:** Bu çalışmada organizma stres durumlarıyla karşılaştığında farklı hücrelerde seviyeleri artan, stres proteinleri ya da Isı Şok Proteinleri (Heat Shock Protein=HSP) olarak adlandırılan protein ailesinden HSP70'in keçi (*Capra hircus*) testisinde immunohistokimyasal olarak lokalizasyonunun belirlenmesi amaçlandı. Çalışmada materyal olarak 10 adet keçiden alınan testisler materyal olarak kullanıldı. Materyaller Bouin solüsyonunda 16 saat süreyle tespit edildi. Tespit işleminden sonra rutin histolojik doku takibinden geçirilen örnekler parafinde bloklandı. Parafin bloklarından 5-6µm kalınlığındaki kesitlere HSP70 varlığının belirlenmesi için Avidin Biotin Peroxidase (ABC) yöntemi uygulandı. Uygulama sonucunda spermatogonyumlarda güçlü reaksiyon gözlemlendi. Spermatozoidlerde ise spermatogonyumlara göre daha zayıf bir reaksiyon tespit edildi. Aynı zamanda Leydig hücreleri ve Sertoli hücrelerinde güçlü reaksiyon görüldü. Spermatozoonlarda ise reaksiyona rastlanmadı.

## Immunohistochemical Localization of Heat Shock Protein 70(HSP 70) in Goat (*Capra hircus*) Testes

### Keywords

Testes,  
Goat,  
Immunohistochemistry,  
HSP70

**Abstract:** In this study, determination of immunohistochemical localization of HSP70, which belongs to a protein family named as heat shock proteins, in goat (*Capra hircus*) testes was aimed. In the study, testes taken from 10 goats were used as research materials. Samples were fixed in Bouin's for 16h at 20-25°C. After the fixation, the samples that entreated with routine tissue processing were embedded in paraffin. 5-6µm thick sections were taken from the paraffin blocks and Avidin Biotin Peroxidase Complex (ABC) method was applied to the sections for the determination of HSP70 existence. As for the application results; strong reaction was observed in Spermatogonia. Spermatozoa showed weaker reaction than Spermatogonia did. Also, in Leydig and Sertoli cells, strong reaction was observed, but there were not any reaction detected in Spermatozoa.

### 1. Giriş

Stres proteinleri olarak da tanımlanan Isı Şok Proteinleri (HSP) başta ısı olmak üzere, çevresel faktörler ve ökaryotların oluşturabileceği moleküler düzeydeki olumsuzluklara karşı hücrede salgılanırlar [1]. Bu proteinler katlanan proteinlerin onarımı ve elimine edilmesi organel düzeyinde protein lokalizasyonu ve proteazlarla etkinleştirilmesi gibi fonksiyonları yerine getirirler [2]. Hücre içinde agregat oluşturan bu proteinler strese karşı reaksiyonun açığa çıkmasına neden olurlar [3]. Isı şok

proteinlerinin 110, 90, 70, 60, 40 ve 27 tipleri bulunmaktadır [4]. Ökaryotlarda HSP70'in ATP ile bağlanan NH<sub>2</sub> ve peptide bağlanan -COOH terminal olmak üzere iki işlevsel bölgesi bulunmaktadır [5].

HSP70 sitosolde, mitokondrilerde ya da endoplazmik retikulumda yerleşim göstermektedir ve buralarda proteinlerin taşınmasına katılır.

Bu çalışmada organizmadaki stres durumunda hücrede seviyeleri artan protein ailesinden HSP70'in keçi (*Capra hircus*) testisinde immünohistokimyasal olarak lokalizasyonunun belirlenmesi amaçlandı.

\*İlgili yazar: kenancinar@sdu.edu.tr

## 2. Materyal ve Metot

Bu çalışmada araştırma materyali olarak 10 adet keçi testisi kullanıldı. Temin edilen testis dokusu örnekleri Bouin solüsyonunda 18 saat süreyle tespit edildi. Dokular daha sonra alkol serilerinden (%50, %70, %80, %90, %100 (I), %100 (II), %100 (III)) geçirilerek dehidre edildi ve ksilolde şeffaflaştırılarak parafinde bloklandı. Parafin bloklardan 6-7 µm kalınlığında alınan kesitlere testis dokusundaki HSP70 lokalizasyonunun belirlenmesi için ABC (Avidin Biotin Peroksidase) immunohistokimyasal yöntemi uygulandı. Bu yöntemle göre kesitler ksilol ve alkol serilerinden geçirilip 30 saniye musluk suyunda yıkandı daha sonra dokular PBS (Phosphate Buffer Saline) ile 15 dakika yıkamaya alındı. Na-Sitrat tamponunda antijen retrieval işlemine tabi tutuldu. Bu işlemde kesitler mikrodalga şalesi içinde 700 watt'ta 15 dakika bekletildi. Bu işlemden sonra kesitler 15 dakika PBS ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından kesitler %3'lük hidrojen peroksit solüsyonu ile inkübe edildi ve ardından tekrar PBS ile yıkandı. Yıkamadan sonra kesitler %10'luk normal goat serumda 30 dakika inkübe edilerek, endojen peroksidaz aktivitesinin ve spesifik olmayan reaksiyonun engellenmesi sağlandı ve daha sonra primer antikorda (HSP70-Santa Cruz, SC33575) 30 dk bekletildi. Bu işlemden sonra PBS ile yıkamaya alınan kesitler 30 dakika süreyle sekonder antikor (Sekonder -Santa Cruz, SC2040) ile inkübe edildi ve kesitler extra avidin peroksidaz kompleksi ile 30 dakika inkübe edilip ardından PBS ile yıkama yapıldı. Daha sonra immunoreaktivitenin görünür hale getirilmesi için %0,05'lik 3,3'-diaminobenzidine (DAB-Plus substrate kit, Invitrogen, Camarillo, CA) 15-20 dakika uygulandı. Ardından 1 defa PBS ve 2 defa distile su ile yıkanan kesitlere Gill (III) hematoksilen yöntemi uygulandı. Zıt boyamadan sonra musluk suyunda yıkanan kesitler alkol ve ksilol serilerinden geçirilip entellan ile kapatıldı.

Kapatma işleminden sonra hazır hale getirilen preparatlar Olympus CX 41 ışık mikroskobu ile incelendi ve ilgili kısımlardan Olympus DP26 kamera ile fotoğraf çekimi yapıldı.

## 3. Bulgular

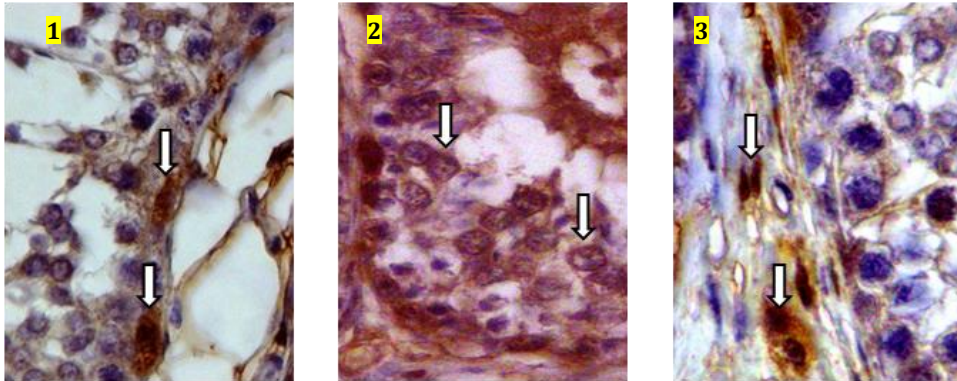
### 3.1. İmmunohistokimyasal bulgular

Testis dokuları üzerine HSP70 antikorunu kullanılarak uygulanan immunohistokimyasal boyama yöntemi ile immunoreaktif hücrelerin dağılımı ve yoğunlukları belirtilmiştir.

Yapılan inceleme sonucunda testis dokusunda immunoreaktif hücrelerin hem dağılımlarında hem de yoğunluklarında farklılıklar belirlendi. Spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatid, Leydig ve Sertoli hücrelerinde reaksiyon gözlemlendi. En fazla reaksiyon ise spermatogonyumlarda (Şekil 1) belirlendi. Uygulanan immunohistokimyasal yöntem sonucunda spermatogonyumlarda HSP70 bakımından oldukça güçlü immunoreaktivite gözlemlendi. Spermatositlerde ise spermatogonyumlara göre daha zayıf reaksiyon gözlemlenirken (Şekil 2), Leydig ve Sertoli hücrelerinde güçlü reaksiyon saptandı (Şekil 3). Spermatozonlarda ise reaksiyona rastlanmadı.

### 4. Tartışma ve Sonuç

Tatlı su istakozu (*Cherax quadricarinatus*) [7], rat [8] ve maymun [9] testislerinde yapılan çalışmalarda HSP70 uygulaması sonucunda spermatogonyumlarda güçlü biçimde gözlemlendiği bildirilen reaksiyon bu çalışmada da saptandı. Japon bildircını (*Coturnix coturnix japonica*), habu yılanı (*Trimeresurus flavoviridis*) ve Çin yumuşak kabuk kaplumbağasında (*Pelodiscus sinensis*) [10] bu reaksiyonun zayıf tarzda gözlemlendiği belirtilmiştir. Bazı memeli türleri [11, 12, 13] ve Japon bildircını (*Coturnix coturnix japonica*), habu yılanı (*Trimeresurus flavoviridis*), Çin yumuşak kabuk kaplumbağası (*Pelodiscus sinensis*) reaksiyon yoğunluğu belirtilmeksizin HSP70 pozitivitesine rastlandığı ileri sürülmüştür. Fare [14] ve tatlı su istakozu (*Cherax quadricarinatus*) [7] testislerinde yapılan çalışmada mayoz bölünme geçirecek olan primer spermatositlerde zayıf HSP70 reaksiyonu saptandığı bildirilmiştir. Fare [11], *Octopus tankahkeei* türü ahtapot [15] ve sivri fare (*Suncus*



**Şekil 1.** (1) Spermatogonyumlarda güçlü reaksiyon (oklar). HSP70. Bar:20µm. (2) Spermatositlerde zayıf reaksiyon(oklar). HSP70. Bar:40µm. (3) Leydig hücrelerinde güçlü reaksiyon(oklar). HSP70. Bar:100µm.

*murinus*) [16] testislerinde reaksiyon yoğunluğu belirtilmeksizin spermatositlerde HSP70'in saptandığı bildirilmiştir. Rat [17] ve sıçanda [10] ise bu çalışmada elde edilen bulguyla uyumlu olarak spermatositlerde güçlü reaksiyon gözlenmiştir. HSP70'in spermatogenezis üzerindeki etkisinin araştırılması üzerine yapılmış çalışmalarda bazı türlerde spermatitlerin bu reaksiyonu gösterdikleri, reaksiyonun mavi beyaz yunus [14] ve maymunda [9] zayıf biçimde gözlenirken bu çalışmada fare [14], Avustralya keseli sıçanı [19], Afrika pençeli kurbağa [12] ve ratlarda [20] yapılan çalışmalarda elde edilen bulgularla benzer tarzda spermatitlerde bu reaksiyonun güçlü olduğu belirlendi. Sertoli hücrelerinde HSP70 varlığı maymun [9] ve hükümdar tavşanda [13] bildirilirken ratlarda [20] reaksiyona rastlanmadığı, HSP70 pozitifitesinin aynı zamanda fare [11] ve maymunda [9] Leydig hücrelerinde de belirlendiği bildirilmiştir. Bu çalışmada da her iki hücrede bu pozitifite güçlü biçimde saptandı.

Sonuç olarak, ülkemizde ve dünyada en fazla yetiştiriciliği yapılan ve ekonomik açıdan önemli bir tür olan keçi (*Capra hircus*) testisinde yapılan bu çalışmada spermatozonlar dışındaki spermatogonik hücrelerde HSP70 varlığı gözlemlendi. Spermatogonyumlarda, Leydig ve Sertoli hücrelerinde güçlü HSP70 reaksiyonu görülürken spermatositlerde daha zayıf bir reaksiyon görülmesi, HSP70'in spermatogenezis devamlılığında rol aldığını göstermektedir. Ayrıca bu proteinin erkek üreme sisteminde önemli rol oynaması erkek kısırlığına neden olan sebeplerin ortadan kaldırılması ve veteriner hekimlikte döl verimini artırma çalışmaları ile ergenlik veya erişkin dönemlerde geçirilen ateşli hastalıkların testisleri etkilediği ve infertiliteye neden olduğu durumlarda bu proteinlerin koruyuculuk yapabileceği ve bu çalışmada elde edilen bulguların bu konuda yapılacak çalışmalara katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

### Teşekkür

Bu projeyi (proje no: 4271-YL115) maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri (BAP) Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederiz.

### Kaynakça

- [1] Nihizawa, J., Nakai, A., Natsuda, K., Komeda, M., Ban, T., Negata, K., 1999. Reactive Oxygen Species Play On An Important Role in Activation Of Heat Shock Factor 1 in Ischemic Reperfused Heart. *Circulation*, 99(7), 934-41.
- [2] Saibil, H.R., 2008. Chaperone Machines in Action. *Curr Opin Struct Biology*, 18(1), 35-42.
- [3] Verbeke, P., Fonager, J., Clark, B.F.C., Rotton, S., 2001. Heat Shock Response And Ageing: Mechanisms And Applications. *Cell Biology International*, 25(9), 845-57.
- [4] Fan, C.Y., Lee, S., Cry, D.M., 2003. Mechanisms For Regulation Of Hsp 70 Function By Hsp 40. *Cell Stress Chaperones*, 8(4), 309-16.
- [5] Henle, K.J., Jethma Lani, S.M., Nagle, W.A., 1998. Stress Proteins And Glycoproteins. *International Journal Of Molecular Medicine*, 1(1), 25-32.
- [6] Mosser, D.D., Caron, A.W., Bourget, L., Larose, C.D., Massie, B., 1997. Role Of The Human Heat Shock Protein Against Stress Induced Apoptosis. *Molecular And Cellular Biology*, 17(9), 5317-27.
- [7] Dian, F., Wang, Q., He, L., Wang, J., Wang, Y., 2012. Characterization Of Heat Shock Protein 70 In The Red Cray Fish (*Cherax Quadricarinatus*): Evidence For Its Role In Regulating Spermatogenesis. *Gene*, 142, 138-147.
- [8] Eduardo, B.O., Castro Sanchez, R., Ramos Gonzalez, B., Tarres Diaz, L., 2010. Rat Spermatogenesis Damage In Intermittent Hypobaric Hypoxia And The Protective Role Of Melatonin II: Testicular Parameters. *International Journal Of Morphology*, 28(2), 537-47.
- [9] Zhou, X.C., Zhang, Z.H., Hu, Z.Y., Zou, R.J., Liu, Y.X., 2002. Expression Of Hsp70-2 In Rhesus Monkey Testis During Germ Cell Apoptosis Induced By Testosterone Undecanoate. *Contraception*, 66, 377-82.
- [10] Dix, D.J., Allen, J.W., Collins, B.W., 1996. Targeted Gene Disruption Of Hsp70 Results In Failed Meiosis, Germ Cell Apoptosis And Male Infertility. *Developmental Biology*, 93, 3264-68.
- [11] Wen, C., Huang, P., Zhang, L., Shi, F., 2009. Acute Heat Stress Increases Hsp 70 Expression In Testis, Epididymis And Vas Deferens Of Adult Male Mice. *National Journal Of Andrology*, 15(3), 200-206.
- [12] Tsunekawa, N., Nishida, T., Fujimoto, H., 1999. Expression Of Spermatid-Specific Hsp70 Antigen Is Conserved In Mammals Including Marsupials. *Journal Veterinary Medicine Science*, 61(4), 341-388.
- [13] Yangli, P., Ying, J., Yinghe, Q., 2012. Effect Of Chronic Heat Stress On The Expressions Of Heat Shock Protein 60, 70, 90, A2 And Hsc70 In Rabbit Testis. *Cell Stress And Chaperones*, 17, 81-87.
- [14] Paminder, K., Bansol, M.P., 2003. Effect Of Oxidative Stress On The Spermatogenic Process

and Hsp70 Expression in Mice Testes. Indian Journal Of Biophysics, 40, 246-51.

Gösterilmesi: Bir İmmunohistokimyasal Çalışma. Kocatepe Tıp Dergisi, 7, 23-26.

[15] Long, L.L., Han, Y.L., Sheng, Z., Du, C., Wong, F.,Zhu, J.Q., 2015. Expression Analysis Of Hsp 70 İn *Octopus Tankahkeei* Under Termal Stress. Comparative Biochemistry And Physiology, 187, 150-159.

[18]Pabst, D.A.,Rommel, S.A., Mclellan, W.A., Williams, T.M., Rowles, T.K., 1995. Thermoregulation Of The İntraabdominal Testes Of Bottlenose Dolphin( *Tursiops Truncatus*) During Exercise. Journal Experimental Biology,198, 221-226.

[16] Hasler, M.J., Nolbondow, A.V., 1974. Body And Peritesticular Temperatures Of Musk Shew(*Sucus Murinus*) Journal Of Reprod Fertil. 36, 397-399.

[19] Carrick, F.N., Setchell, B.P.,1997.The Evolution Of The Scrotum. Reproduction And Evolution, 165-170.

[17] Özen, O.A., Songur, A., Akpolat, N., Kuş, İ., Baş, O., Sarsılmaz, M., 2006. Erişkin Sıçan Testisinin Seminifer Tübüllerinde Isı Şok 70 Proteinin

[20] Feng, H.L., 2001.Decreased Expression Of The Heat Shock Protein Hsp70-2 İs Associated With The Pathogenesis Of Male İnfertilitiy. Fertility And Sterility, 76(6), 1136-9.