

Testiste Spermatogenik Hücrelerde β_1 İntegrin ve Fibronektin Dağılımı Localization of β_1 integrin and fibronectin on spermatogenic cells in rat testis

Emel Nacar*, Çiğdem Elmas**, Deniz Erdoğan**

*Turgut Özal Üniversitesi SMYO, Patoloji Laboratuvar Teknikleri Programı, Ostim/Ankara

**Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Beşevler/Ankara

ÖZET

Amaç: Fibronektin β_1 integrinle etkileşerek hücre adezyonu, göçü ve proliferasyonunda görev alır. Bu çalışmada gelişmekte olan testis dokusunda β_1 integrin ve fibronektin dağılımını immünohistokimyasal yöntemle göstermek amaçlandı.

Gereç ve yöntem: Çalışmada; Wistar cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar, yaşlarına bağlı olarak her grupta 7 adet olmak üzere yenidoğan, 3, 10, 15, 21 günlük, 1, 2 aylık ve ergin olmak üzere 8 gruba ayrıldı. Dokulara fibronektin ve β_1 integrin için immünohistokimyasal yöntem uygulandı.

Bulgular: Testiste fibronektinin bir bazal membran ve bağ doku bileşeni olarak seminifer tüplerin bütünlüğüne katkıda bulunduğu ve hücre-hücre etkileşiminden çok hücre-bazal membran ve bazal membran-İnterstitial doku etkileşiminde işlevsel olduğu görüldü. Fibronektin tutulumunun en belirgin izlendiği alanların peritübüler alan, bazal membran ve myoid hücre katmanı olduğu görüldü. β_1 integrin tutulumunun, özellikle gelişimin ileri evrelerinde, peritübüler dokuda ve bazı spermatogenik seri hücrelerinde belirgin olduğu izlendi.

Sonuç: β_1 integrinin ise daha çok hücre-hücre etkileşiminde ve dolayısıyla spermatogeneziste etkin olabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: β_1 integrin, fibronektin, seminifer tübül, testis

İletişim Adresi: Emel Nacar,
Turgut Özal Üniversitesi SMYO, Patoloji
Laboratuvar Teknikleri Programı,
Ostim/Ankara,

E-posta: enacar@turgutozal.edu.tr

ABSTRACT

Aim: Fibronectin interacts with its receptor, β_1 integrin, and takes place in cell adhesion, migration and proliferation. In this study, we examined the distribution of fibronectin and β_1 integrin of testis tissues in different developmental stages with immunohistochemical methods.

Material and methods: Wistar rats were used in the study and divided into 8 groups according to their ages: newborn, 3 days, 10 days, 15 days, 21 days, 1 month, 2 months and adult. Testis tissues were examined immunohistochemically for fibronectin and β_1 integrin.

Results: The best fibronectin reactions occurred in peritubular area, basement membrane and myoid cell layer and these reactions became more apparent in later stages. Besides we observed that there was no reaction in seminiferous tubule epithelium till adult stage. In adult rat testis tissue, fibronectin immune staining was mild to weak in cell layers of seminiferous epithelium. β_1 integrin immune staining was diffusely strong in peritubular tissue and spermatogonia from seminiferous epithelium. Reaction was restricted to cytoplasm and membranes of the germinal cells.

Conclusion: As a result, fibronectin in testis is more functional in cell-basement membrane and basement membrane-Interstitial tissue interaction than cell-cell interaction; and β_1 integrin is essential in cell-cell interaction and spermatogenesis.

Keywords: β_1 integrin, fibronectin, seminiferous tubule, testis

Geliş tarihi / Received: 09.10.2014 **Kabul tarihi / Accepted:** 10.12.2014

GİRİŞ

Spermatogenezis puberte sonrası seminifer tübüllerde ilkel germ hücreleri olan spermatogonyumlardan başlayarak olgun spermium oluşuncaya değin geçen çoğalma, büyüme, olgunlaşma ve farklılaşma evrelerini içeren gelişim sürecidir. Spermatogeneziste hücreler arası bağlantı ve iletişim son derece önemlidir. Bunu sağlayan ise; gelişim evrelerindeki germ hücreleri yüzeyinde bulunan adezyon molekülleri ve hücre dışı matriks bileşenleri arasındaki etkileşimlerin olduğu düşünülmektedir (1, 2).

Hücre adezyon molekülleri, hücre yüzeyinde bulunan hücrelerin birbirine ve hücre dışı matrikse bağlanmasını sağlayan protein molekülleridir. Etkilerini bağlanma bölgeleri aracılığı ile gerçekleştirirler (3). Adezyon molekülleri kaderinler, selektinler, immunglobulin süper ailesi ve integrinler olarak dört esas grupta toplanan, karmaşık bir ligant-reseptör topluluğudur. Esas işlevleri hücrelerin birbirleriyle ve hücre dışı matriks ile adezyonu ve etkileşimini sağlamaktır. Embriyonik gelişim, doku düzenlenmesi, immün hücre aktivasyonu, yara iyileşmesi, hücre göçü gibi pek çok yaşamsal olayda önemli rol oynarlar (4, 5).

Hücre dışı matriks yapısal bütünlüğün sağlanmasında esas role sahip özelleşmiş, dinamik bir yapıdır. Bileşenleri olan fibronektin, laminin, tip 4 kollajen, vitronektin, tenaskin ve pentaktin hücre dışı matriks ve hücreler arasında tutunmayı sağlayan ipliksi glikoproteinlerdir. Bunlar diğer hücre dışı bileşenleri ve hücre adezyon molekülleri için bağlanma bölgeleri taşırlar. Bağlanma bölgeleri RGD olarak adlandırılan, arjinin-glisin-aspartik asitten oluşan özel bir amino asit dizilimidir (6, 7).

Hücre dışı matriks'in önemli bir bağlayıcı bileşeni olan fibronektin birbirine benzer, molekül ağırlıkları yaklaşık 22000 dalton olan iki büyük alt birimin disülfid bağlarıyla, 'V' şeklinde bir makromolekül biçimlendirmesiyle oluşur. Fibronektin hücre ve matriks adezyonun sağlanmasının yanında hücre göçü, embriyogenezis, yara iyileşmesi, hemostazis, trombozis gibi olaylarda da etkindir (8, 9).

Hücre dışı fibronektin fibrilleri ile hücre içi aktin filamanları arasındaki etkileşimler hücre zarındaki integrin reseptörleri aracılığı ile gerçekleşir. Tutunma özelliğindeki hücreler, yüzeylerinde bulunan integrin reseptörleri (genelde $\alpha_5\beta_1$) ile fibronektinin orta bölgesindeki RGD amino asit dizilimini tanıyıp fibronektine yapışmaktadır (10, 11).

İntegrinler, 1980'den bu yana böceklerde, nematodlarda ve omurgalı hayvanlarda tanımlanmıştır. Dağılımları türden türe değişen, heterodimerik, integral transmembran glikoproteinleridir. İntegrinler, hücre dışı adezyon moleküllerinin, hücre iskeletine tutunmasını sağlar. Kovalent olmayan bağlarla birbirine bağlanan farklı α ve β alt

birimlerinden oluşurlar. Şu ana değin, 16 α ve 8 β alt zinciri tanımlanmıştır. Doğal olarak oluşan 24 farklı integrin vardır. β 1 ve β 3 alt grupları fibronektin, kollajen, laminin ile gerçekleşen adezyondan yükümlü iken β 2 alt grubu daha çok hücre-hücre tutunulurluğu ile ilgilidir.

Spermatogenezis süreci içinde gözleyebildiğimiz hücre-hücre bağlanması, hücreler arasında sinyal iletimi, farklılaşma ve hücre göçü gibi işlevlerin, sağlıklı bir şekilde yürütülmesi için bu iki grup molekül doğrudan birbiriyle etkileşim içinde olmalıdır. Bu nedenlerle bu çalışmada etkileşimin iki önemli bileşeni olan fibronektin ve β 1 integrinin spermatojenik hücrelerdeki dağılımları incelendi.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Kullanımı ve Bakımı ile ilgili yerel etik kurul onayı alındıktan sonra çalışmamızda Wistar cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar, yaşlarına bağlı olarak yenidoğan, 3, 10, 15, 21 günlük, 1, 2 aylık ve ergin olmak üzere 8 gruba ayrıldı. Sıçanlar, doğdukları ilk gün yenidoğan olarak kabul edildi ve sırasıyla diğer gruplar oluşturuldu. Deney süresince laboratuvarın sıcaklığı ortalama 22 ± 2 °C, nisbi nemi ortalama % 50 ± 5 ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlandı. Su ve yem kısıtlaması yapılmadı.

Anestezi altında alınan testis dokuları %10'luk nötral formalinde 72 saat süreyle tespit edildi. Daha sonra dokular alışılagelmiş ışık mikroskop izleme yönteminden geçirilerek parafin bloklar hazırlandı. Bu bloklardan 4-5 mikrometre kalınlığındaki kesitler polilizinli adezivli lamlara alındı.

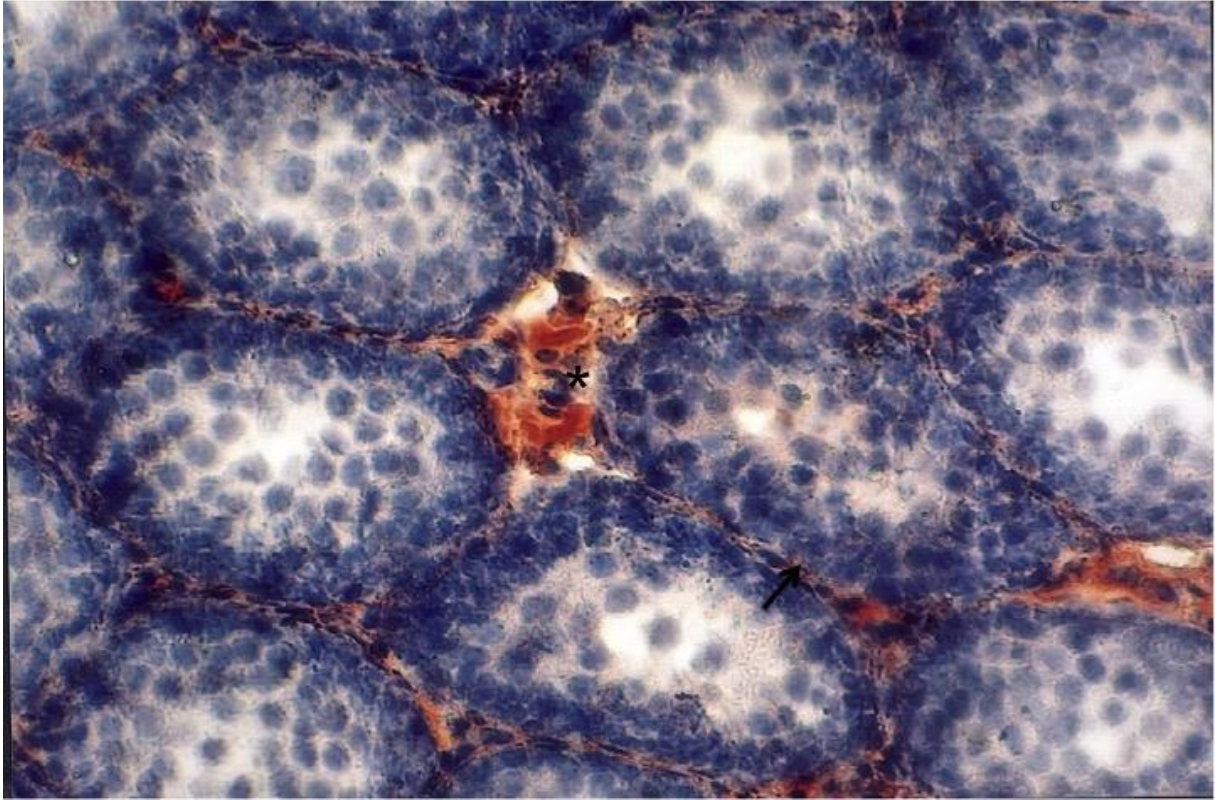
Dokudaki fibronektinin ve laminin reseptörü olan β 1 integrinin saptanması için Neomarkers marka Fibronectin Ab-11 (FBN 11, mouse Mab MS-1351-R7, Lot: 1351R106, Neomarkers, Fremont, CA) ve Santa Cruz marka Laminin β 1 (C-19, cat # SC-6018, lot # E030, goat polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology) kullanıldı.

Kesitler 37 derecelik etüvde 1 gece bekletildikten sonra parafinden arınması 30 dk. ksilol içinde bekletildi. Daha sonra alkol serilerinden geçirilerek ksilolün uzaklaştırılmasının ardından 10 dk. distile suda yıkandı. Antijenik uçların açığa çıkarılması için fibronektinle boyanacak dokular sitrat tamponuna konuldu ve mikrodalga fırında 20 dk. etkin bırakıldı. Lamininle boyanacak kesitlere proteaz damlatıldı ve 37 derecelik etüvde 20 dk. tutuldu. Daha sonra oda ısısında soğutulan dokular önce distile su ile 10 dk. ve sonra da PBS ile 3x3 dk. yıkandı. İnkübasyon kabına dizilen kesitler hidrojen peroxide 15 dk. etkin bırakıldıktan ve PBS ile yıkandıktan sonra Ultra V Blok ile 5 dk. etkin bırakıldı. Aralarda PBS ile yıkamak

şartıyla sırasıyla primer antikor (1 saat), biyotinlenmiş sekonder antikor (20 dk.), streptavidin peroxidase (20 dk.) ve AEC (15 dk.) damlatıldı. Yine PBS ile yıkanan kesitler Mayer's Hematoksilen'de 2 dk. bekletildi. Akar suda 5 dk. bekletildi ve Ultra Mount ile kapatıldıktan sonra Olympus BH2 foto ışık mikroskopta incelenerek fotoğrafları çekildi.

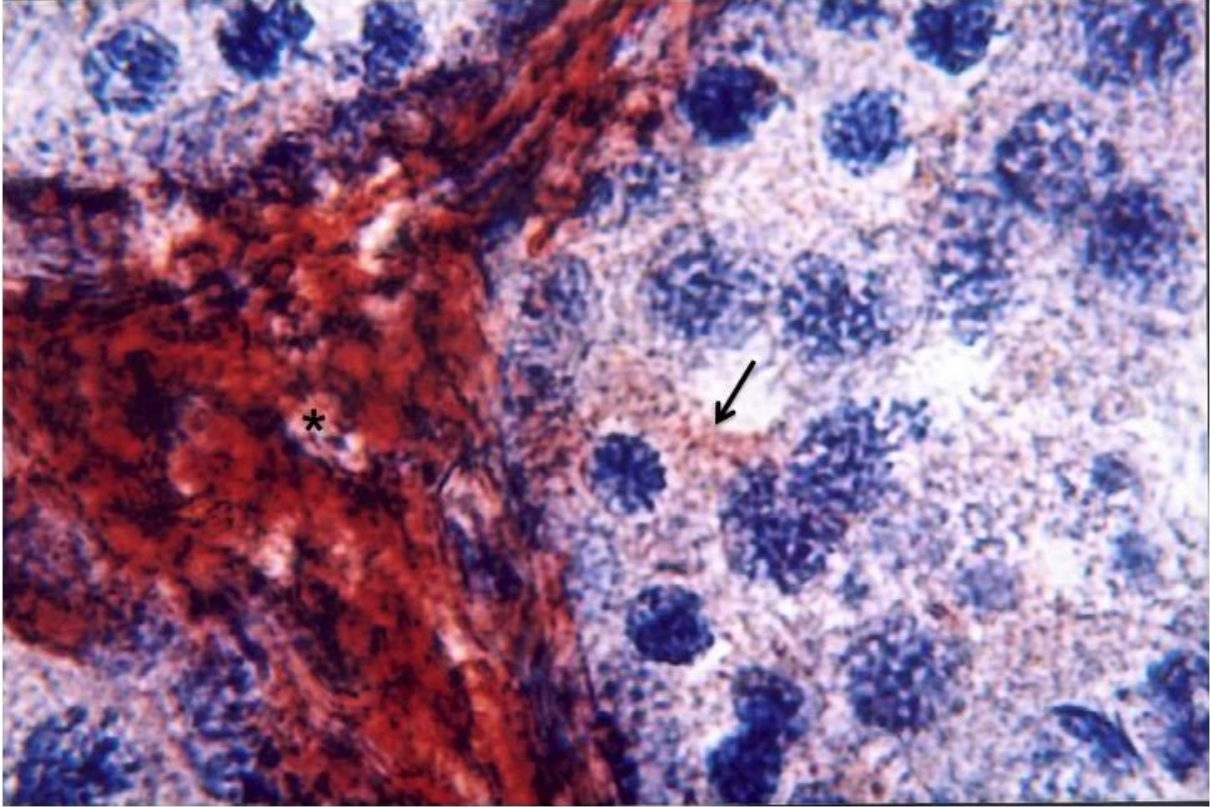
BULGULAR

Fibronektin tutulumu değerlendirildiğinde; yeni doğandan 21. gün grubuna kadar olan dört grupta tübül lümenlerinin kapalı olduğu ve epitelde fibronektin tutulumunun çok zayıf ya da hiç olmadığı izlendi. Bu gruplarda tutulumun peritübüler bölgede ve interstisyel alanda belirgin olduğu görüldü (Resim 1).



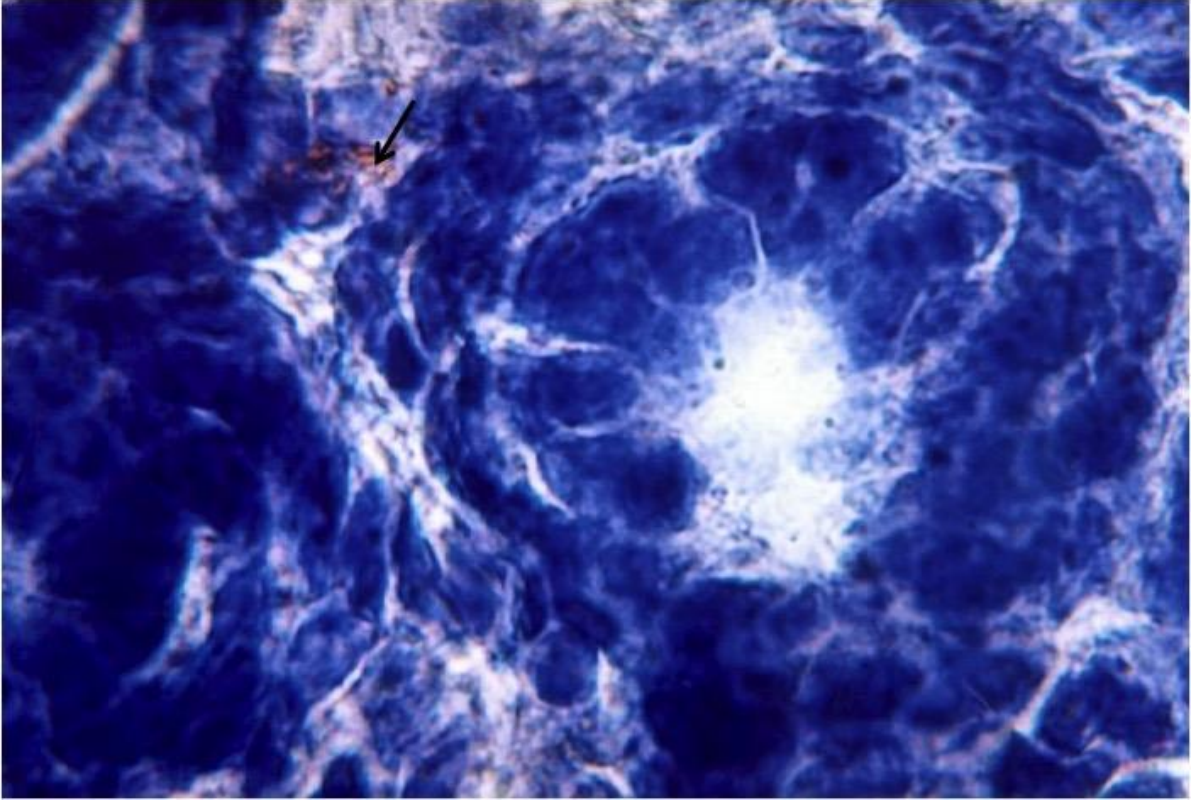
Resim 1: 21. günde peritübüler alanda (↑) ve interstisyel dokuda (*) kuvvetli fibronektin tutulumu izleniyor. İmmünperoksidaz, Hematoksilen, X200

21. günden sonra lümenin açıldığı izlendi. 21. günden erişkine kadar olan dört gruptaki fibronektin tutulumuna bakıldığında özellikle seminifer epitel hücre katmanlarında hücreler çevresinde ortadan zayıfa değişen fibronektin tutulumu izlenirken interstisyel dokuda tutulum oldukça yaygındı (Resim 2). Genel olarak bakıldığında da tutulumun yaşla birlikte arttığı saptandı.

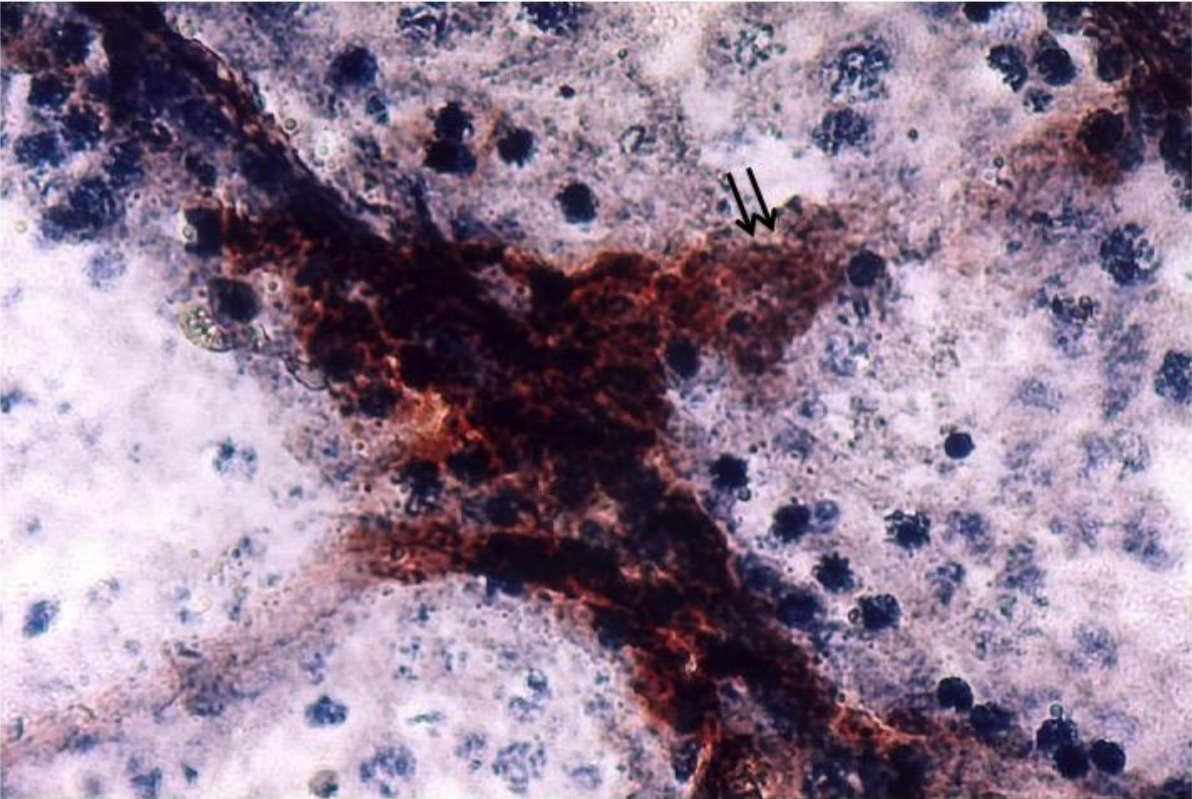


Resim 2: Erişkinde seminifer tübül epitelinde zayıf (↑), interstisyel alanda kuvvetli (*) fibronektin tutulumu ayırt ediliyor. İmmünperoksidaz, Hematoksilen, X1000

$\beta 1$ integrin tutulumu değerlendirildiğinde ise; ilk dört grupta tutulumun son derece az olduğu ve bunun da interstisyel dokunun bazı bölümlerinde olduğu görüldü (Resim 3). 21. günden sonra seminifer tüp epitelinde olgunlaşan hücrelerin $\beta 1$ integrini zar düzeyinde ve orta derecede tuttuğu ve bu tutulumun günlerle orantılı olarak arttığı saptandı. Ek olarak bazal laminada ve interstisyel dokuda kuvvetli tutulum izlendi. Erişkinde seminifer tüp epitelinde bazaldan apikale doğru hücreler olgunlaştıkça ve tüpün döngüye giren bazı hücrelerinde $\beta 1$ integrin tutulumunun oldukça kuvvetli olduğu ve bunun lümene doğru zayıfladığı dikkati çekti (Resim 4). Genel olarak bakıldığında da tutulumun yaşla birlikte arttığı saptandı.



Resim 3: Yenidoğanda, testis dokusunda $\beta 1$ integrin tutulumu sadece interstisyel dokunun bazı bölümlerinde (\uparrow) görülüyor. İmmünperoksidaz, Hematoksilen, X1000



Resim 4: Erişkinde, küçük büyültmelerde seminifer tüp epitelinde bazalden apikale doğru hücreler olgunlaştıkça ve tüpün döngüye giren bazı hücrelerinde $\beta 1$ integrin tutulumunun oldukça kuvvetli olduğu ($\uparrow\uparrow$) dikkati çekiyor. İmmünperoxidaz, Hematoksilen, X1000

TARTIŞMA

Gelişmekte olan testis dokusunda $\beta 1$ integrin ve fibronektin dağılımını gösterebilmek amacıyla yapılan immünohistokimyasal çalışmada, genel olarak literatürle uyumlu bulgular elde edildi.

Son çalışmalarda testis hücrelerine ait pek çok salgısal ürün tanımlanmıştır. İlginç olan bu ürünlerin çoğunun doğrudan yada dolaylı olarak hücre-hücre etkileşimde rol almasıdır. Laminin ve tip I, IV kollagenler Sertoli hücrelerince salgılanırken; fibronektin ve yine tip I kollagen peritübüler hücrelerce salgılanır (12).

Magnanti ve arkadaşlarının kültürdeki peritübüler myoit hücrelerde (PTMH) integrin dağılımını inceledikleri çalışmalarında, bu hücrelerin $\alpha 1, 2, 3, 6, V$ ve $\beta 1, 3, 4$ integrin alt birimlerini eksprese ettikleri bildirilmiştir (13). Magnanti'nin bulgularıyla uyumlu olarak bizim çalışmamızda da, peritübüler alanda myoit hücre düzeyinde yaygın ve kuvvetli $\beta 1$ integrin tutulumu izlendi

Salanova ve ark., spermatositlerin bazal kompartmandan luminal kompartmana geçişlerinde integrin ekspresyonunun önce kaybolduğunu ve sonra yeniden görüldüğünü bildirmişlerdir (14). Palombi ve ark. ise integrin ekspresyonundaki bu kaybolmanın apikal ektoplazmik özelleşmenin dağılması ve spermatitlerin lümene verilmesiyle eş zamanlarda gerçekleştiğini öne sürmüşlerdir (15). Bu bildirimler $\beta 1$ integrin ekspresyonunun spermatogenezdeki önemli evrelerle yakından ilişkili olduğunu ve dolayısıyla tutulum farklılıkları görülebileceğini ortaya koymaktadır.

Mulholland ve ark. seminifer epitelde $\beta 1$ integrin dağılımlarını inceledikleri çalışmalarında $\beta 1$ integrin tutulumlarının, bizim sonuçlarımızı destekler şekilde, özellikle Sertoli-germ hücre ve Sertoli-Sertoli hücre etkileşim bölgelerinde yoğun olduğu bildirilmiştir (16).

Giebel ve arkadaşlarının sıçan testisinde integrin $\beta 1, \alpha 1, \alpha 5$ ve $\alpha 9$ alt birimlerinin yerleşimine baktıkları çalışmalarında, sonuçlarımızla uyumlu şekilde, $\beta 1, \alpha 1$ ve $\alpha 9$ alt birimlerin bazal membranlarda ve/veya bütün seminifer tübüllerde Sertoli hücre bazal bölmelerinde eksprese edildiği bildirilmiştir.

Giebel ve ark. çalışmalarında, Sertoli hücre bazal sitoplazmasına ek olarak $\beta 1, \alpha 1$ ve $\alpha 5$ integrin alt birimlerinin seminifer tübüllerin ara ve luminal bölmelerinde yerleştiklerini ve bu ekspresyonun spermatojenik döngüye bağlı olduğunu bildirmiştir. Giebel ve ark., Palombi ve ark. ve Pfeiffer ve arkadaşlarının çalışmalarının sonucunda $\beta 1$ integrinin ektoplazmik özelleşmelerde yerleşik olduğu bildirilmiştir (15, 17).

Biz de Giebel'in sonuçlarıyla uyumlu olarak Sertoli hücre-bazal membran etkileşiminde integrinlerin rolü olduğunu düşünmekteyiz. Çünkü seminifer epitelde tutulumun bazaldan

apikale yaygınlaştığını ve bazal membranda yaygın kuvvetli $\beta 1$ integrin tutulumu olduğu görüldü.

Schaller ve arkadaşlarının insan testisinde $\beta 1$ integrin ekspresyonunu inceledikleri çalışmalarında; seminifer tübül bazal membranında, spermatozoidlerde, spermatidlerde ve testiküler spermatozoalarda $\beta 1$ integrinlerin β zincirine karşı reaksiyon izlenmiştir. Aynı çalışmada spermatogonyalarda ise tutulum görülmemiştir (18). Çalışmamızda ise seminifer tübül bazal membranı ve tüp epitelinde yaygın $\beta 1$ integrin tutulumu izlenirken; Schaller'ın aksine spermatogonyalarda da tutulum izlendi.

Schaller ve arkadaşlarının 1993'te yaptıkları çalışmada, fibronektin tutulumu seminifer tübül bazal membranında ve germinal hücrelerde belirgin izlenmiştir. Çalışmamızda, Schaller'ın sonuçlarıyla uyumlu olarak, seminifer tüp bazal membranında, myoit hücre katmanında ve interstisyel alanda yaygın kuvvetli fibronektin tutulumu saptandı. Schaller'ın çalışmasında ayrıca, spermatozoid ve spermatidlerde ve spermatozoidlerin özellikle baş kısımlarında kuvvetli reaksiyon görülmüştür. Fibronektinin bu bölgelerde saptanması onun spermatogenezisde hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşiminde etkin olabileceğini düşündürmüştür (18, 19).

Morales ve arkadaşlarının sıçan testisindeki yaşa bağımlı değişiklikleri inceledikleri çalışmanın sonucunda, yaşla birlikte lamina propria kalınlığının arttığı bildirilmiştir. Fibronektin immün reaktivitesi, çalışmamızla uyumlu olarak, kan damarları ve lamina propriada belirgin izlenmiş ve yaşla birlikte tutulumun arttığı bildirilmiştir (20).

Sonuç olarak, testiste fibronektinin bir bazal membran ve bağ doku bileşeni olarak seminifer tüplerin bütünlüğüne katkıda bulunduğu ve hücre-hücre etkileşiminden çok hücre-bazal membran ve bazal membran-interstisyel doku etkileşiminde işlevsel olduğu; $\beta 1$ integrinin ise daha çok hücre-hücre etkileşiminde ve dolayısıyla spermatogenezisde etkin olabileceği kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

1. Brown E, Dejana E. Cell to cell contact and extracellular matrix editorial overview: Cell-cell and cell-matrix interactions – running, jumping, standing still. *Current Opinion in Cell Biology* 2003;15:505-508.
2. Giebel J, Löster K, Rune GM. Localization of integrin $\beta 1$, $\alpha 1$, $\alpha 5$ and $\alpha 9$ subunits in the rat testis. *International Journal of Andrology* 1997;20:3-9.

3. Atabekođlu CS, Engin Y, Üstün Y, Aytaç R. Üreme Fizyolojisi ve Adezyon Molekülleri. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 2002;55:85-92.
4. Alper D, Erdem F. Adezyon molekülleri. T. Klin. Tıp Bilimleri 1997;17:75-77.
5. Flier A, Sonnenber GA. Function and interaction of integrins. Cell Tissue Res. 2001;305:285-298.
6. Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. Journal of Pathology 2003;200:423-428.
7. Humphries MJ. Integrin structure, Biochemical Society Transactions 2000;28:311-339.
8. Hynes RO, Yamada KM. Fibronectins: Multifunctional Modular Glycoproteins. The Journal of Cell Biology 1982;95:369-377.
9. Ruoslahti E. Fibronectin and its receptors, Ann Rev Biochem. 1988;57:375-413.
10. Garcia AJ, Boettiger D. Integrin-fibronectin interactions at the cell-material interface: initial integrin binding and signaling. Biomaterials 1999;20:2427-2433.
11. Main AL, Harve TS, Baron JB, Campbell ID. The Three-Dimensional Structure of the Tenth Type III Module of Fibronectin: An Insight into RGD-Mediated Interactions. Cell 1992;71:671-678.
12. Skinner MK. Cell-Cell Interactions in the Testis. Endocrine Reviews 1991;12:45-77.
13. Magnanti M, Gismondi A, Gandini O, Rossi FM, Michetti PM, Santtiemma V, Morrone S. Integrin Pattern and Effect on Contraction in Cultured Testicular Peritubular Myoid Cells. American Journal of Reproductive Immunology 2001;45:21-27.
14. Salanova M, Ricci G, Boitani C, Stefanini M, De Grossi S, Palombi F. Junctional contacts between Sertoli cells in normal and spermatogenic rat seminiferous epithelium contain $\alpha 6\beta 1$ integrin in their formation in controlled by follicle-stimulating hormone. Biol. Reprod 1998;58:371-378.
15. Palombi F, Salanova M, Taron G, Garini D, Stefanini M. Distribution of $\beta 1$ -integrin subunit in rat seminiferous epithelium. Biol. Reprod. 1992;47:1173-1182.
16. Mulholland DJ, Dedhar S, Vogl AW. Rat Seminiferous Epithelium Contains a Unique (Ectoplasmic Specialization) with Signaling Properties Both of Cell/Cell and Cell/Matrix Junctions. Biology of Reproduction 2001;64:396-407.
17. Pfeiffer D, Dedhar S, Byers SW, Vogl AW. Evidence that an integrin may be present at specialized sites (ectoplasmic specializations) of intercellular adhesion in the seminiferous epithelium. J. Cell Biol. 1991;115:482.

18. Shaller J, Glander HJ, Dethloff J. Evidence of β 1 integrins and fibronectin on spermatogenic cells in human testis. *Human Reproduction* 1993;8:1873-1878.
19. Glander HJ, Herrman K, Haustein UF. The equatorial fibronectin band on human spermatozoa: a diagnostic help for male fertility?. *Andrologia* 1987;19:456-459.
20. Morales E, Horn R, Pastor LM, Santamaria L, Pallares J, Zuasti A, Ferrer C, Canteras M. Involution of seminiferous tubules in aged hamsters: an ultrastructural, immunohistochemical and quantitative morphological study. *Histol Histopathol.* 2004;19:445-55.