

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**TAVŞAN TESTİS VE EPİDİDİMİNDE VASKÜLER
ENDOTELİYAL BÜYÜME FAKTÖR VE RESEPTÖRLERİNİN
LOKALİZASYONU**

**Hazırlayan
Nilgün ANTEPLİ**

**Danışman
Doç. Dr. Feyzullah BEYAZ**

Yüksek Lisans Tezi

**Aralık 2013
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**TAVŞAN TESTİS VE EPİDİDİMİNDE VASKÜLER
ENDOTELİYAL BÜYÜME FAKTÖR VE
RESEPTÖRLERİNİN LOKALİZASYONU
(Yüksek Lisans Tezi)**

**Hazırlayan
Nilgün ANTEPLİ**

**Danışman
Doç.Dr. Feyzullah BEYAZ**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TSY-11-3399 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

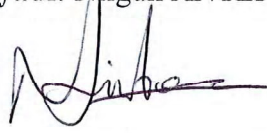
**Aralık 2013
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

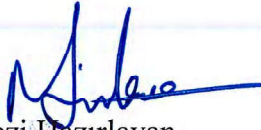
Adı-Soyadı: Nİlgün ANTEPLİ

İmza:



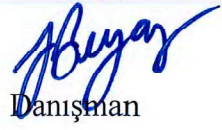
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

“Tavşan Testis ve Epididimisinde Vasküler Endotelial Büyüme Faktör ve Reseptörlerinin Lokalizasyonu” adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.



Tezi Hazırlayan

Nilgün ANTEPLİ



Danışman

Doç.Dr.Feyzullah BEYAZ



Histoloji ve Embriyoloji ABD Başkanı

Prof.Dr.Narin LİMAN

Doç.Dr.Feyzullah BEYAZ'ın danışmanlığında Vet.Hek. Nilgün ANTEPLİ tarafından hazırlanan “**Tavşan Testis ve Epididimisinde Vasküler Endotelial Büyüme Faktör ve Reseptörlerinin Lokalizasyonu**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında **Yüksek lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

26 /12 / 2013

JÜRİ:

Danışman: Doç.Dr. Feyzullah BEYAZ Histoloji ve Embriyoloji AD.
Üye : Prof.Dr. Narin LİMAN Histoloji ve Embriyoloji AD.
Üye : Prof.Dr. Güner KÜÇÜK BAYRAM Histoloji ve Embriyoloji AD.

Handwritten signatures of the jury members: Feyzullah Beyaz, Narin Liman, and Güner Küçük Bayram.

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... / /

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Veteriner Fakültesi lisans mezunu olarak başladığım Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda her şeyden önce Anabilim Dalı'na adaptasyonumda, çalışmalarımı yönlendirmesinde, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda olduğu kadar insani ilişkilerde de sonsuz desteğiyle gelişmeye katkıda bulunan danışman hocam sayın Doç.Dr. Feyzullah BEYAZ'a, Yüksek lisans dersleri ve çalışmaları sırasında yardım ve desteklerinden dolayı Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan hocalarım Prof.Dr. Narin LİMAN, Prof.Dr. Güner KÜÇÜK BAYRAM ve Yard.Doç.Dr. Emel ALAN'a ayrıca çalışmalarım süresince birçok fedakarlıklar gösterip beni destekleyerek her an yanımda olan eşim, oğlum ve kızıma yaşamımın her döneminde bana duydukları güven için aileme en derin duygularıyla teşekkür ederim.

Nilgün ANTEPLİ
Kayseri, 2013

**TAVŞAN TESTİS VE EPİDİDİMİSİNDE VASKÜLER ENDOTELİYAL BÜYÜME
FAKTÖR VE RESEPTÖRLERİNİN LOKALİZASYONU**

Nilgün ANTEPLİ

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Aralık 2013

Danışman: Doç.Dr. Feyzullah BEYAZ

KISA ÖZET

Bu çalışma, VEGF ve reseptörleri VEGFR-1 ile VEGFR-2'nin tavşan testis ve epididimisindeki varlığı ve lokalizasyonunu belirlemek amacıyla yapıldı. Çalışmada; 15 adet sağlıklı, erkek, Yeni Zellanda tavşanından alınmış ve rutin histolojik işlemlerden geçirilmiş 30 adet testis ve epididimisler materyal olarak kullanıldı. Seminifer tübüllerde spermatojenik evrelerin belirlenmesi için PAS, VEGF ve reseptörleri VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin testis ve epididimisteki lokalizasyonunun belirlenmesi için ise Strept-Avidin Biotin Kompleks (ABC) peroksidaz immunohistokimyasal boyama yöntemi uygulandı.

VEGF için yapılan immunboyamalarda, spermatojenik gelişimin tüm evrelerinde olmak üzere Sertoli hücrelerinde, tip A spermatogonyumlarda ve primer spermatositlerde pozitif immunreaksiyon gözlemlendi. Spermatojenik gelişimin V., VI., VII., ve VIII. evrelerindeki seminifer tübüllerde bulunan spermatidlerin akrozomlarında da pozitif immunboyanma dikkati çekti. Ayrıca, interstisyel dokuda Leydig hücreleri ve vasküler endoteliumda da pozitif immunreaksiyon belirlendi. Başlangıç segmenti, kaput, korpus ve kauda epididimis bölümlerinde duktus epididimis duvarını döşeyen prinsipal hücrelerin bazal ve apikal sitoplazmalarında ve apikal ile bazal hücrelerin sitoplazmalarında immunpozitif reaksiyon tespit edildi. Anti-VEGFR-1 (Abcam 9540) primer antikoru uygulanan tavşan testis dokusunda I'den VIII'e kadar tüm spermatojenik evrelerdeki seminifer tübüllerde sadece bazı Sertoli hücrelerinde immunboyanma görülürken, interstisyel alanda Leydig hücrelerinde ve damar endotelinde pozitif immunoreaksiyon belirlendi. Epididimiste, sadece kapiller endotelde immunpozitif reaksiyon saptanırken, kanal epitellerinde herhangi bir pozitif immunboyanma belirlenemedi. Anti-VEGFR-1 (Abcam 2350) primer antikoru uygulanan testis dokusunda I'den VIII'e kadar tüm spermatojenik evredeki seminifer tübüllerde Sertoli hücrelerinde ve spermatogonyumlarda immunpozitif reaksiyon gözlemlendi. İnterstisyel alanda, Leydig hücreleri ve damar endoteliumunda immunpozitif boyanma belirlendi. Epididimisin duktus epididimis epitelindeki hücrelerde, bazalde peritübüler hücrelerde ve damar endotelinde immunboyanma saptandı. Anti-VEGFR-2 (Abcam 9530) primer antikoru uygulanan tavşan testis dokusunda I'den VIII'e kadar tüm spermatojenik evrelerdeki seminifer tübüllerde Sertoli hücrelerinde çok zayıf immunpozitif reaksiyon gözlenirken interstisyel alanda, Leydig hücrelerinde ve damar

endotellerinde ise kuvvetli bir immunboyanma belirlendi. Epididimiste, duktus epididimis duvarında herhangi bir immunboyanma dikkat çekmezken, intersitisyel dokudaki kapillar damar endotellerinde immunboyanma görüldü. Anti-VEGFR-2 (Abcam 10973) primer antikoru uygulanan tavşan testis dokusunda I'den VIII'e kadar tüm spermatojenik evrelerdeki seminifer tübüllerdeki Sertoli hücreleri ve spermatogonyumların sitoplazmalarında çok yoğun immunpozitif boyanma gözlendi. Bununla birlikte V., VI., VII., ve VIII. evrelerde spermatidlerin akrozomlarında immunpozitif reaksiyon tespit edildi. İntersitisyel alanda, Leydig hücreleri ve damar endotelinde de immunboyanma belirlendi. Epididimiste duktus epididimisi döşeyen prinsipal hücrelerin apikal ile bazallerinde, apikal ve bazal hücrelerin sitoplazmalarında ve peritubuler hücrelerin sitoplazmalarında pozitif immunreaksiyon görüldü.

VEGF proteini ve reseptörleri VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin tavşan testislerindeki spesifik lokalizasyonları, bu moleküllerin spermatogonial farklılaşma, spermiyogenezis, spermatidlerde akrozom gelişimi ve Leydig hücrelerinde steroidiogeneze, ayrıca epididimiste sperm olgunlaşması ve kan-epididimis bariyerine katkı sağlama gibi fonksiyonel görevleri olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: VEGF, Testis, Epididimis, VEGF reseptörleri, Tavşan

THE LOCALIZATION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AND ITS RECEPTORS ON TESTIS AND EPIDIDYMIS OF RABBIT

Nilgün ANTEPLİ

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Histology and Embryology

M.Sc. Thesis, December 2013

Supervisor: Associate Professor Feyzullah BEYAZ

ABSTRACT

This study was planned to exhibit the presence and localization of VEGF and its receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 on rabbit testis and epididymis using immunohistochemistry. In this study, 30 testis and epididymis were taken from 15 healthy, male New Zealand rabbit and processed through routine histological process were used as a material. PAS & Hematoxyline staining were applied for determining the spermatogenic stages at seminiferous tubules. Strept-Avidin Biotin Kompleks (ABC) immunohistochemical method was used for the determination of localization of VEGF and its receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 on rabbit testis and epididymis.

At the immunostaining for VEGF, it was seen positive immunoreaction in Sertoli cells, Type A spermatogonia and primary spermatocytes in all spermatogenic stages. It was found the positive immunoreaction for acrosome of spermatids in stages V., VI., VII and VIII within seminiferous tubules. The positive immunoreaction was determined for Leydig cells and vascular endothelium in the interstitium. Moreover, the positive immunoreaction was identified for the apical and basal cytoplasm of prenciple cells and apical cells lining ductus epididymis in initial segment, caput, corpus and cauda epididymis. At rabbit testis where it was applied for anti-VEGFR-1 (Abcam 9540) primary antibody, a positive immunoreaction was seen in only Sertoli cells in seminiferous tubules containing all spermatogenic stages from I to VIII and the leydig cells or vascular endothelium in the interstitium. A positive immunoreaction was just identified for capillar endothelium, but not the epithelium of ducts in epididymis. At rabbit testis where it was applied for anti-VEGFR-1 (Abcam 2350) primary antibody, a positive immunoreaction was seen in Sertoli cells and spermatogonia in seminiferous tubules containing all spermatogenic stages from I to VIII and Leydig cells or vascular endothelium in the interstitium.

A positive immunostaining was determined for epithelial cells lining ductus epididymis, peritubuler cells surrounding ducts and vascular endothelium in epididymis. For anti-VEGFR-2 (Abcam 9530) primary antibody, a weak positive immunoreaction was seen in Sertoli cells in seminiferous tubules containing all spermatogenic stages from I to VIII but it was found a strong positive immunoreaction for Leydig cells or vascular endothelium in the interstitium. A negative immunostaining was determined for epithelial cells lining ductus epididymis, peritubuler cells surrounding ducts in epididymis but capillar endothelium was positive.

For anti-VEGFR-2 (Abcam 10973) primary antibody, a strongly positive immunoreaction was found in Sertoli cells and spermatogonia in seminiferous tubules containing all spermatogenic stages from I to VIII. Moreover, a positive immunoreaction was identified for acrosome of spermatids in stages V., VI., VII., and VIII within seminiferous tubules. It was found a positive immunostaining for Leydig cells or vascular endothelium in the interstitium. A immunopositive reaction was seen at apical and basal part of the principle cell and cytoplasm of apical and basal cells lining ductus epithelium and peritubular cells surrounding ducts.

The specific localizations of VEGF and its receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 in rabbit testis and epididymis indicate they may affect the spermatogonial differentiation, spermiogenesis, acrosomal development of spermatids, steroidogenesis in Leydig cells and sperm maturation and the supporting to blood-epididymis barrier in epididymis.

Keywords: VEGF, Testis, Epididymis, VEGF receptors, Rabbit

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
İÇ KAPAK	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR	v
KISA ÖZET.....	vi
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	x
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	xii
TABLO VE ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.ERKEK GENİTAL SİSTEM.....	3
2.1.1.Testis.....	3
2.1.2.Spermatogoniyal hücrelerin kökeni.....	6
2.1.3. Spermatogenezis.....	6
2.1.3-1.Spermatositogenezis.....	7
2.1.3-2.Mayoz bölünme.....	7
2.1.3.3.Spermiyogenezis.....	8
2.1.3.3.1.Golgi evresi.....	8
2.1.3.3.2.Kep evresi.....	8
2.1.3.3.3.Akrozomal evre.....	8
2.1.3.3.4.Olgunlaşma evresi.....	9
2.1.3.4.Spermatozoon.....	9
2.1.3.4.1.Baş.....	9
2.1.3.4.2.Boyun.....	10
2.1.3.4.3.Orta parça.....	10
2.1.3.4.4.Esas parça.....	10
2.1.3.4.5.Son parça.....	10
2.1.5.Tavşanda Spermatogenezis Evreleri.....	12
2.1.5.1.I.Evre.....	12
2.1.5.2.II. Evre.....	12

2.1.5.3.III. Evre.....	13
2.1.5.4.IV. Evre.....	13
2.1.5.5.V. Evre.....	13
2.1.5.6.VI. Evre.....	14
2.1.5.7.VII. Evre.....	14
2.1.5.8.VIII. Evre.....	14
2.1.6.Testisin İnterstisyel Dokusu.....	15
2.1.7.Epididimis.....	16
2.2.VASKÜLER ENDOTELİYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF).....	17
2.2.1.Genel Bilgi.....	17
2.2.2.Yapısı ve Özellikleri.....	21
2.2.3.Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Reseptörleri.....	23
2.2.3.1.VEGFR-1 (flt-1).....	23
2.2.3.2.VEGFR-2 (flk-1/KDR).....	23
2.2.3.3. VEGFR-3 (flt-4).....	24
3.MATERYAL VE METOD	26
4.BULGULAR.....	28
4.1.Genel Yapı.....	28
4.1.1.I. Evre	28
4.1.1.II. Evre	28
4.1.3.III. Evre	28
4.1.4.IV. Evre	29
4.1.5.V. Evre	29
4.1.6.VI. Evre	29
4.1.7.VII. Evre	29
4.1.8.VIII. Evre	30
4.2.VEGF.....	34
4.2.1.Testis.....	34
4.2.2.Epididimis.....	35
4.3.VEGF R-1.....	42
4.4.VEGF R-2.....	55
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	67
6.KAYNAKLAR.....	79
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ABC	: Avidin Biotin Kompleks
ABP	: Androjen Bağlayıcı Protein
DAB	: 3,3'-Diaminobenzidine
DNA	: Deoksi ribonükleik asit
ECM	: Ekstrasellüler matriks
Flk-1	: Fötal karaciğer kinazı 1
Flt-1	: Fms benzeri tirozin kinaz 1
FSH	: Folikül Stimule Edici Hormon
KDR	: Kinaz insert bölgesi içeren reseptör
mRNA	: Messenger Ribonükleik asit
Nrp-1	: Nöyrofilin-1
Nrp-2	: Nöyrofilin-2
PAS	: Periyodik Asit Shif
PBS	: Fosfat bufer salin
PLGF	: Plasenta benzeri büyüme faktörü
PDGF	: Platelet kökenli büyüme faktörü
VPF	: Vasküler Permabilite Faktörü
VEGF	: Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü
VEGFR-1	: Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü Reseptör 1
VEGFR-2	: Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü Reseptör 2
VEGFR-3	: Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü Reseptör 3

TABLO ve ŞEKİL LİSTESİ

Tablo 3.1.	İmmünohistokimyasal boyamalarda kullanılan primer antikorlar.....	27
Tablo 4.1.	Seminifer epitelde siklik evrelere göre testiküler hücrelerdeki VEGF, VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin hücrel reaktivitesi.....	65
Tablo 4.2.	Testisin intersitisyel dokusunda VEGF, VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin hücrel reaktivitesi.	66
Tablo 4.3.	Epididimisteki hücrelerde VEGF, VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin hücrel reaktivitesi.	66
Şekil 4.1.	Testis dokusunda evre I'in genel görünümü (PAS- Hematoksilen X20 µm).	30
Şekil 4.2.	Testis dokusunda evre II'in genel görünümü (PAS- Hematoksilen X20 µm).	31
Şekil 4.3.	Testis dokusunda evre III'in genel görünümü (PAS- Hematoksilen X20 µm).	31
Şekil 4.4.	Testis dokusunda evre IV'in genel görünümü (PAS- Hematoksilen X20 µm).	32
Şekil 4.5.	Testis dokusunda evre V'in genel görünümü (PAS- Hematoksilen X20 µm).	32
Şekil 4.6.	Testis dokusunda evre VI'in genel görünümü (PAS- Hematoksilen X20 µm).	33
Şekil 4.7.	Testis dokusunda evre VII'in genel görünümü (PAS- Hematoksilen X20 µm).	35
Şekil 4.8.	Testis dokusunda evre VIII'in genel görünümü (PAS- Hematoksilen X20 µm).	34
Şekil 4.9.	VEGF'ün testis dokusundaki lokalizasyonu, evre I (ABC İmmünooperoksidaz boyaması, X20 µm).....	36
Şekil 4.10.	VEGF'ün testis dokusundaki lokalizasyonu, evre II (ABC İmmünooperoksidaz boyaması, X20 µm).....	36
Şekil 4.11.	VEGF'ün testis dokusundaki lokalizasyonu, evre III (ABC İmmünooperoksidaz boyaması, X20 µm).....	37
Şekil 4.12.	VEGF'ün testis dokusundaki lokalizasyonu, evre IV (ABC İmmünooperoksidaz boyaması, X20 µm).....	37
Şekil 4.13.	VEGF'ün testis dokusundaki lokalizasyonu, evre V (ABC İmmünooperoksidaz boyaması, X20 µm).....	38

Şekil 4.14.	VEGF'ün testis dokusundaki lokalizasyonu, evre VI (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, X20 µm).....	38
Şekil 4.15.	VEGF'ün testis dokusundaki lokalizasyonu, evre VII (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	39
Şekil 4.16.	VEGF'ün testis dokusundaki lokalizasyonu, evre VIII (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, X20 µm).	39
Şekil 4.17.	VEGF'ün epididimisin başlangıç segmentindeki immunohistokimyasal lokalizasyonu, (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).	40
Şekil 4.18.	VEGF'ün kaput epididimis epitelindeki prinsipal hücrelerin apikal ve bazal sitoplazmalarındaki ve intersitisyel dokudaki damar endotellerindeki immunohistokimyasal lokalizasyonu, (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).	40
Şekil 4.19	VEGF'ün korpus epididimis epitelindeki prinsipal hücrelerin apikal ve bazal sitoplazmalarındaki ve intersitisyel dokudaki damar endotellerindeki immunohistokimyasal lokalizasyonu, (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	41
Şekil 4.20	VEGF'ün korpus epididimis epitelindeki prinsipal hücrelerin apikal ve bazal sitoplazmalarındaki immunohistokimyasal lokalizasyonu, (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).	41
Şekil 4.21.	VEGF R1 Klon I'in evre I'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	43
Şekil 4.22.	VEGF R1 Klon II'in evre I'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	43
Şekil 4.23.	VEGF R1 Klon I'in evre II'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	44
Şekil 4.24.	VEGF R1 Klon II'in evre II'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	44
Şekil 4.25.	VEGF R1 Klon I'in evre III'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	45

Şekil 4.26.	VEGF R1 Klon II'in evre III'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	45
Şekil 4.27.	VEGF R1 Klon I'in evre IV'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	46
Şekil 4.28.	VEGF R1 Klon II'in evre IV'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	46
Şekil 4.29.	VEGF R1 Klon I'in evre V'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	47
Şekil 4.30.	VEGF R1 Klon II'in evre V'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	47
Şekil 4.31.	VEGF R1 Klon I'in evre VI'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	48
Şekil 4.32.	VEGF R1 Klon II'in evre VI'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	48
Şekil 4.33.	VEGF R1 Klon I'in evre VII'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	49
Şekil 4.34.	VEGF R1 Klon II'in evre VII'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	49
Şekil 4.35.	VEGF R1 Klon I'in evre VIII'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	50
Şekil 4.36.	VEGF R1 Klon II'in evre VIII'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	50
Şekil 4.37.	VEGFR1 Klon I'in epididimisin başlangıç segmenti epitelindeki negatif immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).	51

Şekil 4.38.	VEGFR1 Klon I'in kaput epididimisin epitelindeki negatif immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	51
Şekil 4.39.	VEGFR1 Klon I'in korpus epididimisin epitelindeki negatif immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	52
Şekil 4.40.	VEGFR1 Klon I'in kaput epididimisin epitelindeki negatif immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	52
Şekil 4.41.	VEGFR1 Klon II'in epididimisin başlangıç segmenti epitelindeki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	53
Şekil 4.42.	VEGFR1 Klon II'in kaput epididimisin epitelindeki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).	53
Şekil 4.43.	VEGFR1 Klon II'in korpus epididimisin epitelindeki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	54
Şekil 4.44.	VEGFR1 Klon II'in kauda epididimisin epitelindeki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).	54
Şekil 4.45.	VEGF R2 Klon I'in seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	56
Şekil 4.46.	VEGF R2 Klon I'in seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	56
Şekil 4.47.	VEGF R2 Klon I'in seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	57
Şekil 4.48.	VEGF R2 Klon I'in kaput epididimisin epitelindeki negatif immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	57
Şekil 4.49.	VEGF R2 Klon I'in korpus epididimisin epitelindeki negatif immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	58

Şekil 4.50.	VEGF R2 Klon I'in kaput epididimisin epitelindeki negatif immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	58
Şekil 4.51.	VEGF R2 Klon II'in seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki lokalizasyonu, evre I (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	59
Şekil 4.52.	VEGF R2 Klon II'in seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki lokalizasyonu, evre II (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	59
Şekil 4.53.	VEGF R2 Klon II'in seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki lokalizasyonu, evre III (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).	60
Şekil 4.54.	VEGF R2 Klon II'in seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki lokalizasyonu, evre IV (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm)	60
Şekil 4.55.	VEGF R2 Klon II'in seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki lokalizasyonu, evre V (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).	61
Şekil 4.56.	VEGF R2 Klon II'in seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki lokalizasyonu, evre VI (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).....	61
Şekil 4.57.	VEGF R2 Klon II'in seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki lokalizasyonu, evre VII (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).	62
Şekil 4.58.	VEGF R2 Klon II'in seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki lokalizasyonu, evre VII (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).	62
Şekil 4.59.	VEGFR2 Klon II'in epididimisin başlangıç segmenti epitelindeki immunohistokimyasal lokalizasyonu, DAB X20 µm).	63
Şekil 4.60.	VEGF R2 Klon II'in kaput epididimisteki immunpozitif reaksiyonu (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).	63
Şekil 4.61.	VEGF R2 Klon II'in korpus epididimisteki immunpozitif reaksiyonu (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).	64
Şekil 4.62.	VEGF R2 Klon II'in kauda epididimisteki immunpozitif reaksiyonu (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).	64

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Testisler, erkek bireyin seksüel özellikleri ve üreme kabiliyetleriyle direk ilişkili bir çift organdır. Milattan 300 yıl önce insan ve hayvanlarda erkeğin seksüel özellikleri ve üreme kabiliyeti arasındaki ilişkinin ilk tanımlaması yapılmıştır. Aristo, cinsel erginliğe ulaşmamış erkek kuşların kastrasyonunun, ibikte renklenme ve dişilere ilgi duyma gibi seksüel özelliklerin gelişimini engellediğini gözlemlemiştir. Erkek cinsiyet özelliklerinin oluşmasında testisin rolü üzerine ilk gerçek bulgular 19. yüzyılın ortalarında Arnold Adolph (1849) tarafından ortaya konulmuştur. Berthold, horozların kastrasyonundan sonra ibiklerinde atrofinin oluştuğunu, testislerin abdominal boşluğa tekrar implante edilmesiyle de atrofinin önlenilebileceğini göstermiştir. Prolifere olan totipotent köken hücreler içermeleri, mayozun gözlemlendiği tek erkek organı olmaları ve sahip oldukları endokrin aktiviteleri ile bireyin fenotipini belirleyebilmeleri testisleri özel bir organ konumuna sokmaktadır. Testisin sahip olduğu tüm bu spesifik özellikler, belirli gen örneklerinin koordineli ekspresyonunu sağlayan özel endokrin ve lokal mekanizmalar tarafından düzenlenirler (1).

Testisin, germ hücrelerinin yapımı ve cinsiyet hormonlarının üretimi olmak üzere iki ana fonksiyonu vardır. Pubertaya erişmiş bir erkek bireyde, germ hücreleri mayoz bölünme geçirerek çeşitli gelişim aşamaları sonucunda ileri derecede özelleşmiş spermatozoonları meydana getirirler. Germ hücrelerinin gelişimi ve farklılaşması sırasında, çok sayıda hücre içi ve yüzeyi kaynaklı proteinler ortaya çıkarken, oluşan otoantijenlere karşı bir immunolojik yanıt oluşmaksızın tolerans şekillenmektedir. Son yıllarda, gelişen teknolojiye paralel olarak insan ve çeşitli hayvan türlerinin testisleri üzerinde çok sayıda araştırma yapılmıştır. Araştırmalar özellikle, testislerin morfolojik yapısal özelliklerinin ortaya konulması yanında, yapısında bulunan immun sistem hücrelerinin testiste fonksiyonlarına odaklanmıştır. Bununla birlikte araştırmalar daha çok insan, rat ve fareler üzerinde yoğunlaşırken, diğer türlerde daha az sayıda çalışma bulunmaktadır (1).

Vasküler endoteliyal büyüme faktörü (VEGF, VEGF-A, VPF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, plasenta benzeri büyüme faktörü (PLGF) gibi heparin bağlayıcı büyüme faktörleri ailesinin bir üyesidir (2, 3, 4). VEGF, 40 kDa ağırlığında homodimerik bir glikoprotein olup, yapısında yer aldığı organın hem gelişim evresinde hem de fizyolojik fonksiyonuna bağlı bir kaç önemli biyolojik aktivite sergileyen multifonksiyonel bir moleküldür (5, 6, 7, 8). VEGF reseptörleri VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3 olup bunlar Platelet kökenli büyüme faktörleri (PDGF) reseptör alt familyasının tirozin kinaz sınıf III reseptör ailesine bağlıdır. Erişkin dokularında, VEGFR-1 ve VEGFR-2 vasküler endoteliyal hücrelerde, VEGFR-3 ise başlıca lenfatik endotelde eksprese olurlar (2, 4, 9). Her ne kadar, VEGF; VEGFR-1, VEGFR-2, Nörofilin-1 (Nrp-1) ve Nörofilin-2 (Nrp-2) reseptörlerine bağlanırsa da, onun damar endotelindeki ana sinyal iletim reseptörü VEGFR-2'dir (9). VEGF veya reseptörlerinin inhibisyonunun dokuların çoğunda damar yapısında gerileme gibi bazı mikrovasküler değişikliklere neden olduğu bildirilmektedir (4).

İnsan (10, 11, 12), sıçan (13, 14, 15, 16), fare (17) ve karaca (18, 19) gibi bazı hayvan testis ve epididimislerinde VEGF ve reseptörlerinin ekspresyonu ve lokalizasyonları çeşitli yöntemler kullanılarak gösterilmiştir. Özellikle testiste Sertoli hücreleri, Leydig hücreleri ve vasküler yapılarda VEGF'in varlığı dikkat çekici bulunmuştur. VEGF'in Seminifer tubullerde, spermatogenezis ve spermiyogeneziste, Leydig hücrelerinde ise steroidogeneziste önemli roller oynadığı düşünülmektedir (10, 12, 15-19).

Bununla birlikte, yapılan literatür taramalarında tavşanların testis ve epididimislerinde VEGF proteini ve bu proteinin bağlanarak etkisini gösterdiği VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin varlığı ve lokalizasyonlarıyla ilgili herhangi bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışma, VEGF proteini ve bu proteinin bağlanma reseptörleri VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin tavşan testis ve epididimislerindeki varlığı ve lokalizasyonunu immunohistokimyasal yöntemle ortaya koymak amacıyla planlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.ERKEK GENİTAL SİSTEM

Erkek genital sistemi, testisler, genital akıtıcı kanallar (*tubulus rektus*, *rete testis*, *duktuli eferentisler*, *duktus epididimis* ve *duktus deferens*), bu kanallara açılan yardımcı bezler (vezikula seminalis, prostat bezi ve bulbouretral bez) ve erkek dış genital organı penisten ibarettir (20, 21).

2.1.1.Testisler

Testisler, erkek üreme sisteminin esas fonksiyonel organlarıdır. Bir çift tubüler bileşik bez olan bu organlar skrotum içinde asılı dururlar. Gametlerin üretimi (gametogenezis) ve steroid hormon üretiminden (steroidogenezis) sorumludurlar. Prenatal dönem süresince abdomende gelişimini sürdüren testisler, doğuma yakın bir zamanda inguinal kanaldan geçerek skrotuma inerler ve burada *funikulus spermatikus*'la ile asılı halde tutulurlar. Testisler, skrotumun içerisinde, vücudun dışında yer almaları nedeniyle vücut ısısının 2-3 °C altında bir ısıya sahiptirler (21).

Tavşan testisleri, yassı oval bir şekle sahip olup, hayvanın arka bacaklarının arasında vücudun uzun eksenine biraz çapraz pozisyonda (kraniyomedial-kaudalateral) yerleşim gösterirler. Erişkin bir tavşan testisi 7,2-7,8 g ağırlığında ve 20,5-21,1 mm uzunluğundadır (20, 21). Testis yüzeyinin büyük bir bölümü seröz bir membran olan *tunica vaginalis propria* ile çevrilidir. *Tunica vaginalis*'in altında sıkı düzensiz bağ dokudan oluşan beyaz kalın fibröz bir katman olan *tunica albuginea* bulunur. *Tunica albuginea*'nın yapısında daha fazla kollajen iplikler ile az miktarda da elastik iplikler bulunur. Aygır, koç ve domuz testislerinde ise bunların yanısıra düz kas hücreleri de gözlenir (20, 21, 22). *Tunica albuginea*, *septula testis* adı verilen trabeküllerle organın içine doğru uzantılar gönderir. Bu septalar köpek ve domuzda tam iken, diğer evcil hayvanlarda geniş intravasküler damarlarla çevrelenmiş ancak gözle çok iyi fark edilemeyen bağdokusu trabekülleri şeklindedir. Testikular septa, mediastinumdan

tunica albuginea'ya radyer tarzda uzanır ve organı *lobili testis* adı verilen piramidal kompartmanlara ayırır. Her bir lobçuk kıvrımlı 1-4 adet *tubulus seminiferus*'tan oluşur (22). Erişkin hayvanların testislerinin %80'ini seminifer tubuller oluştururken, geriye kalan %20'sini içerisinde bol miktarda Leydig hücresi bulunan destekleyici bağ dokusu oluşturur. Genellikle kıvrımlı olan tubuller dallanabilir veya kör uçlarla sonlanabilir. Her bir lobulün apeksinde seminifer tubuller iletilici kanal sisteminin bir parçası olan *tubuli rekti*'ye açılırlar. Bu yapılar daha sonra mediastinum bağ dokusu içerisinde epitelle çevrili boşlukların oluşturduğu pleksiform bir sistem olan rete testis'i oluştururlar. İntertubuler boşluklar gevşek bir bağ doku ile doludur. Bu bağ dokusu içerisinde kan ve lenf damarları, fibroblastlar, mononükleer lökositler ve intersitisyel endokrin hücreleri (Leydig hücreleri) bulunur (22, 23, 24).

Tubuli seminiferi kontorti'ler, hayvan türlerinin çoğunda 150-300 µm çapında ve 30-70 cm uzunluğunda iki uçlu kıvrımlı borucuklardır. Bu borucuklar *lamina propria* ile çevrelenmiş çok katlı germinal bir epitel ile örtülüdürler ve bir noktada birleşen her iki uç özelleşmiş bir terminal segment ile tek ve düz bir testiküler tüpe dönüşür. Seminifer tubül epitelinin hemen altında iki katlı bir bazal membran bulunur. Bazal membranın altında tip I kollagenleri içeren açık renkli bir alan ve bu alanın periferinde de peritubuler miyoid veya miyofibroblast hücreleri olarak bilinen yassılaştırmış bir hücre katmanı bulunmaktadır. Bu katmanı lenf damarları endoteli ve fibroblast hücre katmanı izler. Seminifer tubülleri çevreleyen yapıların hepsi birden *lamina propria* olarak tanımlanır (24, 25, 26). *Lamina propria*'nın kalınlığı ve içerdiği hücre tipleri hayvan türleri arasında değişiklikler gösterir. *Lamina propria*'da bulunan miyoid veya miyofibroblastlar olarak bilinen hücreler, seminifer tubüllerde spermatozoonun ve testiküler sıvının transportundan sorumlu kontraktıl hücrelerdir. *Lamina propria* intersitisyumdan seminifer tubüllerdeki germinal epitele geçen maddeler için geçirgen bir bariyer oluşturmaktadır (21, 24, 25).

Sertoli hücreleri, seminifer tubuller içerisindeki tek somatik (non-germinal) yapılardır. Sertoli hücreleri *bazal lamina*'dan seminifer tubullerin lumenine doğru uzanan ve sitoplazmik uzantıları ile komşu germ hücrelerini sararak onlara fiziksel ve fizyolojik destek sağlayan kolumnar hücrelerdir (27, 28). Sertoli hücrelerinin sayısı ile hem testis hacmi, hem de günlük sperm üretimi arasında kuvvetli bir bağlantı vardır (28, 29, 30). Sertoli hücreleri, basal kısım, ana gövde, lateral hücre uzantıları ve apikal hücre yüzeyi

olmak üzere 4 ayrı bölümde incelenebilir. Sertoli hücreleri, spermatojenik hücreler için besleyici, koruyucu ve destekleyici fonksiyonlara sahiptirler. Buna ilaveten, dejenere olan spermatojenik hücreleri ve seminifer tubullerin lumenine salıverdikleri spermatidlerin atık sitoplazmik parçalarını fagosit ederler. Sertoli hücreleri, germ hücreleri üzerinde FSH ve testosteron hormonlarının etkisine aracılık ederler, spermatojenik olayların senkronizasyonunu sağlarlar, androjen bağlayıcı proteini (ABP), transferin ve inhibin gibi intratübüler sıvı içeriklerini sentezlerler (31). Yapılan çalışmalar, Sertoli hücrelerinin, Sertoli-germ hücre etkileşimlerinin moleküler temelini oluşturan çok sayıdaki proteini sentezleyip salgıladıklarını ortaya koymuştur (25-28).

Tüm evcil memelilerin testislerindeki Sertoli hücreleri değişen miktarlarda lipid ve glikojen inklüzyonları içerirler. Yapısında mikrofilamanlar, mikrotübüller ve granülsüz endoplazma retikulumu bol miktarda bulunurken, az sayıda granüllü endoplazma retikulumunun da olduğu bilinmektedir. Hücre yüzeyi spermatidler tarafından sık sık derin bir şekilde çentiklenir. Spermatidlerin akrozomal bölgeleri seviyesinde mikrofilamanlar ile ilişkili bir şekilde yüzeysel olarak lokalize olmuş endoplazmik retikulum sisternaları Sertoli hücrelerinin karakteristik özelliğidir. Benzer yapılar komşu Sertoli hücreleri arasındaki bağlantı bölgelerinde de mevcuttur. Sertoli hücreleri seminifer tubül içerisinde iki daimi (bazal ve adluminal) ve bir geçici (ara) kompartman şekillendirirler. Bazal kompartmanda spermatogoniyumlar ve mayozun erken leptoten fazındaki spermatositler bulunur. Bazo-lateral yüzeylerde komşu Sertoli hücreleri arasındaki tayt cankşınlar (tight junctionlar) ve zonula oklüdens (zonula ocludens) bazalden adluminal kompartmanı sınırlandırır. Kan-testis bariyeri adı verilen bu bariyer yalnızca Sertoli hücreleri tarafından şekillendirildiği için Sertoli hücre bariyeri olarak da adlandırılır. Ara kompartman olarak bilinen üçüncü kompartman, bazalden adluminal kompartmana leptoten hücrelerin geçişi sırasında, tight junctionların yıkımlanması ve tekrar yenilenmesiyle şekillenir. Ara kompartmanın bulunması, bazalden adluminal kompartmana hücrelerin geçişi esnasında Sertoli hücre bütünlüğünün korunmasını sağlar (25-32).

Spermatogoniyumların bölünmeleri ve kök hücrelerin yenilenmeleri bazal kompartmanda meydana gelir. Diffuz bir bariyer olan kan-testis bariyeri mayozun komplike sürecinin ve spermiyogenezin dışarıdan bir etki almaksızın meydana gelmesi için bir mikro ortam sağlar. Sertoli hücre bariyeri adluminal kompartmana bir çok

maddenin girmesine izin verirken bu maddelerin sadece çok küçük bir miktarı tubül lumenine ulaşabilmektedir. Toksinlerin, zehirli maddelerin direkt olarak adluminal germ hücrelerini etkilemesi için ya bariyerin bozulması ya da Sertoli hücrelerinin içerisine girmesi gereklidir (30-33).

2.1.2.Spermatogoniyal hücrelerin kökeni

Hem erkeklerde hem de dişilerde hücre hattının ilk bilinen köken hücresi primordiyal germ hücreleridir. Epiblast (embriyonal ektoderm) hücrelerinin küçük bir topluluğundan oluşurlar. Bu hücreler allantoisin tabanından genital kıvrıma, arka bağırsak boyunca göç ederler. Farelerde göç esnasında ve fetal yaşamın 13. gününe kadar primordiyal germ hücreleri çoğalır (22). Bu hücreler genital kıvrıma ulaştıkları zaman sayıları yaklaşık her gonadda 10.000'e ulaşır. Erkek genital kıvrımında, primordiyal germ hücreleri öncü Sertoli hücreleri olan somatik destek hücreleri tarafından sarılırlar. Primordiyal germ hücreleri ve Sertoli hücreleri birlikte seminifer kord olarak adlandırılan bir hücre dizisini oluştururlar. Gelişim süresince bu kordlar bir lumen şekilendirir ve böylelikle *tubulus seminiferus kontortuslar* oluşur. Seminifer kord içerisinde mevcut olan germ hücreleri morfolojik olarak primordiyal germ hücrelerinden farklıdır ve gonositler olarak adlandırılırlar. Sıçanlarda ve farelerde seminifer kordun şekillenmesinden sonra, gonositler bir kaç gün çoğalırlar ve sonra hücre siklusunun G₀/G₁ fazında tutulurlar. Doğumdan çok kısa bir süre sonra gonositler spermatogonyum A'yı oluşturmak için yeniden çoğalmaya başlarlar (22, 34-42).

2.1.3. Spermatogenezis

Spermatogonyumlardan spermatozoon gelişinceye kadar geçen olaylar dizisi spermatogenezis olarak adlandırılır ve 3 aşamada gerçekleşir; a) spermatositogenezis, b) mayoz bölünme, c) spermiyogenezis (24, 37).

2.1.3.1. Spermatositogenezis:

Spermatogenezis esnasında spermatogonyumlar mitozla çoğalırlar ve sonuçta A-spermatogonyumlar, I-spermatogonyumlar (intermediyet), B-spermatogonyumlar ile en sonunda da preleptoten primer spermatositler oluşur. Primer spermatositler bu aşamadan sonra mitozla bölünmezler, germ hücrelerinin sayısını dört katına çıkaran 2 mayoz bölünme geçirirler. En büyük spermatogonyumlar ve seminifer tubüllerin bazal laminasıyla en geniş teması sağlayan hücreler, A-spermatogonyumlardır. Belirgin bir

çekirdekçik ile soluk ve bulanık görünümlü çekirdekleri vardır. B-spermatogonyumlar, çok miktarda kromatin partikülleri ile çarpıcı olmayan bir çekirdekçik içeren yuvarlak bir çekirdeğe sahiptirler ve birbirlerine sitoplazmik uzantılarla bağlanırlar. B-spermatogonyumlar bölünmeleri sonucunda preleptoten primer spermatositler oluşur. Bu hücreler ve onlardan oluşan hücreler spermiyasyondan çok kısa zaman öncesine kadar birbirlerine gerçek sitoplazmik köprülerle bağlanmışlardır. Preleptoten primer spermatositler yavaş yavaş bazal laminayla bağlantılarını kaybederler ve sertoli hücrelerinin hücreler arası bağlantılarının aralarından adluminal kompartmana doğru yönelirler. Preleptoten primer spermatositlerde çekirdekte DNA replike olmuştur ve bütün kromozomlar 2 kardeş kromatitten ibarettir (24, 37).

2.1.3.2. Mayoz bölünme:

Mayoz esnasında, 1 primer spermatositten 4 adet haploid yapıda spermatid'in oluştuğu peş peşe iki çekirdek bölünmesi gerçekleşir. Tubül epitelleri içinde en büyük spermatogenik hücreler primer spermatositlerdir ve spermatogonyumlarla, spermatidler arasında yerleşim gösterirler. Birinci olgunlaşma bölünmesinin profaz evresi aşırı derecede uzun sürdüğü için tubül kesitlerinde 2 generasyon primer spermatosit görülür. Birinci olgunlaşma bölünmesinin profaz çekirdekteki kromatin maddesindeki karakteristik değişikliklere bağlı olarak leptoten, zigoten, pakiten, diploten ve diyakinez evreleri içerir. Leptoten evresinde kromozomlar ince iplikçikler tarzında düzenlenmişlerdir. Zigoten evresinde homolog kromozomlar eşleşmeye başlarlar ve 4 kromatidli tetrad yapısı oluşur. Eşleşmenin gözlenebilen tek kanıtı elektron mikroskopla görülebilen sinaptonemal komplekstir. Eşleşmenin tamamlanması, eşleşmiş kromozomların kardeş olmayan (non-sister) kromatidleri arasında gerçekleşen crossing over'in meydana geldiği pakiten evresini başlatır. Diploten evresinde eşleşmiş kromozomlar birbirlerinden ayrılırlar ancak kardeş kromatidler, crossing over'in gerçekleştiği kiazma bölgelerinden birbirlerine yapışık kalırlar. Diyakinez esnasında kromozomlar kısalıp kalınlaşırlar ve her bir kromozomda 4 adet ayrı kromatid belirgin hale gelir. Profazın sonunda çekirdek zarı kaybolur. Metafaz, anafaz ve telofaz çok çabuk gerçekleşir. Bu aşamalar esnasında eşleşen kromozomlar önce ekvatoryal plak üzerinde yerleşirler, bundan sonra homolog kromozomlar her birinde kromozom sayısının yarısı kadar kromozoma sahip ve her bir kromozomda iki kromatid (diad) sekonder spermatositleri oluşturmak üzere hücrenin aksi kutuplarına doğru hareket

ederler. Genetik materyalde hiç bir duplikasyonun olmadığı çok kısa bir interfazdan sonra, sekonder spermatositler ikinci olgunlaşma bölünmesine girerler. Mitoz bölünmeye benzer şekilde kısa bir profazı, metafaz, anafaz ve telofaz izler. Bu bölünme sırasında sentromerler bölünür ve sekonder spermatositlerin kardeş kromatidleri birbirinden ayrılır ve bölünme sonucunda oluşacak olan spermatidlere dağılır. Bu yüzden bu hücreler haploid sayıda kromozoma sahiptirler (24, 37).

2.1.3.3. Spermiyogenezis:

Birbirleriyle ilişkili klonlar halindeki yeni oluşmuş spermatidlerin ayrı ayrı spermatozoonlara farklılaşmaları spermiyogenezis olarak adlandırılır. Spermiyogenezis sırasında ortaya çıkan en önemli morfolojik değişiklikler, akrozomun oluşması, çekirdek kromatinin yoğunlaşması, hareketli bir kuyruğun büyüyerek gelişmesi ve spermatid materyalinden (sitoplazma, su, organeller) daha sonra oluşacak olan spermatozoon için gerekli olmayan fazla kısımların kaybıdır. Spermiyogenezis, golgi, kep, akrozomal ve olgunlaşma evrelerinden oluşmaktadır (24, 37).

2.1.3.3.1. Golgi evresi:

Golgi vezikülleri içinde proakrozomal granüller belirir. Proakrozomal granüller, tek bir akrozomal vezikül içinde bir akrozomal granül oluşturmak üzere eriyip birbirleriyle kaynaşırlar. Bu iki oluşum çekirdeğin iç tarafıyla temasa geçmek suretiyle oluşacak olan sperm başının anterior kutbunu belirler (24, 37).

2.1.3.3.2. Kep evresi:

Akrozomal vezikül büyür ve çekirdeğin 2/3'lik ön kısmını kaplayan baş kepinin oluşturur. Geç kep evresinde hareketsiz küresel spermatidler kutuplaşarak çekirdek ve baş kepi ekzentrik (dış merkezli) olarak yer değiştirirler. İki sentriyol, çekirdeğin kaudal kutbunda toplanır ve distal sentriyol, flagellumun gelişip büyümesini sağlar (24, 37).

2.1.3.3.3. Akrozomal evre:

Erken akrozomal evrede çekirdek ve hücre gövdesi kranio-kaudal yönde uzamaya başlar. Bununla aynı zamanda spermatidler de, çekirdekleri tubüllerin periferine ve gelişmekte olan kuyrukları da lumene doğru yönlenecek şekilde dönerler. Sertoli hücrelerinin lateral uzantılarıyla daha önceden birbirinden ayrılan spermatidler, daha sonradan bu hücrelerin apikal girintilerine gömülürler. Çekirdek uzamaya başlayınca, çekirdek histonlarının yerini temel proteinler alır. Bu yoğunlaşmadan sonra DNA,

transkripsiyonel olarak etkisiz hale gelir ve zararlı etkilere karşı direnç kazanır. Fertilizasyon sırasında, kromatinin yoğunlaşmasından önce protaminlerin mutlaka histonlar tarafından yenilenmeleri gerekir. Bu histonlar ovosit tarafından sağlanır (24, 37).

2.1.3.3.4. Olgunlaşma evresi:

Bu aşamada çekirdek yoğunlaşması tamamlanır. Spermatozoonun oluşacak olan orta parça kısmında mitokondriyonların çoğu, aksonem etrafında heliks tarzında toplanırlar. Oluşacak olan esas parçanın dış fibriller sistemi ve fibröz kılıf gelişir. Olgunlaşma evresinin ileri aşamalarındaki spermatidin hacmi, kep evresindeki spermatidin %20-30'u kadardır. Bu azalmadan genelde otoliz sorumlu tutulur. Sığırlarda spermatidleri barındıran Sertoli hücrelerinin uzantıları, spermatid materyalinin emilmesi işlemine katılır. Spermiyasyondan önce, olgunlaşma evresindeki spermatidler arasındaki sitoplazma köprüleri birbirlerinden ayrılır ve artık sitoplazma, residüel cisimcik olarak çıkarılır. Rezidüel cisimciklerin farklı sonları vardır; Sertoli hücreleri tarafından fagosit edilebilirler, tubül lumelinde yok olabilirler ya da tübul epitelinin apikal kenarlarına bağlandığında hızla otolize olurlar. Spermatid sitoplazmasının küçük artık bir parçası, genç spermatozoonun sitoplazmik damlası, epididimisten geçerken kaybolur (24, 37).

2.1.3.4. Spermatozoon:

Spermatazoonların uzunlukları yaklaşık olarak 60-75 um arasında değişir. Işık mikroskopta baş ve kuyruk olmak üzere iki kısımdan oluştuğu, elektron mikroskopta ise kuyruğun boyun, orta parça, esas parça ve son parça gibi kısımlara ayrıldığı görülmektedir (24, 37).

2.1.3.4.1. Baş:

Türe özgü olan ve buna bağlı olarak da türler arasında farklılıklar gösteren spermatozoon başının şeklini, çekirdeğin şekli belirler. Çekirdeğin ön kısmı akrozomal kep ile sarılıdır ve bu yapının iç ve dış akrozomal membranları arka uçta birleşir. Akrozomal kep çok sayıda hidrolitik ve proteolitik (akrozin) enzimler (uterusta kapasite olan spermatozoonun akrozom reaksiyonu esnasında ortaya çıkardığı) içerir. Akrozomal enzimler, döllenme esnasında zona pellusida'nın delinmesi için gereklidir. Çekirdeğin esas kısmı kükürtten zengin proteinler içeren bir postakrozomal kılıf ile sarılıdır. Ölü spermatozoonlarda bu kılıf eozin ve bromfenikol mavisi gibi bazı boyalarla yoğun bir

şekilde boyanmaktadır. Postakrozomal baş bölgesinin plazma membranı, homolog ovositin tanınması için gerekli olan reseptör moleküllerini içermektedir. Çekirdek zarı sperm başının kaudal yüzeyinde kuyruğun ekleneceği eklem benzeri bir oluk oluşturur (24, 37).

2.1.3.4.2. Boyun:

Baş ile orta parça (bağlayıcı parça) arasında yer alan kısa ve dar bir oluşumdur. Merkezi yerleşimli bir sentriyol ile 9 adet periferde ve uzunlamasına yerleşimli ve orta parçanın dış fibrilleriyle devam eden kalın fibrillerden oluşmaktadır (24, 37).

2.1.3.4.3. Orta parça:

Orta parçanın karakteristik flagellum yapısındadır: 1 çift merkezi, 9 çift periferik yerleşimli mikrotübül, aksiyal filament kompleksini oluşturur. Bu oluşumlar, etraflarından 9 adet uzunlamasına yerleşimli, bağlayıcı parçanın fibrilleriyle birleşen ve gittikçe incelen dış fibrillerle kuşatılmışlardır. Bunlar da etraflarından heliks tarzında yerleşmiş mitokondriyonlarla sarılmışlardır. Orta parça plazma membranının yüzük benzeri kalınlaşması, orta parçayla esas parçanın sınırını belirler (24, 37).

2.1.3.4.4. Esas parça:

Spermatozoonun en uzun parçasıdır. Aksiyal filament kompleksinin yapısı orta parçaninkine benzer ve orta parçanın dış fibrilleriyle devam eder. Fibriller büyüklük ve şekil yönünden ara sıra değişikliklere maruz kalır ve esas parçanın sonuna doğru gittikçe inceler (24, 37).

2.1.3.4.5. Son parça:

Sadece aksiyal filament kompleksini içeren fibröz kılıfın son kısmı, son parçanın başlangıcını belirler. Son parçanın proksimalinde bu kompleks kendi karakteristiği olan 9 çift periferik mikrotubuldan oluşmaktadır, ancak distalde bu çiftler teke düşerek değişik seviyelerde son bulur (24, 37).

Işık mikroskobu altında seminifer tübüller incelendiğinde, spermatogonik hücrelerin rastgele değil, aksine iyi tanımlanabilen hücresel ilişkiler içerisinde organize oldukları belirlenmiştir. Örneğin; seminifer tübül epitelinin belirli bir bölgesinde, farklılaşmalarını tamamlamış olan spermatidler gelişimsel basamaklarına göre sadece erken spermatidler, spermatositler ve spermatogoniyumlarla özel kombinasyonlar

şeklinde görülebilirler. Bu hücrel gruplaşmalar (Roma rakamlarıyla sıralanır) seminifer tubülün belirli bir bölgesinde ardışık olarak takip eder ve bu dizi döngüsel olarak kendini yeniler (24). Spermatogenezisin döngüsel işleyişinde her belirgin hücre kümesi bir basamak olarak tanımlanır. Belirgin bir seminifer tubül alanında aynı hücrel gruplaşmanın iki defa ortaya çıkması arasında ardışık basamakların serisi seminifer tubül döngüsü olarak tanımlanır. Her tür için döngüdeki basamak sayısı sabittir (24).

Seminifer epitel döngüsü çok sayıda evrelere ayrılır. Leblond ve Clermont (1952a, b), Clermont ve Leblond (1955), ve Ortavant (1954), PAS tekniği yardımıyla kep oluşumu ve akrozom gelişimini temel alarak sıçanlarda bir döngüyü 12-14 evreye ayırmışlardır (43, 44). Curtis (1918), Roosen-Rudge ve Giesel (1950) ve Ortavant (1954) spermatidlerin çekirdek şekli, spermatidlerin ve spermatozoonların bazal membrana göre yerleşimi, mitotik figürlerin varlığı ve seminifer tubül lümenine spermatozoonların salınımı gibi kriterleri kullanarak bir döngüyü sekiz evreye ayırmışlardır (43, 44). Bununla birlikte, insanda 6, sıçanda 14, maymunda ise 12 basamak tanımlanmıştır. İnsanda ise bir döngünün süresi 16 gündür. Dört döngü sonunda (64 gün) spermatogonyumlar spermiyum haline gelir (24).

Köken hücrelerinin (Tip A spermatogonyalar) bölündüğü ve bu kök hücrelerden köken alan spermatozoonların tubül lümeninde serbest kaldığı zaman arasında gerçekleşen seminifer epitel döngü sayısı türler arasında farklılık gösterir. Buna göre sıçan, fare, koç ve boğalarda 4 döngü, maymunda ise 6 döngü olduğu belirlenmiştir. Canlı sıçanda seminifer tubülün bir parçasını kesintisiz inceleyebileceğimizi varsayalım. Bir seminifer tubül şeridi boyunca tüm 14 basamağın (yani bir döngünün) bir dalgalı yenilenme olarak devam ettiğini anlayabiliriz. Döngü serileri, her biri 14 ardışık basamaktan oluşarak kendisini tekrar tekrar yineler. İnsan testisinde spermatojenik hücre nesilleri sarmal düzende organize olmuştur. Sonuçta, bir seminifer tubül kesiti, sıçan testisindeki tek basamak yerine üç veya dört hücrel gruplaşmayı (basamağı) içerir (24).

Swierstra ve Foote (1963) tavşan testisleri üzerinde yaptıkları araştırmalarında spermatidlerin çekirdek şekli, spermatidlerin ve spermatozoonların bazal membrana göre yerleşimi, mitotik figürlerin varlığı ve seminifer tubül lümenine spermatozoonların salınımı gibi kriterleri kullanarak bir döngüyü sekiz evreye ayırmışlardır (44). Bununla birlikte bu araştırmacılar, tavşan seminifer tubüllerindeki bir döngüyü oluşturan

evrelerin dağılımlarını yüzde olarak sırasıyla şöyle tespit etmişlerdir; evre1: %27.7, evre 2: %13.4, evre 3: %7.3, evre 4: %11.0, evre 5: %4.1, evre 6: %15.7, evre 7: %12.2, evre 8: %8.6 (44).

2.1.5.Tavşanlarda Spermatogenezisin Evreleri:

2.1.5. I. Evre

Tip A spermatogonyumlar ve Sertoli hücreleri bazal membran boyunca dizilmiştir. Tip A spermatogonyumlar granül benzeri bir kromatin içeren ovalden yuvarlağa değişen bir çekirdeğe sahiptirler. Bununla birlikte çekirdek membranı belirgindir. Erken ve geç olmak üzere iki generasyon primer spermatosit mevcuttur. Erken primer spermatositler preleptoten olup bazal membrana yakın yerleşirler. Geç primer spermatositler, pakiten fazda olup tubül lumeni ve bazal membran arasında dağılım gösterirler. I. evre'nin ilk başlarında, erken primer spermatositlerin çekirdekleri yuvarlak olup zayıf boyanmış bir kromatin içerirler. Ayrıca, PAS boyamasında çekirdek membranı fark edilebilmektedir. İlerleyen dönemde, bu leptoten çekirdekde membran daha zayıf olarak gözlenirken, kromatin daha koyu boyanmıştır. Erken primer spermatositler, daha büyük pakiten çekirdeğe sahip olup, çekirdek membranları artık fark edilemez durumdadır. Spermatidler, belirgin nüklear membranlı yuvarlak bir çekirdeğe sahiptirler. PAS boyamasında çekirdeğin yaklaşık yarısını kuşatan yoğun boyanmış bir akrozom belirlenir. Çekirdek içerisinde, bir veya daha fazla oldukça yoğun boyanmış karyozomlar bulunur (44).

2.1.5.2. II. Evre

Bu evrenin en karakteristik özelliği, spermatid çekirdeğinin belirgin şekilde uzamış olmasıdır. II. evrenin başlarında, hücre çekirdekleri hafif şekilde oval iken evrenin sonuna doğru tamamen uzamış olarak gözlenirler. Bu dönemde, her iki tip primer spermatosit generasyonu da belirlenir. Hem erken hem de geç generasyon primer spermatositlerde çekirdek içerisindeki kromatinin görünümü I. evrede tanımlananlarla aynıdır. Sertoli hücreleri ve Tip A spermatogonyumlar bu dönemde de bazal membran üzerinde dizilenmişlerdir. Bununla birlikte Tip A spermatogonyumların sayıları I. evreye göre artış gösterir (44).

2.1.5.3.III. Evre

Bu dönemde de Sertoli hücreleri, I. ve II. evrelerdekine benzer şekilde bazal membran üzerinde dizelenmişlerdir. Her iki tip primer spermatosit generasyonu da mevcut olup, erken primer spermatositlerin çekirdekleri halen küçük olup zigoten evresindedir. Geç spermatositlerin çekirdekleri ise pakiten evresindedir. Spermatidler ise uzamıştır (44).

2.1.5.4.IV. Evre

Bu evrede, bazal membran üzerinde Tip A spermatogonyumlar ve Sertoli hücrelerine ek olarak Tip A spermatogonyumların bölünmesiyle oluşan intermediyer tip spermatogonyumlar da gözlenir. Bu intermediyer tip spermatogonyumlar, bazal membrana paralel uzanan oval bir çekirdeğe sahiptirler. Bu hücrelerin çekirdeklerindeki kromatin iri taneli granüller halindedir. IV. evre'nin başlarında, her iki tip primer spermatosit gözlenebilir. Erken primer spermatositlerin çekirdekleri, pakiten fazda olup bazal membrana yakın olarak lokalize olmuşlardır. Kromatinleri ise oldukça yoğun boyanmıştır. Geç primer spermatositlerin çekirdekleri ise daha büyük olup diploten veya diyakinez evresindedirler. Bu evrenin başlarında geç primer spermatositler ilk olgunlaşma bölünmesini geçirerek sekonder spermatositleri meydana getirirler. Sekonder spermatositler, belirgin çekirdek membranlı yuvarlak şekilli bir çekirdeğe sahiptirler. Bu hücrelerin kromatini, iplikçiklerle birleştirilmiş granüler bir görünüm sergilerler. Sekonder spermatositlerin yaşam süreleri kısmen daha kısa olup bu hücreler sadece IV. evre'de gözlenebilmektedirler. Bu hücreler meydana gelmelerinden kısa bir süre sonra ikinci olgunlaşma bölünmesini geçirerek spermatidleri oluştururlar. Spermatidler, belirgin çekirdek membranı olan yuvarlak bir çekirdeğe sahiptirler. Yeni generasyon spermatidler şekillendiği için III. evre'deki uzamış spermatidler IV. evre'de artık spermatozoon olarak tanımlanacaktır. Bununla birlikte, bu evrede de sıklıkla bölünme aşamasında olan primer ve sekonder spermatositlerde metafaz konfigürasyonları gözlenebilmektedir (44).

2.1.5.5.V. Evre

Bu evrede spermatozoonlar, Sertoli hücrelerine doğru hareket ederler. Çok sayıda spermatogonyum A, intermediyer tip spermatogonyaları oluşturmak için bölünürler. Bu evrenin daha sonraki aşamalarında intermediyer tip spermatogonyumlar daha fazla intermediyer tip spermatogonyaları oluşturmak için bölünme geçirirler. İkinci generasyon primer spermatosit içeren I., II., III., ve IV. (erken dönem) evrelerin aksine

V., VI., VII. ve VIII. (yarısında) evrelerde birinci generasyon spermatositler bulunmaktadır. Bu hücrelerin çekirdeklerinin kromatini yayılma gösterir ve çekirdek bazal membrandan uzaklaşır. Spermatidler yuvarlak şekilli olup belirgin çekirdek mebranına sahiptirler (44).

2.1.5.6.VI. Evre

Sertoli hücreleri, intermediyer tip spermatogonyumlar ve tip A spermatogonyumlar bazal membran üzerinde dizelenmişlerdir. Bu evrenin sonlarına doğru, intermediyer tip spermatogonyumlar bölünür ve tip B spermatogonyumları meydana getirirler. Tip B spermatogonyalar belirgin çekirdek membranına sahip yuvarlak bir çekirdek taşırlar. Bu hücrelerin çekirdeklerindeki kromatin yoğun şekilde boyanan granüller şeklindedir. Primer spermatosit çekirdeklerinin boyutu uzun pakiten evresi sırasında artış gösterir. Spermatid çekirdekleri yuvarlaktır ve bu evrede Sertoli hücreleriyle temas halindedirler (44).

2.1.5.7.VII. Evre

Sertoli hücreleri ve spermatogonyumlar bazal membran üzerinde sıralanmışlardır. Bu dönemde Spermatogonyaların tipi evrenin ne kadar ilerlemiş olmasına bağlıdır. İntermediyer tip spermatogoniya evre VII'nin erken dönemlerinde gözlenebilir. Daha sonra bu hücreler bölünerek tip B spermatogonyumları meydana getirirler. Bunun sonucunda evre VII de çok sayıda tip B spermatogonyum gözlenirken bir kaç adet tip A spermatogonyum da bulunabilir. Primer spermatositlerin pakiten çekirdekleri ebat olarak oldukça büyümüştür. Kromatin ise yoğun bir ağ formundadır. Spermatid çekirdeği yuvarlak olup çekirdek membranı gözlenebilmektedir. PAS boyamasında, çekirdeğin ön bölümünün yaklaşık olarak 1/3'ünü çevreleyen belirgin bir akrozom görülür. Bu dönemde spermatozoonlar lumen doğru hareket ederler (44).

2.1.5.8.VIII. Evre

Bazal membran üzerinde sıralanan hücre popülasyonunun kompozisyonu evrenin ilerleme derecesine bağlıdır. Sertoli hücreleri ve tip A spermatogoniya her zaman mevcuttur. Tip B spermatogoniya evre VIII'in ilk yarısında bulunmaktadır. Evre VIII'in ikinci yarısında, tip B spermatogonyalar mitozla çoğalarak primer spermatositleri üretirler. Bu yeni şekillenen primer spermatositler proleptoten evrede olup yuvarlak bir çekirdeğe sahiptirler ve tip B spermatogonyumlara benzerler. Bununla birlikte, proleptoten

spermatozitlerin çekirdekleri tip B spermatogoniyaların çekirdeklerinden daha küçüktür. Bu hücreler daha az yoğun boyanırlar ve daha az belirgin çekirdek membranlarına sahiptirler. Geç generasyon primer spermatozitlerin pakiten çekirdekleri büyü kromatin ağ formundadır. Spermatid çekirdekleri yuvarlak olup PAS boyamasında bir akrozom belirlenebilir. Spermatozoonlar ise lumende sıralanmışlardır (44).

2.1.6. Testisin intersitisyel dokusu

Testisin interstisyel dokusu (intertubuler doku), seminifer tubüllerin arasını dolduran sinir telleri, kan ve lenf damarlarını içeren gevşek bağdokusundan oluşur (25). Erişkin testislerin interstisyel dokusunun ana hücreleri Leydig hücreleri olmakla birlikte, bu alanlarda fibroblastlar, makrofajlar, lenfositler, plazma hücreleri, dentritik hücreler, mast hücreleri ve farklılaşmamış mezenşimal orijinli hücreler olmak üzere farklı hücrelerin de bulunduğu bilinmektedir (22, 23). İntertubuler doku organizasyonunda, türe özgü bazı farklılıklar belirlenmiştir. Buna göre 3 farklı intertubuler doku yapısı ortaya konulmuştur. Birinci grupta (kobay, şinşilla, rat ve fare) Leydig hücreleri testiküler yapının küçük bir kısmını oluştururlar ve kan damarlarına yakın olarak paketlenmiş yığınlar oluştururlar. Bununla birlikte intersitisyumun çok büyük bir bölümü yaygın lenfatik sinuzoidlerden oluşur. Büyük memelilerin bir çoğunu içerisine alan ikinci grupta (boğa, koç, fil, maymun ve insan) Leydig hücreleri kan damarları ile belirgin bir birliktelik içerisinde değildir ve intertubuler alanlarda merkezi veya ekzantrik olarak yerleşim gösteren lenf damarları tarafından drene edilen ödematöz bir gevşek bağ doku içerisinde dağılım gösteren değişik boyutlardaki hücre yığınları tarzındadır. Üçüncü grupta (domuz, zebra ve kör sıçan) ise sıkıca paketlenmiş Leydig hücreleri geniş intertubuler alanlarda dağılım gösterirler ve testiküler yapının %20-60'ını oluştururlar. Bu türlerde çok az interstisyel bağ dokusu bulunur ve küçük lenfatik damarlara daha az sıklıkta rastlanır (22, 23, 45).

Leydig hücreleri, ekzantrik olarak yerleşimli yuvarlak çekirdeği olan kısmen büyük polimorf şekilli hücrelerdir. Bu hücreler tüm testiküler dokunun koçlarda yaklaşık %1'ni, boğalarda %5'ini ve domuzlarda %20-30'unu oluştururlar. Leydig hücreleri, en önemli androjen (testislerin) kaynağı olup organizmadaki tüm androjenlerin %90'nından fazlasını üretirler (42, 46). Testestoronun ana fonksiyonları, Wolf kanalının oluşturulması ve bu kanalın daha sonra diğer kanallara ve epididimise farklılaşması, penis, erkek eklenti bezleri ve sekonder cinsiyet fonksiyonların gelişiminin başlatılması

ve sürdürülmesi, libidonun arttırılması, FSH hormonu ile birlikte spermatogenezisin kontrolü, negatif geri etki mekanizması ile hipofiz ve hipotalamusun uyarılması ve genel anabolik etkiler olarak bilinir (22, 24, 47, 48, 49).

2.1.7.Epididimis

Memeli epididimisi, tek bir kanal olan duktus epididimis ve rete testisi duktus epididimise bağlayan bir kaç adet duktuli eferentisten oluşmaktadır. Makroskobik olarak, epididimis kaput, korpus ve kauda olmak üzere 3 farklı bölgeye ayrılmaktadır. Bununla birlikte bu bölünme sistemi yapı-fonksiyon ilişkisini tam olarak yansıtmaktadır. Epididimal epitelin histolojik yapısındaki bölgesel farklılıklar ilk olarak, köpeklerde, tavşanlarda, sıçanlarda, aygırlarda ve boğalarda belirlenmiştir. Bir çok hayvan türünde epididimis, histolojik ve sitokimyasal özellikleri temel alınarak başlangıç segmenti, kaput, korpus ve kauda epididimisler olmak üzere 4 farklı kısma ayrılabilir. İlk üç bölüm epididimisin sperm olgunlaşması ile ilgili bölümünü oluştururken, son bölüm spermlerin depolanmasından sorumludur. Bununla birlikte, epididimis histolojik, histokimyasal ve elektron mikroskobik özellikler temel alındığında her bir tür için dağılımı ve sayısı türe özgü karakteristik olan bir kaç alt segmente ayrılabilir (43, 50, 51, 52). Nicander (1957) tavşanlarda bölgesel farklılıklar, lumen içerikleri ve genişliği ayrıca epitelin yüksekliği, yapısı ve sitokimyasal özelliklerine göre epididimisi 8 alt bölgeye ayırmıştır (50). Bununla birlikte, benzer kriterler göz önüne alınarak epididimis kobaylarda 7, kedilerde 6, keçilerde 5, boğa, koç ve aygırlar da ise 6 bölge ayırt edilmektedir (50, 51, 52).

Duktuli eferentislerle birlikte duktus epididimisin başlangıç bölümü kaput epididimisi oluşturur. Sayıları 12- 25 arasında değişen duktuli eferentisler rete testisten köken alırlar ve bunlar uç noktası rete testise doğru olan bir koniye benzer şekilde tertip edilmişlerdir (50, 51). Duktuli eferentisler, silyumlu yalancı çok katlı prizmatik bir epitelle örtülüdürler. Siliyasız hücreler apikal yüzeylerinde mikrovilluslar taşırlar. Tüm türlerde, duktuli eferentisler siliyalı ve siliyasız olmak üzere iki ana hücre tipine sahiptirler. Bununla birlikte, bir kaç adet intraepitelyal lenfosit ve makrofaja da rastlanılır (43, 50, 51).

Duktus epididimis, oldukça kıvrımlı olup kendi üzerinde sarmallanmış bir yapıya sahiptir. Bu kanal, yüzeyinde sterosilyumlar olan prizmatik Prensipal hücreler ile bazal lamina ile ilişkili ve yuvarlak-oval hafif boyanan bir çekirdeğe sahip Bazal hücreler

içeren yalancı çok katlı prizmatik bir epitelle örtülüdür. Bununla birlikte, bu epitelin yapısında bölgeye spesifik olarak yerleşim gösteren apikal hücreler, narrow hücreleri, clear hücreleri ve halo hücreleri de bulunmaktadır (50, 51).

Prinsipal hücreler, tüm memelilerde duktus epididimis epitelindeki baskın hücre tipi olup, yaklaşık olarak epiteli döşeyen hücrelerin %80'nini oluşturmaktadır. Prinsipal hücreler, sentezlediği çok sayıdaki proteini epididimal lumene vermektedirler. Ayrıca, bu hücreler lumende bulunan proteinleri endositozla alınmasında aktif rol oynamaktadırlar. Apikal hücreleri, karakteristik olarak kaput epididimisin epitelinde içerisinde apikalde yerleşim gösteren, yuvarlak bir çekirdeğe sahip olan fakat bazal membranla herhangi bir bağlantısı olmayan hücrelerdir. Bu hücreler, narrow ve clear hücreleri gibi sitoplazmalarında vakuoler H^+ -ATPaz içerirler ve lumene proton pompalarlar. Buna bağlı olarak da lumen içeriğinin asitleştirilmesinde görev alırlar. narrow hücreleri, kaput epididimisi döşeyen epitelde Prinsipal hücreler arasında bazaldan lumene doğru ince bir kalem şeklinde uzanan clear hücreleri ise kaput, korpus, kauda epididimis epitelinde yerleşim gösteren saydam görünümlü hücrelerdir. Bu hücreler de apikal hücrelerle benzer aynı fonksiyona sahiptirler. Bazal hücreler, bazal lamina üzerinde yerleşen ve prinsipal hücrelerle yakın ilişki içerisinde olan hücrelerdir. Halo hücreleri ise tüm epididimal kanal boyunca epitel içerisinde yerleşim gösteren intraepitelyal lenfositlerdir (51).

Bazal hücreler protaglandin PGEF gibi bazı parakrin maddeler sentezleyerek prinsipal hücrelerin elektrolit taşınımını düzenlemektedirler. Böylece epitel içerisindeki hücre-hücre etkileşimleri luminal ortamı ve buna bağlı olarak da sperm olgunlaşmasını direkt olarak etkileyebilmektedir. Bunlara ilaveten, prinsipal hücreler ile diğer prinsipal hücreler arasında kan-epididimis bariyerinin oluşumuna katılan sıkı hücre bağlantıları bulunmaktadır. Kan-epididimis bariyeri, epididimal lumen içerisindeki spermilerin antijenlerden izole bir şekilde olgunlaşabilmesi için gerekli bir immunkorumalı alan oluşmasını sağlamaktadır (51).

2.2. VASKÜLER ENDOTELİYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF)

2.2.1.Genel Bilgi

Anjiojenik moleküller içinde en önemlisi ve üzerinde en çok durulana vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'dür. İlk olarak karsinoma hücre hatları tarafından sentezlenen bir permeabilite faktörü olarak keşfedilirken tümoral olgularında karında su

toplanmasını arttırdığı tespit edilmiştir. Bu nedenle ilk olarak vasküler permabilite faktörü (VPF) olarak adlandırılmıştır (2, 8, 49, 53-57). Bu molekül, endotelial hücrelerinin proliferasyonu, migrasyonu ve hücre canlılığının düzenlenmesinde rol oynayan anjiojenik bir faktör olarak tanımlanmıştır (58). Bununla birlikte, VEGF anjiyogenezisin düzenlenmesinde, köken hücrelerden monosit/makrofaj yapımı ve böbrek ile akciğer bariyer fonksiyonlarının devam ettirilmesi ve hücrelerin korunmasında da önemlidir. VEGF'in gelişimsel, fizyolojik ve patolojik anjigenezisteki önemi çok sayıdaki araştırmayla gösterilmiştir. VEGF'in erişkin dokularındaki fonksiyonları henüz tam olarak açıklık kazanmamıştır (8, 49). VEGF embriyolojik dokularda yaygın bir şekilde bulunurken, erişkin dokulardaki varlığının da önemli olduğu düşünülmektedir. VEGF endotel hücrelerinin migrasyonunda, ekstrasellüler matriksin (ECM) yıkımından sorumlu olan matriks metalloproteazlar ile urokinaz ve doku tipi plazminojen aktivatörlerinin salınımlarının uyarılmasında, dişi genital siklusu sırasında uterus, ovaryum ve memelerde fizyolojik anjiyogeneziste, yara iyileşmesinde, kemik onarımında ve egzersize karşı iskelet kası yanıtında rol oynadığı bilinmektedir (59-66). VEGF erişkinlerin hemen hemen tüm dokularında bulunmaktadır. VEGF'ün erişkin dokularındaki ekspresyonu ile ilgili olarak 3 genel ekspresyon örneği bulunmaktadır. VEGF'ün zayıf olarak lokalize olduğu hücrelerin bulunduğu dokularda, VEGF başlıca perisitler ve vasküler stromal hücreler tarafından üretilir. Retina, beyin ve testis gibi dokularda damar sistemi bir bariyer fonksiyonuna (retina-kan bariyeri, beyin-kan bariyeri, testis-kan bariyeri) sahip olmasıyla karakterizedir. İlginç olarak, bu dokularda çok az hücre VEGF eksprese etmektedir. Az miktarda VEGF eksprese edilen bu organlarda, VEGF muhtemelen bu organlardaki damarlarda impermabilite fonksiyonuna katılmaktadır. VEGF'ün orta derece eksprese edildiği kalp kası ve iskelet kası gibi dokularda, çoğu myositin VEGF eksprese ettiği görülmektedir. Bu dokular fizyolojik olarak dinamik yapıda oldukları ve egzersizle hipertrofiye sahip olmaları nedeniyle, VEGF kasların fizyolojik gereksinimine göre bağlı olarak kasların zengin damar yapısını destekleme fonksiyonuna sahiptir (66, 67, 68). En yüksek yoğunluktaki VEGF ekspresyonun görüldüğü dokular pencereci damar yapısının bulunduğu dokulardır. Bunlar özellikle pencereci damarlarla temas halinde olan epitelde lokalize olmuşlardır. Mikrodamarları pencereci yapıda olan dokular sekrotorik ve/veya filtrasyon fonksiyonuna sahiptirler. Buna en iyi örnek, glomerulus (idrar süzülmesi), koroid pleksus (serebrospinal sıvının üretilmesi), pankreas (ekzokrin ve endokrin sekresyon) ve

karaciğer (filtrasyon ve sekresyon) dir. Bu nedenle bu dokularda VEGF endotel hücrelerinin pencereci konumunun sürdürülmesinde ve canlılığında rol oynayabilir (8, 49). Her ne kadar endotel hücreleri VEGF'ün ana hedefi olsalar da, bu hücreler genellikle VEGF'ü eksprese etmezler. Bunun yerine, sentezlenmiş VEGF'e parakrin tarzda yanıt verirler (49). VEGF veya onun reseptörlerinin inhibisyonu dokuların çoğunda damar gerilemesi gibi mikrovasküler değişikliklere neden olur. VEGF'ün nötralizasyonu sonucunda böbrekte glomerular endoteliyozis ve proteinuri, akciğerlerde ise alveolar apoptozis ve alveollerde genişleme şekillenir (65). Ayrıca pankreasta, trakeyada, tiroide ve ince bağırsaklarda damar atrofisi ortaya çıkar. Bu deneylerde gözlenen kan damarı gerilemesi ve doku disfonksiyonu muhtemelen VEGF'ün endotelial canlılık üzerindeki trofik etkilerinin ortadan kalkması sonucu oluşur (69, 70). VEGF endotel hücreleri dışındaki diğer hücreler üzerinde ya VEGFR-1 ya da VEGFR-2 reseptörlerinin bulunmasıyla etki gösterir. Bununla birlikte, VEGF'ün monositler, makrofajlar, mast hücreleri, eozinofiller, dentritik hücreler, megakaryositler, lenfositler, hematopoetik kök hücreleri, tip II alveol hücreleri ve lens epitel hücreleri üzerinde direkt etkiye sahip oldukları bilinmektedir (8, 49). VEGF'ün vasküler ve immun sistem hücreleri üzerindeki etkileri yanında, nöyronal gelişim ve canlılık üzerinde de etkileri olduğu belirtilmektedir (70). Permabilite, glomerular infiltrasyon, serebrospinal sıvı üretimi, karaciğer kan filtrasyonu ve kan akımına hormon sekresyonu gibi bir çok fizyolojik olayda önemlidir (56, 58). Ayrıca, yara iyileşmesinde ödem oluşmasına neden olduğundan tümörlerin kötüleşmesinde de rolleri vardır. Endotel hücre permabilitesi VEGFR-1 ve VEGFR-2 reseptörlerinin her ikisi aracılığıyla olmaktadır. Bu da, transsellüler ceplerin oluşması, vezikulovakuoler organel şekillenmesi ve fenestrasyonların şekillenmesiyle sonuçlanır. Pencereci endotelial hücreler böbrek glomerulusları, gözün koroid katmanında, koroid pleksusta, gastrointestinal kanalda, tümör damarlarında ve çoğu endokrin dokularda bulunur (49). Bu dokuların her birisinde VEGF içeren hücreler altlarındaki pencereci kapılar damarlara yakın veya bitişik konumda bulunurlar (8, 56, 71).

VEGF, menstru'al siklus ve ovarial folikül gelişimi sırasında fizyolojik aktivitesinin bir gereği olarak vasküler değişiklikleri destekleyerek üreme fonksiyonlarını büyük ölçüde düzenler (46, 67). Gebelik sırasında da uterus damarlarının yeniden biçimlendirilmesini uyarak implantasyondan sonra endometrial sitotrofoblast oluşumunu düzenler (58). Erişkin dişilerin aksine, erkek testislerinde aktif bir anjiogeneze yoktur. Bu gerçeğe

rağmen, testiste VEGF'nin büyük miktarlarda üretildiği bildirilmektedir. İnsan ve bazı hayvan testislerinde Sertoli ve Leydig hücreleri ile vasküler yapılarda VEGF'in varlığı bildirilmiştir. Sertoli hücrelerinde bulunan VEGF'in spermatogenezis ve spermiyogeneziste önemli roller üslendiği düşünülmektedir (11, 12, 16). VEGF ve reseptörlerinin erkek ve dişi genital sisteme ait non-vasküler hücreler (germ hücreleri ve diğerleri) üzerinde de rolleri olduğu ifade edilmektedir. VEGF, VEGFR-2 pozitif spermatogoniyum kök hücreleri ve fertilize olmuş oositlerin proliferasyonunu etkilemektedir. Bununla birlikte, spermatozoonların ve oositlerin motilitesi VEGFR-1 aracılığıyla düzenlenir (16, 71). VEGF'nin insan semeninde son derece yüksek olarak eksprese olduğu ve fare testis ile epididimisinde VEGF'ün aşırı ekspresyonunun spermatojenik blokaj nedeniyle infertiliteye neden olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, insanda hem prostat, hem de vezikula seminalis epitelinde VEGF mRNA ve proteinin kuvvetli bir şekilde eksprese edildiği belirtilmektedir. Bu sonuçlar, seminal plazmada bulunan VEGF'ün ana kaynağının testis ve epididimis olmayıp prostat ve/veya vezikula seminalis olduğunu göstermektedir (69). VEGF prostat ve vezikula seminaliste çok yüksek miktarlarda üretildiği için bu gelişim faktörünün fertilitede önemli rolü olduğu düşünülür. Bununla birlikte VEGF'ün genital sistemdeki rolü tamamen açıklığa kavuşturulamamıştır (50). VEGF'ün üreme üzerindeki birkaç olası fonksiyonunu belirlenmiştir. Bir mikrovasküler permabilite düzenleyicisi olarak VEGF, semendeki sıvı ve protein kompozisyonunun belirlenmesinde önemli rol oynayabilir. Ayrıca semende bulunan VEGF'ün koyitus sırasında dişi genital kanalda mikrovasküler permabiliteyi değiştirebildiği ve sıvı salgılanmasını etkileyebildiği düşünülmektedir. VEGF hem erkek, hem de dişi genital kanal sıvısının miktarı ve kompozisyonu etkileyerek, ayrıca sperm motilitesi ve canlılığını da etkileyerek fertilité üzerinde etkili olmaktadır. Endotelial hücre gelişimi ve anjiogenezis üzerinde stimüle edici etkileri bulunan VEGF endometriyumda blastosistin implantasyonu sırasında önemli olan ilk yeni damarların filizlenmesinde bir rol oynayabilir. VEGF'ün erkek genital kanalındaki bir olası rolü de, Sertoli ve Leydig hücreleri tarafından üretilen VEGF, testisin seminifer tubul ve intersitisyel kompartmanlarında elverişli bir mikroortam sağlayan testikuler mikrodamarlar üzerinde parakrin etkiye sahip olmalarıdır (64). Sertoli ve Leydig hücrelerinde VEGF reseptörlerinin varlığı VEGF'ün bu iki hücre tipi üzerinde otokrin etkiye sahip olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, spermatozoonlarda VEGF reseptörlerinin ekspresyonunun saptanması seminal plazma VEGF'ün spermatozoonları

hedef alabileceğini göstermektedir (50). VEGF reseptörlerinin spermatozoonlarda (ortapakiten spermatositlerde ve yuvarlak spermatidlerde) bulunması, VEGF'ün direk olarak spermatojenik hücreler üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. VEGF reseptörlerinin yuvarlak spermatidlerdeki ekspresyonu özellikle ilginçtir, çünkü gözlenen spermatojenik blokaj tam bu noktada olmaktadır. Gözlenen infertilitenin VEGF reseptörleri de eksprese eden Leydig hücrelerindeki VEGF'ün bir etkisiyle meydana geldiği bildirilmiştir (64).

VEGF'nin germ hücrelerinin hemostazisinin yanı sıra, gelişimi için önemli olan diğer genital kanal hücrelerinin (erkeklerde seminifer tubul epiteli, Sertoli ve Leydig hücreleri, dişilerde ovaryumda granüloza hücreleri) fonksiyonlarını da etkilediği bilinmektedir. Bu hücrelerin tümü VEGF ve reseptörlerinin her ikisini veya birini eksprese ederler (16, 64). İnsanda, VEGF'ün germ hücrelerinin aksine, Leydig ve Sertoli hücrelerinde (12), sıçan (13, 14, 15, 16) ve karaca (19) testislerinde sadece germ ve Leydig hücrelerinde, farede (17) ise sadece Sertoli hücreleri tarafından sentezlendiği ve salgılandığı rapor edilmektedir.

2.2.2.Yapısı ve Özellikleri

VEGF, 45 kDa'luk, homodimerik, heparin-bağımlı bir glikoproteindir. Çeşitli alt grupları tanımlanmış olup yapısında bulunduğu organın hem gelişim evresine, hem de fizyolojik fonksiyonuna bağlı bir kaç önemli biyolojik aktiviteye sahip multifonksiyonel bir moleküldür (5, 6, 8, 49, 52-57, 72, 73). VEGF A, B, C, D, E ya da aminoasit sayılarına göre VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 ve VEGF206 gibi izoformları bulunmaktadır. Vasküler geçirgenlik faktörü olarak da bilinen VEGF-A, disülfid bağlı homodimerlere bağlanmış olan 34-46 kDa'luk sekret glikoproteindir. Endotel hücreleri üzerindeki vasküler endoteliyal büyüme faktörü reseptörü 1 (VEGF-1) ve vasküler endoteliyal büyüme faktörü 2 (VEGF-2) ile neuropilin-1 ve -2'ye bağlanır (51, 62). Tümör anjiyogenezisinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. VEGF-B'nin, VEGF-B167 ile VEGF-B186 olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır. VEGF-B ekspresyonu uyarıldığında ve ürokinaz tip plazminojen aktivatörü arttığında sadece VEGFR-1'e bağlanır ve ekstrasellüler matriksin dejenerasyonunu (ECM) ve endotel hücre (EC) migrasyonunu uyarır. VEGF-C ve VEGF-D, protein maturasyonu sırasında ayrılmış olan, N- ve C-terminal uzamlarında merkezi bir VEGF homoloji bölgesi içerirler. Nonkovalent dimerlerden oluşan VEGF-C ve -D'nin her ikisi de VEGFR-2 ve

Vasküler endoteliyal büyüme faktörü reseptörü 3 (VEGFR-3)'e bağlanır. VEGF-C lenfanjiyogenezde önemli bir rol oynar ve embriyogenez süresince eksprese olur (62). VEGF-C ekspresyonunun gastrik, meme, tiroid ve servikal kanserlerin tümör invazyonuna ve lenf düğümü metastazına neden olduğuyla ilişkili çalışmalar yapılmıştır. VEGF-E ise parapoks orf virusun bir geni tarafından kodlanan proteindir (59, 69).

İnsanlarda VEGF'nin en az sekiz proanjiyogenik izoformu bulunur. Bunlar tek bir gene alternatif bağlanmalar yoluyla üretilirler. VEGF121 heparinle bağlanmaz ve ekstrasellüler aralıkta serbest olarak yayılır. Buna karşın VEGF189 heparine güçlü bir şekilde bağlanır ve ekstrasellüler matriksle hücre yüzeyinde diziler oluşturur. En baskın isoform olan VEGF165 heparine orta düzeyde bir affiniteye sahiptir. İnsan VEGF'sinin diğer izoformları ise VEGF145, VEGF148, VEGF162, VEGF183 ve VEGF206'dır (62).

Fare izoformları kısa bir aminoasit zincirinden oluşur. Farklı potansiyellerine rağmen bütün VEGF izoformları hem VEGFR-1 hem de VEGFR-2'yi aktive eder ve onlara bağlanırlar (65). VEGF165 izoformu damar gelişiminde merkezi bir rol oynamasına rağmen, daha az görülen diğer izoformlar ise damar modellerinde ve özellikle de arter gelişiminde farklı roller üstlenirler. Eksik heparin bağlayan VEGF izoformları miyokardiyal anjiogenezi zayıflatarak işemik kardiyomiyopatiye neden olur ve doğumdan sonraki iki hafta içinde fareler ölür. Bu farelerde ölüm kapillar dallanmadaki azalma sonucu şekillenir (65).

VEGF, aktivitesini üç reseptör ile gerçekleştirir: Tirozin kinaz yapısında olan bu reseptörler VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (flk-1/KDR) ve VEGFR-3 (flt-4)'dür. Bunlardan VEGFR-1 ve -2 endotel hücreleri üzerinde, VEGFR-3 ise lenf damarları üzerinde bulunur. VEGF reseptörlerinin aktivasyonu fosfoinositol-3 kinaz, fosfolipaz-C ve *ras* GTPaz aktivatör proteinleri gibi bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinini fosforile ederek endotel hücrelerinin çoğalma, göç ve farklılaşmasına neden olur (74, 75, 76, 77).

Meme kanserlerinde VEGF ekspresyonu ile tümör mikrovaskülarizasyonu, malignite ve metastaz arasında ilişki bulunmuştur. Bu genin 5' bölgesi analiz edildiğinde bireyler arasında VEGF tanımı bakımından varyasyonları olduğu saptanmıştır. Bu çeşitlilik birçok polimorfizmlerin varlığını göstermektedir. Bu gendeki polimorfik bölgelerin

anjyogenezisde kritik rol oynadığı ve bazı hastalıklarda genin protein üretimi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (59, 77, 78).

VEGF immunreaktivitesi insan ve primatların memesinde terminal kanalların epitel hücrelerinde görülür. Düşük miktardaki VEGF proteini ve VEGF mRNA (189, 165 ve 121 aminoasit izoformları) insan meme dokusunda belirlenmiştir (59). Uterusun endotel hücrelerinde mitozu uyaran VEGF ve VEGFR-2 gebelik süresince artar. VEGF, VEGF-C ve VEGFR-1, -2, -3 ün post-pubertal dönemde kemirici memesinde eksprese olduğu ortaya konulmuştur (79). VEGF-C ve VEGFR-3 gebelik ve laktasyonda çok az artar. Erişkinlerin birçok dokusundaki lenfatik damarlara spesifik olduğu bilinen VEGFR-3, dinlenme fazındaki memede kan kapillar endotel hücrelerinden de eksprese olur. VEGF, VEGFR-1 ve -2 'nin laktasyon süresince aşırı miktarda arttığı da görülür (59, 79-81).

2.2.3.Vasküler Endotel Büyüme Faktörü Reseptörleri

2.2.3.1. VEGFR-1 (flt-1)

Flt-1 (Fms benzeri tirozin kinaz-1) olarak da bilinen VEGFR-1, kan damarlarının edotel hücreleri, monosit/makrofaj, dentritik hücreler, hemopoitik kök hücreleri, trofoblastlar ve osteoklastların membranına bağlı bir reseptördür. Zayıf bir kinaz aktivitesine sahip olmasına rağmen, VEGFR-1 monosit/makrofajların migrasyonunu uyarır (82, 83). Erken embriyonik gelişim süresince anjyogenezde negatif düzenleyici olarak işlev görür. Eksik olduğu farelerde endotel hücre büyümesinde aşırılık meydana geldiği ve kan damarlarında organizasyon bozuklukları olduğu için ölümler görülür (65). VEGFR-1'in tirozin kinaz bölgesinin ortadan kalkması, anjyogenezisin normal gelişmesine izin verir. Son yıllardaki çalışmalarda, hem makrofaj migrasyonunda, hem de patolojik anjyogeneziste VEGFR-1 tirozin kinaz için birçok aktif uyarım yolları gösterilmiştir. VEGFR-1'in inhibisyonu periferel kanda kemik iliğinden ayrılan miyeloid projenitörlerin mobilizasyonunu ve yangısal dokuya lökosit infiltrasyonunu azaltarak patolojik neovaskülarizasyonu ve yangıyı da baskılar (75, 81, 84).

2.2.3.2. VEGFR-2 (flk-1/KDR)

Farelerde Flk-1 (fötal karaciğer kinazı-1) ya da insanlarda KDR (kinaz insert bölgesi içeren reseptör) olarak da bilinen VEGFR-2 hemanjioblastlar ile endotel ve hemotopoitik hücre prekürsörleri için en önemli belirteçtir (85). Farelerde VEGFR-

2'nin ortadan kalkması hem hematopoetik, hem de endotelial hücrelerde eksikliklere neden olduğundan embriyonik ölümlere sebep olur. Bu nedenle VEGFR-2 endotelial hücre prekürsörlerinin farklılaşmasında önemli bir role sahiptir (75). Ayrıca VEGFR-2, şekillenmiş olan kan adacıklarında, vitellüs kesesindeki posterior primitif çizgide ve erken hematopoezisin intraembriyonik döneminde hücrelerin direkt lokalizasyonu için gereklidir (75, 86). Güçlü tirozin kinaz aktivitesinden dolayı, VEGFR-2 endotelial hücrelerde anjiyogenezis, proliferasyon, migrasyon ve yaşamsal uyarımlarda en önemli pozitif sinyal düzenleyici olarak hareket eder (82). Endotel hücrelerinde VEGFR-2 Raf1'i (kemirgen lösemi viral onkojen homolog) aktive ederek, DNA sentezine ve hücre proliferasyonuna sebep olur (75). Ayrıca, hücre migrasyonunu uyaran aracı molekülleri kullanarak P13 kinazı (87) ve damarlarda permeabiliteyi düzenleyen endotelial nitrik oksit sentazın (eNOS) fosforilasyonunu (77) aktive eder. VEGFR-2 ekspresyonu vasküler gelişimin son dönemlerinde azalır, ancak erişkinlerde fizyolojik ve patolojik anjiogenezisde önemli bir düzenleyici olur ve endotel hücrelerinde VEGFR-2 ekspresyonunun yüksek olduğu görülür. VEGFR-2 hematopoetik kök hücrelerinde de eksprese olur (75). Ayrıca non-endotelial ekspresyonu sinir hücreleri, osteoblastlar, pankreatik kanal hücreleri, retinal projenitor hücreler ve megakaryositlerde de gözlenmiştir (82, 88).

2.2.3.3. VEGFR-3 (flt-4)

Flt-4 olarak da bilinen VEGFR-3 diğer VEGFR'ler ile karşılaştırıldığında farklı bir yapısal özelliğe sahiptir. Beşinci Ig-homoloji bölgesinde proteolitik ayrılma yoktur ve aminoterminal bölgesinde bulunan disülfid köprüleri molekülün geri kalan bölümleriyle bağlantılıdır (75). VEGFR-3 homodimerik konfigürasyonlarda farklı karboksiterminal fosforilasyona ve sinyal transdüksiyonuna neden olduğu için, VEGFR-3 ile heterodimerize yapılar oluşturabilme yeteneğine sahiptir (89). Vasküler gelişimin başlangıcında VEGFR-3 kan damarlarının endotelinde eksprese olur. Anjiogenezis için gerekli olmamasına rağmen, primer vasküler pleksusların yeniden şekillenmesi ve maturasyonu için gereklidir (75). Embriyogenezin daha sonraki dönemlerinde kan damarlarında azalır. Azalma ilk olarak arterlerde ve daha sonra venlerde olur. Sonunda lenf damarlarının endotel hücreleri ile sınırlı kalır. VEGFR-3 venlerden farklılaşmış lenfatik endotelial hücrelerin çoğalması ve migrasyonu ile de ilişkilidir. Embriyonik gelişim süresince lenf damarlarının yaşamsal faaliyetleri ve kalıcılığı için gereklidir (75,

90). VEGFR-3 ilişkili uyarımlar lenf damarlarının büyümesini uyarmak için yeterlidir (75, 91). Ayrıca tümörlerde yeni şekillenmiş kan damarlarında da gözlenir (92). Ayrıca, VEGFR-3'ün osteoblastlar ve sinir progenitör hücrelerde de varlığı bildirilmiştir (93, 94, 95).

3.MATERYAL VE METOD

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesinin 10.04.2007 tarihli ve 13 toplantı sayılı ve 21 karar nolu Etik Kurul kararıyla, kas içi sodyum pentobarbital uygulanarak ötanazi edilen 15 adet sağlıklı, erkek, Yeni Zellanda tavşanından alınmış ve Bouine tespit solüsyonuyla 12 saat süreyle tespitten sonra sırasıyla dereceli alkoller, metil benzoat ve benzol serilerinden geçirilerek parafinde bloklanmış olan 30 adet testis ve epididimisler çalışmada materyal olarak kullanıldı.

Tavşan testis ve epididimisinin genel yapısını belirlemek amacıyla parafin bloklardan normal lamlara 5-6 µm kalınlığında alınan üçlü boyama yöntemi uygulandı. Ayrıca, testislerde seminifer tubüller kontrol edilerek tavşan testisleri için bildirilen spermatojenik evrelerin belirlenmesi için PAS boyaması yapıldı. Parafin bloklardan ise VEGF ve reseptörleri VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin testis ve epididimisteki lokalizasyonunun belirlenmesi amacıyla strept-ABC immunohistokimyasal boyama yöntemi yapıldı. Kesitler, endojen peroksidazın inaktivasyonu amacıyla metanolde hazırlanan %3'lük hidrojen peroksitte 20 dakika süreyle tutuldu. Ardından, dokuların antijenik özelliklerinin yeniden kazandırılması amacıyla kesitler 90°C'lik sitrat buffer'da 20 dak. süreyle bırakıldı. Daha sonra, kesitler non-spesifik bağlanmaları engellemek için %10'luk keçi serumu (Labvision, Ultravision kit, TM-125-HL) ile 5 dakika süreyle muamele edildi. Bu işlemten sonra, kesitler Tablo 1'de belirtilen primer antikorlarla 1 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Ardından, kesitlere 20 dakika süreyle biotinli anti-mouse/rabbit sekonder antikor (Labvision, Ultravision kit, TM-125-HL) ve 20 dakika süreyle de avidin-peroksidaz solüsyonları (Labvision, Ultravision kit, TM-125-HL) uygulandı. Bu işlemin ardından, kesitlere antijen-antikor reaksiyonun görüntülenebilmesi için 5-10 dakika süreyle DAB kromojeni (Invitrogen), ardından zemin boyaması için 2-3 dakika süreyle Gill'in hematoksileni tatbik edildi. Tüm boyama işlemleri oda ısısında bir nem kamarası (Shandon, UK) içerisinde

gerçekleştirildi, yıkamalar PBS (Phosphate buffer saline, 0.01 M, pH;7.4) ile yapıldı. Pozitif kontrol olarak, tavşan ve insan deri, böbrek ve bağırsaklarına ait dokular kullanıldı. Negatif kontrol için ise primer antikorların yerine PBS damlatılarak geriye kalan boyama işlemlerine normal boyamalarda olduğu gibi devam edildi. Olympus BX-51 ışık mikroskobu ile incelenen preparatlar DP72 Olympus kamera ile fotoğraflandı.

Boyama sonuçları, Semi-kantitatif yöntemle değerlendirildi. Reaksiyon alanında ışık mikroskobunda yüksek büyütme (X40) ile boyanmış hücrelerin görülebilmesi reaksiyon yok (-), reaksiyonun sadece yüksek büyütme (X40) ile görülmesi zayıf (+), düşük büyütmeyle (10X) rahatlıkla görülmesi orta derecede (++), düşük büyütme (10X) ile dikkati çekici olarak görülmesi şiddetli reaksiyon (+++) olarak tanımlandı.

Tablo 3.1. İmmunohistokimyasal boyamalarda kullanılan primer antikorlar

Antikorlar	Klon	Ürün kodu	Dilüsyon	Firma
Monoklonal mouse anti-VEGF	Ab-3(JH121)	MS-350	1:400	Thermo Sci.
Monoklonal mouse anti-VEGFR1	FIt-1/EWC	9540	1:50	Abcam
Rabbit poliklonal anti-VEGFR1	FIt-1	2350	1:50	Abcam
Monoklonal mouse anti-VEGFR2	KDR/EIC	9530	1:50	Abcam
Monoklonal mouse anti-VEGFR2	KDR-2	10973	1:50	Abcam

4. BULGULAR

4.1. GENEL YAPI

PAS boyaması uygulanan testis dokularında seminifer tubüllerde tubülün morfolojik yapısına göre 8 farklı evre tespit edildi.

4.1.1. I. Evre

I. evredeki seminifer tubüller de, tip A spermatogoniyalar (a) ve Sertoli hücrelerinin (s) bazal membran (m) boyunca dizildiği görüldü. Tip A spermatogoniyalar toz benzeri bir kromatin içeren ovalden yuvarlağa değişen bir çekirdeğe sahip olup çekirdek membranları belirgindi. Bununla birlikte alanda, erken (e) ve geç (g) dönemler olmak üzere iki farklı generasyon primer spermatosit belirlendi. Erken dönem primer spermatositler (e) preleptoten fazda olup bazal membrana yakın olarak yerleşmişlerdi. Geç primer spermatositler (g) ise pakiten evrede olup, tubul lumeni ve bazal membran arasında rastgele bir dağılım göstermekteydiler. Lümeni sınırlandıran spermatidlerin (t), belirgin çekirdek membranı olan yuvarlak bir çekirdeğe sahip oldukları ve çekirdeklerinin yaklaşık yarısını kuşatan yoğun bir şekilde PAS (+) boyanmış bir akrozom içerdikleri gözlemlendi (Şekil 4.1).

4.1.2. II. Evre

II. evredeki seminifer tubüller incelendiğinde, evre I'deki oluşumlar benzer şekilde gözlenirken en belirgin farklılık olarak lümeni sınırlandıran spermatidlerin (t) çekirdeklerinin belirgin şekilde uzayarak ovalimsi şekil görüldü (Şekil 4.2).

4.1.3. III. Evre

III. evrede Sertoli hücrelerinin (S) ve tip A spermatogoniyumların (a) I. ve II. evrelerdekine benzer şekilde bazal membran (m) üzerinde dizelendiği, her iki tip primer spermatosit generasyonunun (e ve g) da mevcut olduğu ve spermatidlerin (t) çekirdeklerinin daha da uzamış olduğu belirlendi (Şekil 4.3).

4.1.4. IV. Evre

IV. evrede diğerk 3 evrede olduğu gibi bazal membran (m) üzerinde Tip A spermatogoniyumlar (a) ve Sertoli hücreleri (s) ile ayrıca bazal membrana paralel uzanan oval bir çekirdeğe sahip intermediyer tip spermatogoniyumların (i) da bulunduğu bu evrede, çekirdekleri pakiten fazda olan erken dönem primer spermatositler (e) bazal membrana yakın olarak lokalize olmuşlardı. Diploten döneminde olan geç dönem primer spermatositlerin (g) çekirdekleri ise daha büyüktü. Sekonder spermatositler (r), belirgin çekirdek membranlı yuvarlak çekirdekli oldukları gözlemlendi. Yeni jenerasyon Spermatidler (t) de belirgin çekirdek membranlı yuvarlak bir çekirdeğe sahiptirler. Bununla birlikte, bölünme aşamasında olan primer ve sekonder spermatositlerde mitotik figürler (u) gözlemlendi (Şekil 4.4).

4.1.5. V. Evre

V. evrede spermatogoniyum A'ların (a) yanında çok sayıda intermediyer tip spermatogoniyaların (i) bulunduğu dikkati çekti. Alanda, geç dönem primer spermatositler (g), yuvarlak şekilli spermatidler (t) ve lumene doğru uzanan uzamış çekirdekli spermatidler (eski jenerasyon) gözlemlendi (Şekil 4.5).

4.1.6. VI. Evre

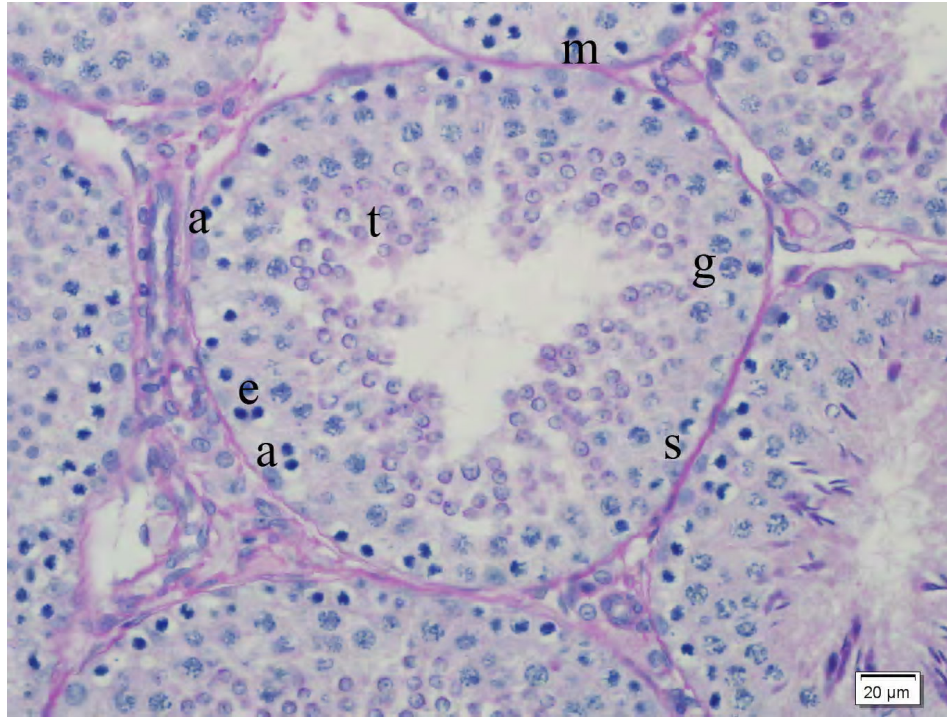
VI. evrede Sertoli hücreleri (s), intermediyer tip spermatogoniyumlar (i) ve tip A spermatogoniyumların (a) bazal membran (m) üzerinde dizelendiğı gözlemlendi. Bununla birlikte, alanda geç dönem primer spermatositler (g), yuvarlak çekirdekli yeni jenerasyon spermatidler (t) ve eski jenerasyon spermatidler belirlendi (Şekil 4.6).

4.1.7. VII. Evre

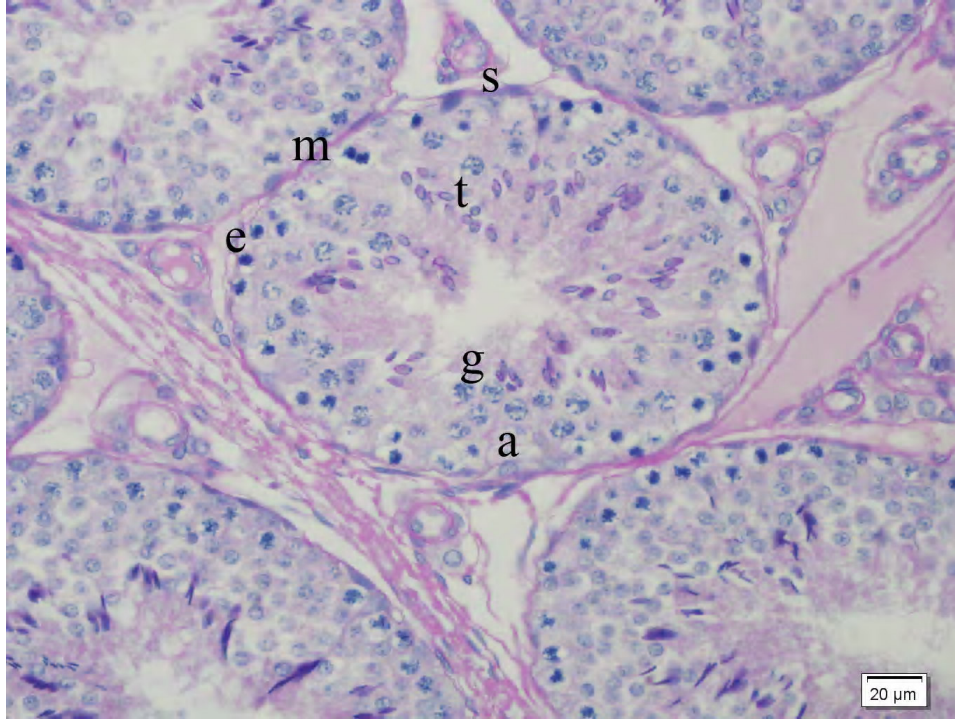
VII. evrede Sertoli hücreleri (s) ve her 3 tip spermatogoniyumların (a, b ve i) bazal membran (m) üzerinde sıralandığı görüldü. Bununla birlikte alanda, pakiten çekirdekli geç dönem primer spermatositler (g), bunların üzerinde sıralanmış çekirdeğin ön bölümü yaklaşık 1/3'ünü kuşatan belirgin bir akrozom içeren yuvarlak çekirdekli yeni jenerasyon spermatidler ile lümeni çevreleyen eski jenerasyon spermatidler (t) belirlendi (Şekil 4.7).

4.1.8. VIII. Evre

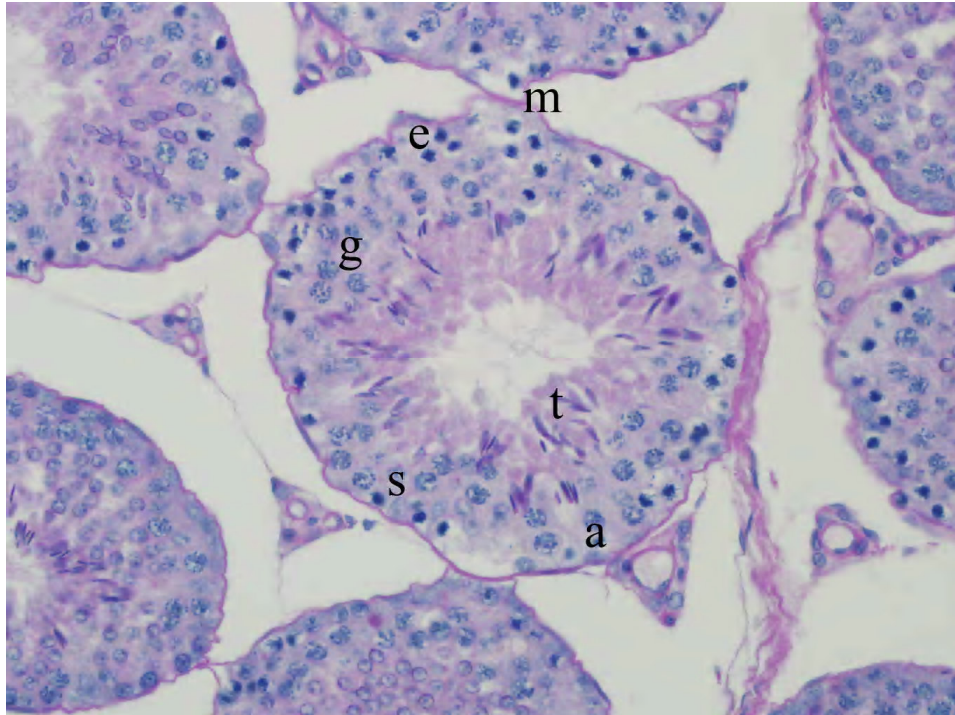
VIII. evrede Sertoli hücreleri (s), tip A (a) ve Tip B (b) spermatogoniyalar belirlendi. Ayrıca, alanda yuvarlak çekirdekli ve preleptoten dönemde olan primer spermatositler (e) tip B spermatogoniyumlara (b) oldukça benzer olarak gözlemlendi. Preleptoten spermatositlerin çekirdekleri tip B spermatogoniyaların çekirdeklerinden daha küçüktü. Sahada, geç jenerasyon primer spermatositler (g), belirgin akrozomlu yuvarlak çekirdekli spermatidler (t) ve lumene doğru uzanmış çok sayıda spermatozoonlar (z) görüldü. Bununla birlikte atık cisimlerin varlığı tespit edildi (Şekil 4.8).



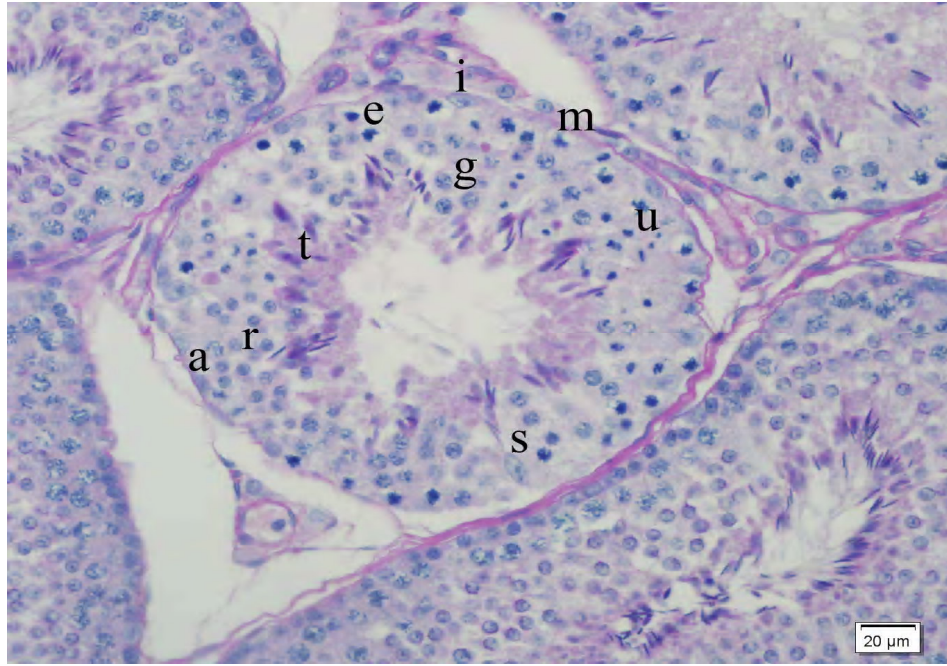
Şekil 4.1. Seminifer tubülde evre I'in genel görünümü (PAS-X20 µm). S: Sertoli hücresi, m: Bazal membran, a: Tip A spermatogonium, e: Erken dönem primer spermatosit, g: Geç dönem primer spermatosit, t: spermatidler.



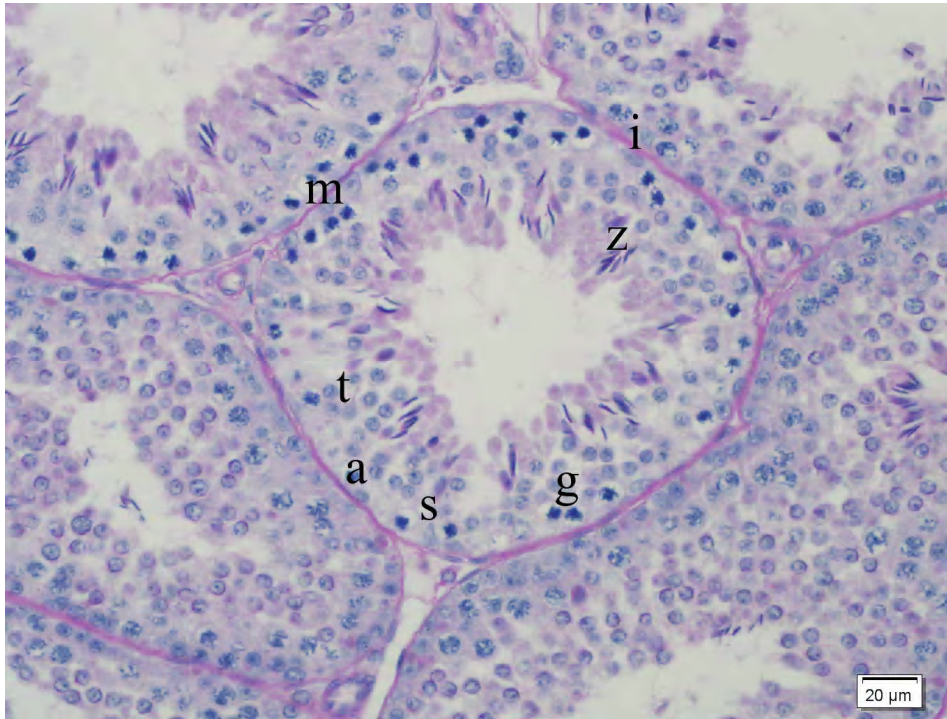
Şekil 4.2. Seminifer tubülde evre II'in genel görünümü (PAS-X20 μm). S: Sertoli hücresi, m: Bazal membran, a: Tip A spermatogonyum, e: Erken dönem primer spermatosit, g: Geç dönem primer spermatosit, t: spermatidler.



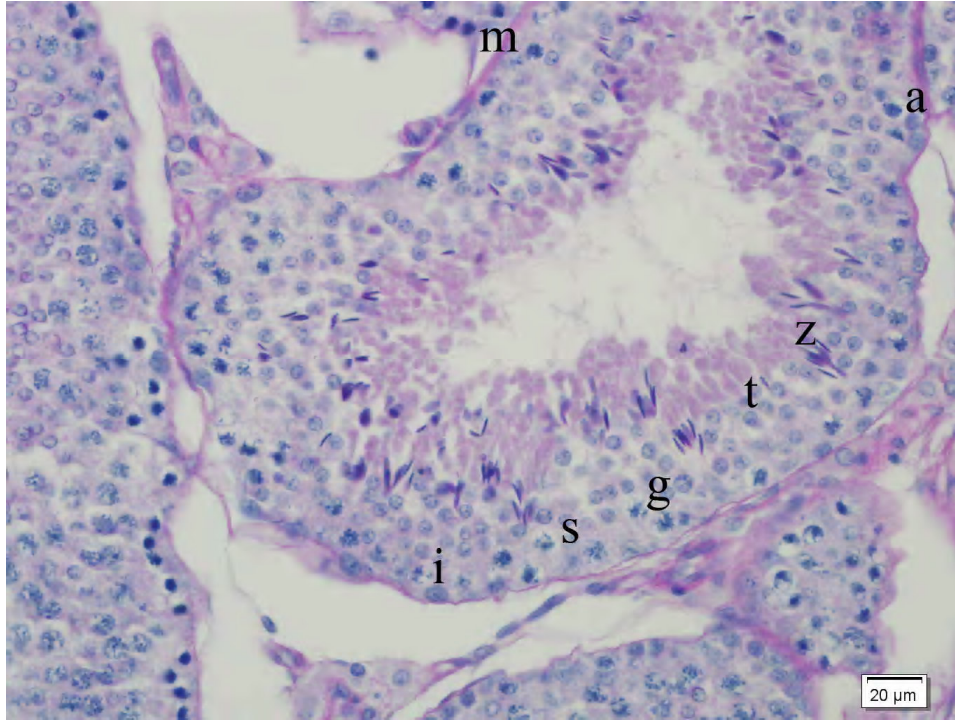
Şekil 4.3. Seminifer tubülde evre III'in genel görünümü (PAS-X20 μm). S: Sertoli hücresi, m: Bazal membran, a: Tip A spermatogonyum, e: Erken dönem primer spermatosit, g: Geç dönem primer spermatosit, t: spermatidler.



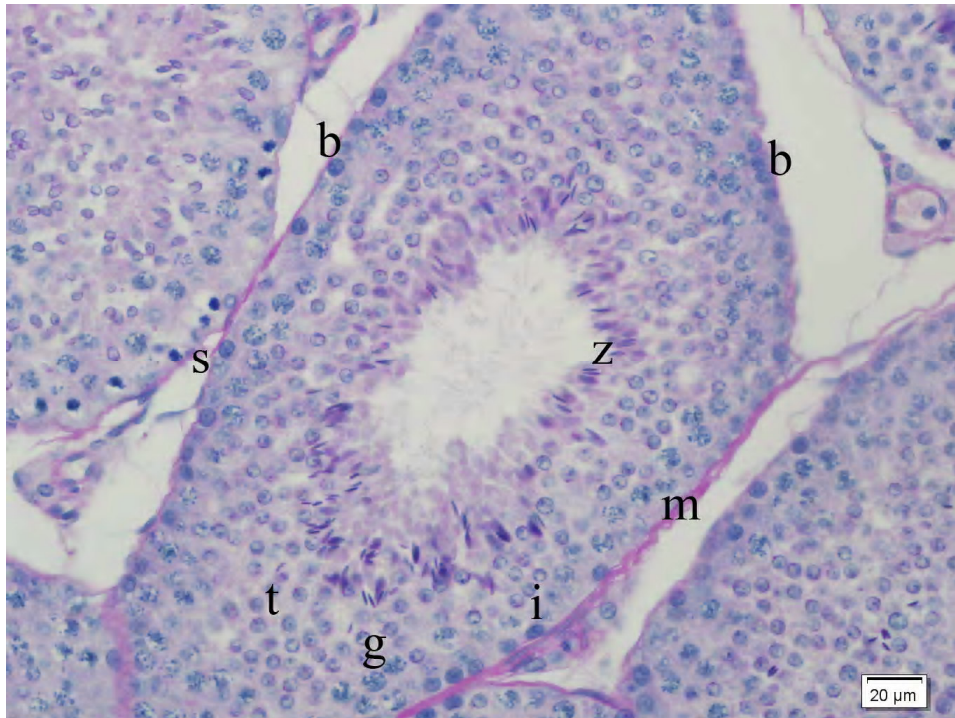
Şekil 4.4. Seminifer tubülde evre IV'in genel görünümü (PAS-X20 μ m). S: Sertoli hücresi, m: Bazal membran, a: Tip A spermatogonyum, i: İntermediyer spermatogonyumlar, e: Erken dönem primer spermatosit, g: Geç dönem primer spermatosit, r: sekonder spermatosit, u: metafaz aşamasında sekonder spermatositler, t: spermatidler.



Şekil 4.5. Seminifer tubülde evre V'in genel görünümü (PAS-X20 μ m). S: Sertoli hücresi, m: Bazal membran, a: Tip A spermatogonyum, i: İntermediyer spermatogonyumlar, g: Geç dönem primer spermatosit, t: spermatidler, z: eski jenerasyon spermatidler.



Şekil 4.6. Seminifer tubülde evre VI'in genel görünümü (PAS-X20 µm). S: Sertoli hücresi, m: Bazal membran, a: Tip A spermatogonyum, i: İntermediyer spermatogonyumlar, g: Geç dönem primer spermatosit, t: spermatidler, z: eski jenerasyon spermatidler.



Şekil 4.7. Seminifer tubülde evre VII'in genel görünümü (PAS- X20 µm). S: Sertoli hücresi, m: Bazal membran, a: Tip A spermatogonyum, b: Tip B spermatogonyum, i: İntermediyer spermatogonyumlar, g: Geç dönem primer spermatosit, t: spermatidler, z: eski jenerasyon spermatidler.



Şekil 4.8. Seminifer tubülde evre VIII'in genel görünümü (PAS-X20 µm). S: Sertoli hücresi, m: Bazal membran, a: Tip A spermatogonyum, b: Tip B spermatogonyum, g: Geç dönem primer spermatosit, e: Erken dönem primer spermatosit, t: spermatidler, z: Spermatozoonlar.

4.2. VASKÜLER ENDOTELİYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF)

Tavşan testis ve epididimis dokularında Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü'nün lokalizasyonunu belirleyebilmek amacıyla mouse anti-VEGF (Thermo Scientific) primer antikoru kullanılmıştır. Seminifer tübüllerdeki tüm spermatojenik evreler ve epididimis incelenerek aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

4.2.1. Testis

Spermatojenik gelişimin I. ve II. evrelerinde olduğu belirlenen seminifer tübüllerde Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında, tip A spermatogonyumların çekirdek periferlerindeki sitoplazmada ve primer spermatositlerde granüler tarzda pozitif immunreaksiyon gözlemlendi. (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10).

Spermatojenik gelişimin III. ve IV. evrelerinde olan seminifer tübüllerde Sertoli hücrelerinin sitoplazması, tip A spermatogonyumların çekirdeklerinin perinükleer sitoplazmasında ve primer spermatositleri sitoplazmalarında granüler tarzda pozitif immunreaksiyon gözlenirken, Sertoli hücrelerinin sitoplazmasında I. ve II evrelere göre daha yoğun immunpozitif boyanma dikkati çekti (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12).

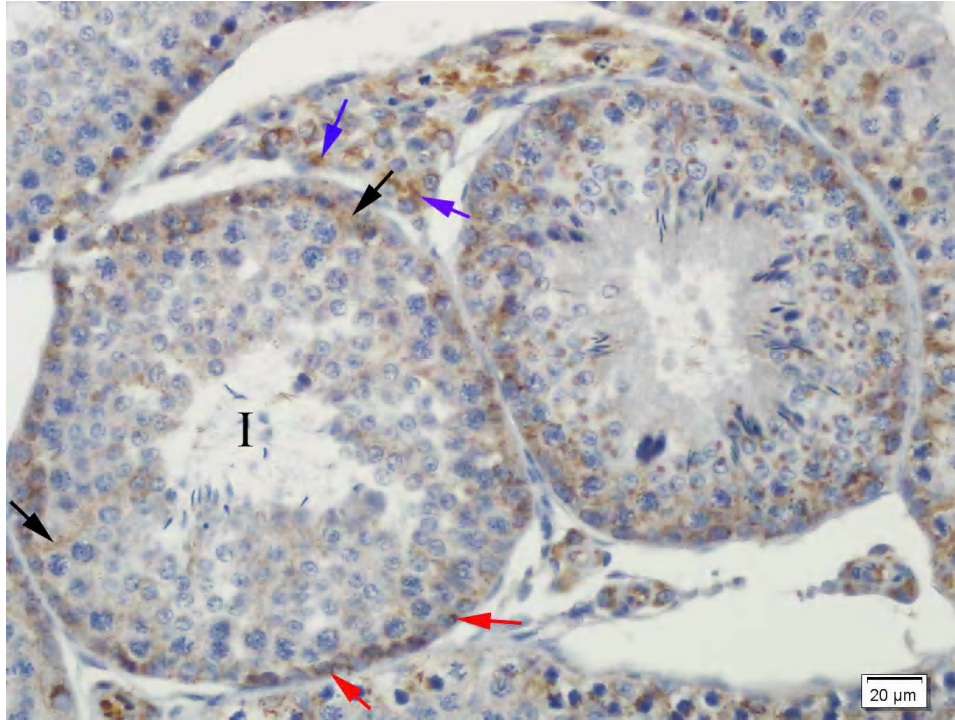
Spermatojenik gelişimin V. evresinde olan seminifer tubüllerde Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında daha belirgin immunboyanma gözlenirken, tip A spermatogonyumların çekirdeklerinin perinükleer sitoplazmasında ve primer spermatositlerde pozitif immunreaksiyon belirlendi. Yeni jenerasyon spermatidlerin akrozomlarında ise pozitif immunreaksiyon dikkati çekti (Şekil 4.13).

Spermatojenik gelişimin VI. VII ve VIII. evrelerinde olan Seminifer tubullerin yapısı incelendiğinde önceki dönemlerde olduğu gibi Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında, tip A spermatogonyumların çekirdek çevresinde ve spermatositlerde pozitif immun reaksiyon gözlemlendi. Bu dönemlerde de V. evrede olduğu gibi yeni jenerasyon spermatidlerin akrozomlarında pozitif immunreaksiyon belirlendi (Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16).

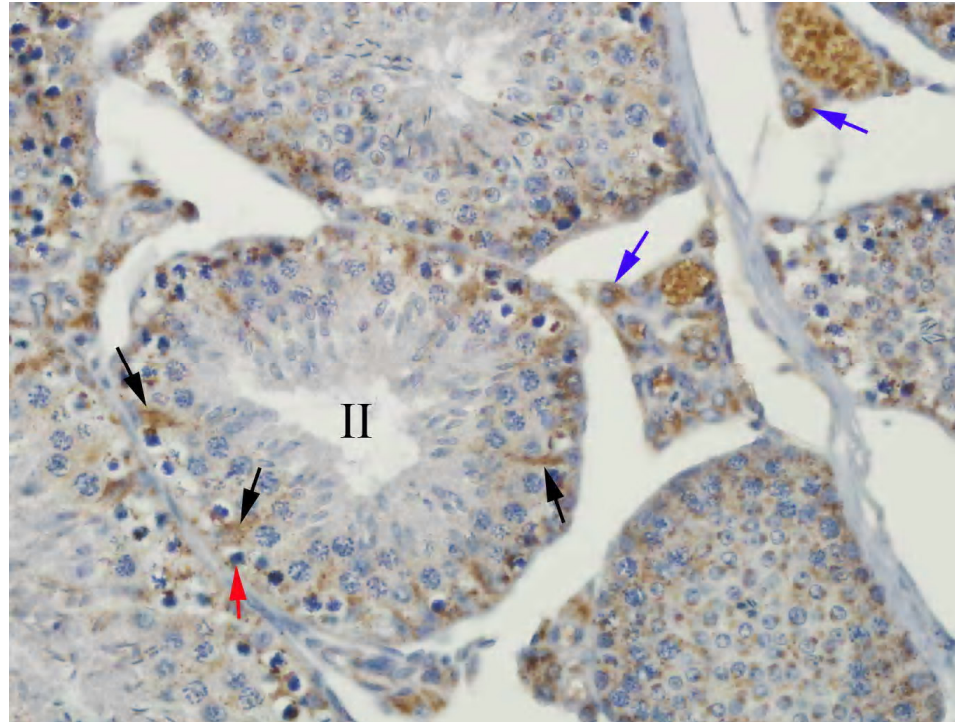
İnterstisyel dokuya bakıldığında ise, Leydig hücrelerinin sitoplazmalarında granüler tarzda kapillarların endotelyumunda pozitif immunreaksiyon görüldü (Şekil 4.11 – 16)

4.2.2. Epididimis

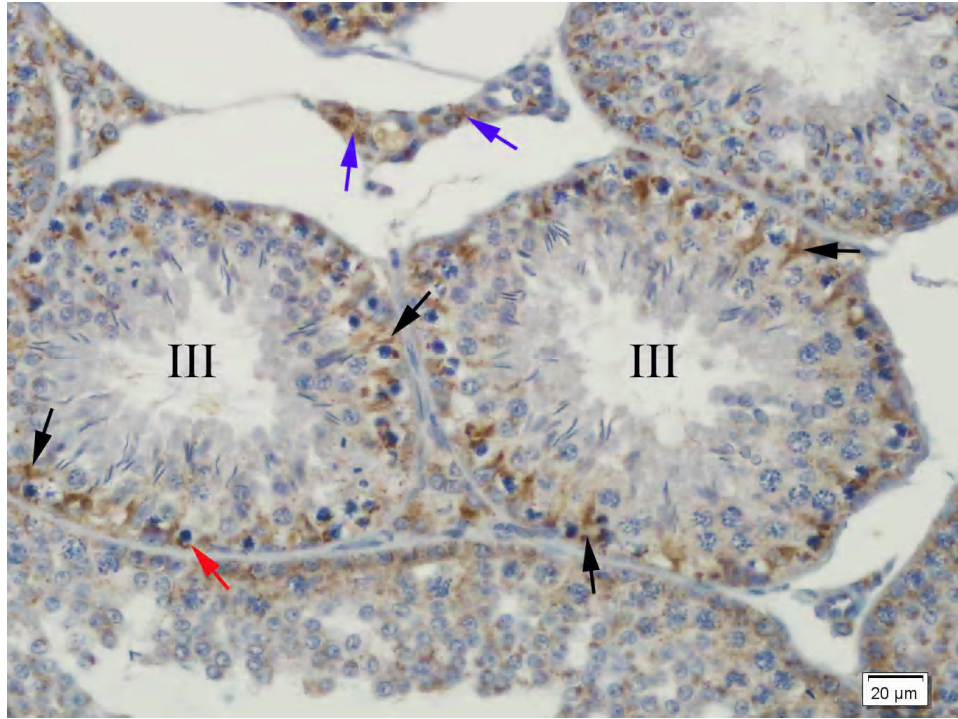
Epididimisi, başlangıç segmenti, kaput, korpus ve kauda epididimis olmak üzere 4 ayrı bölümde inceledik. Başlangıç segmentinin epitelini döşeyen prinsipal hücrelerin apikal ve bazal sitoplazmalarında granüler tarzda, apikal hücreler ve bazı bazal hücrelerin sitoplazmalarında ise yoğun immunboyanma belirlendi (Şekil 4.17). Kaput epididimis (Şekil 4.18), korpus epididimis (Şekil 4.19) ve kauda epididimisi (Şekil 4.20) döşeyen epitellerdeki prinsipal hücrelerin apikal ve bazal sitoplazmalarında granüler tarzda ve bazı bazal hücrelerin sitoplazmalarında ise yoğun immunreaktivite dikkati çekti.



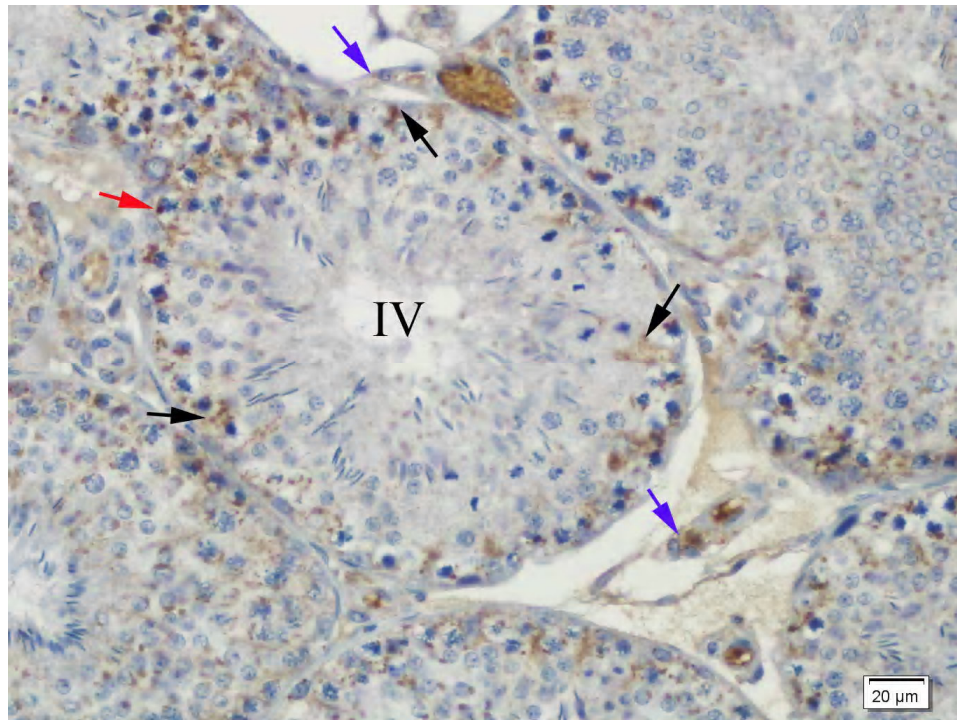
Şekil 4.9. VEGF'ün testis dokusundaki immunohistokimyasal lokalizasyonu, evre I (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, X20 μ m). Siyah oklar: Sertoli hücreleri, mavi oklar: Leydig hücreleri, kırmızı oklar: Tip A Spermatogoniyumlar.



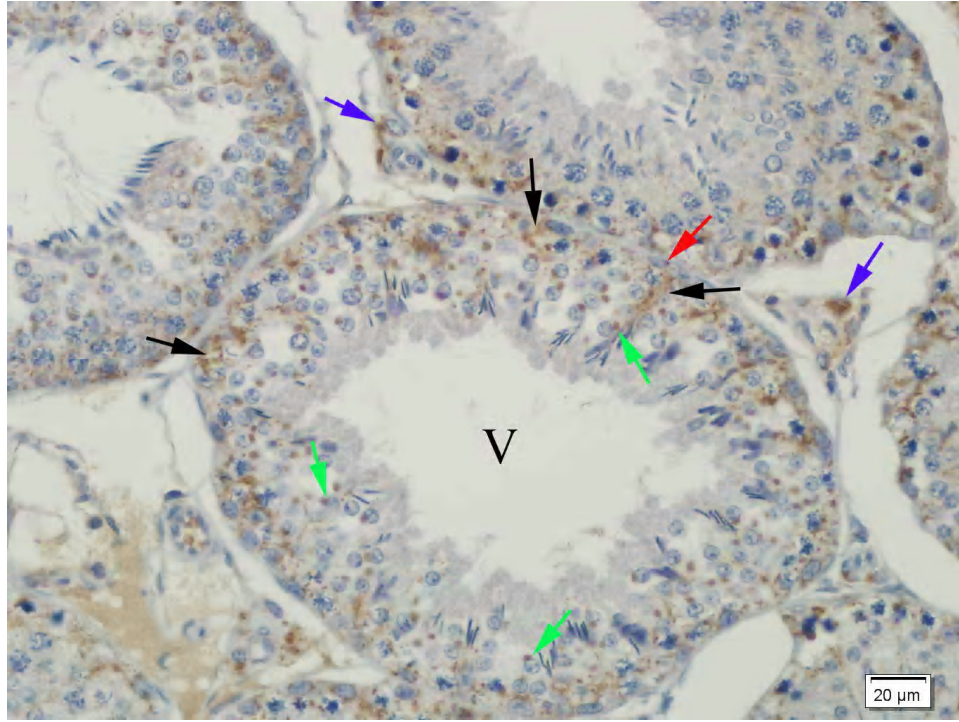
Şekil 4.10. VEGF'ün testis dokusundaki immunohistokimyasal lokalizasyonu, evre II (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, X20 μ m). Siyah oklar: Sertoli hücreleri, mavi oklar: Leydig hücreleri, kırmızı oklar: Tip A Spermatogoniyumlar.



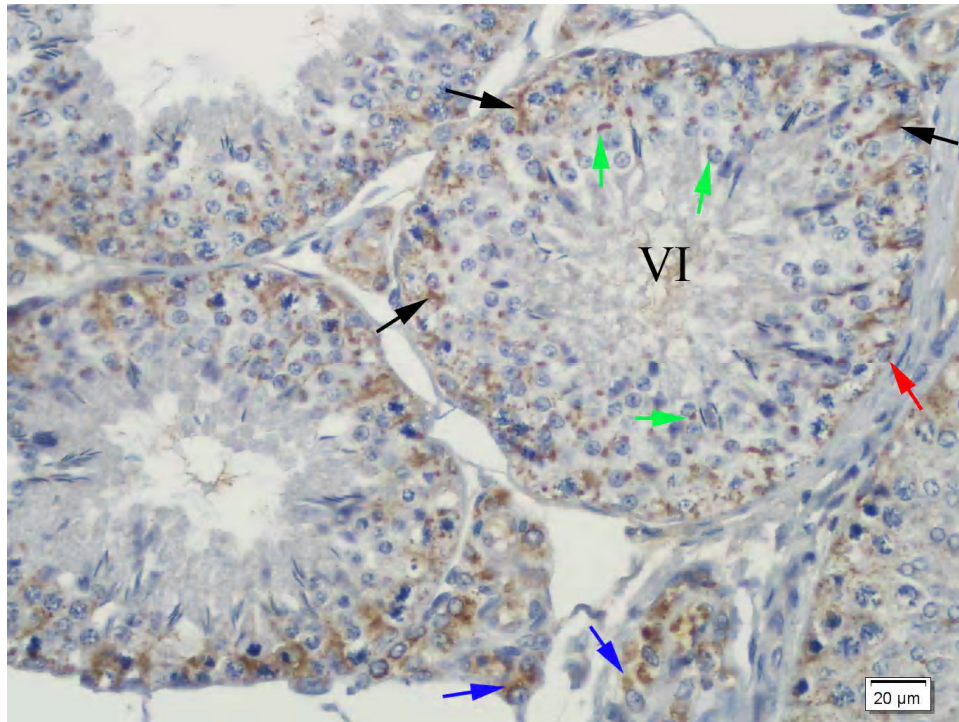
Şekil 4.11. VEGF'ün testis dokusundaki immunohistokimyasal lokalizasyonu, evre III (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, X20 µm). Siyah oklar: Sertoli hücreleri, mavi oklar: Leydig hücreleri, kırmızı oklar: Tip A Spermatogoniyumlar.



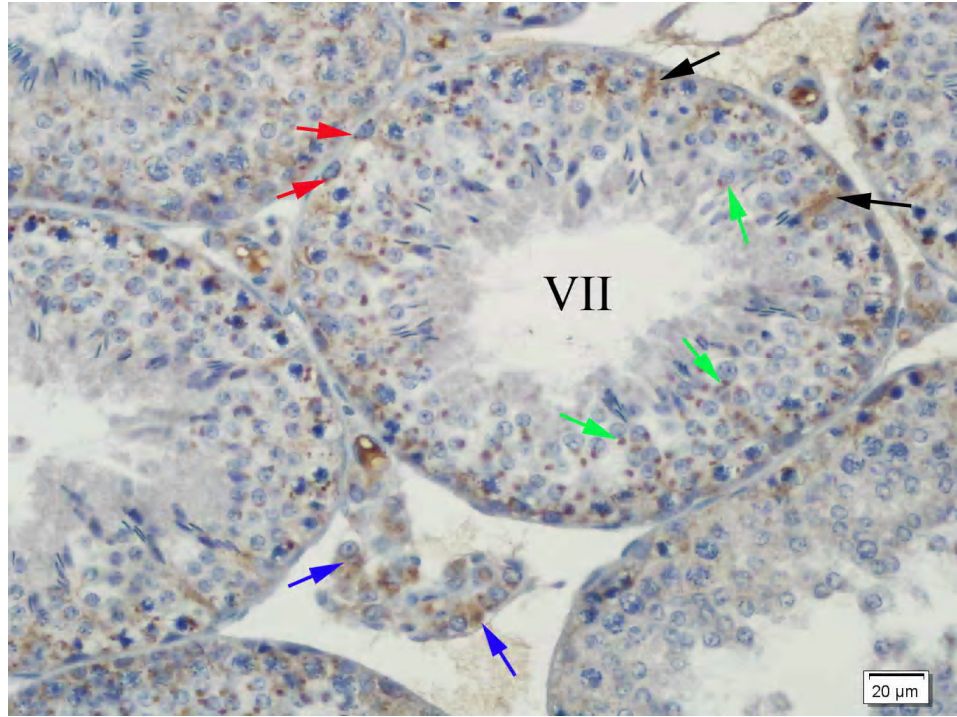
Şekil 4.12. VEGF'ün testis dokusundaki immunohistokimyasal lokalizasyonu, evre IV (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, X20 µm). Siyah oklar: Sertoli hücreleri, mavi oklar: Leydig hücreleri, kırmızı oklar: Tip A Spermatogoniyumlar.



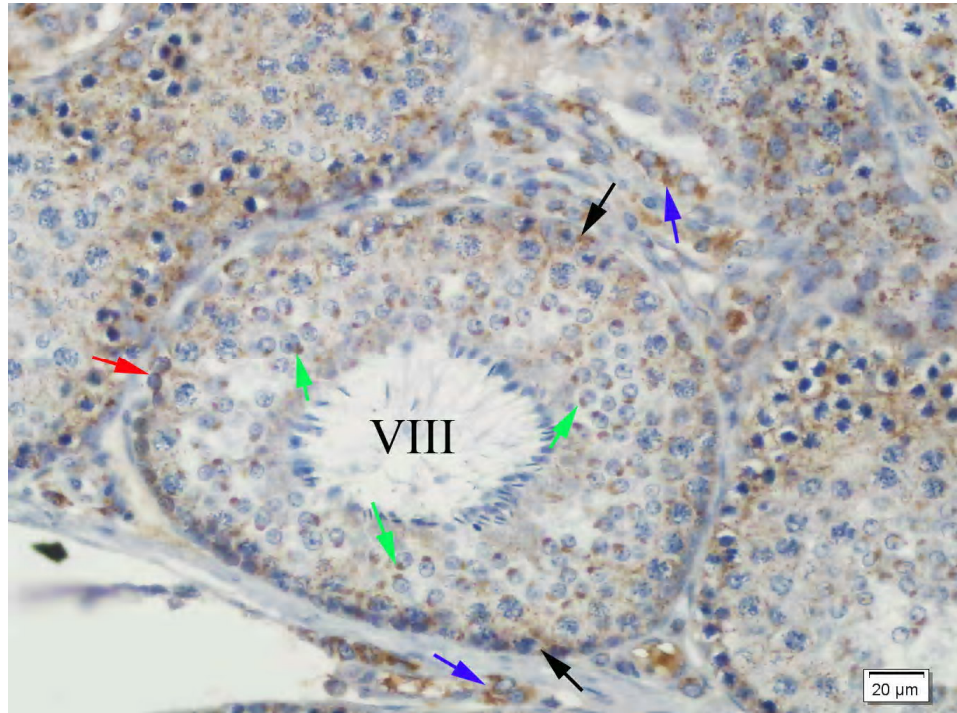
Şekil 4.13. VEGF'ün testis dokusundaki immunohistokimyasal lokalizasyonu, evre V (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, X20 μ m). Siyah oklar: Sertoli hücreleri, mavi oklar: Leydig hücreleri, kırmızı oklar: Tip A Spermatogoniyumlar, yeşil oklar: spermatidlerde immunpozitif akrozomlar.



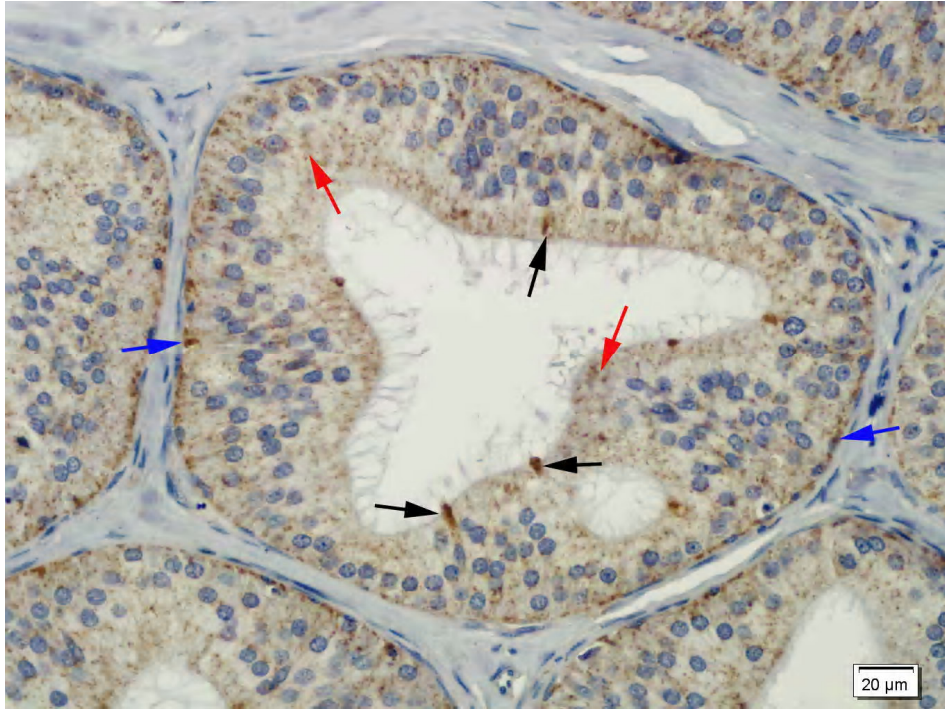
Şekil 4.14. VEGF'ün testis dokusundaki immunohistokimyasal lokalizasyonu, evre VI (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, X20 μ m). Siyah oklar: Sertoli hücreleri, mavi oklar: Leydig hücreleri, kırmızı oklar: Tip A Spermatogoniyumlar, yeşil oklar: spermatidlerde immunpozitif akrozomlar.



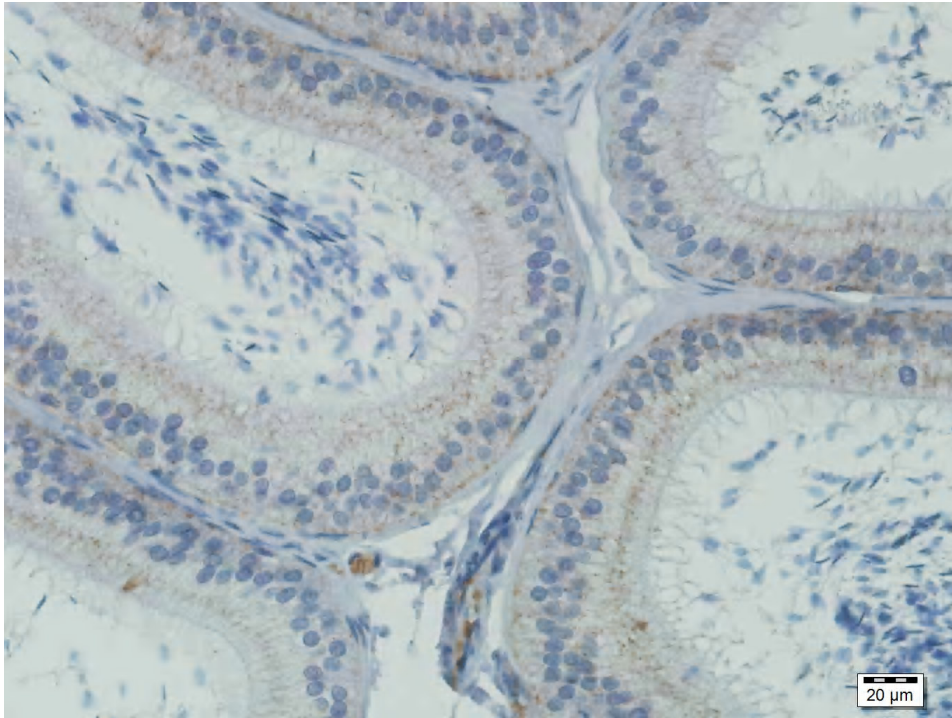
Şekil 4.15. VEGF'ün testis dokusundaki immunohistokimyasal lokalizasyonu, evre VII (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 μ m). Siyah oklar: Sertoli hücreleri, mavi oklar: Leydig hücreleri, kırmızı oklar: Tip A Spermatogoniyumlar, yeşil oklar: spermatidlerde immunpozitif akrozomlar.



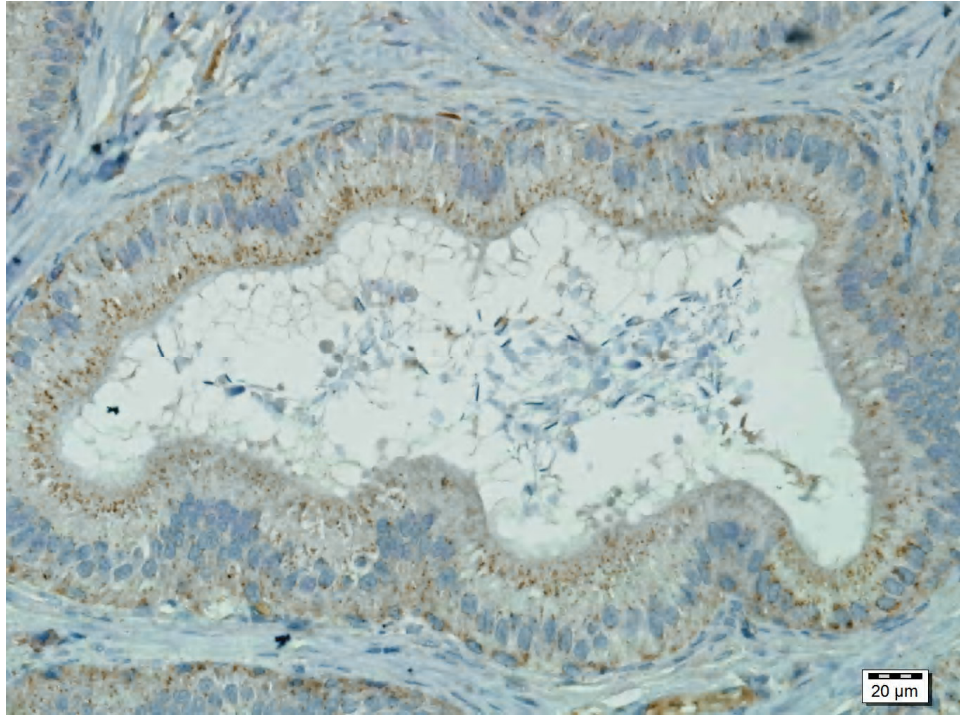
Şekil 4.16. VEGF'ün testis dokusundaki immunohistokimyasal lokalizasyonu, evre VIII (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, X20 μ m). Siyah oklar: Sertoli hücreleri, mavi oklar: Leydig hücreleri, kırmızı oklar: Tip A Spermatogoniyumlar, yeşil oklar: spermatidlerde immunpozitif akrozomlar.



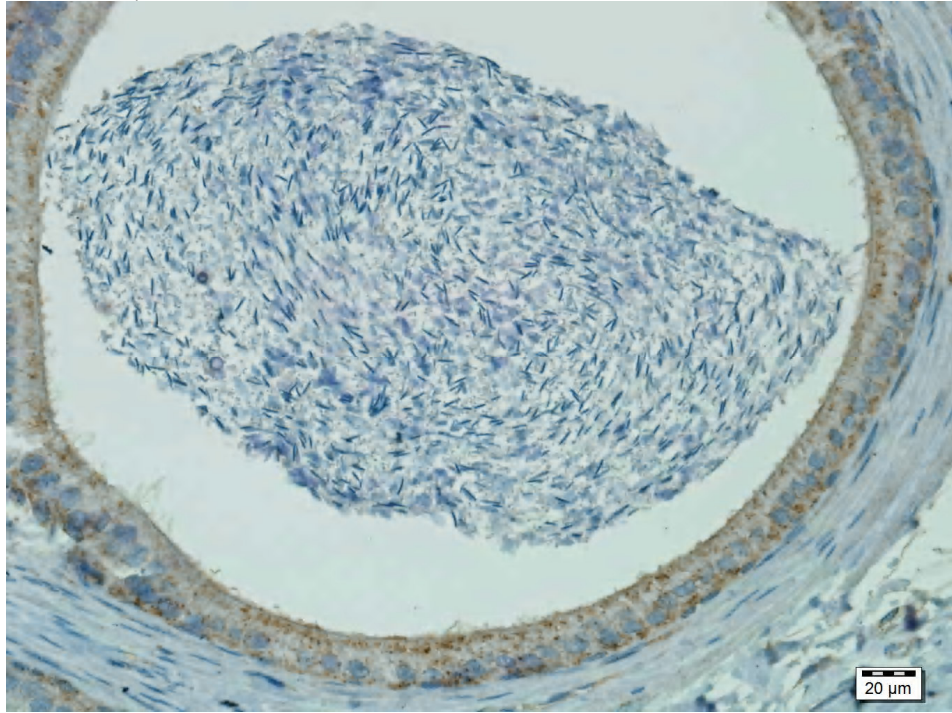
Şekil 4.17. VEGF'ün epididimisin başlangıç segmentindeki immunohistokimyasal lokalizasyonu, (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 μ m). Siyah oklar: Apikal hücrelerde immunpozitif reaksiyon, mavi oklar: Bazal hücrelerde immunpozitif reaksiyon, kırmızı oklar: Prinsipal hücrelerde immunpozitif reaksiyon.



Şekil 4.18. VEGF'ün kaput epididimis epitelindeki prinsipal hücrelerin apikal ve bazal sitoplazmalarındaki ve intersitisyel dokudaki damar endotellerindeki immunohistokimyasal lokalizasyonu, (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 μ m).



Şekil 4.19 VEGF'ün korpus epididimis epitelindeki prinsipal hücrelerin apikal ve bazal sitoplazmalarındaki ve intersitisyel dokudaki damar endotellerindeki immunohistokimyasal lokalizasyonu, (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).



Şekil 4.20 VEGF'ün korpus epididimis epitelindeki prinsipal hücrelerin apikal ve bazal sitoplazmalarındaki immunohistokimyasal lokalizasyonu, (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).

4.3.Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Reseptör 1 (VEGF – R1)

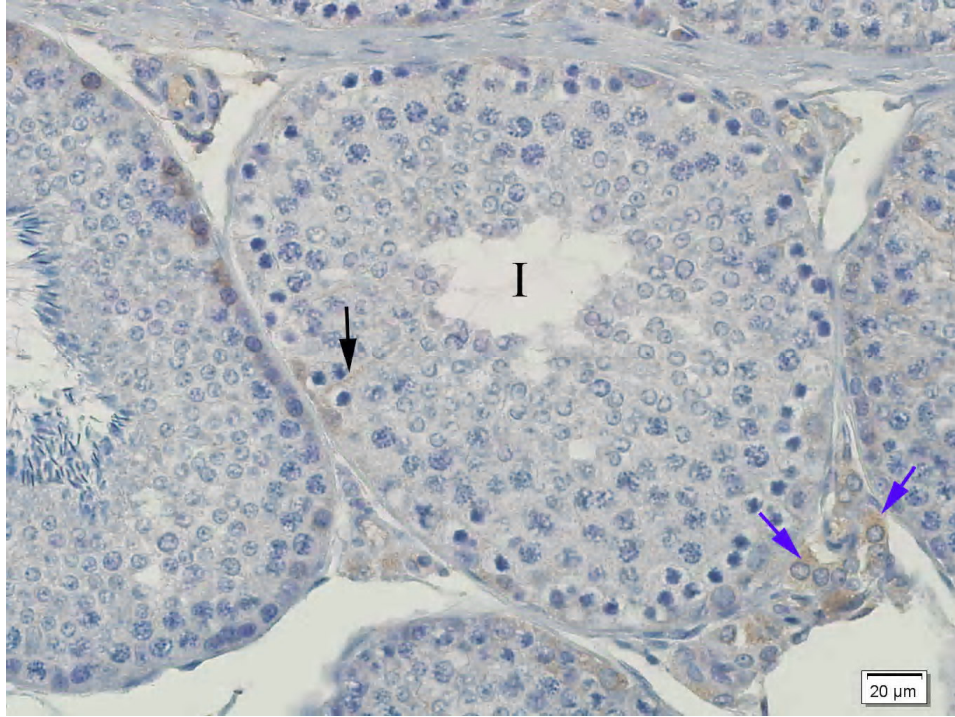
Tavşan testis ve epididimis dokularında Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Reseptör 1'i immunohistokimyasal olarak belirleyebilmek amacıyla monoklonal mouse anti-VEGFR-1 (Abcam 9540) ve rabbit poliklonal anti-VEGFR-1 (Abcam 2350) olmak üzere 2 farklı primer antikör kullanılmıştır.

Monoklonal mouse anti-VEGFR-1 (Abcam 9540) primer antikoru uygulanan tavşan testis dokusunda I'den VIII'e kadar tüm spermatojenik evreler incelendiğinde seminifer tubüllerde sadece tek tük olarak bazı Sertoli hücrelerinde bir immunboyanma görülürken, intersitisyel alandaki Leydig hücrelerinde ve kan damarları endotelinde ise zayıf pozitif immunoreaksiyon gözlemlendi (Şekil 4. 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 ve 35).

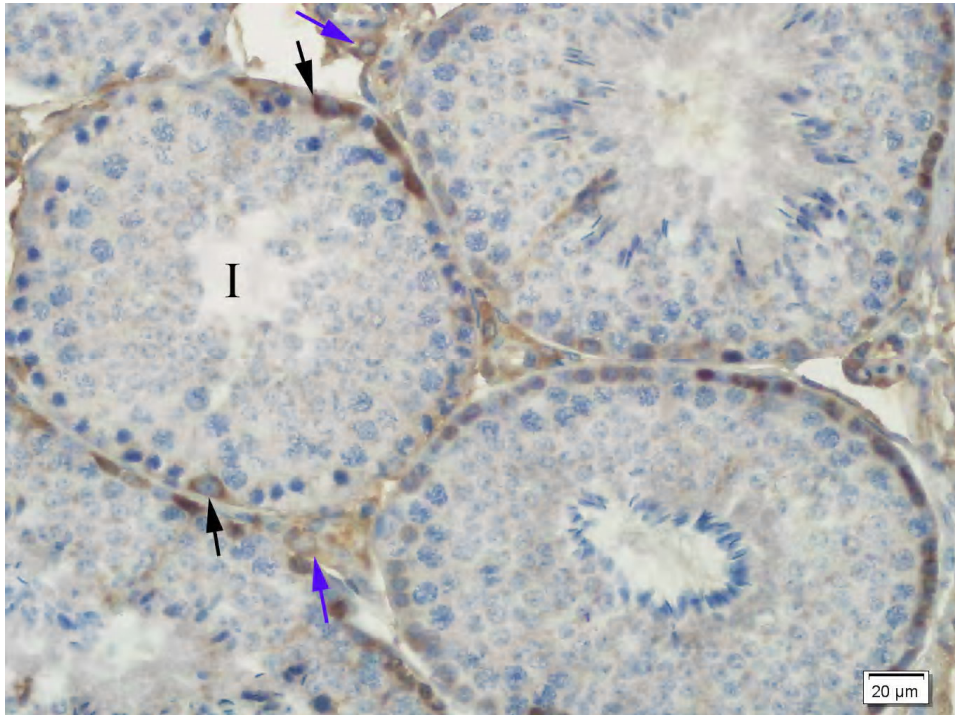
Epididimiste başlangıç segmenti (Şekil 4.37) kaput epididimis (Şekil 4.38), korpus epididimis (Şekil 4.39) ve kauda epididimisi (Şekil 4.40) döşeyen epitellerde negatif reaksiyon görülürken, interstisyumda sadece kapiller damar endotelinde immunopozitif reaksiyon belirlendi.

Rabbit poliklonal anti-VEGFR-1 (Abcam 2350) primer antikoru uygulanan testis dokusunda tüm spermatojenik evrelerde seminifer tubüllerde Sertoli hücrelerinde ve spermatogonyumlarda immunopozitif reaksiyon gözlemlendi. İntersitisyel alanda ise Leydig hücreleri ve kapillar damar endotelinde reaksiyon pozitifliği (Şekil 4.22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 ve 36).

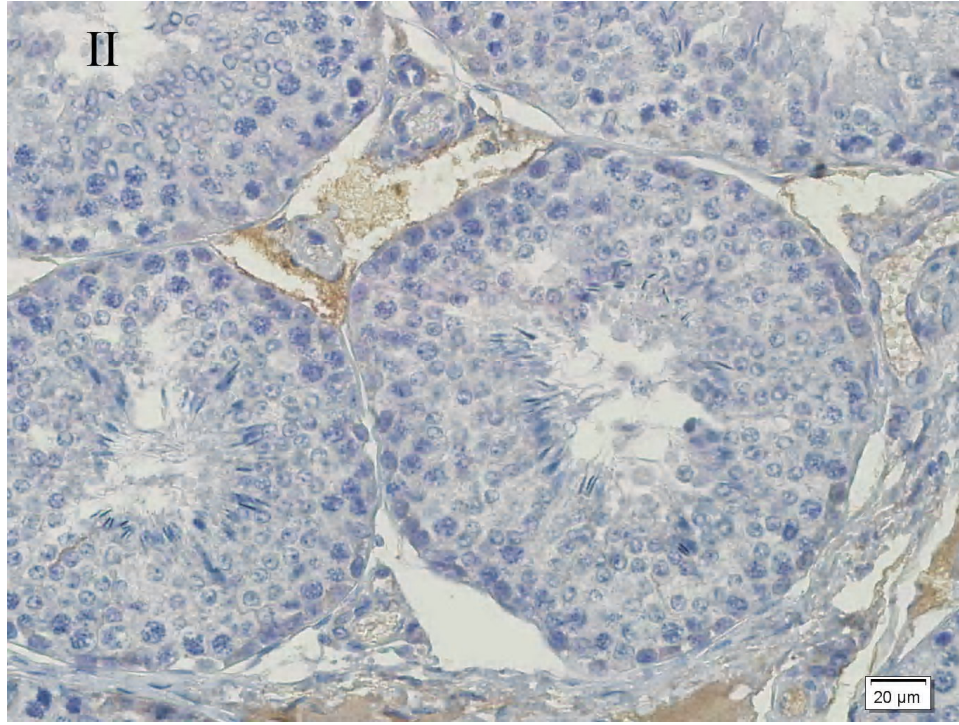
Epididimisin başlangıç segmentinin epitelini döşeyen prinsipal hücrelerin apikal ve bazal sitoplazmalarında granüler tarzda reaksiyon görülürken bazı prensipal hücreler ve bazal hücrelerin sitoplazmalarında ise daha yoğun immunboyanma belirlendi (Şekil 4.41). Kaput epididimis (Şekil 4.42), korpus epididimis (Şekil 4.43) ve kauda epididimisi (Şekil 4.44) döşeyen epitellerdeki prinsipal hücrelerin apikal ve bazal sitoplazmalarında granüler tarzda ve bazı bazal hücrelerin sitoplazmalarında ise yoğun immunreaktivite dikkati çekti. Ayrıca, bazalda peritübüler hücrelerde ve kan damarları endotelinde pozitif reaksiyon belirlendi.



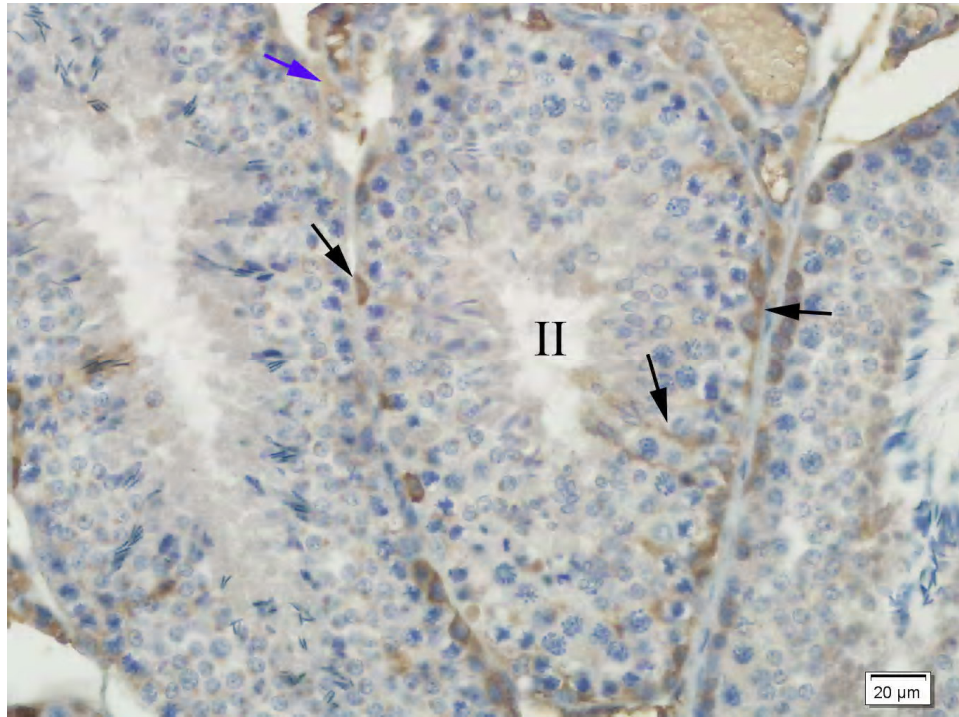
Şekil 4.21. VEGFR1 Klon I'in evre I'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm). Siyah oklar: Sertoli hücrelerinde immunpozitif reaksiyon, mavi oklar: Leydig hücrelerinde immunpozitif reaksiyon.



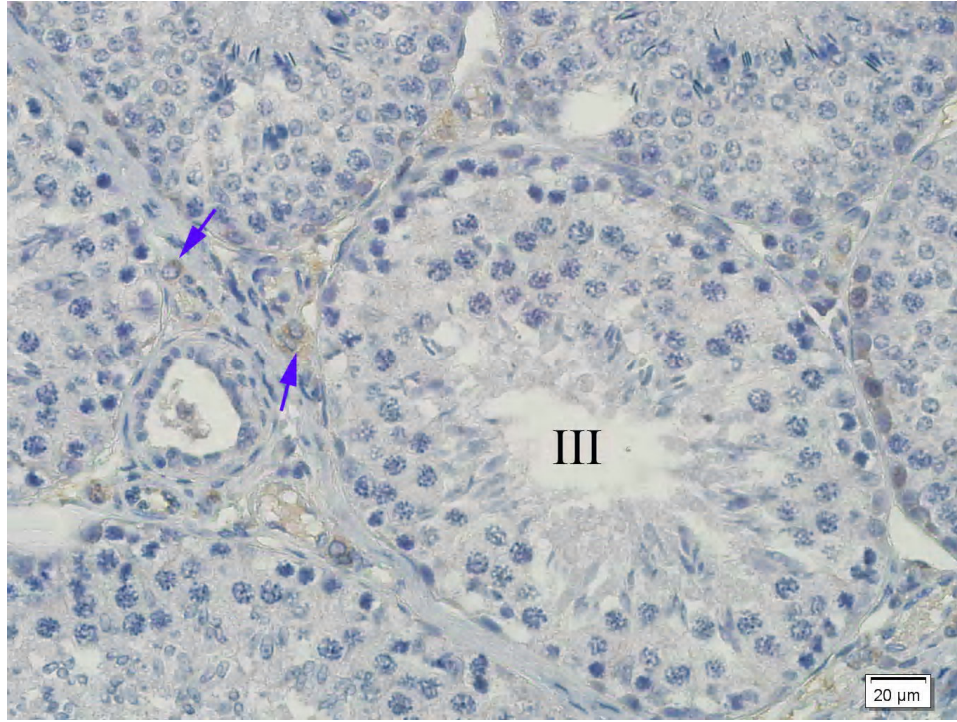
Şekil 4.22. VEGF R1 Klon II'in evre I'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm). Siyah oklar: Sertoli hücrelerinde immunpozitif reaksiyon, mavi oklar: Leydig hücrelerinde immunpozitif reaksiyon.



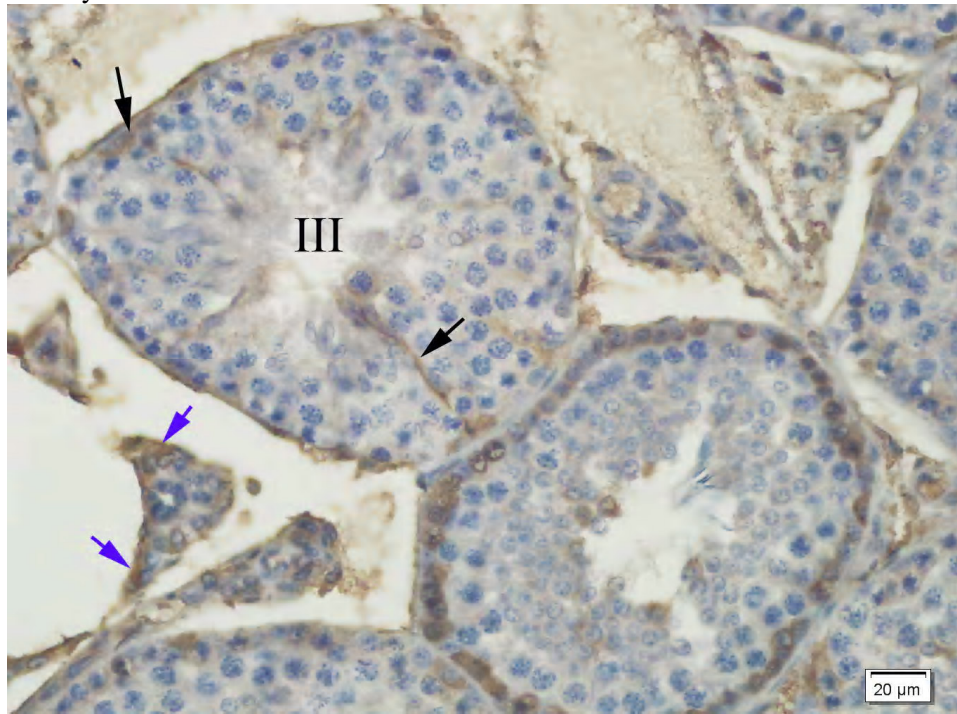
Şekil 4.23. VEGF R1 Klon I'in evre II'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).



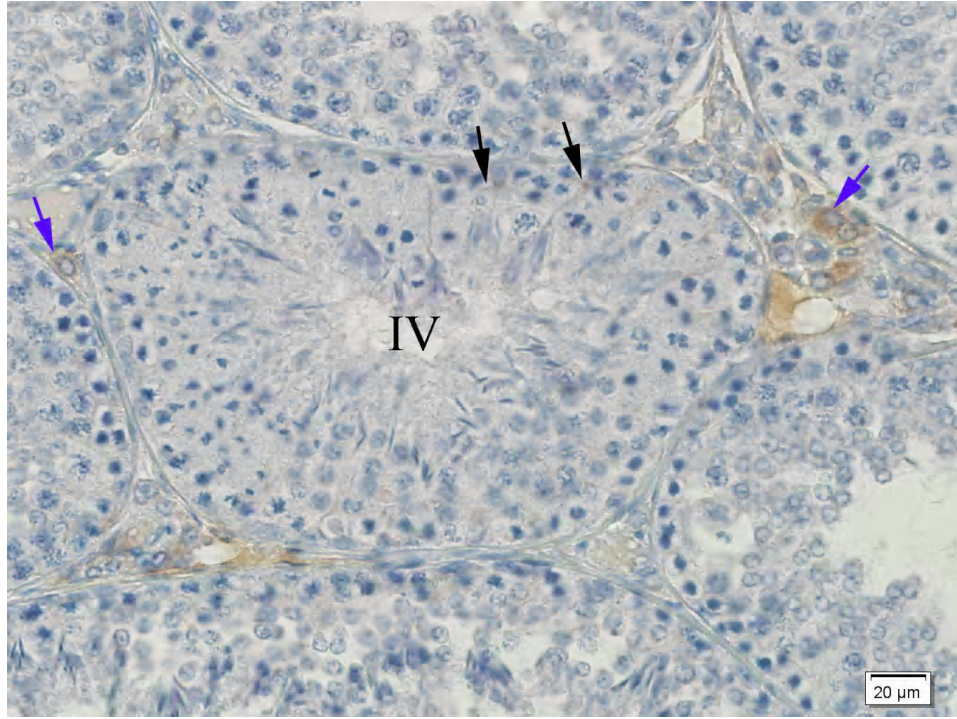
Şekil 4. 24. VEGF R1 Klon II'in evre II'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm). Siyah oklar: Sertoli hücrelerinde immunpozitif reaksiyon, mavi oklar: Leydig hücrelerinde immunpozitif reaksiyon.



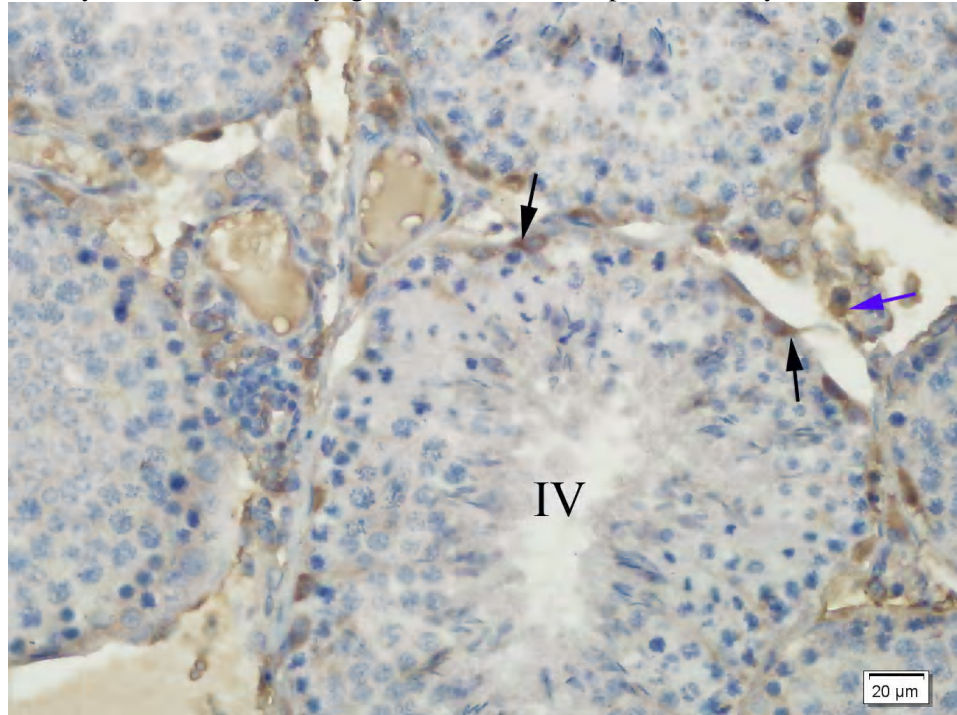
Şekil 4.25. VEGF R1 Klon I'in evre III'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm). Mavi oklar: Leydig hücrelerinde immunpozitif reaksiyon.



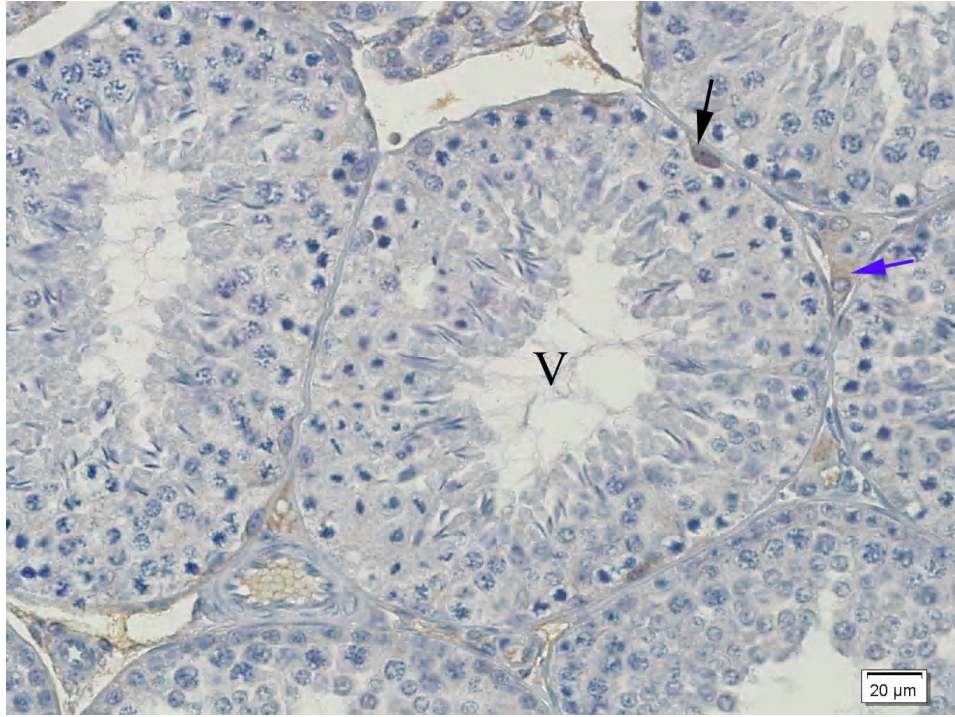
Şekil 4.26. VEGF R1 Klon II'in evre III'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm). Siyah oklar: Sertoli hücrelerinde immunpozitif reaksiyon, mavi oklar: Leydig hücrelerinde immunpozitif reaksiyon.



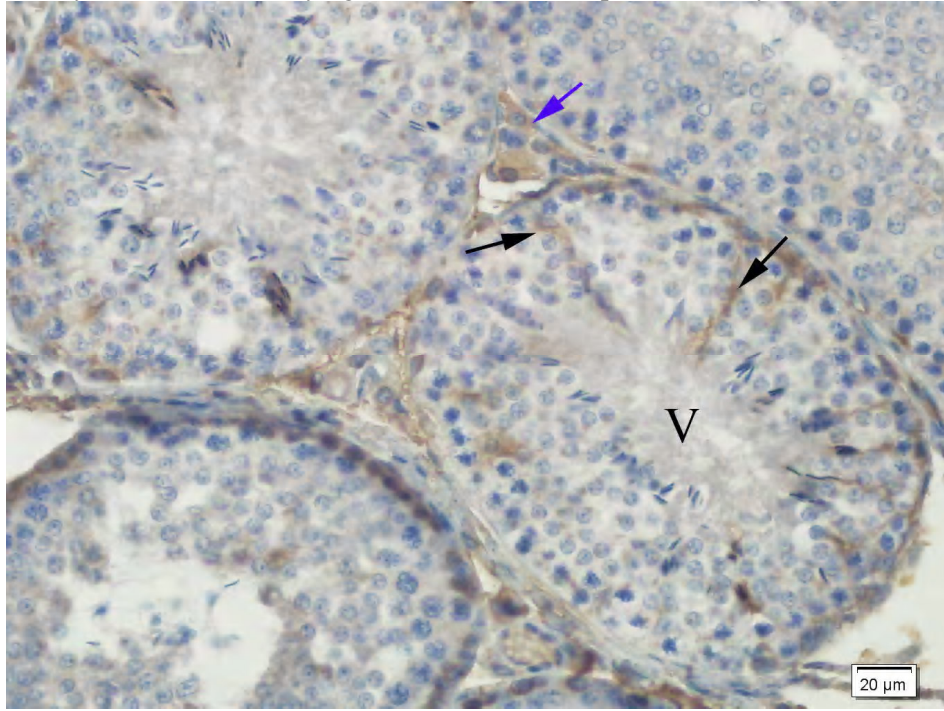
Şekil 4.27. VEGF R1 Klon I'in evre IV'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm). Siyah oklar: Sertoli hücrelerinde immunpozitif reaksiyon, mavi oklar: Leydig hücrelerinde immunpozitif reaksiyon.



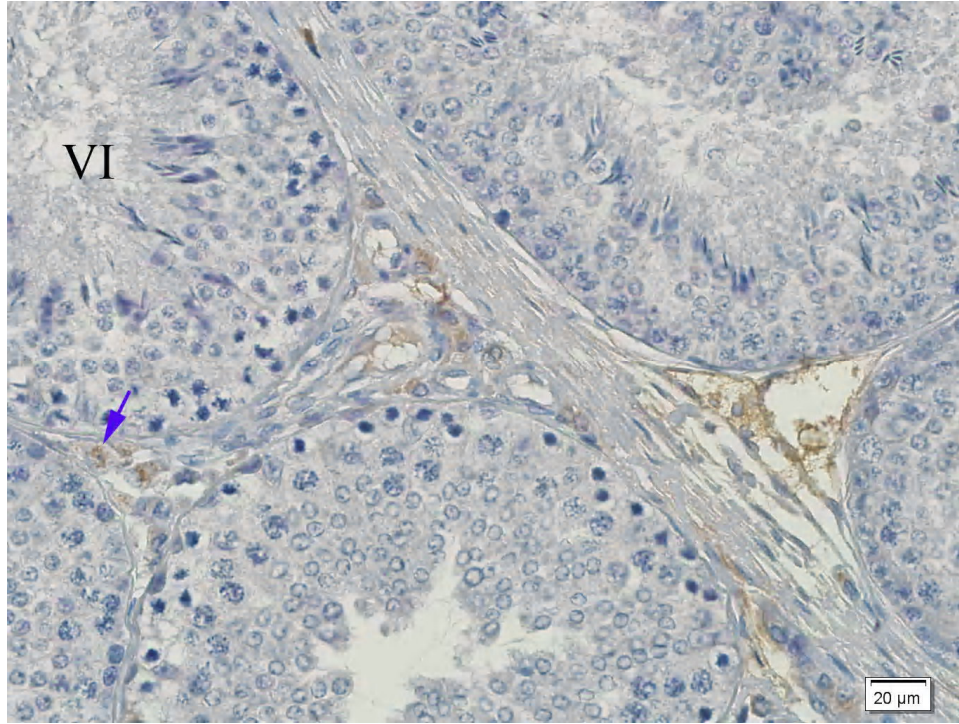
Şekil 4.28. VEGF R1 Klon II'in evre IV'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm). Siyah oklar: Sertoli hücrelerinde immunpozitif reaksiyon, mavi oklar: Leydig hücrelerinde immunpozitif reaksiyon.



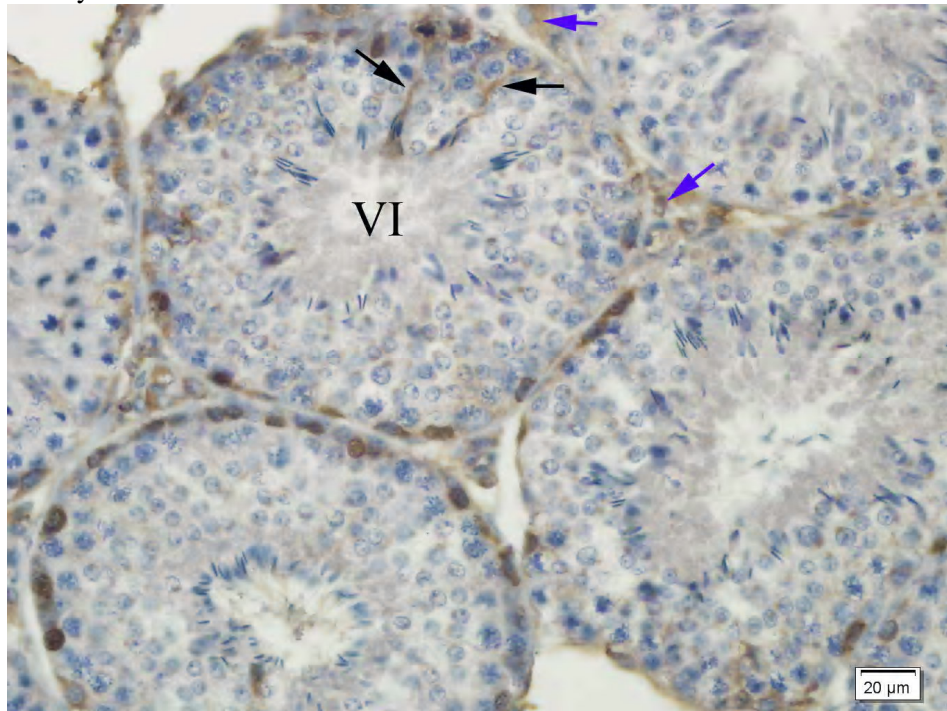
Şekil 4.29. VEGF R1 Klon I'in evre V'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 μm). Siyah oklar: Sertoli hücrelerinde immunpozitif reaksiyon, mavi oklar: Leydig hücrelerinde immunpozitif reaksiyon.



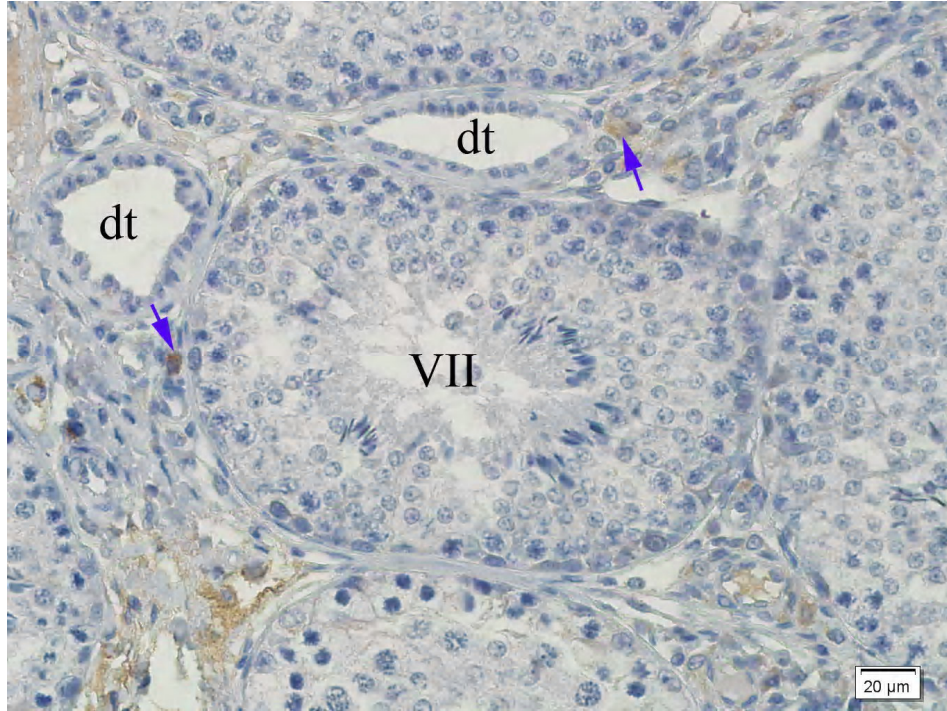
Şekil 4.30. VEGF R1 Klon II'in evre V'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 μm). Siyah oklar: Sertoli hücrelerinde immunpozitif reaksiyon, mavi oklar: Leydig hücrelerinde immunpozitif reaksiyon.



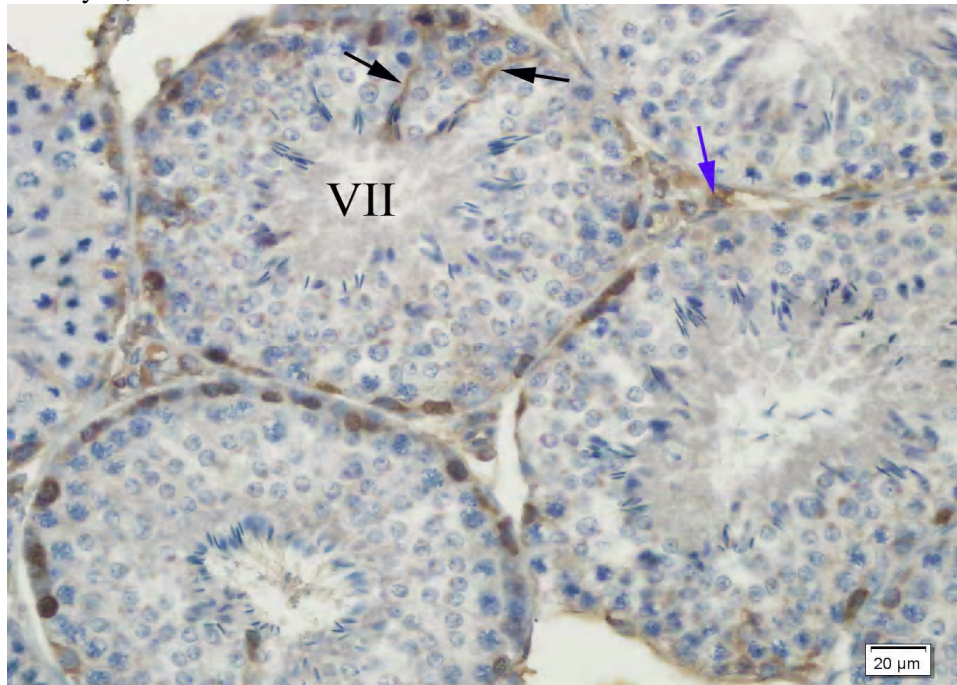
Şekil 4.31. VEGF R1 Klon I'in evre VI'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm). Mavi oklar: Leydig hücrelerinde immunpozitif reaksiyon.



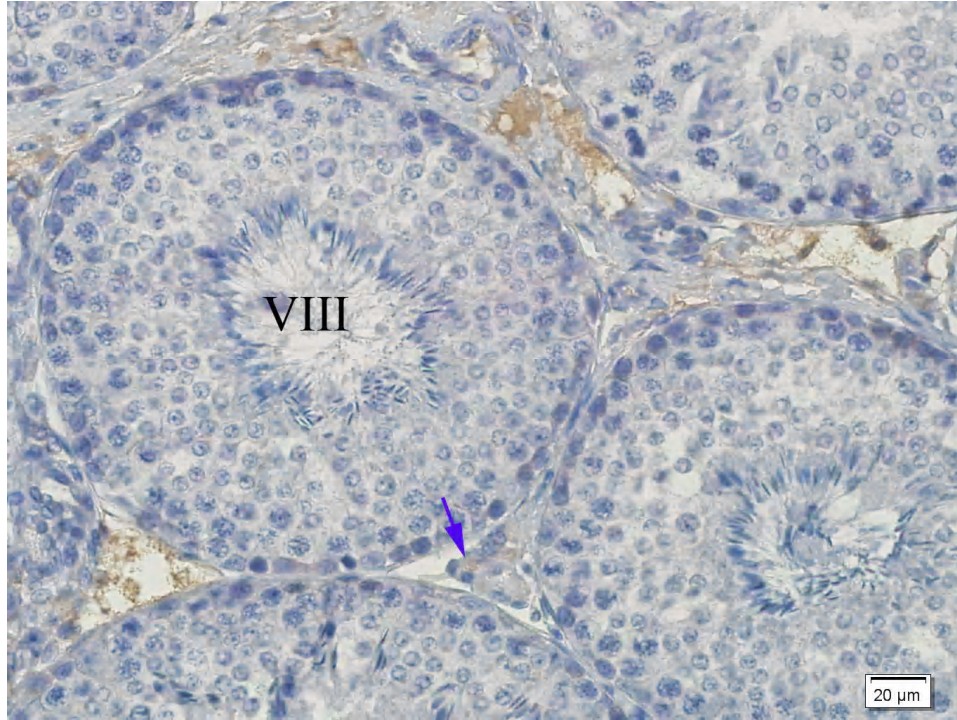
Şekil 4.32. VEGF R1 Klon II'in evre VI'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm). Siyah oklar: Sertoli hücrelerinde immunpozitif reaksiyon, mavi oklar: Leydig hücrelerinde immunpozitif reaksiyon.



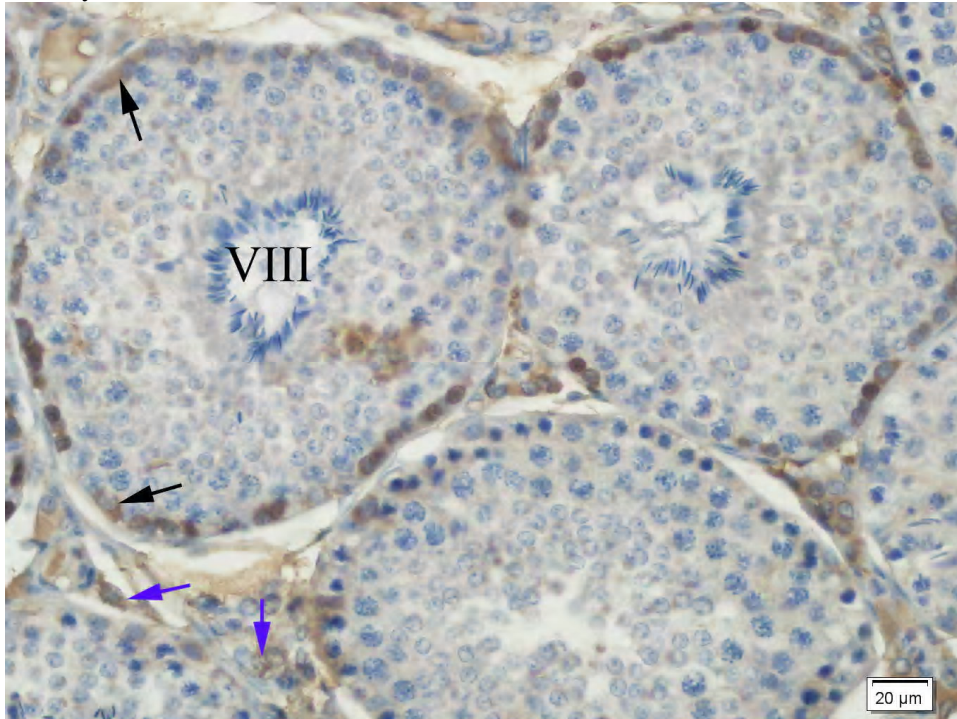
Şekil 4.33. VEGF R1 Klon I'in evre VII'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm). Mavi oklar: Leydig hücrelerinde immunpozitif reaksiyon, dt: düz tubüller.



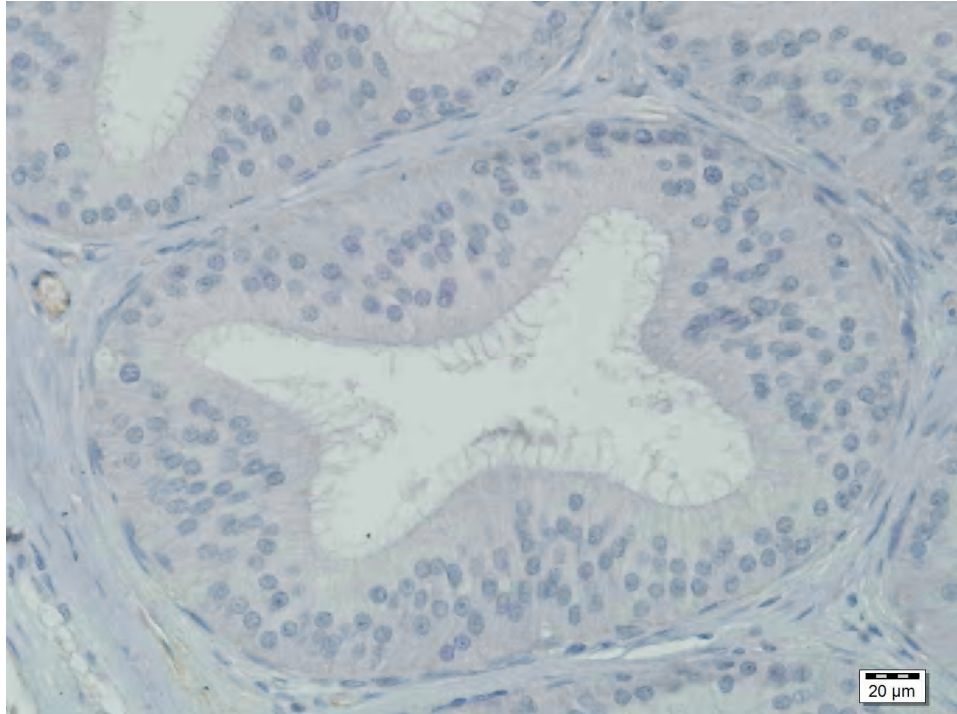
Şekil 4.34. VEGF R1 Klon II'in evre VII'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm). Siyah oklar: Sertoli hücrelerinde immunpozitif reaksiyon, mavi oklar: Leydig hücrelerinde immunpozitif reaksiyon.



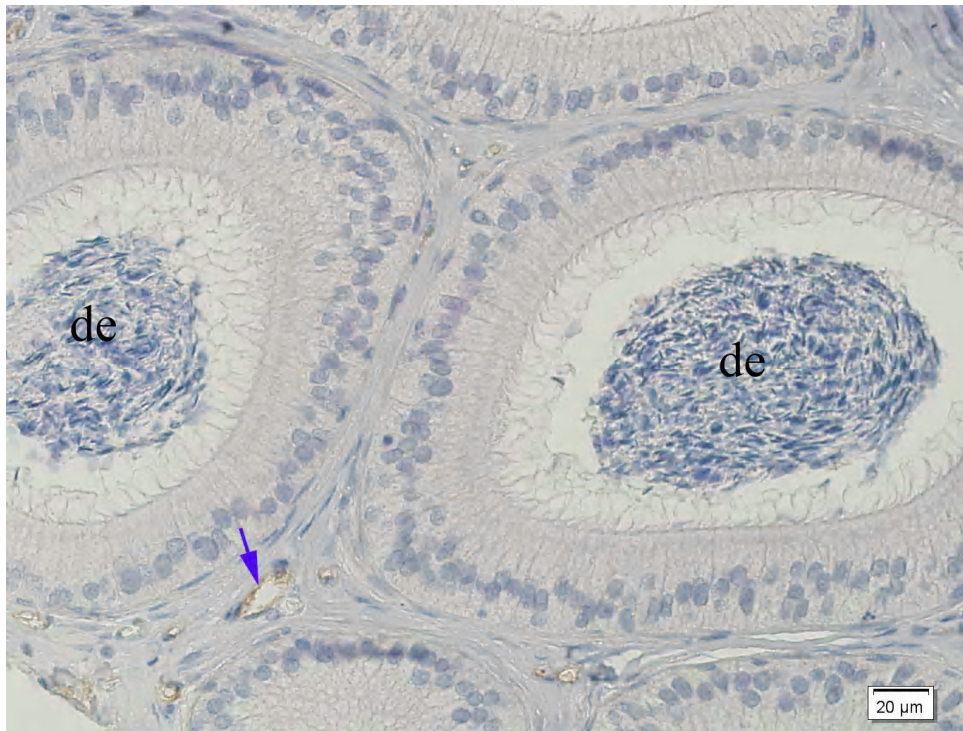
Şekil 4.35. VEGF R1 Klon I'in evre VIII'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm). Mavi oklar: Leydig hücrelerinde immunpozitif reaksiyon.



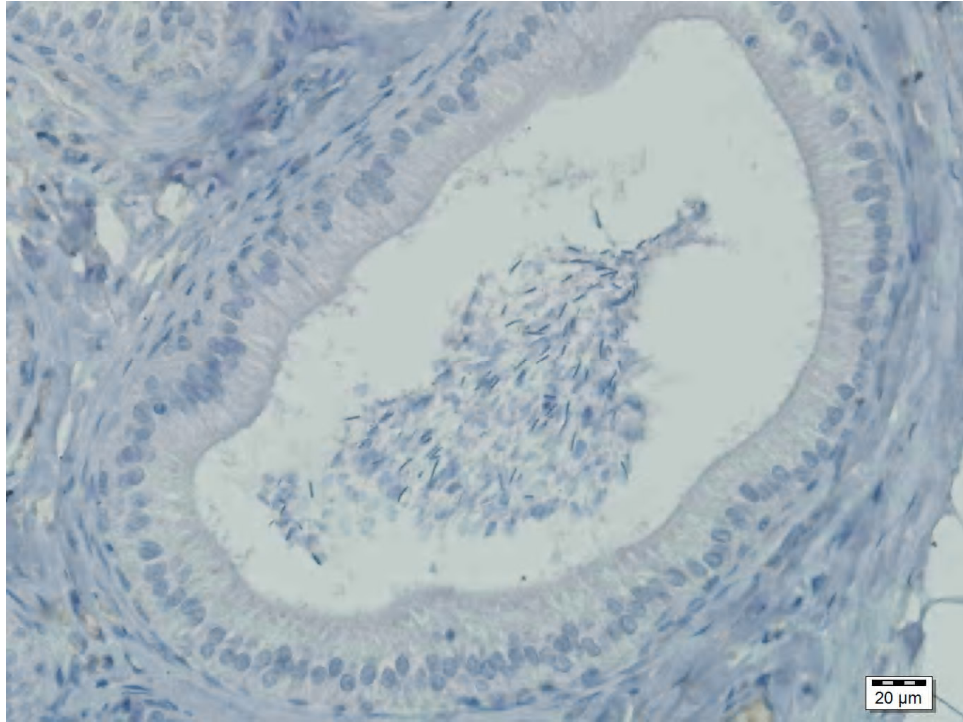
Şekil 4.36. VEGF R1 Klon II'in evre VIII'deki seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm). Siyah oklar: Sertoli hücrelerinde immunpozitif reaksiyon, mavi oklar: Leydig hücrelerinde immunpozitif reaksiyon.



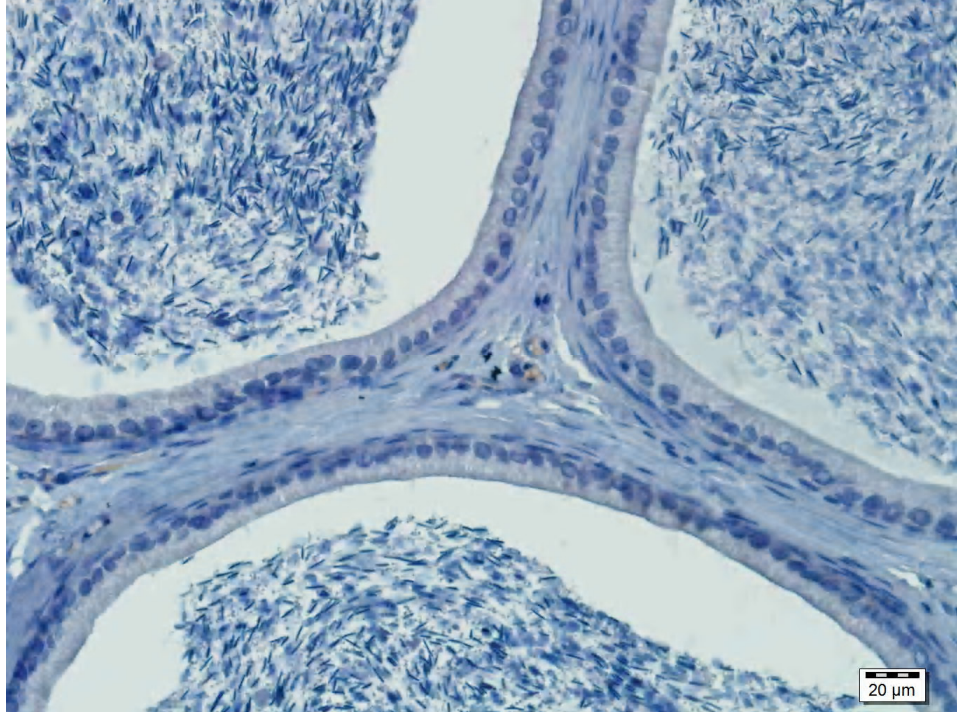
Şekil 4.37. VEGFR1 Klon I'in epididimisin başlangıç segmenti epitelindeki negatif immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).



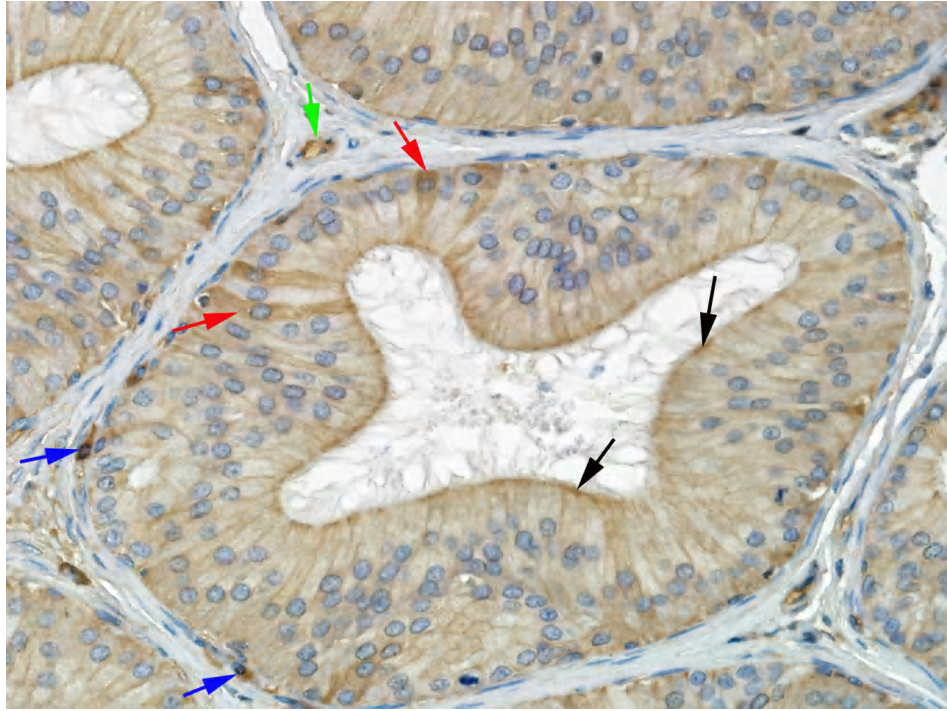
Şekil 4.38. VEGFR1 Klon I'in kaput epididimisin epitelindeki negatif immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm). Mavi ok: damar endotellerinde immunpozitif reaksiyon. de: kanaldaki spermatozoonlar.



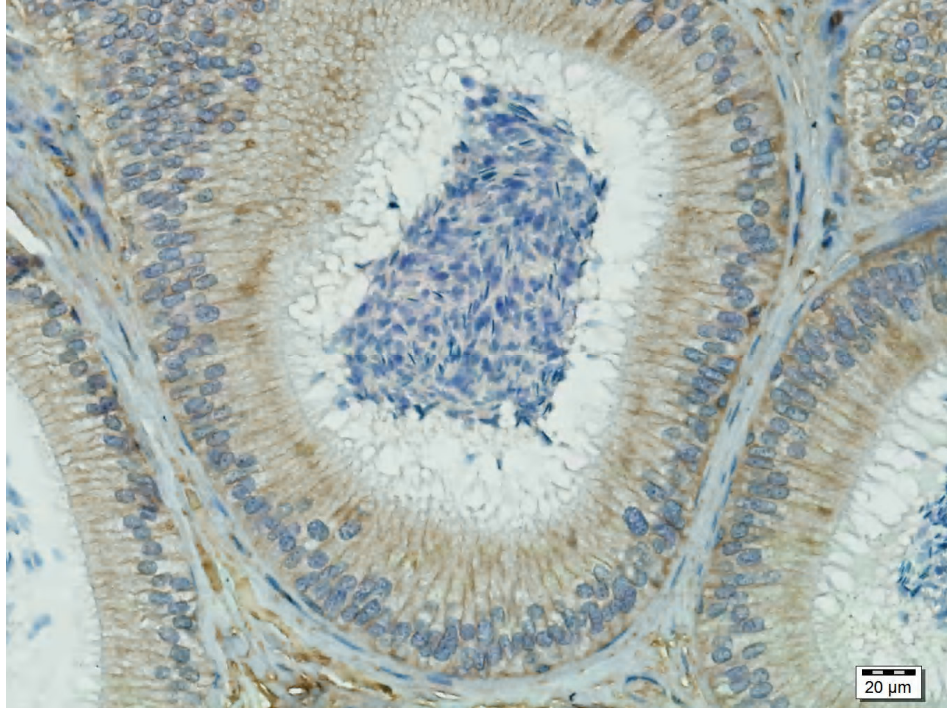
Şekil 4.39. VEGFR1 Klon I'in korpus epididimisin epitelindeki negatif immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).



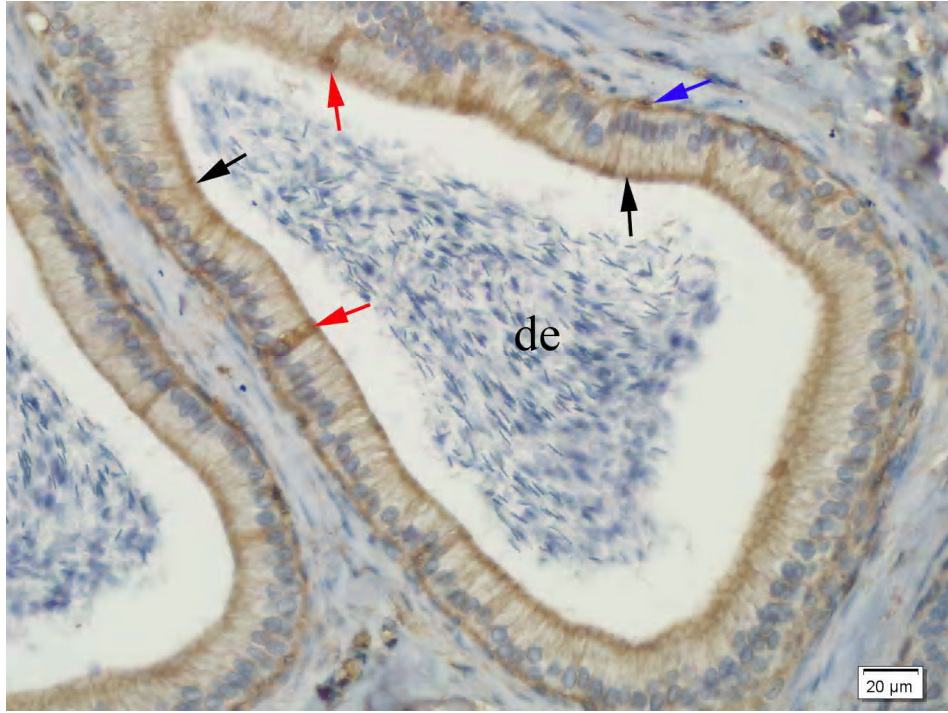
Şekil 4.40. VEGFR1 Klon I'in kaput epididimisin epitelindeki negatif immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).



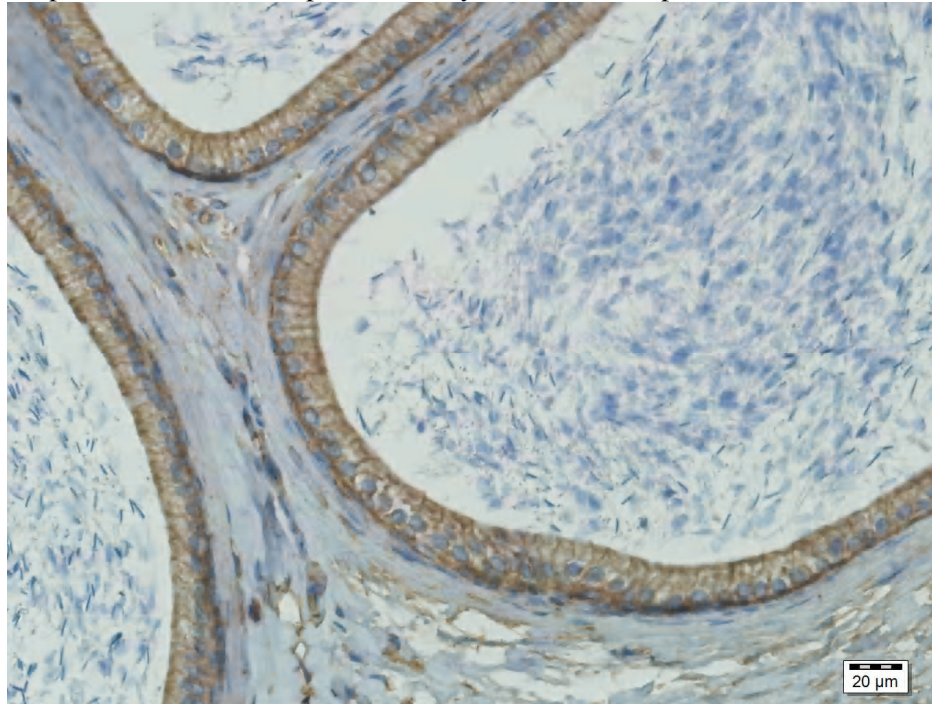
Şekil 4.41. VEGFR1 Klon II'in epididimisin başlangıç segmenti epitelindeki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 μ m). Siyah oklar: Prinsipal hücrelerin apikal sitoplazmasında immunpozitif reaksiyon, Mavi oklar: Bazal hücrelerin sitoplazmasında immunpozitif reaksiyon. kırmızı oklar: Bazı hücrelerin sitoplazmasında immunpozitif reaksiyon.



Şekil 4.42. VEGFR1 Klon II'in kaput epididimisin epitelindeki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 μ m).



Şekil 4.43. VEGFR1 Klon II'in korpus epididimisin epitelindeki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm). Siyah oklar: Prinsipal hücrelerin apikal sitoplazmasında immunpozitif reaksiyon, Mavi oklar: Bazal hücrelerin sitoplazmasında immunpozitif reaksiyon. kırmızı oklar: bazı prinsipal hücrelerin sitoplazmalarında immunpozitif reaksiyon, de: duktus epididimis.



Şekil 4.44. VEGFR1 Klon II'in kauda epididimisin epitelindeki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).

4.4. Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü Reseptör 2 (VEGF – R2)

Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü Reseptör 2'nin lokalizasyonu ile varlığını tavşan testis ve epididimis dokularında belirleyebilmek amacıyla monoklonal mouse anti-VEGFR-2 (Abcam 9530) ve monoklonal mouse anti-VEGFR-2 (Abcam 10973) olmak üzere 2 farklı primer antikoru kullanılmıştır.

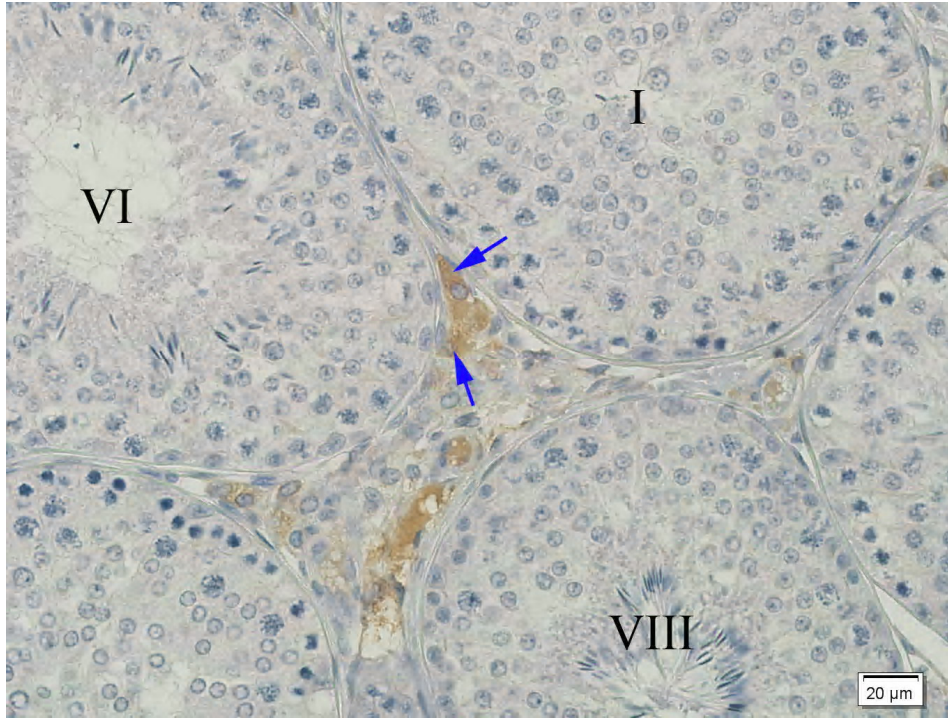
Monoklonal mouse anti-VEGFR-2 (Abcam 9530) primer antikoru uygulanan tavşan testis dokusunda kadar tüm spermatojenik evrelerde seminifer tubüllerdeki Sertoli hücrelerinde çok zayıf immunopozitif reaksiyon gözlemlendi. İntersitisyel alandaki Leydig hücrelerinde ve kan damarı endotelinde ise belirgin bir immunboyanma belirlendi (Şekil 4.45, 46 ve 47).

Epididimiste başlangıç segmenti kaput epididimis (Şekil 4.48), korpus epididimis (Şekil 4.49) ve kauda epididimisi (Şekil 4.50) döşeyen epitellerde negatif reaksiyon görülürken, tubüller arası boşluktaki bazı kapillar damarların endotelinde ise pozitif immunreaksiyon belirlendi.

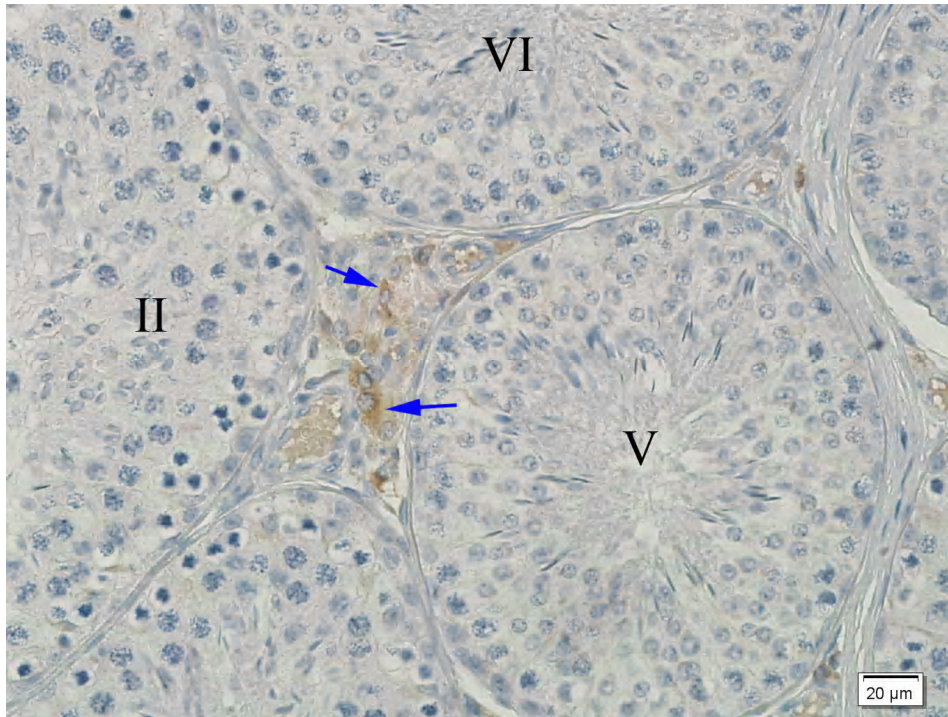
Monoklonal mouse anti-VEGFR-2 (Abcam10973) primer antikoru uygulanan tavşan testis dokusunda tüm spermatojenik evrelerde seminifer tubüllerdeki Sertoli hücreleri ve spermatogonyumların sitoplazmalarında çok yoğun immunopozitif boyanma gözlemlendi. Bununla birlikte V., VI., VII., ve VIII. evrelerinde spermatidlerin akrozomlarında immunopozitif reaksiyon tespit edildi. İntersitisyel alandaki Leydig hücreleri ve kan damarları endotelinde de immunboyanma belirlendi (Şekil 4.51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 ve 58).

Epididimisin başlangıç segmentinin epitelini döşeyen prinsipal hücrelerin apikal ve bazal sitoplazmalarında granüler tarzda reaksiyon görülürken bazı apikal hücreler ve bazal hücrelerin sitoplazmalarında ise daha yoğun immunboyanma belirlendi (Şekil 4.59). Kaput epididimis (Şekil 4.60), korpus epididimis (Şekil 4.61) ve kauda epididimisi (Şekil 4.62) döşeyen epitellerdeki prinsipal hücrelerin apikal ve bazal sitoplazmalarında granüler tarzda ve bazı bazal hücrelerin sitoplazmalarında ise yoğun immunreaktivite görüldü. Bununla birlikte hücrelerin lateral membranlarındaki pozitif reaksiyon dikkat çekiciydi. Ayrıca, bazalda peritübüler hücrelerde ve kan damarları endotelinde pozitif reaksiyon belirlendi.

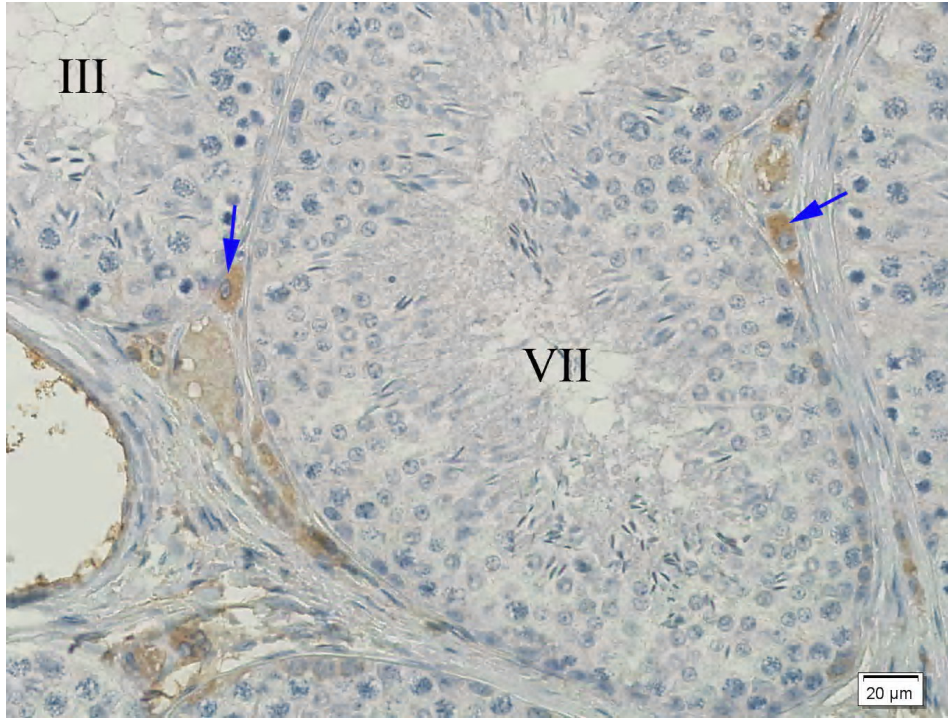
Tüm sonuçlar Tablo 3.2 , 3.3 ve 3.4 de özetlenmiştir.



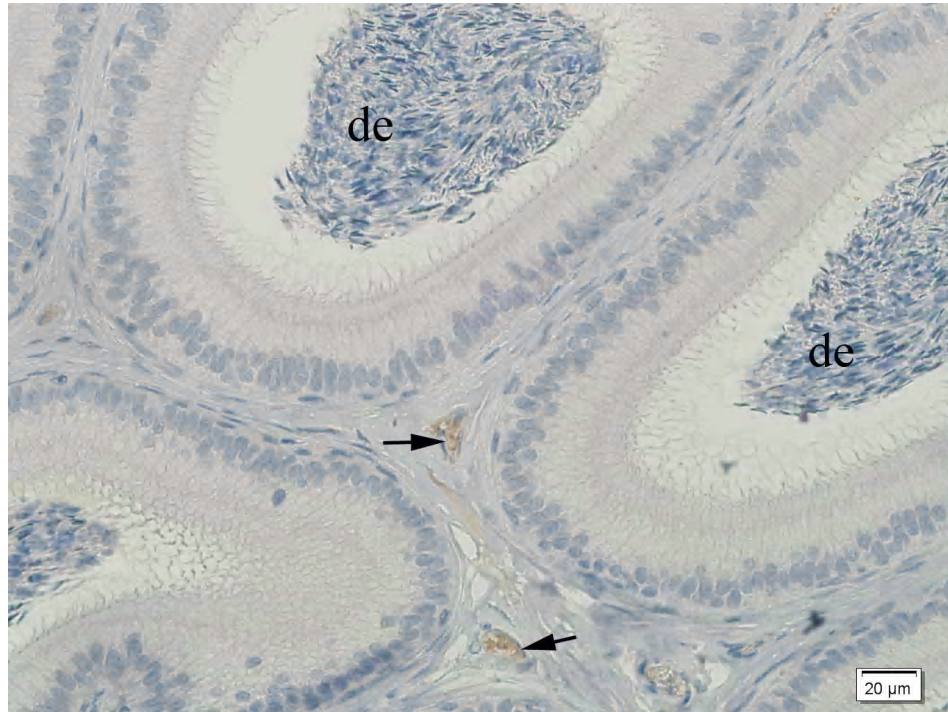
Şekil 4.45. VEGF R2 Klon I'in seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm). Mavi oklar: Leydig hücrelerinde immunpozitif reaksiyon.



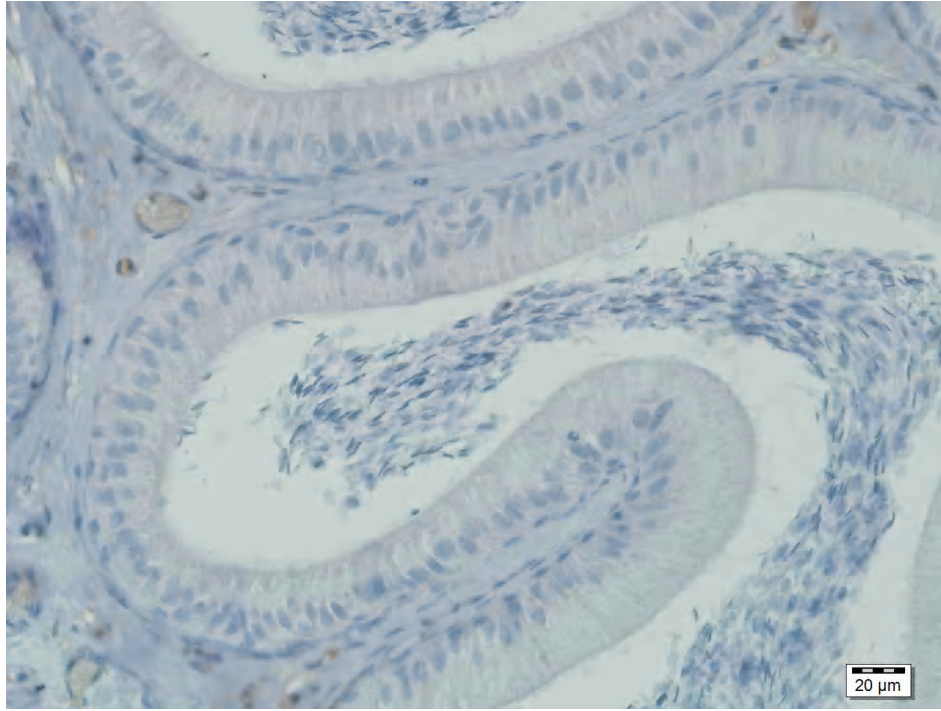
Şekil 4.46. VEGF R2 Klon I'in seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm). Mavi oklar: Leydig hücrelerinde immunpozitif reaksiyon.



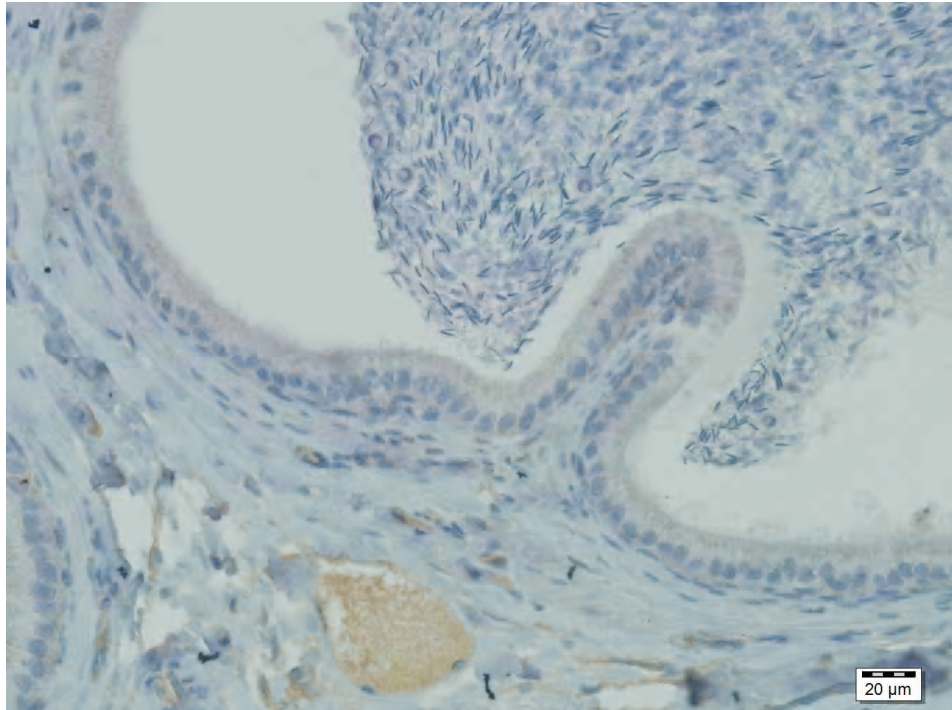
Şekil 4.47. VEGF R2 Klon I'in seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm). Mavi oklar: Leydig hücrelerinde immunpozitif reaksiyon.



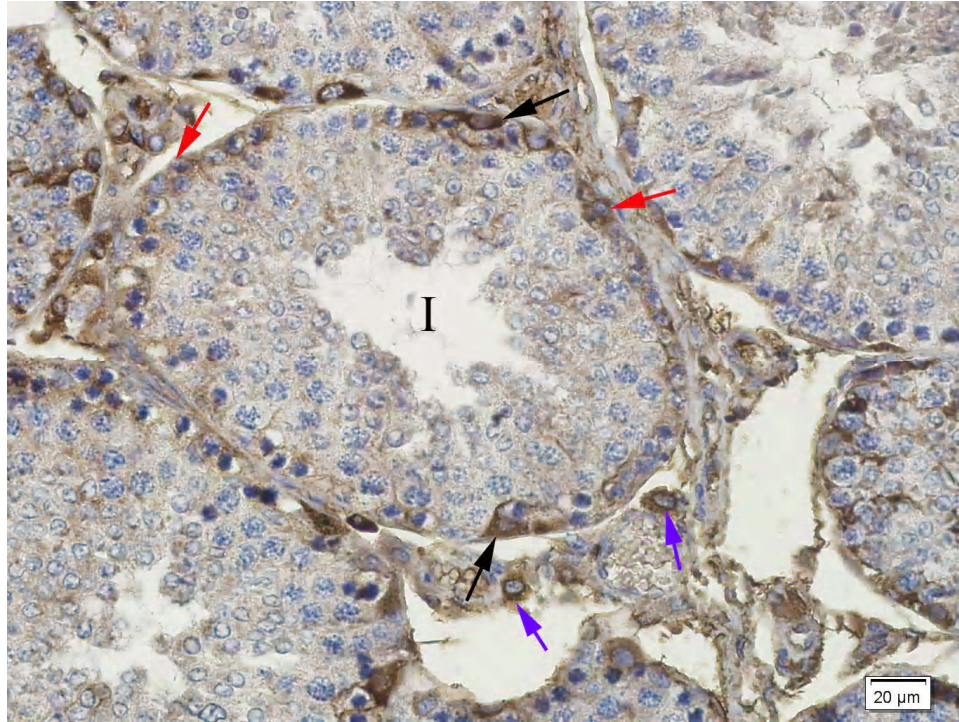
Şekil 4.48. VEGF R2 Klon I'in kaput epididimisin epitelindeki negatif immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm). Siyah oklar: Damar endotellerindeki immunpozitif reaksiyon.



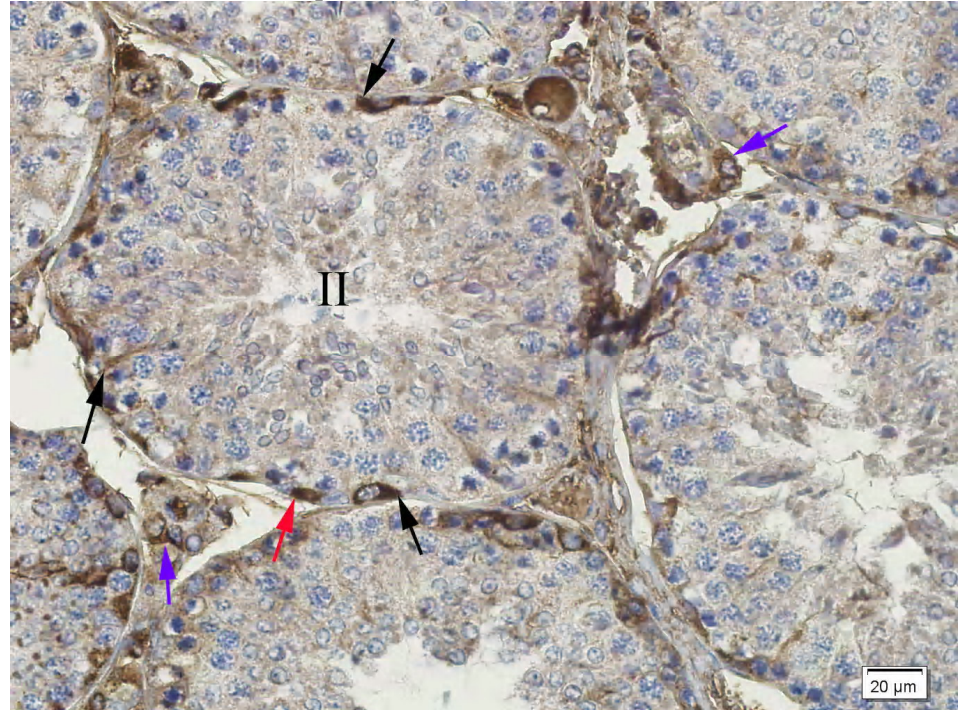
Şekil 4.49. VEGF R2 Klon I'in korpus epididimisin epitelindeki negatif immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).



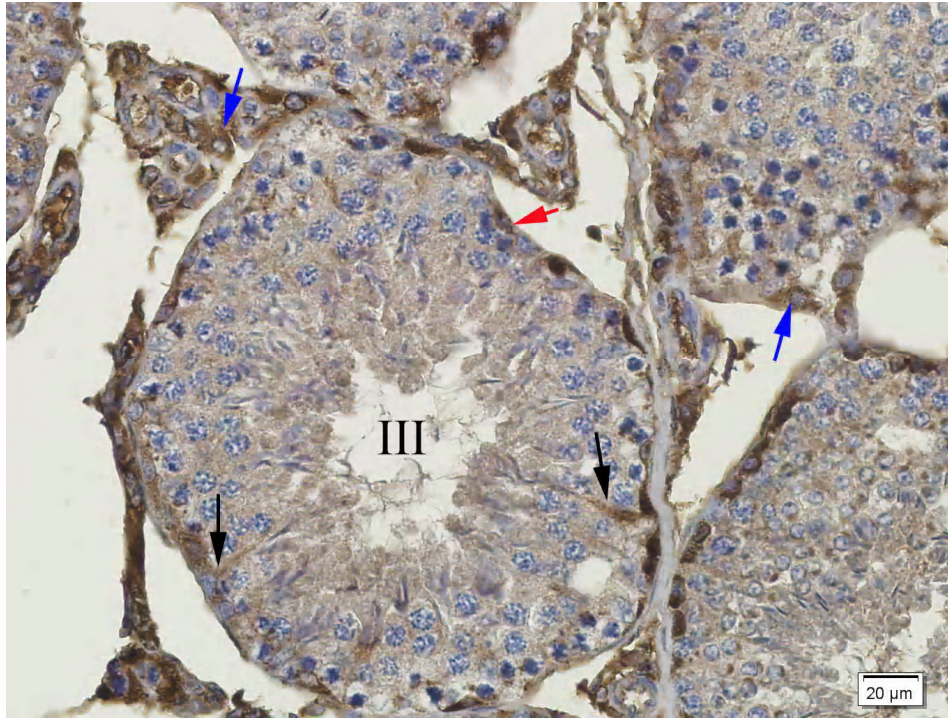
Şekil 4.50. VEGF R2 Klon I'in kaput epididimisin epitelindeki negatif immunohistokimyasal lokalizasyonu. (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm).



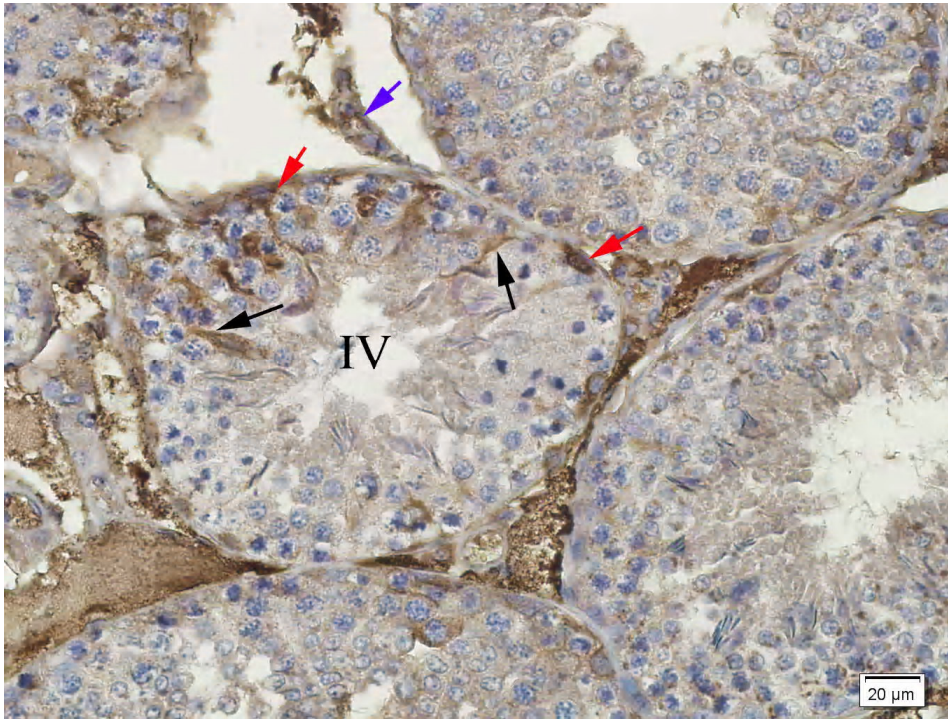
Şekil 4.51. VEGF R2 Klon II'in seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki immunohistokimyasal lokalizasyonu, evre I (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm). Siyah oklar: Sertoli hücreleri, mavi oklar: Leydig hücreleri, kırmızı oklar: Spermatogoniyumlar.



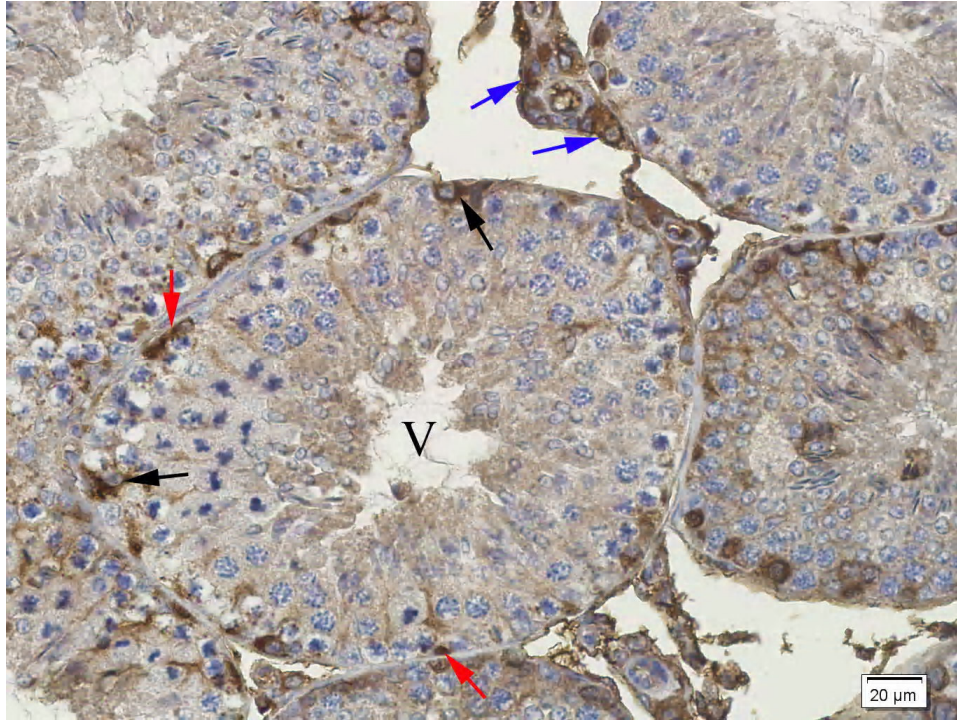
Şekil 4.52. VEGF R2 Klon II'in seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki immunohistokimyasal lokalizasyonu, evre II (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm). Siyah oklar: Sertoli hücreleri, mavi oklar: Leydig hücreleri, kırmızı oklar: Spermatogoniyumlar.



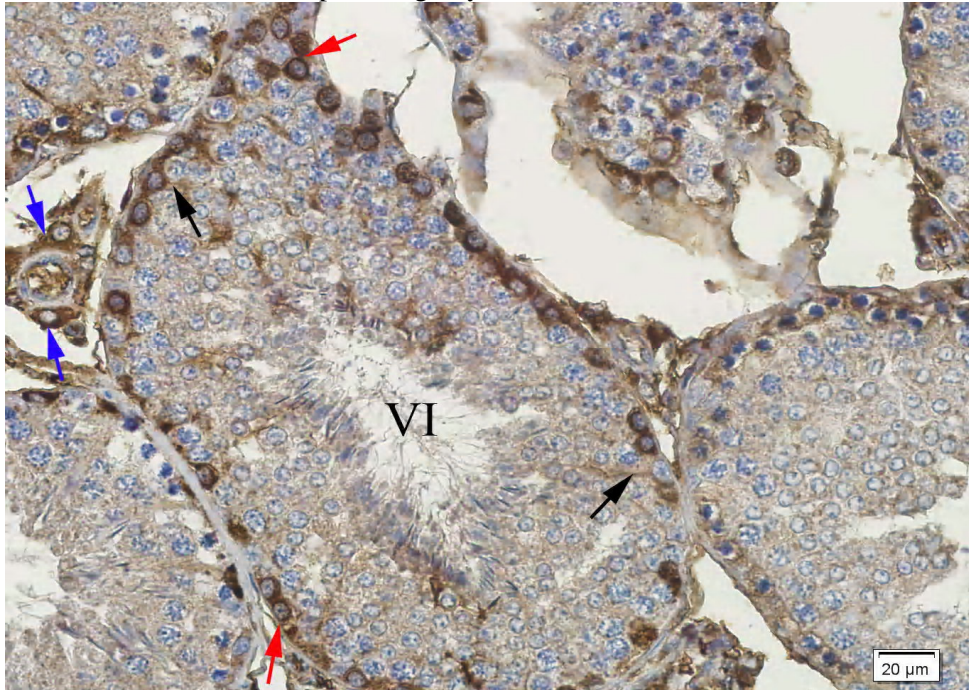
Şekil 4.53. VEGF R2 Klon II'in seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki immunohistokimyasal lokalizasyonu, evre III (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 μ m). Siyah oklar: Sertoli hücreleri, mavi oklar: Leydig hücreleri, kırmızı oklar: Spermatogoniyumlar.



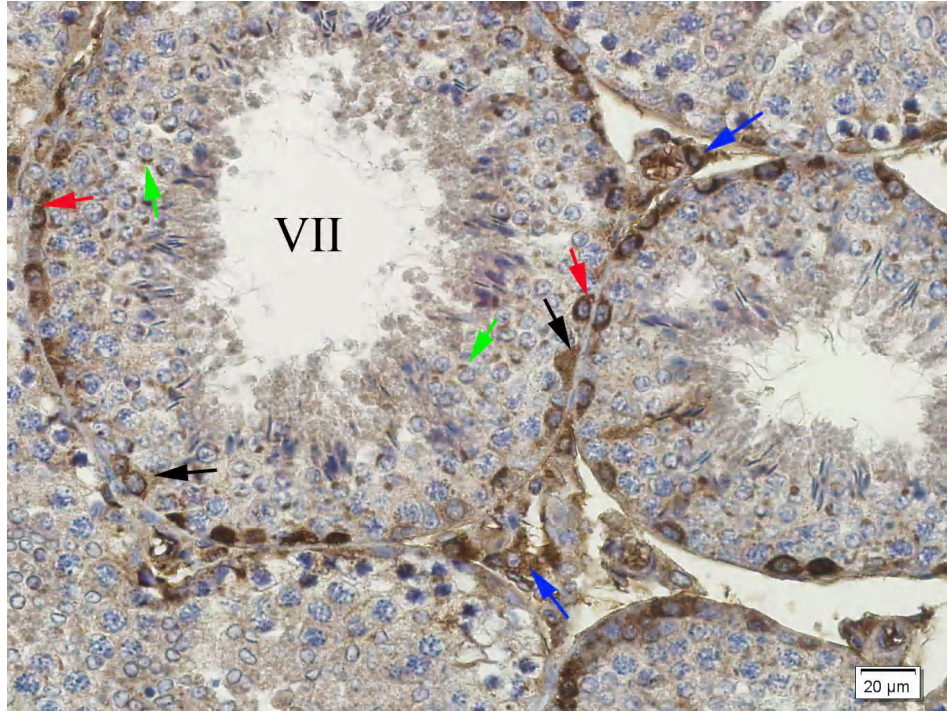
Şekil 4.54. VEGF R2 Klon II'in seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki immunohistokimyasal lokalizasyonu, evre IV (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 μ m). Siyah oklar: Sertoli hücreleri, mavi oklar: Leydig hücreleri, kırmızı oklar: Spermatogoniyumlar.



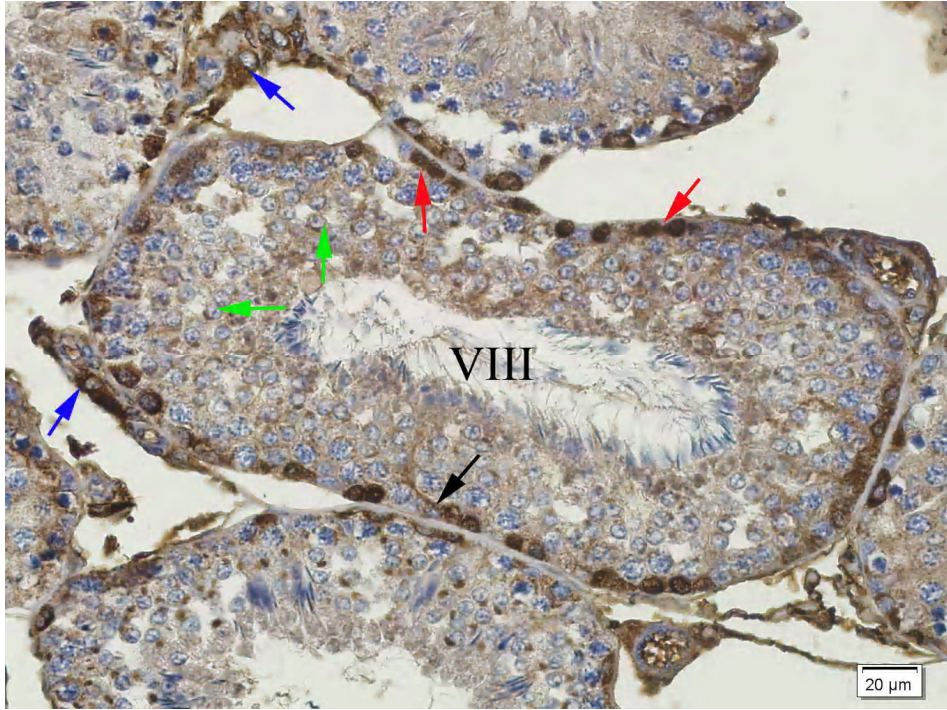
Şekil 4.55. VEGF R2 Klon II'in seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki immunohistokimyasal lokalizasyonu, evre V (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm). Siyah oklar: Sertoli hücreleri, mavi oklar: Leydig hücreleri, kırmızı oklar: Spermatogoniyumlar.



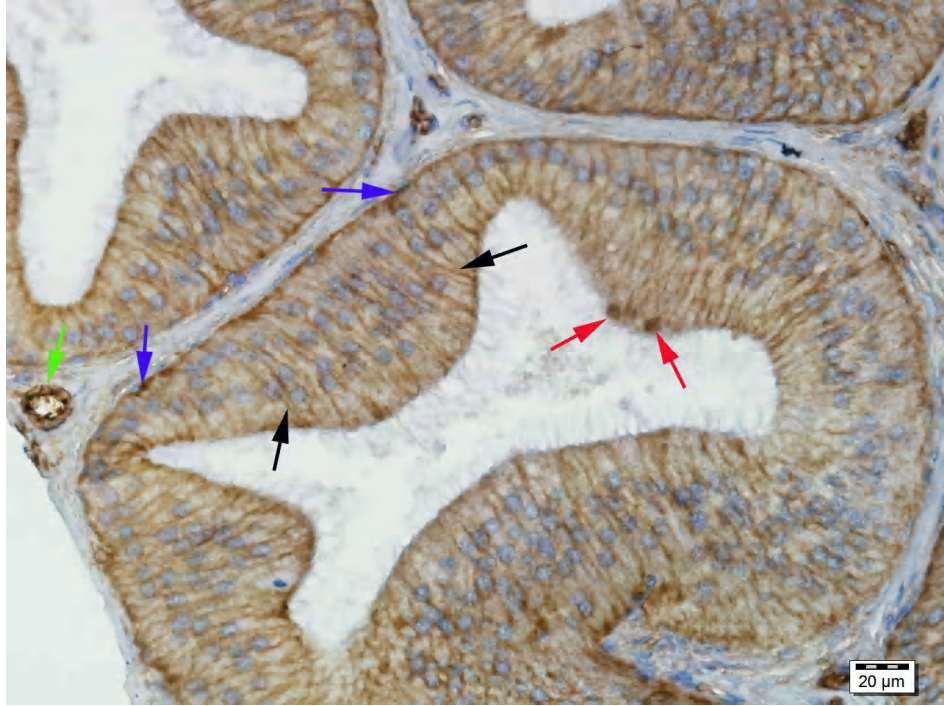
Şekil 4.56. VEGF R2 Klon II'in seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki immunohistokimyasal lokalizasyonu, evre VI (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm). Siyah oklar: Sertoli hücreleri, mavi oklar: Leydig hücreleri, kırmızı oklar: Spermatogoniyumlar.



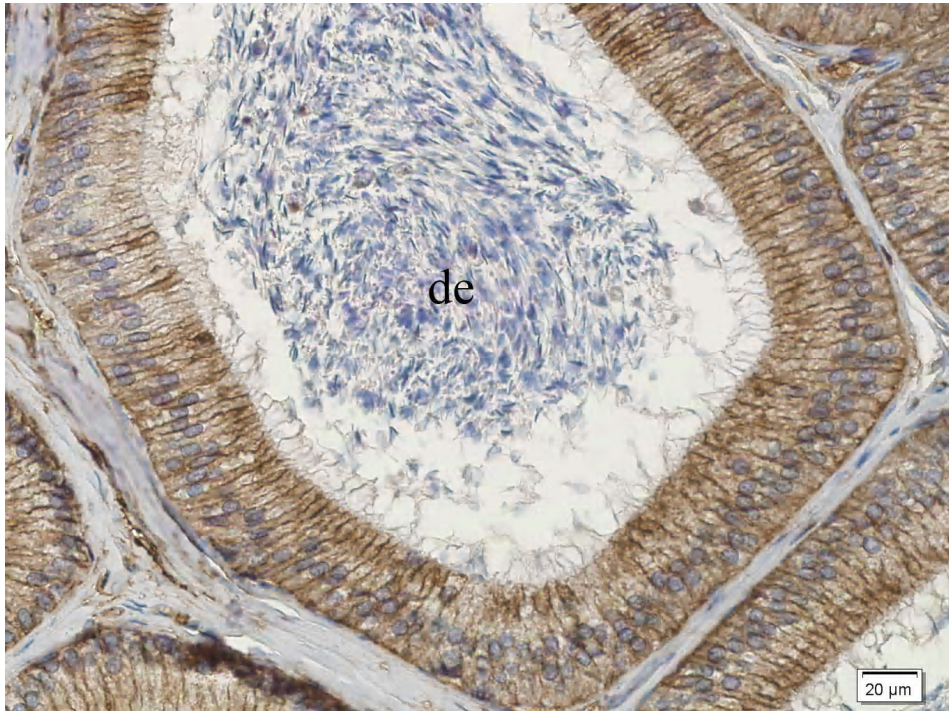
Şekil 4.57. VEGF R2 Klon II'in seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki immunohistokimyasal lokalizasyonu, evre VII (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm). Siyah oklar: Sertoli hücreleri, mavi oklar: Leydig hücreleri, kırmızı oklar: Spermatogoniyumlar, yeşil oklar: spermatid akrozomlarında pozitif reaksiyon.



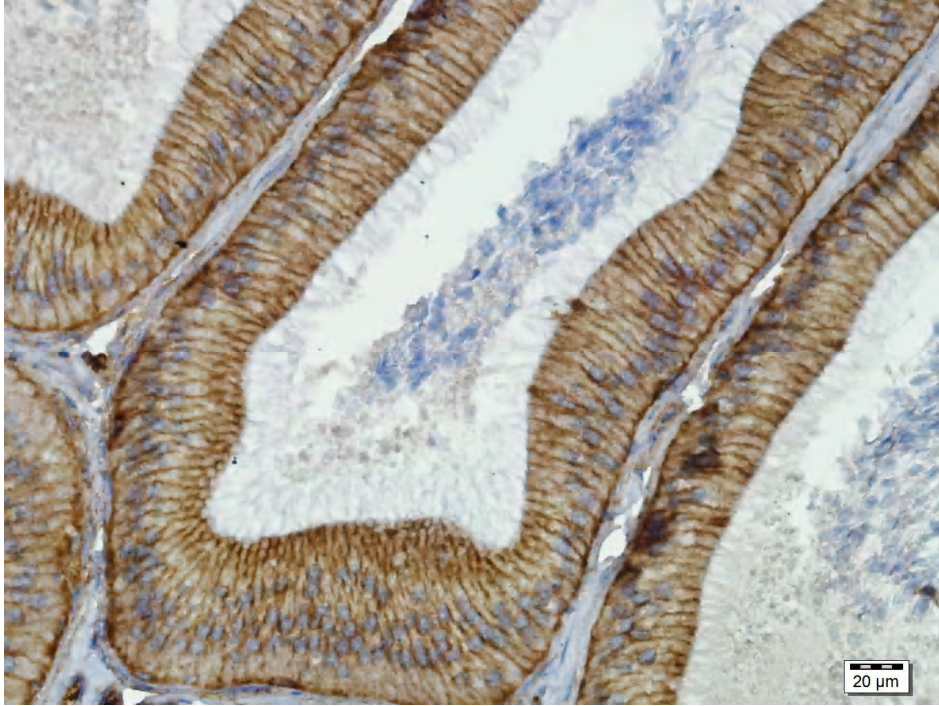
Şekil 4.58. VEGF R2 Klon II'in seminifer tubüller ve intersitisyel dokudaki immunohistokimyasal lokalizasyonu, evre VII (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm). Siyah oklar: Sertoli hücreleri, mavi oklar: Leydig hücreleri, kırmızı oklar: Spermatogoniyumlar, yeşil oklar: spermatid akrozomlarında pozitif reaksiyon.



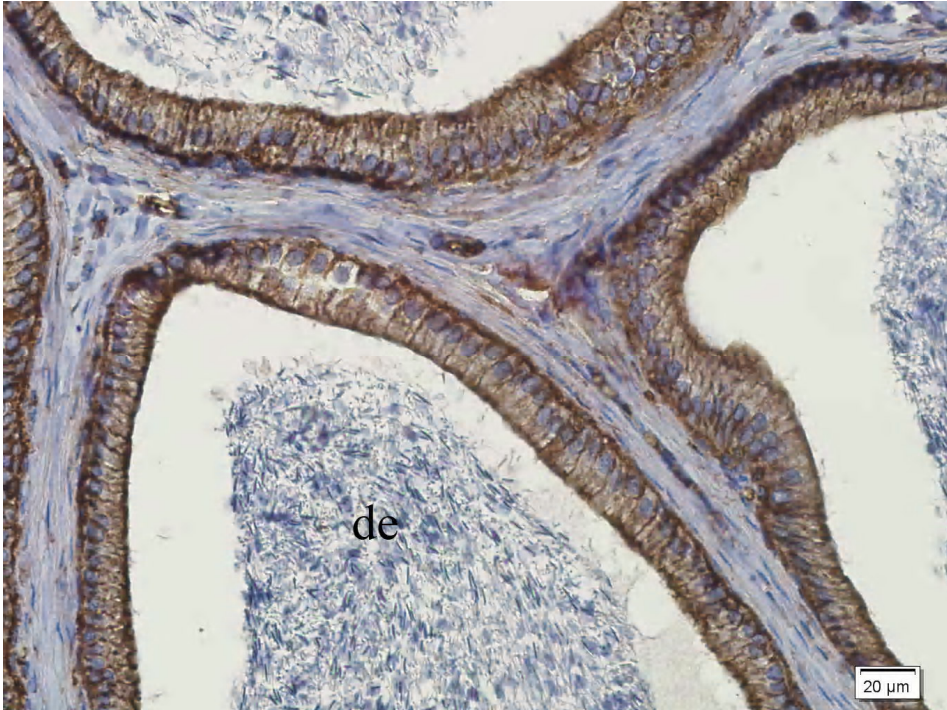
Şekil 4.59. VEGFR2 Klon II'in epididimisin başlangıç segmenti epitelindeki immunohistokimyasal lokalizasyonu, DAB X20 µm). Siyah oklar: Prinsipal hücrelerin apikal sitoplazmasında immunpozitif reaksiyon, Mavi oklar: Bazal hücrelerin sitoplazmada immunpozitif reaksiyon. kırmızı oklar: Apikal hücrelerin sitoplazmalarında immunpozitif reaksiyon. Yeşil ok: kan damarı endotelinde reaksiyon.



Şekil 4.60. VEGF R2 Klon II'in kaput epididimisteki immunpozitif reaksiyonu (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm). Prinsipal hücrelerin lateral membranlarda yoğun boyanma, de: duktus epididimisi.



Şekil 4.61. VEGF R2 Klon II'in korpus epididmisteki immunpozitif reaksiyonu (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm). Prinsipal hücrelerin lateral membranlarda yoğun boyanma.



Şekil 4.62. VEGF R2 Klon II'in kauda epididmisteki immunpozitif reaksiyonu (ABC İmmunoperoksidaz boyaması, DAB X20 µm). Prinsipal hücrelerin lateral membranlarda yoğun boyanma, de: duktus epididymis.

Tablo 4.1. Seminifer epitelde siklik evrelere göre testiküler hücrelerdeki VEGF, VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin hücresel reaktivitesi.

Evreler	Reaksiyon	Spermatogonialar	Spermatositler	Spermatidler	Sertoli hücreleri
Evre I					
	VEGF	++	++	-	+
	VEGFR1-1	-	-	-	+
	VEGFR1-2	+++	-	+	+++
	VEGFR2-1	-	-	-	+
	VEGFR2-2	+++	-	-	+++
Evre II					
	VEGF	++	++	-	+
	VEGFR1-1	-	-	-	+
	VEGFR1-2	+++	-	+	+++
	VEGFR2-1	-	-	-	+
	VEGFR2-2	+++	-	-	+++
Evre III					
	VEGF	++	++	-	+++
	VEGFR1-1	-	-	-	+
	VEGFR1-2	+++	-	+	+++
	VEGFR2-1	-	-	-	+
	VEGFR2-2	+++	-	-	+++
Evre IV					
	VEGF	++	++	-	+++
	VEGFR1-1	-	-	-	+
	VEGFR1-2	+++	-	+	+++
	VEGFR2-1	-	-	-	+
	VEGFR2-2	+++	-	-	+++
Evre V					
	VEGF	++	++	-	+++
	VEGFR1-1	-	-	-	+
	VEGFR1-2	+++	-	+	+++
	VEGFR2-1	-	-	-	+
	VEGFR2-2	+++	-	-	+++
Evre VI					
	VEGF	++	++	++	+++
	VEGFR1-1	-	-	-	+
	VEGFR1-2	+++	-	+	+++
	VEGFR2-1	-	-	-	+
	VEGFR2-2	+++	-	+++	+++
Evre VII					
	VEGF	++	++	++	+++
	VEGFR1-1	-	-	-	+
	VEGFR1-2	+++	-	+	+++
	VEGFR2-1	-	-	-	+
	VEGFR2-2	+++	-	+++	+++
Evre VIII					
	VEGF	++	++	++	+++
	VEGFR1-1	-	-	-	+
	VEGFR1-2	+++	-	+	+++
	VEGFR2-1	-	-	-	+
	VEGFR2-2	+++	-	+++	+++

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Testisler, erkek bireyin seksüel özellikleri ve üreme kabiliyetiyle doğrudan ilişkili bir organ çiftidir. Bu ilişki 2000 yıl öncesinden beri bilinmekle birlikte, günümüzde testislerin erkek bireylerin bedenlerinde sahip olduğu çok sayıdaki özel fonksiyonlar artık iyi bir şekilde tanımlanmıştır. Prolifere olan totipotent köken hücreler içermeleri, mayozun gözlendiği tek erkek organı olmaları ve sahip oldukları endokrin aktiviteleri ile erkek bireyin fenotipini belirleyebilmeleri testisleri özel bir organ konumuna sokmaktadır (1, 31, 32, 33).

Testisin, germ hücrelerinin üretilmesi ve cinsiyet hormonlarının yapılması olmak üzere temel iki fonksiyonu bulunmaktadır. Pubertaya erişmiş bir erkek bireyde, germ hücreleri mayoz bölünme geçirerek çeşitli gelişim aşamaları sonucunda ileri derecede özelleşmiş spermatozoonları meydana getirirler. Germ hücrelerinin gelişimi ve farklılaşması sırasında, çok sayıda hücre içi ve yüzeyine ait proteinler ortaya çıkarken, oluşan bu otoantijenlere karşı bir immunolojik yanıt oluşmaksızın tolerans şekillenmektedir. Sahip olduğu özellikler testisi üzerinde çok fazla sayıda araştırma yapılan bir organ konumuna getirmiştir. Buna bağlı olarak, son yıllarda gelişen teknolojiye paralel olarak insan ve çeşitli hayvan türlerinin testisleri üzerinde çok sayıda araştırma yapılmıştır (1, 97-100).

Seminifer epitel döngüsü çok sayıda evrelere ayrılabilir. Leblond ve Clermont (1952a, b), Clermont ve Leblond (1955), ve Ortavant (1954), PAS tekniği yardımıyla keop oluşumu ve akrozom gelişimini temel alarak bir döngüyü 12-14 evreye ayırmışlardır (44). Curtis 1918, Roosen-Rudge ve Giesel 1950 ve Ortavant 1954 spermatidlerin çekirdek şekli, spermatidlerin ve spermatozoonların bazal membrana göre yerleşimi, mitotik figürlerin varlığı ve seminifer tubül lümenine spermatozoonların salınımı gibi kriterleri kullanarak bir döngüyü sekiz evreye ayırmışlardır (44). Bununla birlikte, insanda 6, sıçanda 14, maymunda ise 12 basamak tanımlanmıştır. İnsanda bir

döngünün süresi 16 gündür. Dört döngü sonunda (64 gün) spermatogonyumlar spermiyum haline gelir (24). Bu çalışmada, Swierstra ve Foote (1963)'nin (44) tavşan testisleri üzerinde daha önce yaptıkları araştırmalarına benzer olarak, spermatidlerin çekirdek şekli, spermatidlerin ve spermatozoonların bazal membrana göre yerleşimi, mitotik figürlerin varlığı ve seminifer tubül lümenine spermatozoonların salınımı gibi temel kriterler dikkate alınarak seminifer tubüllerdeki bir döngü sekiz evre olarak belirlenmiştir.

VEGF, anjiojenik moleküller içerisindeki en önemli molekül olup, ilk önceleri vasküler permabilite faktörü (VPF) olarak tanımlanmıştır (2, 8, 49,51-56). Endotelial hücrelerin proliferasyonu, migrasyonu ve hücre canlılığının düzenlenmesinde rol oynayan anjiojenik bir faktör olarak adlandırılmıştır (58, 59). VEGF, 45 kDa'luk, homodimerik, heparin-bağımlı bir glikoproteindir. Çeşitli alt grupları tanımlanmış olup yapısında bulunduğu organın hem gelişim evresinde hem de fizyolojik fonksiyonuna bağlı bir kaç önemli biyolojik aktiviteye sahip multifonksiyonel bir moleküldür (5, 6, 8, 49, 52-57, 72, 73). VEGF A, B, C, D, E ya da aminoasit sayılarına göre VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 ve VEGF206 gibi izoformları bulunmaktadır. Vasküler geçirgenlik faktörü olarak da bilinen VEGF-A, disülfid bağlı homodimerlere bağlanmış olan 34-46 kDa'luk sekret glikoproteindir. Endotel hücreleri üzerindeki vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 1 (VEGF-1) ve vasküler endotelial büyüme faktörü 2 (VEGF-2) ile neuropilin-1 ve -2'ye bağlanır (51, 62). VEGF, embriyonik dokularda yaygın bir şekilde bulunurken, erişkin dokularındaki fonksiyonları tam olarak açıklık kazanmamakla birlikte (8, 49, 59) çok önemli bazı fonksiyonlarda görev aldıkları düşünülmektedir. Endotel hücrelerinin migrasyonunda, ekstrasellüler matriksin (ECM) yıkımından sorumlu olan matriks metalloproteazlar ile urokinaz ve doku tipi plazminojen aktivatörlerinin salınımlarının uyarılmasında, genital siklusuda uterus, ovaryum ve memelerde fizyolojik anjiyogeneze, yara iyileşmesinde, kemik onarımında ve ekzersize karşı iskelet kası yanıtında rol oynamak olarak bu görevler olarak tanımlanmaktadır (60-66). Bununla birlikte, VEGF erişkinlerin hemen hemen tüm dokularında bulunurken, etkilerini hedef hücreler üzerinde bulunan VEGFR1 (Flk-1) veya VEGFR2 (KDR/Fkl-1) reseptörleri aracılığıyla gösterirler. Permabilite, glomerular infiltrasyon, serebrospinal sıvı üretimi, karaciğer kan filtrasyonu ve kan akımına hormon sekresyonu gibi birçok fizyolojik olayda da önemli fonksiyonları olduğu düşünülmektedir (56, 58). Bunlara ilaveten, menstrual siklus ve ovarial folikül

gelişimi sırasında fizyolojik aktivitesinin bir parçası olarak vasküler değişiklikleri destekleyerek üreme fonksiyonlarını büyük ölçüde düzenlemesi de sayılabilir (46, 67). Erişkin dişilerin aksine, erkek testislerinde aktif bir anjiogenez bulunmamakla birlikte, testiste çok büyük miktarlarda VEGF üretilmektedir. İnsan ve bazı hayvan testislerinde Sertoli ve Leydig hücreleri ile vasküler yapılarda VEGF'in varlığı bildirilirken, Sertoli hücrelerinde bulunan VEGF'in spermatogenezis ve spermiyogeneziste önemli roller üstlenebileceği düşünülmektedir (11, 16, 71). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, VEGF ve reseptörlerinin erkek ve dişi genital sisteme ait non-vasküler hücreler (germ hücreleri ve diğerleri) üzerinde de rolleri olduğu ifade edilmektedir. VEGF, VEGFR-2 pozitif spermatogonyum kök hücreleri ve fertilize olmuş oositlerin proliferasyonunu etkilemektedir. Bununla birlikte, spermatozonların ve oositlerin motilitesi VEGFR1 aracılığıyla düzenlenir (16, 71). VEGF'nin insan semeninde son derece yüksek olarak eksprese olduğu ve fare testis ile epididimisinde VEGF'ün aşırı ekspresyonunun spermatojenik blokaj nedeniyle infertiliteye neden olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, insanda hem prostat, hem de vezikula seminalis epitelinde VEGF mRNA ve proteinin kuvvetli bir şekilde eksprese edildiği belirtilmektedir. Bu sonuçlar, seminal plazmada bulunan VEGF'ün ana kaynağının testis ve epididimis olmayıp prostat ve/veya vezikula seminalis olduğunu göstermektedir (69). VEGF prostat ve vezikula seminaliste çok yüksek miktarlarda üretildiği için bu gelişim faktörünün fertilitede önemli rolü olduğu düşünülebilir. Bunlara rağmen, VEGF'ün genital sistemdeki rolü tamamen açıklığa kavuşturulamamıştır (50). VEGF'ün üreme üzerindeki birkaç olası fonksiyonunu belirlenmiştir. Bir mikrovasküler permabilite düzenleyicisi olarak VEGF, semendeki sıvı ve protein kompozisyonunun belirlenmesinde bir önemli rol oynayabilir. Ayrıca semende bulunan VEGF'ün koyitus sırasında dişi genital kanalda mikrovasküler permabiliteyi değiştirebildiği ve sıvı salgılanmasını etkileyebildiği düşünülmektedir. VEGF, hem erkek hem de dişi genital kanal sıvısının miktarı ve kompozisyonu üzerindeki etkisi sperm motilitesi ve canlılığını etkileyerek fertilité üzerinde etkili olmaktadır. VEGF'ün erkek genital kanalındaki bir olası rolü de, Sertoli ve Leydig hücreleri tarafından üretilen VEGF, testisin seminifer, tubuler ve intersitisyel kompartmanlarında elverişli bir mikroortam sağlayan testikuler mikrodamarlar üzerinde parakrin etkiye sahip olmalarıdır (64). Sertoli ve Leydig hücrelerinde VEGF reseptörlerinin varlığı VEGF'ün bu iki hücre tipi üzerinde otokrin etkiye sahip olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, spermatozoonlarda VEGF reseptörlerinin

ekspresyonunun saptanması seminal plazma VEGF'ün spermatozoonları hedef alabileceğini göstermektedir (50). VEGF reseptörlerinin spermatozolda (orta-pakiten spermatositlerde ve yuvarlak spermatidlerde) bulunması, VEGF'ün direk olarak spermojenik hücreler üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. VEGF reseptörlerinin yuvarlak spermatidler üzerindeki ekspresyonu özellikle ilginçtir, çünkü gözlenen spermatojenik blokaj tam bu noktada olmaktadır (64). Korpelainen ve ark., (1998) da gözlenen infertilitenin VEGF reseptörlerini de eksprese eden Leydig hücrelerindeki VEGF'ün bir etkisiyle meydana geldiğini bildirilmiştir (65). VEGF'nin germ hücrelerinin hemostazisi yanı sıra, gelişimi için önemli olan diğer genital kanal hücrelerinin (erkeklerde seminifer tubul epiteli, Sertoli ve Leydig hücreleri, dişilerde ovaryumda granuloza hücreleri) fonksiyonlarını da etkilediği bilinmektedir. Bu hücrelerin tümü VEGF ve reseptörlerinin her ikisini veya birini eksprese ederler (16, 64). İnsanda, VEGF'ün germ hücrelerinin aksine, Leydig ve Sertoli hücrelerinde (12), sıçan (15) ve karaca (19) testislerinde sadece germ ve Leydig hücrelerinde fare (17) de ise sadece Sertoli hücreleri tarafından sentezlendiği ve salgılandığı rapor edilmektedir.

VEGF, aktivitesini üç reseptör ile gerçekleştirir: Tirozin kinaz yapısında olan bu reseptörleri VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (flk-1/KDR) ve VEGFR-3 (flt-4)'dür. Bunlardan VEGFR-1 ve 2 endotel hücreleri üzerinde, VEGFR-3 ise lenf damarları üzerinde bulunur. VEGF reseptörlerinin aktivasyonu; fosfoinositol-3 kinaz, fosfolipaz-C ve *ras* GTPaz aktivatör proteinleri gibi bir dizi hücre içi sinyal iletim proteini fosforile ederek endotel hücrelerinin çoğalma, göç ve farklılaşmasına neden olur (59, 77). Flt-1 (Fms benzeri tirozin kinaz 1) olarak bilinen VEGFR-1, kan damarlarının endotel hücreleri, monosit/makrofaj, dentritik hücreler, hemopoietik kök hücreleri, trofoblastlar ve osteoklastların membranına bağlı bir reseptördür (75). Farelerde Flk1 (fötal karaciğer kinazı1) ya da insanlarda KDR (kinaz insert bölgesi çeren reseptör) olarak da bilinen VEGFR-2 hemanjioblastlar ile endotel ve hemotopoietik hücre prekürsörleri için en önemli belirteçtir (85). Farelerde VEGFR-2'nin ortadan kalkması hem hematopoietik hem de endotelial hücrelerde eksikliklere neden olduğundan embriyonik ölümlere sebep olur. Bu nedenle VEGFR-2 endotelial hücre prekürsörlerinin farklılaşmasında önemli bir role sahiptir (75). Güçlü tirozin kinaz aktivitesinden dolayı, VEGFR-2 endotelial hücrelerde anjiyogenezis, proliferasyon, migrasyon ve yaşamsal uyarılarda en önemli pozitif sinyal düzenleyici olarak hareket eder (82). Endotel hücrelerinde VEGFR-2 Raf1'i (kemirgen lösemi viral onkogen homolog) aktive ederek, DNA

sentezine ve hücre proliferasyonuna sebep olur (75). Ayrıca, hücre migrasyonunu uyaran aracı molekülleri kullanarak P13 kinazı (87) ve damarlarda permeabiliteyi düzenleyen endotelial nitrik oksit sentazın (eNOS) fosforilasyonunu (77) aktive eder. VEGFR-2 ekspresyonu vasküler gelişimin son dönemlerinde azalır, ancak erişkinlerde fizyolojik ve patolojik anjiogenezde önemli bir düzenleyici olur ve endotel hücrelerinde VEGFR-2 ekspresyonunun yüksek olduğu görülür (75).

İnsan (10, 12) ve fare (17), sıçan (13, 15, 16), karaca (18, 19) gibi hayvanların testis ve epididimislerinde VEGF proteinin ve bunun bağlanma reseptörlerinin varlığı çeşitli yöntemlerle belirlenmiştir. Sertoli hücrelerinde bulunan VEGF'in spermatogenez ve spermiyogenezde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (12, 16, 19). Yapılan literatür taramaları sonucunda, tavşanların testis ve epididimislerinde VEGF ve reseptörler VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin varlığı ve lokalizasyonlarıyla ilgili herhangi bir araştırmaya rastlanılmaması bu tez çalışmasının yapılmasına temel teşkil etmiştir.

Ergün ve ark., (1997) insan testisleri üzerinde yaptıkları çalışmalarında, VEGF proteinin Sertoli ve Leydig hücrelerinin sitoplazmasındaki immunohistokimyasal lokalizasyonlarını göstermişlerdir (12). Araştırmacılar aynı çalışmalarında, VEGFR-1 (Flt-1)'in Sertoli hücreleri, Leydig hücreleri ve damar endotel hücrelerinde, VEGFR-2 (Flk-1)'in ise yine aynı hücrelerde benzer şekilde immuno reaktivite gösterdiklerini tespit etmişlerdir. Zhang ve ark., (2004) sıçanlar üzerindeki araştırmalarında, VEGF proteinin testis ve epididimislerindeki varlığını immunohistokimyasal ve Western Blot teknikleriyle göstermişlerdir (16). Araştırmacılar, bu çalışmalarında testis dokusunda spermatidlerin, Sertoli hücrelerinin ve Leydig hücrelerinin sitoplazmalarında VEGF immunpozitif partiküllere rastladıklarını ancak bu hücrelerin çekirdeklerinde herhangi bir immunboyanma gözlemlemediklerini bildirmişlerdir. Spermatidlerde gözlemlendiği bildirilen immunoreaktivitenin her 14 evrede de farklı olduğu, bununla birlikte en güçlü immunopozitif reaksiyonun başlıca spermiyogenik atık cisimcikler ve yuvarlak/uzamış spermatidlerin şekillenmekte olan/şekillenmiş akrozomlarında olduğunu tespit etmişlerdir (16). Ai ve ark., (2008, 2009) yaptıkları çalışmalarında, sıçan testislerinde VEGF ve VEGFR-1 (Flt-1)'in testis ve epididimisteki immunohistokimyasal lokalizasyonlarını incelemişlerdir (13, 15). Araştırmacılar bu çalışmalarının sonucunda, spermatogenik germ hücrelerinin sitoplazmalarında, spermatidlerin gelişmekte olan akrozomlarında, Sertoli hücreleri ve Leydig hücrelerinde VEGF immunoreaktif

partiküller belirlemişlerdir. Bununla birlikte araştırmacılar VEGFR-1 (Flt-1) immunoreaktivitesine sadece spermatidlerin gelişmekte olan akrozomlarında ve Leydig hücrelerinde rastlamışlardır (13, 15). Nalbandian ve ark., (2003) fare testisleri üzerinde yaptıkları araştırmalarında, VEGF'ün Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında çok güçlü pozitif bir şekilde immunpozitiflik sergilediğini bununla birlikte VEGFR-1 (Flt-1) ve VEGFR-2 (Flk-1)'in ise negatif reaksiyon gösterdiğini bildirmişlerdir (17). Araştırmacılar bu çalışmalarında VEGF reseptörlerinin germ hücrelerinde farklı ekspresyonlara sahip olduklarını ifade etmişlerdir. VEGFR-2 (Flk-1)'nin tip A spermatogonyumların sitoplazmalarında VEGFR-1 (Flt-1)'in ise spermatozoa ve spermatidlerin akrozomal bölgesinde lokalize olduğu bildirilmiştir (17). Schön ve ark., (2010) karacaların testisleri üzerinde yaptıkları araştırmalarında, spermatogonialar, spermatositler ve intersitisyel hücrelerde VEGF pozitif reaksiyon gözlemişlerdir (19). Araştırmacılar, uzamış spermatidlerde, damar endotel hücrelerinde ve perivasküler hücrelerde VEGFR-1 (Flt-1) pozitif boyanma belirlerken Sertoli hücrelerinde ise sadece VEGFR-2 (Flk-1) immunoboyanma belirlemişlerdir (19).

Çalışmada, tavşan testis ve epididimis dokularında Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü'nü immunohistokimyasal olarak belirleyebilmek amacıyla mouse anti-VEGF (Thermo Scientific) primer antikoru kullanılmıştır. Seminifer tübüllerdeki tüm spermatojenik evreler ve epididimis incelenerek şu sonuçlar elde edilmiştir;

Spermatojenik gelişimin I. ve II. evrelerinde olduğu belirlenen seminifer tübüllerde Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında, tip A spermatogonyumların çekirdek periferlerinde, primer spermatositlerde granüler tarzda pozitif immunreaksiyon gözlemlendi. İnterstisyel dokuda ise Leydig hücre sitoplazmalarında granüler tarzda bir immunoboyanma belirlendi. Ayrıca, kapıllarların endotelyumunda da pozitif immunreaksiyon dikkati çekti. Spermatojenik gelişimin III. ve IV. evrelerinde olan seminifer tübüllerde Sertoli hücrelerinin tip A spermatogonyumların perinükleer sitoplazmasında, primer spermatositlerde granüler tarzda pozitif immunreaksiyon gözlenirken, Sertoli hücrelerinin sitoplazmasında I. ve II evrelere göre daha yoğun immunpozitif boyanma gözlemlendi. İnterstisyel dokuya bakıldığında ise I. ve II evrelerde olduğu gibi Leydig hücre sitoplazmalarında granüler tarzda bir immun reaksiyon ve kapıllar endotelyumunda immunpozitif reaksiyon belirlendi. Spermatojenik gelişimin V. evresinde olan seminifer tübüllerde Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında daha belirgin

immunboyanma gözlenirken, tip A spermatogonyumların perinükleer sitoplazmasında ve spermatositlerde pozitif immunreaksiyon belirlendi. Spermatidlerin akrozomlarında ise pozitif immunreaksiyon dikkati çekti. İnterstisyel dokuya bakıldığında ise önceki 4 evrelerde olduğu gibi Leydig hücre sitoplazmalarında granüler tarzda bir immun reaksiyon ve kapillar endotelyumda immunpozitif reaksiyon mevcuttu. Spermatojenik gelişimin VI. VII ve VIII. evrelerinde olan Seminifer tubullerin yapısı incelendiğinde önceki dönemlerde olduğu gibi Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında, tip A spermatogonyumların çekirdek çevresinde ve spermatositlerde pozitif immun reaksiyon gözlemlendi. Bu dönemlerde de V. evrede olduğu gibi spermatidlerin akrozomlarında pozitif immunreaksiyon belirlendi. İnterstisyel dokuya bakıldığında ise önceki 5 dönemde olduğu gibi Leydig hücrelerinin sitoplazmalarında granüler tarzda ve kapillarların endotelyumunda pozitif immunreaksiyon görüldü. Çalışmada, tavşan testis ve epididimis dokularında Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü Reseptör 1'i immunohistokimyasal olarak belirleyebilmek amacıyla monoklonal mouse anti-VEGFR-1 (Abcam 9540) ve rabbit poliklonal anti-VEGFR-1 (Abcam 2350) olmak üzere 2 farklı primer antikoru kullanılmıştır. Monoklonal mouse anti-VEGFR-1 (Abcam 9540) primer antikoru uygulanan tavşan testis dokusunda I'den VIII'e kadar tüm spermatojenik evreler incelendiğinde seminifer tubüllerde sadece tek tük olarak bazı Sertoli hücrelerinde bir immunboyanma görülürken, intersitisyel alandaki Leydig hücrelerinde ve kan damarları endotelyumunda ise pozitif immunoreaksiyon gözlemlendi. Tüm bu boyanmalar zayıf karakterdeydi. Rabbit poliklonal anti-VEGFR-1 (Abcam 2350) primer antikoru uygulanan testis dokusunda I'den VIII'e kadar tüm spermatojenik evreler incelendiğinde seminifer tubüllerde Sertoli hücrelerinde ve spermatogonyumlarda immunpozitif reaksiyon gözlemlendi. İntersitisyel alanda ise Leydig hücreleri ve kapillar damar endotelyumunda immunpozitif boyanma belirlendi. Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü Reseptör-2'yi testis ve epididimis dokularında immunohistokimyasal olarak belirleyebilmek amacıyla monoklonal mouse anti-VEGFR-2 (Abcam 9530) ve monoklonal mouse anti-VEGFR-2 (Abcam 10973) olmak üzere 2 farklı primer antikoru kullanılmıştır. Monoklonal mouse anti-VEGFR-2 (Abcam 9530) primer antikoru uygulanan tavşan testis dokusunda I'den VIII'e kadar tüm spermatojenik evreler incelendiğinde seminifer tubüllerdeki Sertoli hücrelerinde çok zayıf immunpozitif reaksiyon gözlemlendi. İntersitisyel alandaki Leydig hücrelerinde ve kan damarları endotellerinde ise belirgin bir immunboyanma belirlendi. Monoklonal

mouse anti-VEGFR-2 (Abcam10973) primer antikoru uygulanan tavşan testis dokusunda I'den VIII'e kadar tüm spermatojenik evreler incelendiğinde seminifer tubüllerdeki Sertoli hücreleri ve spermatogonyumların sitoplazmalarında çok yoğun immunpozitif boyanma gözlemlendi. Bununla birlikte V. VI. VII. ve VIII. evrelerde spermatidlerin akrozomlarında immunpozitif reaksiyon tespit edildi. İntersitisyel alandaki Leydig hücreleri ve kan damarları endotelinde de immunboyanma belirlendi. Sunulan çalışmada, tavşan testis dokusunda insan (12), sıçan (15, 96) ve farelerde (16) bildirilen bulgularla uyumlu olarak Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında VEGF proteini için pozitif immunreaksiyon belirlenmiştir. Ayrıca çalışmamda, karaca (78) testislerine benzer olarak spermatogoniyaların ve spermatidlerin sitoplazmalarında da VEGF pozitif reaksiyon tespit edilmiştir. Bununla birlikte, farelerin (16) aksine tavşan testis dokusunda insan (12), sıçan (13, 16) ve karacalara (19) benzer olarak Leydig hücrelerinde kuvvetli VEGF immunpozitif immunreaksiyon tespit edilmiştir. Bununla birlikte sıçan (13, 16) ve fare (17) testislerinde spermatidlerin akrozomlarında gözlemlendiği bildirilen VEGF pozitif reaksiyon tavşan testislerinde de gözlemlenmiştir. Tavşan testis dokusunda Sertoli hücreleri, spermatogoniyalar ve spermatositlerde VEGF proteinin belirlenmesi bu molekülün spermatogeneziste önemli bir görev aldığını bize düşündürmüştür. Sunulan çalışmada, insan (12) testislerinde olduğu gibi tavşan testislerindeki Sertoli hücreleri ve Leydig hücrelerinde de kullandığımız her iki VEGFR-1 primer antikoru için pozitif immunreaksiyon görülmüştür. Bununla birlikte tavşan testislerinde sıçan (13, 16) ve fareler (17) için bildirildiği gibi spermatidlerin akrozomlarında da VEGFR1 pozitif immunreaksiyon belirlenmemiştir. Sunulan çalışmada, fare (17) testislerinde bildirilenlere benzer olarak VEGFR-2 için immunpozitif reaksiyon görülmüştür. Ayrıca, insan (12) ve karaca (19) testislerinde olduğu gibi VEGFR-2 için Sertoli hücreleri, Leydig hücreleri ve damar endotellerinde de immunpozitif reaksiyon belirlenmiştir. VEGF proteini ve bunun bağlanma reseptörleri olarak görev yapan VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin tavşan testis ve epididimisinde insan (12), sıçan (15, 16) ve farede (17) olduğu gibi yaygın bir şekilde lokalize olduğu görülmüştür. Bu bulguların testislerde spermatogonial farklılaşma, spermiyogeneziste ve özellikle de spermatidlerde akrozom gelişiminde ayrıca Leydig hücrelerinde steroidogeneziste rol oynayabileceği bilgisini desteklemektedir. Bunlara ilaveten, VEGF'nin testis ve epididimiste bir parakrin faktör olarak Flt-1 ve Flk-1

aracılığıyla kan damarlarının permabilitesi üzerinde etkili olabileceği fikrini desteklemektedir.

Memeli epididimisi, tek bir kanal olan duktus epididimis ve rete testisi duktus epididimise bağlayan bir kaç adet duktuli eferentisten oluşmaktadır. Makroskobik olarak, epididimis kaput, korpus ve kauda olmak üzere 3 farklı bölgeye ayrılmaktadır. Bununla birlikte bu bölünme sistemi yapı-fonksiyon ilişkisini tam olarak yansıtmaktadır. Epididimal epitelin histolojik yapısındaki bölgesel farklılıklar ilk olarak, köpeklerde, tavşanlarda, sıçanlarda, aygırlarda ve boğalarda belirlenmiştir. Bir çok hayvan türünde epididimis, histolojik ve sitokimyasal özellikleri temel alınarak başlangıç segmenti, kaput epididimis, korpus epididimis ve kauda epididimis olmak üzere bölümlendirilerek incelenmektedir (43, 50, 51, 52, 96, 101).

Duktus epididimis, oldukça kıvrımlı olup kendi üzerinde sarmallanmış bir yapıya sahiptir. Bu kanal, yüzeyinde sterosilyumlar olan prizmatik prinsipal hücreler ile bazal lamina ile ilişkili ve yuvarlak-oval hafif boyanan bir çekirdeğe sahip bazal hücreler içeren yalancı çok katlı prizmatik bir epitelle örtülüdür. Bununla birlikte, bu epitelin yapısında bölgeye spesifik olarak yerleşim gösteren apikal hücreler, narrow hücreleri, clear hücreleri ve halo hücreleri de bulunmaktadır (50, 51, 102).

Prinsipal hücreler, tüm memelilerde duktus epididimis epitelindeki baskın hücre tipi olup, yaklaşık olarak epiteli döşeyen hücrelerin %80'nini oluşturmaktadır. Prinsipal hücreler, sentezlediği çok sayıdaki proteini epididimal lumene vermektedirler. Ayrıca, bu hücreler lumende bulunan proteinleri endositozla alınmasında aktif rol oynamaktadırlar. Apikal hücreleri, karakteristik olarak kaput epididimisin epiteli içerisinde apikalde yerleşim gösteren, yuvarlak bir çekirdeğe sahip olan fakat bazal membranla herhangi bir bağlantısı olmayan hücrelerdir. Bu hücreler, narrow ve clear hücreleri gibi sitoplazmalarında vakuoler H^+ -ATPaz içerirler ve lumene proton pompalarlar. Buna bağlı olarak da lumen içeriğinin asitleştirilmesinde görev alırlar. narrow hücreleri, kaput epididimisi döşeyen epitelde Prinsipal hücreler arasında bazaldan lumene doğru ince bir kalem şeklinde uzanan clear hücreleri ise kaput, korpus, kauda epididimis epitelinde yerleşim gösteren saydam görünümlü hücrelerdir. Bu hücreler de apikal hücrelerle benzer aynı fonksiyona sahiptirler. Bazal hücreler, bazal lamina üzerinde yerleşen ve prinsipal hücrelerle yakın ilişki içerisinde olan hücrelerdir.

Halo hücreleri ise tüm epididimal kanal boyunca epitel içerisinde yerleşim gösteren intraepitelyal lenfositlerdir (51).

Bazal hücreler protaglandin PGEF gibi bazı parakrin maddeler sentezleyerek prinsipal hücrelerin elektrolit taşınımını düzenlemektedirler. Böylece epitel içerisindeki hücre-hücre etkileşimleri luminal ortamı ve buna bağlı olarak da sperm olgunlaşmasını direkt olarak etkileyebilmektedir. Bunlara ilaveten, prinsipal hücreler ile diğer prinsipal hücreler arasında kan-epididimis bariyerinin oluşumuna katılan sıkı hücre bağlantıları bulunmaktadır. Kan-epididimis bariyeri, epididimal lumen içerisindeki spermlerin antijenlerden izole bir şekilde olgunlaşabilmesi için gerekli bir immunprotektif alan oluşmasını sağlamaktadır (51).

Ergün ve ak., (1998) insan epididimisleri üzerinde yaptıkları çalışmalarında, efferent kanalların silyalı hücreleri ile peritubuler hücrelerinde ve duktus epididimisin bazal hücreleri ile peritubuler hücrelerinde VEGF proteinini immunohistokimyasal olarak belirlerken, vasküler endotelial hücrelerde negatif boyanma gözlemlemişlerdir (10). Araştırmacılar aynı çalışmalarında, efferent kanalların silyalı hücrelerinde ve lenfatik damarlarda VEGFR-1 (Flt-1) için pozitif immunoreaksiyon göstermiştir. Vasküler endotelial hücreler VEGFR-1 (Flt-1) için negatif boyanmanın olduğunu, VEGFR-2 (KDR) için pozitif immunoreaksiyon bulunduğunu bildirmektedirler (10). Zhang ve ark., (2004) sıçan epididimisinde, VEGF proteinin epididimal kanalda bölge spesifik ve hücre spesifik bir ekspresyonu ve lokalizasyonu ile karşılaşmışlardır (16). Araştırmacılar, başlangıç bölümünde VEGF proteinin tüm epitelyal hücrelerde bulunduğunu ve immunreaktif partiküllerin hücrelerin supranükleer bölgesinde lokalize olduklarını bildirmektedirler. İmmun pozitif hücrelerin bir kaç prinsipal ve bazal hücre haricinde genellikle kaput, korpus ve kauda epididimisindeki clear hücreleri olduğundan söz edilmektedir. İmmunpozitif partiküllerin clear hücrelerin sitoplazmasının farklı bölgelerinde lokalize olduğu, bazılarında supranükleer bölgede, bazılarında tüm sitoplazmada, bazılarının da ise serbest kenar boyunca hücrelerin dışında dağılım gösterdiği ifade edilmektedir. Pozitif spermatozoal akrozomlara sadece proksimal epididimisin lümeninde rastlanılmıştır. Sıçanların testis ve epididimisin intersitisyel kan damarları ve kapıllarlarında herhangi bir immunreaksiyon belirlenmemiştir (15, 16). Ai ve ark., (2008 ve 2009) sıçan epididimisi üzerinde yaptıkları araştırmalarında VEGF proteinin epididimal kanalda bölge spesifik ve hücre spesifik bir ekspresyona sahip

olduğunu bununla birlikte VEGFR-1 (Flt-1)'in epididimis epitelindeki prinsipal hücrelerde bulunduğu belirtmektedirler. VEGF tüm epididimiste, VEGFR-1 (Flt-1)'inde kaput ve kauda epididimiste görüldüğü rapor edilmektedir (13, 15). Hem VEGF, hem de VEGFR-1 (Flt-1)'nin spermiyumların akrozomlarında ayrıca boyun, orta ve kuyruğun ana parçasında lokalize olduğu rapor edilmektedir (13, 15).

Sunulan çalışmada, Epididimis, başlangıç segmenti, kaput, korpus ve kauda epididimis olmak üzere 4 ayrı bölümde incelenmiştir. Başlangıç segmentinin epitelini döşeyen prinsipal hücrelerin apikal ve bazal sitoplazmalarında granüler tarzda, apikal hücreler ve bazı bazal hücrelerin sitoplazmalarında ise yoğun VEGF immunpozitif reaksiyon belirlenmiştir. Reaksiyon, kaput epididimis, korpus epididimis ve kauda epididimisi döşeyen epitellerdeki prinsipal hücrelerin apikal ve bazal sitoplazmalarında granüler tarzda, bazı bazal hücrelerin sitoplazmalarında ise yoğunlu. Monoklonal mouse anti-VEGFR-1 (Abcam 9540) primer antikoru uygulanan tavşan epididimiste ise epididimiste başlangıç segmenti, kaput epididimis, korpus epididimis ve kauda epididimisi döşeyen epitellerde negatif reaksiyon görülürken, interstisyumda sadece kapiller damar endotelinde immunopozitif reaksiyon belirlendi. Rabbit poliklonal anti-VEGFR-1 (Abcam 2350) primer antikoru uygulanan epididimisin başlangıç segmentinin epitelini döşeyen prinsipal hücrelerin apikal ve bazal sitoplazmalarında granüler tarzda reaksiyon görülürken bazı prensipal hücreler ve bazal hücrelerin sitoplazmalarında ise daha yoğun immunboyanma belirlendi. Reaksiyon, kaput epididimis, korpus epididimis ve kauda epididimisi döşeyen epitellerdeki prinsipal hücrelerin apikal ve bazal sitoplazmalarında granüler tarzda ve bazı bazal hücrelerin sitoplazmalarında ise yoğunlu. Ayrıca, bazalda peritübüler hücrelerde ve kan damarları endotelinde de pozitif reaksiyon belirlendi.

Monoklonal mouse anti-VEGFR-2 (Abcam 9530) primer antikoru uygulanan epididimiste başlangıç segmenti, kaput epididimis, korpus epididimis ve kauda epididimisi döşeyen epitellerde negatif reaksiyon görülürken, tubüller arası boşluktaki bazı kapillar damarların endotelinde ise pozitif immunreaksiyon belirlendi. Monoklonal mouse anti-VEGFR-2 (Abcam10973) primer antikoru uygulanan epididimisin başlangıç segmentinin epitelini döşeyen prinsipal hücrelerin apikal ve bazal sitoplazmalarında granüler tarzda reaksiyon görülürken bazı apikal hücreler ve bazal hücrelerin sitoplazmalarında ise daha yoğun immunboyanma belirlendi. Reaksiyon,

kaput epididimis, korpus epididimis ve kauda epididimisi döşeyen epitellerdeki prinsipal hücrelerin apikal ve bazal sitoplazmalarında granüler tarzda ve bazı bazal hücrelerin sitoplazmalarında ise yoğunlu. Bununla birlikte hücrelerin lateral membranlarındaki pozitif reaksiyon dikkat çekiciydi. Ayrıca, bazalda peritübüler hücrelerde ve kan damarları endotelinde pozitif reaksiyon belirlendi.

Sunulan çalışma, tavşan epididimislerinde insan (10), sıçan (13, 15) için bildirildiği gibi epididimisi döşeyen epitelde VEGF proteini için pozitif immun reaksiyon belirlenmiştir. Bununla birlikte, tavşan epididimisinde insan epididimisinin aksine peritubuler hücrelerde VEGF için pozitif reaksiyon belirlenememiştir. Ayrıca, tavşan epididimisinde insan (10) ve sıçan (13, 15) epididimisine benzer olarak damar endotellerinde VEGF için negatif immunreaktivite görülmüştür. Sunulan çalışmada, insan (10) ve sıçan (13, 15) epididimislerine benzer olarak tavşan epididimisini döşeyen epitelde VEGFR-1 için pozitif immunreaksiyon tespit edilmiştir. Bununla birlikte sunulan çalışmada, tavşan epididimisinde VEGFR-2'nin epididimisi döşeyen epitel, peritubuler hücreler ve damar endotellerinde kuvvetli pozitif boyandığı belirlenmiştir. Prinsipal hücrelerin lateral membranlarda kuvvetli VEGFR-2 immunboyanmasının olması hücrelerarası bağlantılar üzerinde bu reseptörlerin lokalize olabileceğini göstermiştir. Hücrelerarası bağlantıların kan-epididimis bariyerinin yapısında önemli görevler aldığı bilindiğinden (103, 104) VEGF proteinin tavşan epididimisinde VEGFR-2 reseptörü aracılığıyla kan-epididimis bariyerinin yapısına katkı sağlama gibi fizyolojik bir görevi olabileceği düşünülmüştür.

Tüm elde edilen bulgular ışığında, VEGF proteini ve bunun bağlanma reseptörleri olarak görev yapan VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin tavşan testis ve epididimisinde insan (10, 12), sıçan (13, 15, 16) ve farede (17) olduğu gibi yaygın bir şekilde lokalize olduğu görülmüştür. VEGF proteini ve reseptörleri VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin tavşan testislerindeki spesifik lokalizasyonları, bu moleküllerin spermatogonial farklılaşma, spermiyogenezis, spermatidlerde akrozom gelişimi ve Leydig hücrelerinde steroidiogeneze, epididimiste ise sperm olgunlaşması ve kan-epididimis bariyerine katkı sağlama gibi fonksiyonel görevleri olabileceği hipotezini akla getirmektedir. Ayrıca, VEGF'nin testis ve epididimiste bir parakrin faktör olarak Flt-1 ve Flk-1 aracılığıyla kan damarlarının permeabilitesi üzerinde de etkili olabileceği ileri sürülebilir.

6. KAYNAKLAR

1. Beyaz F, Bayram G.K, Alan E. Tavşan testislerinin morfolojik özellikleri ile yapılarında bulunan immün sistem hücreleri üzerinde immüohistokimyasal çalışmalar. Erciyes Üniversitesi Araştırma Projesi, Kod No: VA-07-07, Proje Yöneticisi, 2007.
2. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* 2003; 9: 669-676.
3. Swierstra E.E. Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoan transit through the epididymis. *Anat Record* 1968; 161: 171-185
4. Vaillant S, Dorizzi M, Pieau C, Richard-Mercier N. Sex reversal and aromatase in chicken. *J Experimental Zool*, 2001; 290: 727-740
5. Bates D.O, Hillman N.J, Williams B, Neal C.R, Pocock T.M. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J Anat* 2002; 200: 581-597.
6. Breen E.C. VEGF in biological control. *J Cellular Biochem*, 2007; 102: 1358-1367.
7. Kilic S, Lortlar N, Bardakcı Y, Ozdemir E, Yuksel B, Ozturk U, Budak G, Dogan M. Caspase-3 and VEGF immunopositivity in seminiferous tubule germ cells in cases of obstructive and non-obstructive azoospermia in smokers versus non-smokers. *J Assist Reprod Genet*, 2009; 26: 57-63.
8. Maharaj A.S.R, D'Amore P.A. Roles for VEGF in the adult. *Microvascular Res*, 2007; 74: 100-113.
9. Pepper M.S, Baetens D, Mandriota S.J et al. Regulation of VEGF and VEGF receptor expression in the rodent mammary gland during pregnancy, lactation and involution. *Dev Dynam*, 2000; 218: 507-524.

10. Ergün S, Luttmer W, Fiedler W, Holstein A.F. Functional expression and localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in the human epididymis. *Biol Reprod*, 1998; 58: 160-168.
11. Koeva Y. Immunoexpression of growth factors in human testis. *Tome*, 2003; 5: 99-103.
12. Ergün A, Kiliç N, Fiedler W, Mukhopadhyay A.K. Vascular endothelial growth factor and its receptors in normal human testicular tissue. *Mol Cell Endocrinol*, 1997; 131: 9-20.
13. Ai Q.Y, Tian H, Zhag J, Ma L, Miao N.Z, Huo Y.W, Wang L.R, Qiu S.D, Zhang Q.Y. Expression of VEGF and Flt-1 in the testis, epididymis and epididymal sperm of adolescent rats. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 2008; 14: 871-875.
14. Lu N, Kruse S, Slattery R, Clopton D, Cupp A.S. Effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms on rat testis composition and germ cell numbers. *Biol Reprod*, 2009; 81: 20.
15. Ai Q.Y, Tian H, Ma L, Miao N.Z, Huo Y.W, Wang H.X, Wang L.R, Qiu S.D, Zhang Q.Y. Experimental varicocele affects VEGF and Flt-1 protein expressions in the testis and epididymis of adolescent rats. *Zhonghua Nan Ke Xue.*, 2009; 15: 488-92.
16. Zhang Q.Y, Qui S.D, Ge L. Studies on expression and location of VEGF protein in rat testis and epididymis. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao*, 2004, 37: 1-8.
17. Nalbandian A, Dettin L, Dym M, Ravindranth N. Expression of vascular endothelial growth factor receptors during male germ cell differentiation in the mouse. *Biol Reprod*, 2003; 69: 985-994.
18. Wagener A, Blottner S, Göritz F, Streich W.J, Fickel J. Circannual changes in the expression of vascular endothelial growth factor in the testis of roe deer (*capreolus capreolus*). *Animal Reprod Sci*, 2010; 117: 275-278.
19. Schön J, Blottner S, Gabler C, Fickel J. Vascular endothelial growth factor A is a putative paracrine regulator in seasonally controlled spermatogenesis: Insights from a ruminant model, the roe deer. *Growth Factors*, 2010; 28: 202-210.
20. Çakır A, Bozkurt EÜ, Düzler A. Tavşan, kobay ve sığanda testisin şekli, konumu ve testis epididymis ilişkisi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 2001; 48: 129-132.

21. Huerkamp MJ. The rabbit. In: B. Ballard R. Cheek (1st Ed), exotic animal medicine for the veterinary technician. Iowa State Press, Ames, Iowa, 2003; pp 192-196.
22. Abd-Elmaksud A. Morphological, glycohistochemical, and immunohistochemical studies on the embryonic and adult bovine testis. A thesis submitted for the Doctor Degree in Veterinary Medicine Faculty of Veterinary Medicine. Ludwig-Maximilians-Universitat, Munchen, 2005; pp 35-40.
23. Ariyaratne S, Mendis-Handagama C. Changes in the testis interstitium of sprague dawleys rats from birth to sexual maturity. Biol Reprod 2000; 62: 680-690.
24. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Demir R. Çeviri editörü, Palme Yayıncılık, 2006; s.552-554.
25. Christl HW. The lamina propria of vertebrate seminiferous tubules: a comparative light and electron microscopical investigation. Andrologia, 1990; 22: 85-94.
26. Davidoff MS, Breucker H, Holstein AF, Seidl K. Cellular architecture of lamina propria of human seminiferous tubules. Cell Tissue Res, 1990; 262: 253-261.
27. Dym M. Basement membrane regulation of Sertoli cells. Endocrin Rev, 1994; 15: 102-105.
28. Maddocks S, Setchell BB. The physiology of the endocrine testis. Oxford Rev Reprod Biol, 1988; 10: 53-123.
29. Aumüller G, Steinbrück M, Krause W, Wagner HJ. Distribution of vimentin-type intermediate filaments in Sertoli cells of human testis, normal and pathologic. Anat Embryol 1988; 178: 129-136.
30. Berndtson WE, Igboeli G, Pickett BW. Relationship of absolute numbers of Sertoli cells to testicular size and spermatogenesis in young beef bulls. J Anim Sci, 1987; 64: 241-246.
31. Franke FE, Paulus K, Rey R, Marks A, Bergmann M, Steger K. Differentiation markers of Sertoli cells and germ cells in fetal and early postnatal human testis. Anat Embryol, 2004; 209: 169-177.
32. Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. Sem Cell Dev Biol, 1998; 9: 411-416.

33. Delbes G, Duquenne C, Szenker J, Taccon J, Habert R, Levacher C. Developmental changes in testicular sensitivity to estrogens throughout fetal and neonatal life. *Toxicological Sci*, 2007; 99, 234-243
34. Dreef H.C, Esch E.V. De Rijk E.P.C.T. Spermatogenesis in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*): A practical guide for routine morphological staging. *Toxicol Pathol*, 2007; 35:395-404.
35. Maymon B-S, Yavetz H, Schreiber L, Paz G. Immunohistochemistry in the evaluation of spermatogenesis and Sertoli cell's maturation status. *Clin Chem Lab Med*, 2002; 40: 217-220.
36. Nakai M, Van Cleeff J.K, Bahr J.M. Stages and duration of spermatogenesis in the domestic ferret (*Mustela putorius furo*). *Tissue Cell* 2004; 36: 439-446.
37. Özer A, Özfiliz N, Erdost H, Zık B. *Veteriner Embriyoloji*. 3. Basım, Eylül 2007.
38. Blonco-Rodriguez. DNA replication and germ cell apoptosis during spermatogenesis in the cat. *Journal Androl*, 2002; 23: 4.
39. Chrenek P, Makarevich AV, Kubovicova E, Pivko J. Morphology of testes from transgenic rabbits: Histological and ultrastructural aspects. *Anat Histol Embryol*, 2010; 39: 27-33.
40. Franca L.R, Godinho C.L. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol Reprod*, 2003; 68: 1554-1561.
41. Guo R, Yu Z, Guan J, Ge Y, Ma J, Li S, Wang S, Xue S, Han D. Stage- specific and tissue-specific expression characteristics of differentially expressed genes during mouse spermatogenesis. *Molecular Reprod Develop*, 2004; 67: 264-272.
42. Haeussler S, Wagner A, Welter H, Claus R. Changes of testicular aromatase expression during fetal development in male pigs (*sus scrofa*). *Reproduction*, 2007; 133: 323-330.
43. Osman DI. A comparative ultrastructural study on typical and modified Sertoli cells before and after ligation of the efferent ductules in the rabbit. *Anat Histol Embryol*, 1979; 8: 114-123.
44. Swierstra E.E, Foote RH. Cytology and kinetics of spermatogenesis in the rabbit. *J Reprod Fertil*, 1963; 5: 309-322.

45. Fawcett DW, Neaves WB, Flores MN. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol Reprod*, 1973; 9: 500-532.
46. Shweiki D, Itin A, Neufeld G, Gitay-Goren H, Keshet E. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J Clin Invest*, 1993; 91: 2235-2243.
47. Gondos B, Renston RH, Goldstein DA. Postnatal differentiation of Leydig cells in the rabbit testis. *Am J Anat* 1976; 145: 167-181.
48. Gondos B, Morrison KP, Renston RH. Leydig cell differentiation in the prepubertal rabbit testis. *Biol Reprod*, 1977; 17: 745-748.
49. Maharaj ASR, Saint-Geniez, Maldonado AE, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor localization in the adult. *Am J Pathol*, 2006; 168: 639-648.
50. Nicander L. On the regional histology and cyto chemistry of the ductus epididymidis in rabbits. *Acta Morphol Neerl Scand*, 1957; 1: 99-118.
51. Cornwall G.A. New insight into epididymal biology and function. *Human Reprod Update*, 2009; 15: 213-227.
52. Palacios J, Regadera J, Paniagua R, Gamallo C, Nistal M. Immunohistochemistry of the human ductus epididymis. *Anat Rec*, 1993; 235: 560-566.
53. Nieminen T, Toivanen PI, Rintanen N, Heikura T, Jauhainen S, Airene KJ, Alitalo K, Marjomaki V, Yla-Herttuala S. The impact of the receptors binding profiles of the vascular endothelial growth factors on their angiogenic features. *Biochem Biophysica Acta*, 2004; 1840: 454-463.
54. Reddy N, Kasukurthi KB, Mahla RS, Pawar RM, Goel S. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) transcript and protein in the testis of several vertebrates, including endangered species. *Theriogenology*, 2012; 608-614.
55. Reisinger K, Baal N, McKinnon T, Münstedt K, Zygmunt M. The gonadotropins: Tissue-specific angiogenic factors? *Molecular Cell Endocrinol*, 2007; 269: 65-85.
56. Roy H, Bhardwaj S, Yla-Herttuala H. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Letters*, 2006; 2879-2887.

57. Tjwa M, Aernout L, Autiero M, Carmaliet P. VEGF and PlGF: two pleiotrophic growth factors with distinct roles in development and homeostasis. *Cell Tissue Res*, 2003; 314: 5-14.
58. Wagener A, Blottner S, Göritz F, Fickel J. Detection of growth factors in the testis of roe deer (*Capreolus capreolus*). *Animal Reprod Sci*, 2000; 64: 65-75.
59. Haggström R, Winkström P, Jonsson A, Collin O, Bergh A. Hormonal regulation and function role of vascular endothelial growth factor A in the rat testis. *Biol Reprod*, 2004; 70: 340-347.
60. Palacios J, Regadera J, Paniagua R, Gamallo C, Nistal M. Immunohistochemistry of the human ductus epididymis. *Anat Rec*, 1993; 235: 560-566.
61. Cupp A.S, Bott R.C, Pohlmann R.M, Ten Broeck R.A, Clopton D.T. Vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms may regulate sex-specific vascular development, cord formation and follicle progression in developing gonads. Animal Science Department. Faculty Papers and Publications in Animal Science. University of Nebraska-Lincoln, 2008.
62. Hashimoto H, Ishikawa T, Yamaguchi K, Shiotani M, Fujisawa M. Experimental ischemia-reperfusion injury induces vascular endothelial growth factor expression in the rat testis. *Andrologia*, 2009; 41: 216-221.
63. Hiratsuka S, Kataoka Y, Nakao K et al. Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) is involved in guidance of VEGF receptor-positive cell to the anterior portion of early embryos. *Molecular Cell Biol*, 2005; 25: 355-363.
64. Longo R, Sarmiento R, Fanelli M. Anti-angiogenic therapy: Rationale, challenges and clinical studies. *Angiogenesis*, 2002; 5: 237-256.
65. Korpelainen EI, Karkkainen MJ, Tenhunen A, Lakso M, Rauvalla H, Vierula M, Parvinen M, Alitalo K. Overexpression of VEGF in testis and epididymis causes infertility in transgenic mice: Evidence for nonendothelial targets for VEGF. *J Cell Biol*, 1998; 1705-1712.
66. Petrova TV, Makinen T, Alitalo K. Signalling via vascular endothelial growth factor receptors. *Experimental Cell Res*, 1999; 253: 117-130.
67. Shirahishi K. Involvement of vascular endothelial growth factor on spermatogenesis in testis with varicocele. *Fertil Steril*, 2008; 90: 1313-1316.

68. Ebisch I.M.W, Thomas C.M.G, Wetzels A.M.M et al. Review of the role of the plasminogen activator system and vascular endothelial growth factor in subfertility. *Fertil Steril*, 2008; 90: 2340-2350.
69. Shayu D, Rao A.J. Expression of functional aromatase in the epididymis: Role of androgens and LH in modulation of expression and activity. *Molecular Cell Endocrinol*, 2006; 249: 40-50.
70. Borg C.L, Wolski K.M, Gibbs G.M, O'Bryan M.K. Phenotyping male infertility in the mouse: how to get the most out of a 'non-performer'. *Hum Reprod Update*, 2009; 1: 1-20.
71. Bott R.C, Clopton D.T, Cupp A.S. A proposed role for VEGF isoforms in sex-specific vasculature development in the gonad. *Reprod Domestic Anim*, 2008; 43: 310-316.
72. Obermair A, Obruca A, Pöhl M, Kaider A, Vales A, Leodolter S, Wojta J, Feichtinger. Vascular endothelial growth factor and its receptors in male fertility. *Fertil Steril*, 1999; 72: 269-275.
73. Ross A.J, Capel B. Signaling at the crossroads of gonad development. *Trends Endocrinol Metabol*, 2005, 16: 19-25.
74. Caires C.K, Avila J, McLean D.J. Vascular endothelial growth factor regulates germ cell survival during of spermatogenesis in the bovine testis. *Reproduction*, 2009; 138: 667-677.
75. Le Couter J., Lin R., Tejada M., Frantz G., Peale F., Hillan K.J. And Ferrara N. The endocrine-gland-derived VEGF homologue Bv8 Promotes angiogenesis in the testis: Localization of Bv8 receptors to endothelial cells. *PNAS*, 2003; 100: 2685-2690.
76. Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol*, 1999; 9: 211-220.
77. Wrobel KH. Male Reproductive System. In Delmann H.D., Eurell J.A.(Eds). *Textbook of Veterinary Histology* 5th Ed. Williams and Wilkins, Pennsylvania, USA, 1998; pp.226-235.
78. Qui Y, Hoareau-Aveilla C, Oltean S, Harper S.J, Bates D.O. The angiogenic isoforms of VEGF in health and disease. *Biochem Soc Trans*, 2009; 37: 1207-1213.

79. Anand R.J.K., Paust H.J, Altenpohl K. Mukhopadhyay A.K. Regulation of vascular endothelial growth factor production by Leydig Cells In Vitro: The Role of Protein Kinase A and Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade. *Biol Reprod*, 2003; 68: 1663-1673.
80. Bott RC, McFee RM, Clapton DT, Toombs C, Cupp AS. Vascular endothelial growth factor and kinase domain region receptor are involved in both seminiferous cord formation and vascular development during testis morphogenesis in the rat. *Biol Reprod*, 2006; 75: 56-67.
81. Yoshida A, Anand-Apte B. Zetter B.R. Differential endothelial migration and proliferation to basic fibroblast growth and vascular endothelial growth factor. *Growth Factors*, 1996; 13: 57-64.
82. Garcia-Tomas M, Sanchez J, Piles M. Postnatal sexual development of testis and epididymis in the rabbit: Growth and maturity patterns of macroscopic and microscopic markers. *Theriogenology*, 2009; 71: 292-301.
83. Gist D.G, Bradshaw S, Morrow C.M.K, Congdon J.D, Hess R.A. Estrogen response system in the reproductive tract of the male turtle: An immunocytochemical study. *General Comparative Endocrinol.*, 2007; 151: 27-33.
84. Carreau S, Silandre D, Bois C, Bouraima H, Galeraud-Denis I, Delalande C. Estrogens: A new player in spermatogenesis. *Folia Histochem Cytobiol.*, 2007; 45: 5-10.
85. Schwarzenbach H, Chakrabarti G, Paust H.J, Mukhopadhyay A.K. Gonadotropin-mediated regulation of the murine VEGF expression MA-10 Leydig cell. *J Androl*, 2004; 25: 128-139.
86. Carreau S, Silandre D, Bourguiba S, Hamden K, Said L, Lambard S, Galeraud-Denis I. Delalande C. Estrogens and male reproduction: a new concept. *Brazilian J Medical Biol Res*, 2007; 40: 761-768.
87. Altunbaş K. Deneysel Diyabetli Farelerin Testisinde Epidermal Growth Faktör (EGF) Reseptörünün İmmunohistokimyasal Lokalizasyonu, Bursa-2002.
88. Carreau S, Lambard S, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bilinska B. Bourguiba S. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. *Reprod Biol Endocrino*, 2003; 1: 35.

89. Carreau S, De Vienne C, Galeraud-Denis I. Aromatase and estrogens in man reproduction: a review and latest advances. *Advances in Medical Sciences*, 2008; 53: 139-144.
90. Conley A.J, Corbin C.J, Hinshelwood M.M, Liu Z, Simpson E.R, Ford J.J, Harada N. Functional aromatase expression in porcine adrenal gland and testis. *Biol Reprod*, 1996; 54: 497-505.
91. Belgorosky A, Guercio G, Pepe C, Saraco N, Rivarola M.A. Genetic and clinical spectrum of aromatase deficiency in infancy, childhood and adolescence. *Hormone Res*, 2009; 9: 321-330.
92. Hamden K, Silandre D, Delalande C, El Feki A, Carreau S. Age-related decrease in aromatase and estrogen receptor (ER α and ER β) expression in rat testes: protective effect of low caloric diets. *Asian J Androl*, 2008; 10: 177-187.
93. Carreau S, Delalande C, Silandre D, Bourguiba S, Lambard S. Aromatase and estrogen receptors in male reproduction. *Mol Cell Endocrinol*, 2006; 246: 65-68.
94. Holash J.A, Harik S.I, Perry G, Stewart P.A. Barrier properties of testis microvessels. *Proc Natl Acad Sci*, 1993; 90: 11069-11073.
95. Otrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: Review. *Blood Cell Mol Dis*, 2007; 38: 258-268.
96. Jones R, Hamilton DW, Fawcett DW. Morphology of the epithelium of the extratesticular rete testis, ductuli efferentes and ductus epididymidis of the adult male rabbit. *Am J Anat*, 1979, 156; 373-400.
97. Liman N, Alan E, Beyaz F, Gürbulak K. Endothelial and inducible nitric oxide synthase (NOS) immunoreactivity and NOS-associated NADPH-diaphorase histochemistry in the domestic cat (*Felis catus*) testis. *Theriogenology*, 2013, 80; 1017-1032.
98. Beyaz F, Küçük Bayram G, Alan E. Pre-pubertal ve pubertal dönemlerde Ankara tavşanı testis ve epididimislerinde S100 proteininin immunohistokimyasal lokalizasyonu, *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 2008, 5; 79-84.
99. Beyaz F, Küçük Bayram G, Alan E. Tavşan testis ve epididimisinde makrofajların immunohistokimyasal lokalizasyonu, *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 2009, 6; 97-103.

- 100.Beyaz F, Küçük Bayram G, Alan E. Vimentin, sitokeratin, α -SMA ve desmin'in Yeni Zellanda tavşanı testis ve epididimisindeki immunohistokimyasal ekspresyonu, Erciyes Üniv Vet Fak Derg, 2009, 6; 111-119.
- 101.Turner TT, Bomgardner D, Jacops JP, Nguyen QAT. Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. Reproduction, 2003, 125; 871-878.
- 102.Joseph A, Shur BD, Hess RA. Estrogen, efferent ductules, and the epididymis. Biol Reprod, 2011, 84; 207-217.
- 103.Mital P, Hinton BT, Dufour JM. The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. Biol Reprod, 2011, 84: 851-858.
- 104.Yoon SI, Park CJ, Nah WH, Gye MC. Expression of occluding in testis and epididymis of wild rabbits, *lepus sinensis coreanus*. Reprod Dom Anim, 2009, 44; 745-750.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Nilgün ANTEPLİ

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 10 Eylül 1977, Kayseri

Medeni Durumu: Evli

Tel: 0532 578 26 02

email: nilgundilbazz@hotmail.com

Yazışma Adresi: İl Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü / Gıda ve Yem Şubesi

Yeni Mahalle 7. Cad. No:57 38090 Kocasinan/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	EÜ Veteriner Fakültesi	2000
Lise	Kayseri Lisesi, Kayseri	1994

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2007- Halen	İl Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü – Gıda Ve Yem Şubesi Kayseri	Veteriner Hekim
2005–2007	Şen Piliç Bölge Bayiliği-Kayseri	Veteriner Hekim-Sorumlu Yönetici
2001-2005	Animed Veteriner Kliniği-Kayseri	Veteriner Hekim-Sorumlu Yönetici
2000-2001	İmamoğlu Sucukları-Kayseri	Veteriner Hekim-Sorumlu Yönetici

YABANCI DİL

İngilizce