



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**RAT (WİSTAR ALBİNO) TESTİS VE EPİDİDİMİSİNİN POSTNATAL
GELİŞİMİ VE EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ İLE
LİGANDLARININ GELİŞİMSEL VE SPERMATOGENİK SIKLUSA
BAĞLI EKSPRESYONLARI ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR**

Yahy Abood Kareem ALESAWİ

**VETERİNERLİK HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Emel ERGÜN**

**ANKARA
2026**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü' ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Rat (Wistar albino) Testis ve Epididimisinin Postnatal Gelişimi ve Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü ile Ligandlarının Gelişimsel ve Spermatogenik Siklusa Bağlı Ekspresyonları Üzerinde Araştırmalar" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler ve yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Yahy Abood Kareem Alesawi

Tarih: 29. 01. 2026

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veterinerlik Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda

Yahy Abood Kareem Alesawi tarafından hazırlanan

“Rat (Wistar albino) Testis ve Epididimisinin Postnatal Gelişimi ve Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü ile Ligandlarının Gelişimsel ve Spermatogenik Siklusa Bağlı Ekspresyonları Üzerinde Araştırmalar” adlı

tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 29. 01. 2026

Prof. Dr. Hikmet ALTUNAY

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Aytül KÜRÜM

Kırıkkale Üniversitesi

Raportör

Prof. Dr. Hakan ÖZTÜRK

Ankara Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Siyami KARAHAN

Kırıkkale Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Emel ERGÜN

Ankara Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Rat (Wistar albino) Testis ve Epididimisinin Postnatal Gelişimi ve Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü ile Ligandlarının Gelişimsel ve Spermatogenik Siklusa Bağlı Ekspresyonları Üzerinde Araştırmalar

Bu çalışma, farklı postnatal gelişim aşamalarındaki Wistar albino ratların testis ve epididimis dokularının gelişimini inceleyerek, epidermal büyüme faktörü reseptörü EGFR (erbB1, HER1) ile ligandları olan amfiregulin (AREG), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü alfa (TGF- α)'nın gelişimsel ve hücreye özgü ekspresyonlarını belirlemeyi amaçlamıştır. Ayrıca, spermatogenik siklus süresince testisteki hücre tiplerinin bu moleküllerle ilişkileri değerlendirilmiştir.

Çalışmada, dört farklı postnatal gelişim aşamalarındaki Wistar albino ratın testis ve epididimis dokuları materyal olarak kullanılmıştır. Her biri altı rattan oluşan bu gruplar; neonatal (postnatal 5 günlük, PND5), infantil (postnatal 20 günlük, PND20), geç pubertal (postnatal 50 günlük, PND50) ve olgun (postnatal 70 günlük, PND70) olarak düzenlenmiştir. Testis ve epididimisin histomorfolojik gelişimi Periyodik Asit Schiff (PAS) ve Crossmon'un modifiye üçlü boyama yöntemleriyle, ayrıca yarı ince kesitlere uygulanan Toluidin mavisi boyası ile değerlendirilmiştir. Epididimisin başlangıç segmenti, kaput, korpus ve kauda bölgeleri ile testisin seminifer tubuluslarından alınan kesitlerde EGFR, AREG, EGF ve TGF- α 'nın hücresel ve segmental ekspresyonlarındaki yaşa bağlı değişimler, Leydig hücrelerine özgü steroidojenik bir enzim olan CYP11A1'in lokalizasyonu ile birlikte araştırılmıştır. Tüm immunohistokimyasal boyamalar Streptavidin-Biotin Kompleks (Strept-ABC) immunperoksidad yöntemi ile gerçekleştirilmiş; elde edilen veriler semikantitatif olarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Semikantitatif immunreaktivite skorları medyan ve aralık (minimum–maksimum) değerleri ile özetlenmiştir. Postnatal dönemler arasındaki farklılıklar Kruskal–Wallis testi ile; aynı yaş grubundaki epididimis segmentleri arasındaki karşılaştırmalar ise Friedman testiyle değerlendirilmiştir.

Bulgular, EGFR ve ligandlarının testis ve epididimis dokularında hücre tipi ve gelişim dönemine özgü farklı ekspresyon paternleri sergilediğini göstermiştir. Testiste EGFR özellikle Sertoli, peritubular myoid ve damar düz kas hücrelerinde belirgin, Leydig hücrelerinde ise daha zayıf düzeyde saptanmıştır. EGF ve AREG güçlü şekilde Leydig hücrelerinde eksprese olurken, TGF- α spermatidlerde evreye bağlı pozitiflik göstermiştir. Epididimiste EGFR bazal ve şeffaf hücrelerde belirgin pozitiflik sergilemiş; EGF ve TGF- α yalnızca geç pubertal ve olgun dönemlerde kaput epitelinde ekspresyon göstermiştir. AREG ise epididimis boyunca bazal ve şeffaf hücrelerde pozitiflik göstermesine rağmen gelişim dönemleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik sergilememiştir. Testiste EGF, EGFR, TGF- α ve AREG ekspresyonlarının dönemsel karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Epididimis dokusunda ise yalnızca kaput segmentinde EGF ve TGF- α ekspresyonu geç pubertal–olgun dönemlerde anlamlı düzeyde artmış (her ikisi için $p = 0,043$) ve segment karşılaştırmalarında kaputun diğer segmentlere kıyasla daha yüksek pozitiflik gösterdiği belirlenmiştir (her ikisi için $p = 0,01$). EGFR açısından epididimis segmentleri ve gelişim dönemleri arasında anlamlı bir fark izlenmemiştir.

Sonuç olarak, EGF ailesi üyelerinin testis ve epididimis dokularında hücreler arası etkileşimler ile postnatal gelişimle ilgili bölgesel düzenleme süreçlerinde rol oynayabileceği düşünülmektedir. Elde edilen bulgular, özellikle epididimis dokusundaki büyüme faktörlerinin segmental ve hücresel dağılımına ilişkin literatürdeki sınırlı bilgiyi genişletmekte ve EGF ailesi üyelerinin postnatal erkek genital sistemin gelişimindeki olası rollerine ışık tutmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü, Epididimis, Ligandlar, Rat, Testis

SUMMARY

Investigations on Postnatal Development of Testes and Epididymis of Rat (Wistar albino) and Developmental and Spermatogenic Cycle-Related Expressions of Epidermal Growth Factor Receptor and Ligands

This study aimed to investigate the development of testicular and epididymal tissues in Wistar albino rats at different postnatal stages and to identify the developmental and cell-specific expression patterns of the epidermal growth factor receptor EGFR (erbB1, HER1) and its ligands amphiregulin (AREG), epidermal growth factor (EGF), and transforming growth factor- α (TGF- α). In addition, the relationships of these molecules with the various testicular cell types throughout the spermatogenic cycle were evaluated.

The study utilized testicular and epididymal tissues obtained from Wistar albino rats representing four distinct postnatal developmental stages, with six rats in each group: neonatal (postnatal day 5, PND5), infantile (postnatal day 20, PND20), postpubertal (postnatal day 50, PND50), and adult (postnatal day 70, PND70). The histomorphological development of the testis and epididymis was assessed using Periodic Acid–Schiff (PAS) staining, Crossmon's modified trichrome staining, and Toluidine blue staining applied to semi-thin sections. Age-related changes in the cellular and segmental expression of EGFR, AREG, EGF, and TGF- α were examined in sections taken from the seminiferous tubules and from the initial segment, caput, corpus, and cauda of the epididymis, together with the localization of CYP11A1, a steroidogenic enzyme specific to Leydig cells. All immunohistochemical procedures were performed using the Streptavidin–Biotin Complex (Strept-ABC) immunoperoxidase method, and the results were evaluated semi-quantitatively. Statistical analyses were conducted using SPSS software. Semi-quantitative immunoreactivity scores were summarized as median and range (minimum–maximum). Differences among postnatal periods were analyzed using the Kruskal–Wallis test, while comparisons among epididymal segments within the same age group were assessed using the Friedman test.

The findings demonstrated that EGFR and its ligands exhibit cell-type-specific and developmentally regulated expression patterns in testicular and epididymal tissues. In the testis, EGFR was prominently detected in Sertoli cells, peritubular myoid cells, and vascular smooth muscle cells, whereas weaker expression was observed in Leydig cells. EGF and AREG showed strong expression in Leydig cells, while TGF- α displayed stage-dependent positivity in spermatids. In the epididymis, EGFR showed marked positivity in basal and clear cells. EGF and TGF- α were expressed in the caput epithelium only during the postpubertal and adult periods. Although AREG was detected in basal and clear cells throughout the epididymis, its expression did not differ significantly among developmental stages. In the testis, no statistically significant differences were observed among postnatal periods in the expression of EGF, EGFR, TGF- α , or AREG. However, in the epididymis, expression of EGF and TGF- α in the caput segment increased significantly during the postpubertal and adult stages (both $p = 0.043$). Segmental comparisons also revealed that the caput exhibited higher positivity than the other regions ($p = 0.01$ for both factors). No significant differences were detected for EGFR among epididymal segments or developmental stages.

In conclusion, members of the EGF family may play roles in local regulatory processes and intercellular interactions involved in the postnatal development of testicular and epididymal tissues. The findings of this study expand the limited literature concerning the segmental and cellular distribution of growth factors in the epididymis and shed light on the potential roles of EGF family members in the postnatal development of the male reproductive system.

Keywords: Epidermal Growth Factor Receptor, Epididymis, Ligands, Rat, Testis

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiii

1. GİRİŞ

1.1. Erkek Genital Sistem	1
1.1.1. Testis Anatomisi	1
1.1.2. Testis Histolojisi	2
1.1.2.1. Tubulus Seminiferus Kontortus	3
1.1.2.2. Sertoli Hücreleri	4
1.1.2.2.1. Kan-Testis Bariyeri	5
1.1.2.3. Spermatogenezis	6
1.1.2.4. Spermatogenik Siklus	8
1.1.2.5. Spermatogenik Siklus Evreleri	10
1.1.3. Spermatozoonun Yapısı	13
1.1.4. İnterstisyel Doku	13
1.1.4.1. Leydig Hücreleri	13
1.1.5. Eşey Hücrelerini İleten Kanalcıklar	15
1.1.5.1. Tubulus Rektus	15
1.1.5.2. Rete Testis	16
1.1.5.3. Duktuli Efferentes	16
1.1.6. Epididimis	16
1.1.6.1. Prinsipal Hücreler	18
1.1.6.2. Kalem Hücreleri	19
1.1.6.3. Apikal Hücreler	19
1.1.6.4. Şeffaf Hücreler	20
1.1.6.5. Halo Hücreleri	20
1.1.6.6. Bazal Hücreler	21
1.1.6.7. Kan-Epididimis Bariyeri	21
1.1.7. Duktus Deferens	22
1.1.8. Testis ve Epididimisin Embriyolojik Gelişimi	22
1.2. Büyüme Faktörleri	26
1.2.1. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR)	28
1.2.2. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)	30
1.2.3. Amfiregulin (AREG)	31
1.2.4. Dönüştürücü Büyüme Faktörü Alfa (TGF- α)	31

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyali	33
2.2. Histokimyasal İncelemeler	34
2.3. Yarı İnce Kesitlerin Elde Edilmesi ve İncelenmesi	34

2.4. İmmunohistokimyasal İncelemeler	34
2.5. İmmunohistokimyasal Boyamaların Değerlendirilmesi	36
3. BULGULAR	37
3.1. Testisin Yapısal Özellikleri	37
3.1.1. Neonatal Dönem	38
3.1.2. İnfantil Dönem	38
3.1.3. Geç Pubertal Dönem	39
3.1.4. Olgun Dönem	40
3.2. Epididimis	40
3.2.1. Neonatal Dönem	40
3.2.2. İnfantil Dönem	42
3.2.3. Geç Pubertal Dönem	44
3.2.4. Olgun Dönem	47
3.3. Leydig Hücreleri	50
3.4. Spermatogenik Siklus Evreleri	52
3.5. İmmunohistokimyasal Bulgular	54
3.5.1. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) Ekspresyonu	54
3.5.1.1. Testis	55
3.5.1.2. Epididimis	56
3.5.2. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) Ekspresyonu	62
3.5.2.1. Testis	63
3.5.2.2. Epididimis	64
3.5.3. Amfiregulin (AREG) Ekspresyonu	69
3.5.3.1. Testis	70
3.5.3.2. Epididimis	70
3.5.4. Dönüştürücü Büyüme Faktörü Alfa (TGF- α) Ekspresyonu	76
3.5.4.1. Testis	77
3.5.4.2. Epididimis	80
4. TARTIŞMA	86
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	99
KAYNAKLAR	101
EKLER	122
Ek-1 Etik Kurul Onayı	122
ÖZGEÇMİŞ	124

ÖNSÖZ

Testisler, erkek üreme sisteminin başlıca işlevsel organları olup gametogenez ve steroidogenezden sorumludur. Testislerde üretilen spermatozoonlar, epididimis boyunca geçirdikleri olgunlaşma süreci sonucunda fertilizasyon yeteneği kazanır. Bu nedenle epididimis, spermilerin depolanması, taşınması ve fonksiyonel olgunlaşması için önemlidir.

Büyüme faktörleri, birçok dokuda olduğu gibi üreme sisteminde de hücrel proliferasyon, farklılaşma ve doku homeostazisinde önemli roller üstlenmektedir. Bu faktörler arasında epidermal büyüme faktörü (EGF) ile onun reseptörü EGFR ve ilişkili ligandlar olan dönüştürücü büyüme faktörü alfa (TGF- α) ve amfiregulin (AREG), reseptör tirozin kinaz aktivasyonu yoluyla hücrel iletişim ve doku morfogenezini yönlendiren temel bir sinyal ağı oluşturur. Ancak bu moleküllerin testis ve epididimis dokularındaki gelişimsel rolleri, özellikle postnatal dönemler açısından yeterince aydınlatılamamıştır.

Bu tez çalışmasında Wistar albino erkek ratların farklı postnatal dönemlerinde (neonatal, infantil, geç pubertal, olgun) testis ve epididimis dokularının gelişimi incelenmiş; EGFR (erbB1/HER1) ile ligandları AREG, EGF ve TGF- α 'nın hücrel ve segmental ekspresyon paternleri değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, bu moleküllerin testiküler ve epididimal gelişimdeki potansiyel rollerine ışık tutmaktadır.

Danışmanım, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Emel ERGÜN'e, doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince bana akademik bilgisi ve tecrübesiyle rehberlik ettiği için teşekkür ederim.

Ayrıca tez izleme komitesinde yer alarak bana yönlendirme ve rehberlik eden Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Hikmet ALTUNAY'a; Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. HAKAN ÖZTÜRK'e, Prof. Dr. Nevin KURTDEDE'ye, Prof. Dr. Alev Gürol BAYRAKTAROĞLU'na, Doç.Dr. Ahmet CEYLAN'a ve İstatistik Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr. Doğukan ÖZEN'e, değerli hocalarıma ve meslektaşlarıma da teşekkür ederim.

Sevgili babam Abood'a minnettarım; her zaman bana destek olmuş, bugüne ulaşmam için maddi ve manevi olarak büyük fedakârlıklar göstermiştir.

Tezimin gerçekleştirilmesinde maddi destek sağlayan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'ne teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABP	Androjen Bağlayıcı Protein
ADAM	Disintegrin İçeren ve Metalloproteinaz Aktivitesi Olan Protein Ailesi
AEC	3-Amino-9-Etilkarbazol
AGTR2	Anjiyotensin II Tip 2 Reseptörü
ALC	Erişkin Leydig Hücresi
AMH	Anti-Müllerian Hormon
AREG	Amfiregulin
BMP-4	Kemik Morfogenetik Protein 4
CNTF	Silyer Nörotrofik Faktör
CYP11A1	Sitokrom P450 Ailesi 11 Alt Aile A Üyesi1
CYP17A1	Sitokrom P450 Ailesi 17 Alt Aile A Üyesi1
DHH	Desert Hedgehog
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ERK	Ekstraselüler Sinyalle Düzenlenen Kinaz
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FLC	Fötal Leydig Hücresi
GM-CSF	Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
HB-EGF	Heparin-Bağlayıcı EGF
HSD17B3	17 β -Hidroksisteroid Dehidrogenaz
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
INSL3	İnsülin Benzeri Peptit 3
JNK	C-Jun Amino Terminal Kinaz
LIF	Lösemi İnhibitör Faktörü
MAPK	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz

μm	Mikrometre
NGF	Sinir Büyüme Faktörü
PACAP	Hipofiz Adenilat Siklaz Aktive Edici Polipeptit
PAS	Periyodik Asit Schiff
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PDGF	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PND	Postnatal Gün
STAR	Steroidojenik Akut Düzenleyici Protein
Strept- ABC	Streptavidin Biotin Kompleks
TDF	Testis Belirleyici Faktör
TGF- α	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Alfa
TGF- β	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta
V-ATPaz	Vakuolar H ⁺ -ATP Enzimi
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Testisin yapısı	3
Şekil 1.2. A. Rat testisinde 14 spermatogenez evresi, B. Rat seminifer tubul epitelinde spermatogenik hücrelerin gelişimsel evreleri	9
Şekil 1.3. A. Vitellus kesesi duvarında bulunan primordiyal eşey hücreleri B. Primordiyal eşey hücrelerinin, arka bağırsak ve dorsal mezenter boyunca, krista genitalise (genital çıkıntı) göçü	24
Şekil 2.1. Çalışma gruplarına ait testisler	33
Şekil 3.1. Neonatal döneme ait testis kesitleri	37
Şekil 3.2. İnfantil döneme ait testis kesitleri	38
Şekil 3.3. Geç pubertal döneme ait testis kesitleri	39
Şekil 3.4. Olgun döneme ait testis kesitleri	40
Şekil 3.5. Neonatal döneme ait epididimis kesitleri	41
Şekil 3.6. İnfantil döneme ait epididimis kesitleri	43
Şekil 3.7. Geç pubertal döneme ait epididimis kesitleri	47
Şekil 3.8. Olgun döneme ait epididimis kesitleri	49
Şekil 3.9. Neonatal dönem rat testisinde Leydig hücrelerinin morfolojik ve immunohistokimyasal özellikleri	51
Şekil 3.10. Farklı gelişim dönemlerine ait rat testislerinde Leydig hücrelerinin dağılımı	52
Şekil 3.11. Rat testisinde seminifer tubul epitelinde tanımlanan spermatogenik siklusun 14 evresine ait mikroskopik görüntüler	54
Şekil 3.12. EGFR immunohistokimyasal boyamasına ait kontrol kesitleri	55
Şekil 3.13. Farklı postnatal dönemlerde rat testisinde EGFR immunohistokimyasal boyaması	56
Şekil 3.14. Neonatal döneme ait epididimis bölgelerinde EGFR immunohistokimyasal boyaması	57
Şekil 3.15. İnfantil döneme ait epididimis bölgelerinde EGFR immunohistokimyasal boyaması	58
Şekil 3.16. Geç pubertal döneme ait epididimis bölgelerinde EGFR immunohistokimyasal boyaması	58
Şekil 3.17. Olgun döneme ait epididimis bölgelerinde EGFR immunohistokimyasal boyaması	59
Şekil 3.18. Testiste EGFR ekspresyonuna ait dönemsel karşılaştırma grafiği ($p = 0,805$)	61
Şekil 3.19. Her bir gelişim dönemi içinde epididimis segmentlerine ait EGFR immunreaktivite yoğunluklarının karşılaştırılma grafiği ($p > 0,05$)	61
Şekil 3.20. Epididimis segmentlerinde postnatal gelişim dönemlerine ait EGFRimmunreaktivite yoğunluklarının karşılaştırılma grafiği ($p > 0,05$)	62
Şekil 3.21. EGF immunohistokimyasal boyamasına ait kontrol kesitleri	62
Şekil 3.22. Farklı postnatal dönemlerde rat testisinde EGF immunohistokimyasal boyaması	63
Şekil 3.23. Neonatal dönemde rat epididimisinde EGF immunohistokimyasal boyaması	64
Şekil 3.24. İnfantil dönemde rat epididimisinde EGF immunohistokimyasal boyaması	65
Şekil 3.25. Geç pubertal dönemde rat epididimisinde EGF immunohistokimyasal boyaması	65
Şekil 3.26. Olgun dönemde rat epididimisinde EGF immunohistokimyasal boyaması	66
Şekil 3.27. Testiste EGF ekspresyonuna ait dönemsel karşılaştırma grafiği ($p = 1,000$)	68
Şekil 3.28. Kaput segmentinde EGF ekspresyonunun postnatal gelişim dönemleri arasında karşılaştırılma grafiği ($p = 0,043$)	68

Şekil 3.29. Geç pubertal ve olgun dönemlerde epididimis segmentleri arasında EGF ekspresyonunun karşılaştırılma grafiği ($p = 0,01$)	69
Şekil 3.30. AREG immunohistokimyasal boyasına ait kontrol kesitleri	69
Şekil 3.31. Farklı postnatal dönemlerde rat testisinde AREG immunohistokimyasal boyaması	70
Şekil 3.32. Neonatal dönemde rat epididimisinde AREG immunohistokimyasal boyaması	71
Şekil 3.33. İnfanıl dönemde rat epididimisinde epididimis AREG immunohistokimyasal boyaması	72
Şekil 3.34. Geç pubertal dönemde rat epididimisinde AREG immunohistokimyasal boyaması	72
Şekil 3.35. Olgun dönemde rat epididimisinde AREG immunohistokimyasal boyaması	73
Şekil 3.36. Testiste AREG ekspresyonunun dönemsel karşılaştırılma grafiği ($p = 1,000$)	75
Şekil 3.37. Epididimis segmentlerinde AREG ekspresyonunun postnatal gelişim dönemleri arasında karşılaştırılma grafiği ($p > 0,05$)	75
Şekil 3.38. Her bir postnatal dönemde epididimis segmentleri arasında AREG ekspresyonunun karşılaştırılma grafiği ($p > 0,05$)	76
Şekil 3.39. TGF- α immunohistokimyasal boyamasına ait kontrol kesitleri	76
Şekil 3.40. Neonatal ve infanıl döneme ait testis dokusunda TGF- α immunohistokimyasal boyaması	77
Şekil 3.41. Geç pubertal döneme ait testis dokusunda TGF- α immunohistokimyasal boyaması	78
Şekil 3.42. Olgun döneme ait testis dokusunda TGF- α immunohistokimyasal boyaması	79
Şekil 3.43. Neonatal dönemde rat epididimisinde TGF- α immunohistokimyasal boyaması	80
Şekil 3.44. İnfanıl dönemde rat epididimisinde TGF- α immunohistokimyasal boyaması	81
Şekil 3.45. Geç pubertal dönemde rat epididimisinde TGF- α immunohistokimyasal boyaması	81
Şekil 3.46. Olgun dönemde rat epididimisinde TGF- α immunohistokimyasal boyaması	82
Şekil 3.47. Testiste TGF- α ekspresyonunun dönemsel karşılaştırılma grafiği ($p = 0,863$)	84
Şekil 3.48. Epididimis kaput segmentinde postnatal gelişim dönemleri arasında TGF- α ekspresyonunun karşılaştırılma grafiği ($p = 0,043$)	84
Şekil 3.49. Geç pubertal ve olgun dönemlerde epididimis segmentleri arasında TGF- α ekspresyonunun karşılaştırılma grafiği ($p = 0,01$)	85

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan primer antikorlar ve özellikleri	35
Çizelge 3.1. Testis ve epididimiste EGFR ekspresyonunun postnatal gelişim dönemlerine göre hücresel ve segmental dağılımının semikantitatif değerlendirmesi	60
Çizelge 3.2. Testis ve epididimiste EGF ekspresyonunun postnatal gelişim dönemlerine göre hücresel ve segmental dağılımının semikantitatif değerlendirmesi	67
Çizelge 3.3. Testis ve epididimiste AREG ekspresyonunun postnatal gelişim dönemlerine göre hücresel ve segmental dağılımının semikantitatif değerlendirmesi	74
Çizelge 3.4. Testis ve epididimiste TGF- α ekspresyonunun postnatal gelişim dönemlerine göre hücresel ve segmental dağılımının semikantitatif değerlendirmesi (Spermatidler evrelere göre sınıflandırılmıştır: erken = adım 1–8, orta = adım 9–14, geç = adım 15–19)	83

1. GİRİŞ

1.1. Erkek Genital Sistem

Erkek genital sistemi; spermatozoonların üretimi, olgunlaşması ve taşınmasının yanı sıra, cinsel gelişim ile endokrin fonksiyonların sürdürülmesi için gerekli hormonların sentez ve salgılanmasından sorumlu organlardan oluşur. Bu sistemin dış yapılarından biri olan penis, çiftleşmeyi sağlamakla birlikte, idrar ve ejakulatın atılımında görevli üretrayı da barındırır. Skrotum ise testisleri çevreleyen deri ve kas katmanlarından oluşan bir kesedir (Gadea vd., 2013; Gurung vd., 2023; Ross ve Pawlina, 2011).

Üreme sisteminin temel organı olan testis, iki ana biyolojik işlev yürütür: spermatogenez yoluyla spermatozoonların üretimi ve steroidogenez aracılığıyla başta testosteron olmak üzere androjenlerin sentezi. Testosteron, embriyonik dönemde erkek fenotipinin oluşumunda belirleyici rol oynarken (Özer vd., 2007; Ross ve Pawlina, 2011), pubertal dönemdeki artışı spermatogenezin başlamasını, genital kanallar ile yardımcı bezlerin fonksiyonel olgunlaşmasını ve sekonder cinsiyet özelliklerinin gelişimini uyarır. Erişkin dönemde ise testosteron hem sperm üretiminin sürekliliği hem de erkek genital sisteminin yapısal ve işlevsel bütünlüğünün korunması için zorunludur (Ross ve Pawlina, 2011).

Spermatozoonların olgunlaşması ve hareket yeteneği kazanması epididimiste gerçekleşir. Burada olgunlaşan spermler, duktus deferens aracılığıyla taşınarak yardımcı genital bezlerin (seminal veziküller, prostat ve bulbouretral bezler) salgılarıyla birleşir ve ejakulatı oluşturur (Ergün, 2010; Gadea vd., 2013; Ross ve Pawlina, 2011; Standring, 2021).

1.1.1. Testis Anatomisi

Embriyolojik gelişim sürecinde abdominal bölgede bulunan testisler, ratlarda doğumdan sonraki 4-6 hafta içinde skrotal bölgeye ulaşır. Kemirgenlerde kanalis inguinalis kapanmadığından, testis ile karın boşluğu arasında sürekli bir geçiş alanı bulunur; bu nedenle hayvanın cinsel olarak aktif olmadığı dönemlerde testisler geçici olarak abdominal boşluğa geri çekilebilir (Chawla ve Jena, 2021; Knoblaugh vd., 2018). Spermatogenezin sağlıklı bir şekilde sürdürülebilmesi için testislerin vücut sıcaklığından birkaç derece daha düşük bir ortamda bulunması gereklidir. Bu denge, m. kremaster kası ile plexus pampiniformis

aracılığıyla sağlanır. Plexus pampiniformis, testiküler arter çevresinde yer alan geniş bir venöz ağ yapısıdır ve arteriyel kanı testise ulaşmadan önce soğutarak sıcaklık homeostazına önemli ölçüde katkıda bulunur (Eşrefoğlu, 2021; Ross ve Pawlina, 2011).

Testisin arka yüzünde bulunan epididimis, baştan kuyruğa doğru uzanan kıvrımlı bir kanaldan oluşur. Kemirgen epididimisi insandaki epididimise kıyasla daha uzun olup, testise daha gevşek bağlarla tutunmuştur. Ratlarda özellikle kaput bölgesinin epididimal yağ yastığı ile çevrelendiği bildirilmiştir (Knoblaugh vd., 2018). Epididimisin kauda kısmı ise duktus deferens ile devam eder (Chawla ve Jena, 2021; Ergün, 2010; Knoblaugh vd., 2018; Ross ve Pawlina, 2011).

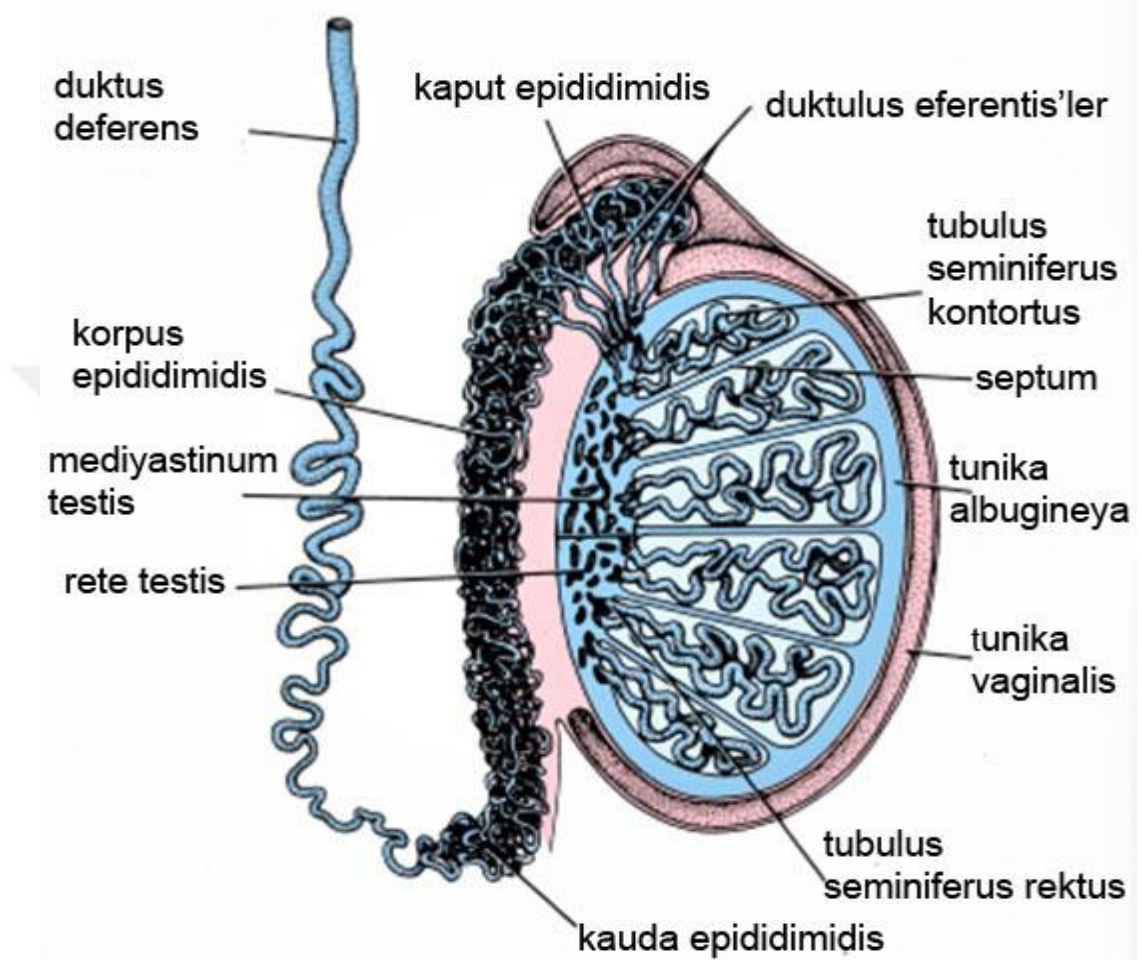
Testislerin arteriyel beslenmesi, abdominal aortadan ayrılan testiküler arterler aracılığıyla sağlanır. Venöz drenaj ise hem ısı değişimini düzenleyen hem de testiküler venlere açılan pampiniform plexus üzerinden gerçekleşir. Sağ testiküler ven vena cava inferior'a, sol testiküler ven ise sol renal vene drene olur. Organın lenfatik drenajı, para-aortik lenf nodlarına yönelir ve bu yolla doku sıvısı ile immun hücrelerin taşınımı sağlanır. Sinirsel innervasyon, sempatik ve parasempatik liflerden oluşur; bu lifler kan akışını ve hormonal sekresyonu düzenler (Kotian vd., 2016).

1.1.2. Testis Histolojisi

Testisin dış yüzeyi, peritonun viseral tabakasından türeyen ve organı dıştan saran tunika vaginalis ile örtülüdür. Bu zarın hemen altında, testise şeklini veren ve mekanik dayanıklılık sağlayan yoğun fibröz yapıdaki tunika albuginea bulunur. Albugineanın iç yüzeyi ise zengin damar ağı içeren tunika vaskuloza tarafından kaplanmıştır (Junqueira ve Carneiro, 2015; Ross ve Pawlina, 2011; Tiwana ve Leslie, 2023). Tunika albuginea arka bölgede belirgin biçimde kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur; damarlar, lenfatikler ve genital kanal yapıları testise bu bölgeden girip çıkış yapar (Ergün, 2010; Ross ve Pawlina, 2011) (Şekil 1.1.).

Kapsülden içeriye doğru uzanan bağ dokusu septaları, testis paraneşimini çok sayıda küçük lopçuğa ayırır. Bu lopçukların her biri, kıvrımlı tubulus seminiferus kontortuslar ile bunların arasındaki interstisyel dokudan oluşur. Seminifer tubuller mediastinuma yaklaştıkça daralarak kısa ve düz bir yapı oluşturan tubulus rektuslara dönüşür. Tubulus rektuslar, testisin merkezinde yer alan ve birbirleriyle bağlantılı kanalcıklardan oluşan rete testis ağına

açılır. Rete testis, henüz olgunlaşmamış spermatozoonların epididimise doğru yönlendirilmesinde görev alan bir geçiş bölgesidir (Bloom ve Fawcett, 1994; Mescher, 2016; Ross ve Pawlina, 2011).



Şekil 1.1. Testisin yapısı (Ross ve Pawlina, 2011’den uyarlanmıştır)

1.1.2.1. Tubulus Seminiferus Kontortus

Spermatogenezin gerçekleştiği seminifer tubuller (tubulus seminiferus kontortuslar), testisin lopçukları içerisinde yer alan ve oldukça kıvrımlanan kanalcıklardır. Her lopçukta birden fazla sayıda seminifer tubul bulunur. Tubul duvarını oluşturan seminifer epitel, Sertoli hücreleri ile farklı olgunlaşma evrelerindeki eşey hücrelerinin birlikte oluşturduğu çok katmanlı bir yapıya sahiptir ve epitel dıştan bir bazal membran ile sınırlanır. Bazal membranın dışında, düz kas hücrelerine benzer özellikler gösteren peritubular miyoid hücreler yer alır; bu hücreler aktin filamentleri aracılığıyla tubul lümenindeki testis sıvısının

ve gelişmekte olan spermatozoonların hareketine katkıda bulunur (Junqueira vd., 2018; Ross ve Pawlina, 2011).

Ayrıca bu myoid hücreler, ekstraselüler matriks bileşenleri ile çeşitli büyüme faktörlerini salgılayarak testiküler mikroçevrenin düzenlenmesine destek olur ve parakrin mekanizmalar üzerinden spermatogenez ile testis gelişimini etkiler (Hoeben vd., 1995; Maekawa vd., 1996). Seminifer tubuller arasındaki interstisyel alanda ise kan ve lenf damarlarına ek olarak immun hücreler (lenfositler, makrofajlar) ve testosteron sentezinden sorumlu Leydig hücreleri yer alır (Bloom ve Fawcett, 1994; Junqueira vd., 2018; Ross ve Pawlina, 2011).

1.1.2.2. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri, tubulus seminiferus kontortus'un bazal membranından lümene kadar uzanan ve spermatogenezin düzenlenmesinde önemli rol üstlenen somatik hücrelerdir. Apikal ve lateral uzantıları aracılığıyla spermatogenik hücrelerle geniş temas yüzeyleri oluşturur ve bu hücrelerin gelişimi için gerekli yapısal ve metabolik desteği sağlarlar (Bartles vd., 1996; Seidl vd., 1996; Skinner, 1991; Ulkay, 2005).

Bu hücreler; eğey hücrelerinin beslenmesi, olgunlaşan spermatozoonların lümene salınımının (spermiasyon) kolaylaştırılması, artık sitoplazmik materyalin fagositozu ve kan-testis bariyerinin oluşturulması gibi testis mikroçevresini düzenleyen birçok işlevi yerine getirir (Skinner ve Griswold, 2005; Su ve Cheng, 2004; Ulkay, 2005).

Sertoli hücreleri farklılaştıktan sonra bölünme yeteneklerini kaybeder ve puberte sonrası dönemde sayıları sabit kalır (Seidl vd., 1996; Skinner ve Griswold, 2005; Ulkay, 2005). Embriyonik dönemde Sertoli hücrelerinin uygun şekilde farklılaşması, testisin normal gelişimi için zorunlu olup gonadal taslağın testis yönünde farklılaşmasında belirleyici rol oynar (Skinner ve Griswold, 2005). Puberte öncesinde hızla artan Sertoli hücresi sayısı ise erişkin dönemdeki spermatogenik kapasiteyi belirlemektedir (Merchant-Larios ve Moreno-Mendoza, 1998; Orth, 1982).

Sertoli hücreleri tarafından salgılanan büyüme faktörleri ve hormonlar testisin sağlıklı gelişimi, spermatogenez ve erkek fertilitésinin devamı için hayati öneme sahiptir. Bu faktörler, hücresel proliferasyon ve farklılaşmayı reseptör aracılı sinyal iletimi yoluyla

kontrol eder. Bu düzenleme hem otokrin hem de parakrin mekanizmalarla gerçekleşir. Sertoli hücreleri, otokrin sinyaller ile kendi aktivitelerini düzenlerken, parakrin yollarla eşey hücreleri, Leydig hücreleri ve peritubular myoid hücrelerin fonksiyonlarını etkiler (Skinner, 1991; Skinner ve Griswold, 2005). Sertoli hücreleri tarafından salgılanan büyüme faktörleri arasında kök hücre faktörü (kit ligandı), insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF-1 ve IGF-2), fibroblast büyüme faktörü (FGF), glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör, dönüştürücü büyüme faktörleri alfa ve beta, nörotrofinler ve kemik morfogenetik protein 4 (BMP-4) yer alır (Hofmann ve McBeath, 2022; Young ve Vogl, 2012).

Ayrıca östrojen, aktivin, inhibin ve anti-Müllerian hormon (AMH) gibi endokrin moleküllerin yanı sıra (Von vd., 2020), silyer nörotrofik faktör (CNTF), eritropoietin ve lösemi inhibitör faktörü (LIF) gibi trofik faktörleri de üretirler (Magnanti vd., 2001). Hipofizden salgılanan FSH'nın etkisiyle androjen bağlayıcı protein (ABP) sentezleyerek testosteron ve dihidrotestosteronun seminifer tubul lümeninde optimal düzeyde tutulmasını sağlarlar. Bu mekanizma, spermatogenezin devamlılığı için zorunludur (Skinner ve Griswold, 2005; Von vd., 2020; Wong ve Cheng, 2005).

1.1.2.2.1. Kan-Testis Bariyeri

Sertoli hücrelerinin bazal kutbunda yerleşen hücresel bağlantı yapıları, bu hücrelerin birbirleriyle güçlü bir şekilde temas kurmasını sağlayarak kan-testis bariyerini (Sertoli hücre bariyeri) oluşturur. Memelilerde en seçici bariyerlerden biri olarak kabul edilen bu yapı, gelişmekte olan eşey hücrelerine özgül bir mikroçevre sağlamasının yanı sıra seminifer epitelin polaritesinin devamlılığı açısından da önemlidir (Setchell, 2008; Skinner ve Griswold, 2005).

Testiste kan-testis bariyerinin postnatal dönemde tamamen geliştiği bildirilmiştir (Mok vd., 2012). Bariyerin oluşmasıyla birlikte seminifer epitel iki ayrı bölgeye ayrılır: Bazal kompartman, spermatogonyumlar ile preleptoten ve leptoten evresindeki primer spermatositleri barındırırken; adluminal kompartman, mayozun ileri evrelerindeki spermatositleri, sekonder spermatositleri ve spermatidleri içerir. Preleptoten ve leptoten spermatositlerinin adluminal bölgeye geçebilmesi, bariyer bileşenlerinin geçici olarak düzenlenmesi ve yeniden yapılanmasını gerektirir (Chojnacka vd., 2016; Ross ve Pawlina, 2011; Setchell, 2008; Skinner ve Griswold, 2005; Wong ve Cheng, 2005).

Kan-testis bariyeri yalnızca sıkı bağlantı (tight junctions) komplekslerinden ibaret değildir. Sıkı bağlantılar, ektoplazmik özelleşmeler, dezmozomlar ve gap junctionlar ile birlikte mayozun ilerleyebilmesi ve spermatidlerin olgun spermatozoonlara dönüşmesi için gerekli mikroçevrenin oluşturulmasında birlikte görev alır (Cheng vd., 2011; Wang vd., 2022; Zhixiang vd., 2022). Ektoplazmik özelleşmeler, sıkı bağlantılar ve gap junctionlar aktin mikrofilyamentlerine bağlanırken (Mao vd., 2020; Young vd., 2009), dezmozomal bağlantılar ara filamentlerle ilişkilidir (Delva vd., 2009; Lie vd., 2011). Bu hücresel bağlantılar, epitel bütünlüğünün korunması ve metabolik etkileşimlerin düzenlenmesinde de önemli rol oynar (Cheng vd., 2011; Mruk ve Cheng, 2015).

Bariyerin sağladığı izolasyon, mayoz geçiren spermatositlerin ve gelişmekte olan spermatidlerin bağışıklık sistemi hücreleriyle temasını engelleyerek, bu hücrelerde bulunan özgün antijenik yapıların potansiyel bir immun yanıt başlatma olasılığını büyük ölçüde sınırlar. Kan-testis bariyerinin yapı veya işlev açısından zarar görmesi, eşey hücresi gelişiminde aksamalara neden olarak spermatogenezin ilerleyişini sekteye uğratabilir (Ross ve Pawlina, 2011; Skinner ve Griswold, 2005; Von vd., 2020; Wong ve Cheng, 2005).

1.1.2.3. Spermatogenezis

Memeli testislerinde seminifer tubuller boyunca ardışık olarak ilerleyen ve spermatogonyumlardan başlayıp olgun spermatozoonların oluşumuyla sonuçlanan hücresel dönüşüm süreci spermatogenezis olarak tanımlanır. Gonadotropinlerin (özellikle FSH ve LH) yanı sıra testosteronun düzenleyici etkisi altında ilerleyen bu süreç, Sertoli hücreleri ile gelişmekte olan eşey hücreleri arasındaki etkileşimlerin yanı sıra, peritubular miyoid ve Leydig hücrelerinin oluşturduğu mikroçevrenin de katkısıyla kontrol edilmektedir. Türler arasında bazı farklılıklar gösterebilse de genel olarak üç ana aşamada incelenmektedir: spermatogonyumların çoğaldığı dönem (spermatogonyal evre), mayozun gerçekleştiği dönem (mayotik evre) ve spermatidlerin spermatozoonlara olgunlaştığı son dönem (spermiyogenez) (Griswold, 2016; Hess ve Renato de Franca, 2008; Holdcraft vd., 2004; Kierszenbaum, 2006; Ross ve Pawlina, 2011; Wald, 2005).

1. Spermatogonyal evre: Bu evrede spermatogonyumlar mitoz bölünmeler gerçekleştirerek primer spermatositlere dönüşecek hücre popülasyonunu oluştururlar (Ross ve Pawlina, 2011).

Spermatogonyumlar, çekirdek yapıları ve kromatin özelliklerine göre çeşitli tiplere ayrılır. Tip A koyu (Ad) spermatogonyumlar, bazofilik boyanma göstermeleri ve ince granüllü kromatin içeren oval çekirdek yapılarıyla dikkat çeker ve seminifer tubulusların kök hücreleri olarak görev yaparlar. Ad hücreleri düzensiz aralıklarla bölünerek ya iki Ad (koyu) tipi ya da daha soluk kromatin yapısına sahip iki Ap (soluk) tipi spermatogonyum oluştururlar. Ap tipi spermatogonyumlar, ardışık mitozlarla tip B spermatogonyumlara dönüşürler. Tip B spermatogonyumlar nükleolus çevresinde yoğunlaşmış kromatin adacıkları içeren yuvarlak çekirdeklere sahiptir ve daha sonra primer spermatositlere farklılaşırlar (Ergün, 2010; Ross ve Pawlina, 2011).

2. Mayotik evre: Primer spermatositlerin kromozomal içeriği yarıya indirmek amacıyla mayoz bölünmeye girmesiyle başlar. İlk mayoz bölünme tamamlandığında sekonder spermatositler oluşur. Sekonder spermatositler DNA replikasyonu gerçekleştirmeden doğrudan ikinci mayoz evresine ilerler ve sonuçta her birinden iki adet haploid spermatid meydana gelir (Mescher, 2016; Ross ve Pawlina, 2011; Segatelli vd., 2009; Swingen ve Koopman, 2013).

3. Spermiyogenez: Bu evre, sitoplazmik köprülerle birbirine bağlı spermatidlerin, yapısal olarak farklılaşarak olgun spermatozoonlara dönüşmesini içerir. Bu dönüşüm sırasında akrozom oluşumu, çekirdekteki kromatinin yoğunlaşması, hareketliliği sağlayacak flagellumun gelişmesi ve artık sitoplazmanın uzaklaştırılması gibi temel morfolojik değişiklikler meydana gelir. Süreç sonunda olgun spermatozoonlar seminifer tubul lümenine salınır; bu olaya spermiyasyon adı verilir (Eşrefoğlu, 2021; Kierszenbaum, 2006; Mescher, 2016; Ross ve Pawlina, 2011).

Ratlarda spermiyogenezis 19 adımdan oluşur ve bu adımlar Golgi, kep, akrozom ve olgunlaşma olmak üzere dört ana faz altında sınıflandırılır (Leblond ve Clermont, 1952b).

Golgi fazında spermatidlerdeki Golgi kompleksi tarafından glikoproteinden zengin proakrozomal granüller üretilir ve bu granüller birleşerek akrozomal vezikülü oluşturur. Akrozomal vezikül, çekirdeğin ön kutbuna yerleşerek spermin baş bölgesini belirler. Aynı dönemde sentriyoller çekirdeğin arka kutbuna hareket eder ve ilerleyen aşamada flagellumu (kuyruk) oluşturacak mikrotubuler yapı şekillenmeye başlar (Eşrefoğlu, 2021; Liebig, 2019; Swingen ve Koopman, 2013).

Kep fazında akrozomal vezikül çekirdek yüzeyine yayılarak akrozomal kep (başlık) hâlini alır. Bu dönemde çekirdek yoğunlaşmaya başlar ve sitoplazmanın büyük bir kısmı, organeller de dâhil olmak üzere, spermatidin distal kısmına doğru göç eder. Sentirol çifti ise çekirdeğin distal kutbunda bulunur (Liebich, 2019).

Akrozomal fazda spermatid çekirdeği uzayarak yassılaşır ve olgun çekirdek yapısına yaklaşır. Çekirdek çevresinde mikrotubullerden oluşan manşet benzeri bir yapı ortaya çıkar ve çekirdeğin son şeklini kazanmasında görev alır. Bu dönemde distal sentiroiden köken alan flagellum gelişimini sürdürerek uzar (Liebich, 2019; Swingen ve Koopman, 2013).

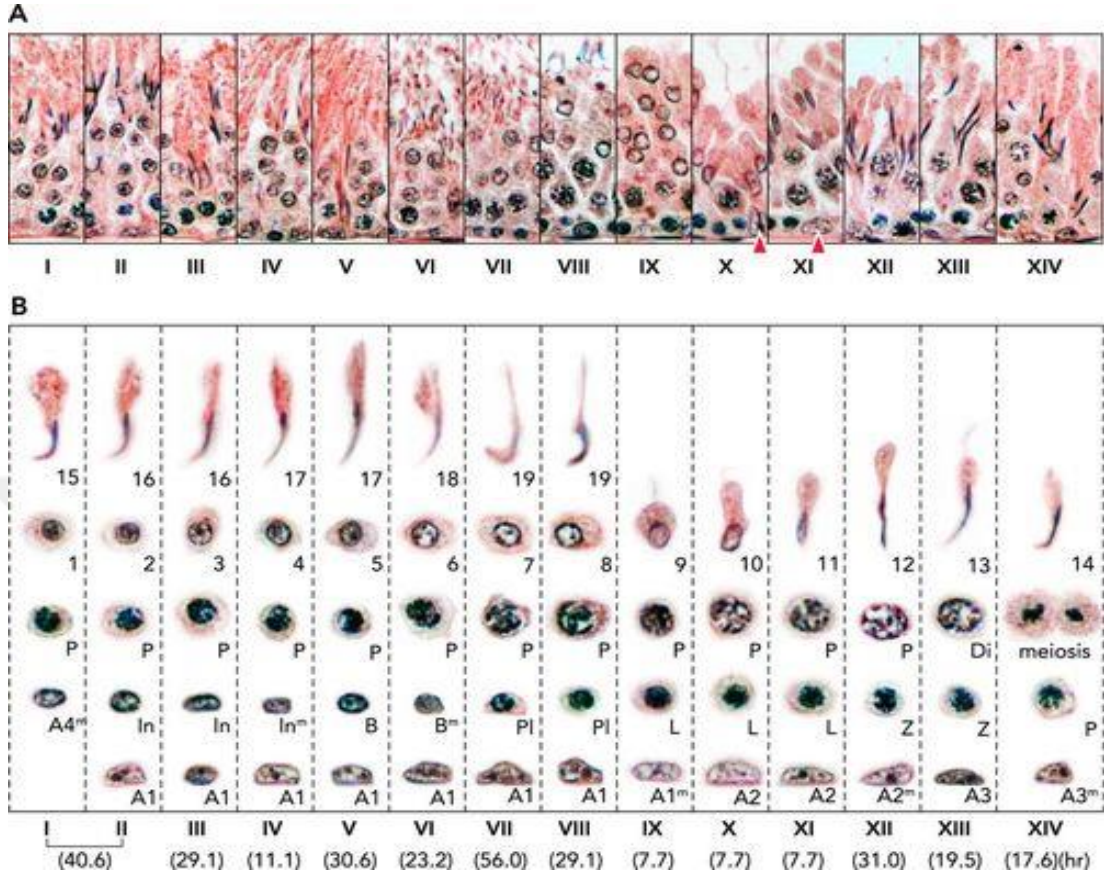
Olgunlaşma fazı olarak adlandırılan son evrede spermatid, sitoplazmasının büyük bölümünü kaybederek artık (reziduel) cisimler meydana getirir ve bu artık yapılar Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Spermatidler arasındaki sitoplazmik köprüler de kaybolur ve spermiyasyon ile Sertoli hücrelerinin apikal bölgesinden tubulus seminiferus lümenine serbest bırakılırlar (Liebich, 2019; Mescher, 2016; Ross ve Pawlina, 2011).

1.1.2.4. Spermatogenik Siklus

Işık mikroskopuyla yapılan incelemeler, rat testisindeki seminifer tubullerde bulunan spermatogenik hücrelerin rastgele bir dizilim göstermediğini; aksine, belirli bir düzen içerisinde yerleştiklerini ortaya koymuştur. Genç spermatidlerin gelişiminin ilk sekiz adımı boyunca, seminifer epitel aynı zamanda bir önceki nesilden gelen daha olgun spermatidleri de barındırmaktadır. Bu nedenle, genç spermatidler sekizinci adıma ulaştığında, bir önceki nesle ait olgun hücreler tubul lümenine salınmaktadır. Bu döngü devam ettikçe, seminifer epitelde belirgin bir yapısal düzen oluşmasına yol açmaktadır (Leblond ve Clermont, 1952a) (Şekil 1.2.).

Spermatidlerdeki bu ardışık yapısal değişimler, spermatogenik siklus olarak bilinen tekrarlayıcı bir düzenin ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Rat testislerinde bu siklus, genç spermatidlerin gelişimi sürecince ilerlediği 14 evreye ayrılmıştır. Buna göre, siklusun I. evresinde spermiyogenezin 1. adımındaki spermatidler diğer hücrelerle birlikte bulunurken, II. evrede 2. adım spermatidleri yer almaktadır. Bu düzen, evre XIV'e kadar devam eder. Özellikle, 1-8. adım spermatidleri, siklusun I-VIII. evrelerinde görülürken, aynı evrelerde 15-19. adım spermatidleri de eş zamanlı olarak bulunur. IX-XIV evrelerde ise yalnızca 9-14. adım spermatidlerin varlığı dikkat çeker (Creasy ve Chapin, 2018; Hess, 1990; Hess ve

Renato de Franca, 2008; Kierszenbaum, 2006; Leblond ve Clermont, 1952a; Xiao vd., 2014) (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. A. Rat testisinde 14 spermatogenez evresi, B. Rat seminifer tubul epitelinde spermatogenez hücrelerinin gelişimsel evreleri (Xiao vd., 2014)

Ratlarda bir spermatogonyumun olgun spermatozoona dönüşmesi yaklaşık sekiz hafta sürmektedir. Bu periyod, her biri ortalama iki hafta devam eden dört spermatogenez siklusunun tamamlanmasıyla gerçekleşir. Örneğin VII. evrede bulunan bir seminifer tubul kesitinde gelişime başlayan A tipi bir spermatogonyum, iki hafta sonra aynı bölge tekrar VII. evreye ulaştığında preleptoten spermatosit dönüşmüş olur. Bunu takip eden döngülerde hücre önce pakiten spermatosit, ardından yuvarlak spermatid ve sonrasında uzamış spermatid (19. adım) formuna ulaşır. Nihayetinde, olgun spermatidler lümenine bırakılarak spermiyasyon meydana gelir (Creasy ve Chapin, 2018; Kierszenbaum, 2006; Xiao vd., 2014). İnsanda ise bir spermatogenez siklus yaklaşık 16 gün sürmekte ve bir spermatogonyumdan olgun spermiyum oluşumu yaklaşık 64 gün içinde tamamlanmaktadır (Kierszenbaum, 2006).

1.1.2.5. Spermatogenik Siklus Evreleri

Rat testislerinde spermatogenik siklus evrelerinin tanımlanmasında en sık kullanılan yöntemlerden Periyodik Asit Schiff (PAS) boyamasıdır. Bu yöntem, spermatid çekirdeklerinin morfolojik gelişimi, akrozomal yapıdaki değişimler ve mitotik figürlerin ayırt edilebilmesi gibi özelliklere dayalı olarak evrelerin ayrımını mümkün kılar (Creasy ve Chapin, 2018; Hess, 1990). Bununla birlikte, hematoksilin-eozin ile boyanmış kesitlerde de spermatidlerin morfolojisi ve seminifer tubul içerisindeki konumları dikkate alınarak daha pratik bir sınıflandırma yapılabilen, spermatogenez döngüsü erken, orta ve geç evreler şeklinde tanımlanabilmektedir (Creasy ve Chapin, 2018). Ayrıca, Sertoli hücrelerinde siklus boyunca gözlenen morfolojik değişiklikler de evre ayrımında önemli göstergelerden biri olarak kabul edilmektedir (Griswold, 2016).

Evre I: Spermatositlerin ikinci mayotik bölünmeyi tamamlamasıyla başlayan bu evrede 1. adım spermatidler görülür. Bu genç spermatidler Golgi bölgesinde PAS ile orta yoğunlukta boyanan ve idiozom olarak adlandırılan küresel yapılara sahiptir. Seminifer epitelin apikalinde ise olgunlaşmamış spermatozoa adı da verilen, yüzgeç benzeri membran yapıları olan 15. adım spermatidler bulunur. Sertoli hücresi çekirdekleri yoğunlukla bazal membrana yakın, hafif yassılaştırmış görünümündedir (Creasy ve Chapin, 2018; Griswold, 2016; Hess, 1990).

Evre II: 2. adım spermatidlerin idiozom bölgesinde proakrozomal granüller belirginleşir ve bu granüller PAS ile orta yoğunlukta boyanır. Bu evrede A tipi spermatogonyumların yanı sıra B tipine farklılaşmak üzere olan intermediyer spermatogonyumlar dikkati çeker. PAS boyaması, 2. ve 16. adım spermatidlerin birbirinden kolaylıkla ayrılmasını sağlar. Ayrıca 15. adım spermatidlerdeki yüzgeç benzeri membran yapısı, 16. adımda düzleşir ve spermatidler seminifer epitelin daha derin tabakalarında demetler halinde gruplaşır (Creasy ve Chapin, 2018; Griswold, 2016; Hess, 1990).

Evre III: 3. adım spermatidlerde proakrozomal granüller birleşerek tek bir akrozomal granül oluşturur. Bu dönemde A tipi spermatogonyum az, intermediyer tip ise daha fazladır. Genç (3. adım) ve olgun (16. adım) spermatidler bir arada görülür. 16. adım spermatidlerden oluşan olgunlaşmamış spermatozoa demetleri, bu evrenin yanı sıra IV, V ve VI evrelerde de seminifer epitelin farklı katmanlarında bulunur ve baş kısımları Sertoli hücre çekirdeklerine yakın konumlanır (Creasy ve Chapin, 2018; Griswold, 2016; Hess, 1990).

Evre IV: 4. adım spermatidlerde akrozomal vezikül nükleer membrana yaslanır. Bu evrede 17. adım spermatidler de ayırt edilmektedir. İntermedier tip spermatogonyumlar mitoz geçirerek nükleer membran boyunca kabuk benzeri kromatin birikimleriyle karakterize B tipi spermatogonyumlara dönüşür (Creasy ve Chapin, 2018; Griswold, 2016; Hess, 1990).

Evre V: 5. adım spermatidlerde akrozomal granül, çekirdeğin üzerine yayılarak kep şeklini alır. 17. adım spermatidler seminifer epitelin daha derin tabakalarına doğru ilerler. Bu evrede spermatogonyumların çoğunluğu B tipidir, az sayıda A tipi spermatogonyum da bulunur (Creasy ve Chapin, 2018; Griswold, 2016; Hess, 1990).

Evre VI: 6. adım spermatidlerde kep yapısı genişleyerek çekirdeğin bir kutbunu örten şemsiye benzeri bir görünüm kazanır. 18. adım spermatidler bazofilik granüller içerir ve Sertoli hücre çekirdeğinden uzaklaşıp lümene doğru yönelir. Bazal membran yakınında az sayıda A tipi ve yoğun B tipi spermatogonyum bulunur. Spermatositler çoğunlukla pakiten aşamasındadır (Creasy ve Chapin, 2018; Griswold, 2016; Hess, 1990).

Evre VII: 7. adım spermatidlerde kep yapısı maksimum boyutuna ulaşır. Lümen sınırındaki 19. adım spermatidlerde iri bazofilik granüller ve belirgin çekirdek eğriliği görülür; kuyrukları lümen çevresinde kıvrılarak dizilir. Bu evrede A tipi spermatogonyum nadiren görülür. Sertoli hücresi çekirdekleri üçgen ya da dikdörtgen biçiminde olup, dik konumlanır (Creasy ve Chapin, 2018; Griswold, 2016; Hess, 1990).

Evre VIII: 19. adım spermatidler spermiyasyon öncesinde tubul lümeninin kenarında hizalanır. Bir kısmı epitelden ayrılırken, çoğunluğu hâlen epitelde bulunur. Spermiyasyonun başlamasıyla birlikte seminifer epitelin kalınlığı azalır ve tubul lümeni diğer evrelere kıyasla daha geniş görünür. Ayrıca bu evrede, dik konumlanmış Sertoli hücresi çekirdeklerinin sayısı maksimum düzeye ulaşır (Creasy ve Chapin, 2018; Griswold, 2016; Hess, 1990).

Evre IX: 19. adım spermatidler tamamen spermatozoona dönüşerek lümene salınır. Aynı zamanda 9. adım spermatidlerde akrozomal sistemin bazal membrana doğru uzandığı gözlenir. A tipi spermatogonyumların sayısı önceki evrelere göre azalır (Creasy ve Chapin, 2018; Griswold, 2016; Hess, 1990).

Evre X: 10. adım spermatid çekirdeğinin sagittal düzlemde V şeklini almasıyla belirginleşir. Aynı tubul kesitinde genç spermatositler leptoten, olgun spermatositler ise pakiten aşamasında bulunur (Creasy ve Chapin, 2018; Griswold, 2016; Hess, 1990).

Evre XI: 11. adım spermatidlerde akrozomal kepin çıkıntılı ucunun yuvarlak bir tüp görünümü kazanmasıyla başlar. Spermatogonyum ve spermatositlerde (leptoten ve pakiten) önemli morfolojik değişiklik görülmez. 11. adım spermatidlerin spermatositler arasında demetler oluşturması bu evre için tipiktir (Creasy ve Chapin, 2018; Griswold, 2016; Hess, 1990).

Evre XII: 12. adım spermatidlerin maksimum uzunluğa ulaşması ve akrozomal yapının üçgen kama şeklini almasıyla tanımlanır. Spermatid çekirdeğinde uzama, daralma ve düzleşme gibi değişimler belirginleşir. A tipi spermatogonyumların sayısı mitozla artar. Bu hücreler, leptoten aşamasındaki spermatositlerle ilişkili bir tabaka oluştururken; pakiten aşamasındaki spermatositler arasında uzamış spermatid demetleri gözlenir (Creasy ve Chapin, 2018; Griswold, 2016; Hess, 1990).

Evre XIII: 13. adım spermatidler, yoğun ve sivri uçlu kavisli bir çekirdeğe sahiptir. Akrozomal sistem ventral yerleşimlidir ve çekirdeğin ventral yüzeyinde çıkıntı yapar. Bu evrede diploten spermatositler tipik olarak görülür; bunlar pakiten evresindekilere göre daha büyük çekirdeğe, belirgin nükleolusa ve yoğun kromatin kümelerine sahiptirler (Creasy ve Chapin, 2018; Griswold, 2016; Hess, 1990).

Evre XIV: 14. adım spermatidlerde çekirdek daralır ve uzunluğu önceki evrelere kıyasla üçte ikiye iner. Bu evre, mitotik figürlerin ve sekonder spermatositlerin varlığı ile ayırt edilir. Spermatositlerin ikinci olgunlaşma bölünmesini tamamlamasıyla yeni spermatidler oluşur ve böylece yeni bir spermatogenik siklus başlar (Creasy ve Chapin, 2018; Griswold, 2018; Hess, 1990).

Sonuç olarak, spermatogenik siklus boyunca sadece spermatidler değil, aynı zamanda spermatogonyum ve spermatositlerde de evreye özgü morfolojik değişiklikler izlenmektedir (Creasy ve Chapin, 2018).

1.1.3. Spermatozoonun Yapısı

Spermatozoon, tamamen olgunlaşmış erkek eşey hücresidir ve yapısal olarak baş, boyun ve kuyruk olmak üzere üç ana bölümde incelenir. Baş bölgesi büyük ölçüde çekirdekten oluşur; ön kısmında yer alan lizozomal kökenli akrozom ise döllenme sürecinde görev alan hiyaluronidaz, asit fosfataz ve akrozin gibi enzimleri içerir. Boyun kısmında ön ve arka sentriyoller bulunur; arka sentriyolden gelişen kamçı yapısı, kuyruk bölümünü oluşturur. Kuyruk; orta parça, ana parça ve son parça olmak üzere üçe ayrılır (Ergün, 2010; Kim vd., 2013; Ross ve Pawlina, 2011; Tanyolaç, 1999).

1.1.4. İnterstisyel Doku

Testiste seminifer tubuller arasında yer alan interstisyel doku, Leydig hücreleri, fibroblastlar, lenf damarları ve pencere (fenestralı) kapillerlerden zengin gevşek bağ dokusu yapısındadır (Ross ve Pawlina, 2011).

1.1.4.1. Leydig Hücreleri

Leydig hücreleri, granülsüz endoplazmik retikulum ve mitokondriyonlarında bulunan çeşitli steroidojenik enzimler aracılığıyla kolesterolden androjen, özellikle testosteron, sentezleyen iri ve eozinofilik özellikte hücrelerdir. Testosteron, erkeklerde seksüel farklılaşma, spermatogenez ve sekonder cinsiyet karakterlerinin sürdürülmesinde önemli rol oynar (Al-Agha ve Axiotis, 2007; Anni vd., 2019; Ergün, 2010; Haider, 2004; Ross ve Pawlina, 2011).

Erkeklerde androjen üretimi, fetal ve erişkin dönemler olmak üzere iki dönemde gerçekleşir ve buna bağlı olarak Leydig hücreleri fetal (FLC) ve erişkin (ALC) olmak üzere iki farklı tipe ayrılır. FLC'ler, fetal gonadların gelişimi ve maskulinizasyon için gerekli testosteronu üretirken, ALC'ler postnatal dönemde testosteron sentezini sürdürür (Bhattacharya ve Dey, 2023; Keer ve Jørgensen, 2024; Skakkebaek vd., 2016). Embriyonik dönemde androjen üretiminden sorumlu FLC'ler, testis interstisyumunda bazal lamina ile çevrili kümeler halinde organize olurlar. Buna karşın, erişkin Leydig hücreleri böyle bir membranla çevrili değildir (Haider, 2004; Skakkebaek vd., 2016).

FLC'lerin sayısı doğumdan sonra azalır ve testosteron üretimi bu dönemde düşer. Neonatal dönemde interstisyel progenitor hücrelerden ALC'ler gelişmeye başlar ve testosteron üretimi giderek artar (Li ve Papadopoulos, 2018). Bu süreçte ALC öncülleri mitotik aktivite gösterebilir; dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β), insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF1) ve sinir büyüme faktörü (NGF) gibi parakrin sinyaller bu proliferasyonu destekler (Teerds ve Huhtaniemi, 2015). FLC'ler ise mitotik aktivite göstermeyen hücrelerdir (Keer ve Jørgensen, 2024). Kemirgenlerde, özellikle ratlarda, FLC'lerin sayısı postnatal ilk haftalarda hızla azalır; ancak bazı tür ve soy farklılıklarına bağlı olarak daha ileri dönemlere kadar varlıklarını sürdürebildikleri bildirilmiştir (Habert vd., 2001; Haider, 2004; Kaftanovskaya vd., 2015). FLC'ler androjen üretiminin yanı sıra insülin benzeri peptid 3 (INSL3) hormonu da salgırlar. Testisin skrotuma inişi, hem FLC kaynaklı INSL3'e hem de androjenlere bağlıdır (Kothandapani vd., 2020; Zimmermann vd., 1999).

Androjen biyosentezi, steroidojenik akut düzenleyici protein (STAR), sitokrom P450 ailesi 11 alt aile A üyesi 1 (CYP11A1), sitokrom P450 ailesi 17 alt aile A üyesi 1 (CYP17A1) ve 3 β -HSD gibi steroidojenik enzimlerin işlevleriyle gerçekleşir (Keer ve Jørgensen, 2024; Miller ve Auchus, 2011; Miyabayashi vd., 2017). Bu enzimlerden CYP11A1, kolesterolü pregnenolona dönüştüren anahtar basamakta görev yapar ve tüm steroidojenik hücrelerde bulunur (Culty vd., 2015; Li vd., 2018; Miller ve Auchus, 2011; Shih vd., 2011; Shima vd., 2015). Erişkin Leydig hücreleri testosteron üretimi için gerekli tüm enzimlere sahipken, FLC'lerde 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaz (HSD17B3) ekspresyonu düşüktür. Bu nedenle androstenedionun testosterona dönüşümü Sertoli hücrelerinin desteğiyle gerçekleşir (O'Shaughnessy vd., 2000; Shima vd., 2015).

Leydig hücrelerinin androjen sentezi, gelişim dönemine göre farklı mekanizmalarla düzenlenir. Erişkinlerde süreç esas olarak hipofiz bezinden salgılanan LH aracılığıyla kontrol edilir (Zirkin ve Papadopoulos, 2018). Buna karşılık fetal testiste steroidogenez, hipotalamo-hipofizer-gonadal aks tam aktifleşmeden önce başladığı için LH'dan büyük ölçüde bağımsızdır (El-Gehani vd., 1998; Zhang vd., 2001).

Fetal dönemde steroidogenezin temel düzenleyicileri parakrin faktörlerdir. Sertoli hücrelerinden salınan Desert Hedgehog (DHH) proteini, FLC'lerin androjen sentezini destekleyen en önemli parakrin faktörlerden biridir (Inoue vd., 2016). Ayrıca vazoaaktif bağırsak peptidi, atriyal natriüretik peptid, beyin natriüretik peptid ve C tipi natriüretik

peptid ile özellikle hipofiz adenilat siklaz aktive edici polipeptit (PACAP) gibi moleküllerin de FLC steroidogenezinde rol oynayabileceği belirtilmiştir (El-Gehani vd., 1998). PACAP ve reseptörlerinin fotal testisteki dağılımı henüz tam olarak aydınlatılamamıştır; ancak erişkin testiste Leydig hücrelerinde PACAP immunreaktivitesi saptanmış, PAC1 reseptörünün ise hem vasküler endotel hem de Leydig hücrelerinde eksprese edildiği gösterilmiştir. Bu bulgular, endotel hücrelerinin Leydig hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde parakrin katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir (Prisco vd., 2020).

FLC'ler yalnızca geçici endokrin hücreler olmayıp, progenitor hücre farklılaşması veya transdiferansiyasyon yoluyla ALC popülasyonuna sınırlı ölçüde katkı sağlayabilecekleri de ileri sürülmüştür (Barsoum vd., 2013). Bazı araştırmalar, peritubular miyoid hücrelerin ALC'ler için alternatif bir öncül kaynak olabileceğini öne sürse de çoğu çalışma ALC'lerin esas olarak ayrı interstisyel progenitor hücrelerden türediğini ve FLC'lerin postnatal dönemde büyük oranda kaybolduğunu vurgulamaktadır (Li ve Papadopoulos, 2018; Shima ve Morohashi, 2017). Ancak son bulgular, erişkin testiste küçük bir FLC subpopülasyonunun (%5-20) varlığını sürdürebildiğini ve ALC için potansiyel progenitor kaynağı olabileceğini göstermektedir (Bhattacharya ve Dey, 2023).

1.1.5. Eşey Hücrelerini İleten Kanalcıklar

Eşey hücrelerini ileten kanalcıklar; testis içinde yer alan tubulus rektus ve rete testis ile testis dışı yerleşimli duktuli efferentes (eferent kanalcıklar) olmak üzere üç ana yapıdan oluşur. Bu kanalcıklar aracılığıyla spermatozonlar ve luminal sıvı, seminifer tubullerden epididimidis kanalına iletilir (Ross ve Pawlina, 2011).

1.1.5.1. Tubulus Rektus

Kıvrımlı seminifer tubuller, kısa ve düz bir segment olan tubulus rektus ile sonlanır ve bu yapı rete testise açılır. Düz testiküler tubuller genellikle kısa olup, domuz ve aygırda daha uzundur. Köpek ve boğa gibi türlerde, Sertoli hücrelerinin oluşturduğu kümeler, kıvrımlı tubullerden düz tubullere geçiş bölgesinde intratubuler çıkıntılar (terminal segment) şeklinde gözlenir. Bu yapılar fagositoza katkıda bulunur ve tubuler sıvının geriye akışını önler (Liebich, 2019; Ross ve Pawlina, 2011).

Tubulus rektus, başlangıçta modifiye Sertoli hücrelerinden oluşan, daha distal kısımlarında ise basit küboidal epitel ile döşeli emici bir epiteldir (Liebich, 2019; Ross ve Pawlina, 2011). Bu bölgedeki Sertoli hücrelerinin, spermatozoa ve tubul sıvısının tek yönlü akışının sağlanmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Akışın ise yalnızca tubulus iç basıncının rete testis ve efferent kanalcıklardaki basıncı aşması durumunda gerçekleştiği belirtilmektedir (Ross ve Pawlina, 2011).

1.1.5.2. Rete Testis

Tubulus rektuslar, seminifer tubullerin uç kısımlarından başlayarak mediastinum testis içerisinde yer alan rete testis adı verilen kanal ağına açılır. Bu ağ, damardan zengin bağ dokusu içinde konumlanmış olup, tek katlı yassı ya da kübik epitel hücreleriyle döşelidir (Ergün, 2010; Ross ve Pawlina, 2011).

Rete testis, seminifer tubuluslardan gelen sıvının ve bazı proteinlerin ilk kez geri emildiği bölge olup, aynı zamanda spermatozoonların kısa süreli rezervuarı olarak görev yapar. Bu bölgeden çıkan spermatozoonlar ve luminal sıvı, türlere göre sayısı değişmekle birlikte yaklaşık 4 ile 20 arasında olan efferent kanalcıklar (duktuli efferentes) aracılığıyla epididimise aktarılır (Nistal ve Paniagua, 1984).

1.1.5.3. Duktuli Efferentes

Rete testisten ayrılıp tunika albugineayı geçerek testis dışına çıkan duktuli efferentes, yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Epiteldeki silyumlar, spermatozoonlar ile luminal sıvının epididimis kanalına doğru taşınmasına yardımcı olur (Ergün, 2010; Liebich, 2019). Kanalcıkları çevreleyen düz kas tabakası peristaltik kasılmalar oluşturarak sperm taşınmasını destekler. Efferent kanalcıklar ayrıca tubuler sıvının büyük bölümünün geri emildiği, spermatozoonlara besin sağlandığı ve dejeneratif spermilerin fagositozla uzaklaştırıldığı bir bölgedir (Liebich, 2019; Ross ve Pawlina, 2011).

1.1.6. Epididimis

Epididimis, duktus epididimidis adı verilen tek ve son derece kıvrımlı bir kanaldan oluşan, spermatozoonların olgunlaşma, korunma ve depolanma süreçlerinin gerçekleştiği

özelleşmiş bir organdır. Yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşeli olan duktus epididimidis, başlangıç segmenti, kaput, korpus ve kauda olmak üzere dört ana bölümden oluşur. Bu segmentler, spermatozoonların fonksiyonel olgunlaşmasını destekleyen özgün mikroçevresel koşullara sahiptir ve bu özellikler büyük ölçüde androjenlerin düzenleyici etkileriyle şekillenir (Breton vd., 2019; Cornwall, 2009; Picut vd., 2018; Sullivan vd., 2019).

Epididimal kanalın postnatal dönemde üç temel gelişim evresinden geçtiği bilinmektedir (Breton vd., 2016; Cornwall, 2009; Murashima vd., 2015; Shum vd., 2013; Sullivan vd., 2019). Bu evreler sırasıyla farklılaşmamış dönem (PND 14' e kadar), farklılaşma dönemi (PND 16-44) ve olgunlaşma dönemi (PND 45-70) şeklinde sınıflandırılmaktadır. İlk evrede epitel hücreleri mitotik aktivitenin yüksek olduğu kolumnar bir yapıdadır ve segmentleri ayıran septalar oluşmaya başlar. Farklılaşma döneminde bazal, şeffaf, apikal, kalem ve halo hücreleri gibi farklı epitel hücre tipleri tanımlanabilir hale gelir. Olgunlaşma döneminde ise lümen çapı artar, sperm geçişi başlar ve fibromuskuler tabakada proliferasyon belirginleşir (Meng vd., 2020; Picut ve Remick, 2017; Robaire ve Hinton, 2015). Bu süreçlerin düzenlenmesinde androjenler temel belirleyici faktör olmakla birlikte, testisten epididimise efferent kanalcıklar yoluyla taşınan östrojenler, retinoidler ve çeşitli büyüme faktörlerinin de katkı sağladığı gösterilmiştir (Abe vd., 1984; Robaire vd., 2006).

Epididimisin segmental çeşitliliği, her bölümde devreye giren özgün gen ekspresyon profilleri ve moleküler düzenleyici mekanizmalarla ilişkilidir. Segmentleri birbirinden ayıran bağ doku bölmeleri yalnızca yapısal bütünlük sağlamaz, aynı zamanda gen ve protein düzeyindeki farklılaşmayı destekleyerek her segmentin fonksiyonel olarak bağımsız bir birim gibi davranmasına katkıda bulunur (Avellar vd., 2019; Cornwall, 2009; Domeniconi vd., 2016; Kirchoff, 1999; Turner vd., 2003). Bu düzenlemeler luminal içeriğin segmentler arasında belirgin biçimde farklılaşmasına ve böylece spermatozoonların kademeli olgunlaşmasına uygun biyokimyasal mikroçevrelerin oluşmasına zemin hazırlar (Belleannée vd., 2012; Björkgren ve Sipilä, 2019; Breton vd., 2019; Da Silva ve Barton, 2016; Gervasi ve Visconti, 2017; James vd., 2020; Johnston vd., 2005; Kierszenbaum, 2006).

Spermatozoonlar testisten çıktıktan sonra epididimis boyunca ilerlerken fonksiyonel olgunluklarını kazanırlar. Özellikle başlangıç segmenti ve kaput bölgesinden salgılanan glikoproteinler ve yüzey proteinleri, motilite kazanımı ve fertilizasyon kapasitesi için belirleyici rol oynar. Olgunlaşma süreci korpus segmentinde devam ederken, kauda bölgesi olgun spermatozoonların depolandığı ve aynı zamanda yapısal veya fonksiyonel kusur

gösteren hücrelerin elimine edildiği bir segment olarak işlev görür (Akbarsha vd., 2015; Axner, 2006; Bedford, 2015; Cooper, 1998; Dacheux vd., 2005; Robaire ve Hermo, 1988; Sullivan vd., 2019).

Epididimal epitel, spermatozoonlarla doğrudan temas halinde bulunan ve immün dengenin sürdürülmesine katkı sağlayan özelleşmiş bir mukozal yapıdır (Battistone vd., 2019b; Battistone vd., 2020; Mendelsohn vd., 2020; Wijayarathna vd., 2020). Epitel hücreleri salgılama ve endositoz gibi mekanizmaları kullanarak lümenin bileşimini sürekli olarak düzenler ve spermatozoonların olgunlaşma sürecinde rol oynayan çeşitli proteinleri üretir (Breton vd., 2016; Hermo ve Robaire, 2002). Ayrıca, sperm antijenlerine karşı immün yanıtların sınırlandırılması ve patojenlere yönelik lokal savunma yanıtlarının desteklenmesi, epididimise immün açıdan koruyucu bir mikroçevre özelliği kazandırır (Da Silva vd., 2011; Smith vd., 2014; Wang vd., 2021).

Epididimal epitel; prinsipal, kalem (narrow), apikal, şeffaf, halo ve bazal hücreler gibi farklı hücre tiplerini içerir (Akbarsha vd., 2015; Avellar vd., 2019; Chen vd., 2021; Cornwall, 2009). Bu hücrelerin segmentlere göre değişen dağılımı, epididimis boyunca gözlenen işlevsel farklılaşmanın temelini oluşturarak her segmentin kendine özgü görevler üstlenmesine olanak sağlar (Breton vd., 2016; Sullivan vd., 2019).

1.1.6.1. Prinsipal Hücreler

Epididimal kanal boyunca en büyük hücre popülasyonunu oluşturan prinsipal hücrelerin yapısal ve işlevsel özellikleri bulundukları segmente göre farklılık göstermektedir (Breton vd., 2019; Hermo vd., 1994; James vd., 2020). Metabolik olarak aktif olan bu hücreler hem salgılama hem de absorpsiyon süreçlerinde görev alır. Epididimis lümenine salgıladıkları çok sayıda özelleşmiş protein; spermin olgunlaşması, luminal ortamın asit-baz dengesinin korunması ve hücreler arası sinyal iletimi gibi birçok mekanizmanın sürdürülmesini sağlar (Rinaldi vd., 2020).

Prinsipal hücreler şeffaf hücrelerle birlikte epididimal lümen pH'sının ayarlanmasında önemli bir role sahiptir. Segmentlere özgü iyon taşınım mekanizmaları sayesinde, başlangıç segmentinde bikarbonat geri emilimi, kaudal segmentte ise proton ve bikarbonat sekresyonu ile pH dengesi sağlanır (Breton ve Brown, 2013; Jensen vd., 1999; Park vd., 2017). Ayrıca prinsipal hücreler tarafından salgılanan çeşitli antimikrobiyal peptidler, spermin

olgunlaşmasına katkı sağlarken aynı zamanda epididimal mikrofloranın kontrolünde de görev alır (Bernal vd., 1980).

Bunlara ek olarak, bu hücreler epididimozom adı verilen ekstraselüler veziküllerin üretiminde rol oynar. Epididimozomlar, protein, lipid ve nükleik asit gibi biyomolekülleri taşıyarak sperm hücrelerinin canlılığını ve işlevsel kapasitesini destekler (Martin-DeLeon, 2015; Méar vd., 2024; Sullivan vd., 2007). İçeriklerindeki glutatyon peroksidaz ve glutatyon S-transferaz gibi antioksidan enzimler, epididimal savunma sisteminin önemli bileşenlerindendir (Björkgren ve Sipilä, 2019; Nixon vd., 2019; Taylor vd., 2013).

1.1.6.2. Kalem Hücreleri

Kalem hücreleri, yalnızca epididimisin başlangıç segmentinde bulunan, ince ve uzun morfolojide, stereosilyumsuz hücrelerdir. Bu hücrelerin çekirdekleri küçük ve yassılaştırmış görünümde olup, apikal sitoplazmaları çok sayıda mitokondri içerir (Adamali ve Hermo, 1996; Akbarsha vd., 2015; Serre ve Robaire 1999; Wang vd., 2024). Kalem hücreleri, V-ATPaz enzim kompleksinin oluşturduğu proton pompalama mekanizması aracılığıyla luminal ortamın asidik karakterinin korunmasını sağlar (Kujala vd., 2007; Shum vd., 2009). Bu süreçte apikal kutupta biriken V-ATPaz zengin veziküller, gerektiğinde apikal membrana füzyon yaparak H^+ iyonlarının lümene salınmasını sağlar ve böylece epididimal mikroçevrenin pH düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Breton vd., 2019).

1.1.6.3. Apikal Hücreler

Apikal hücreler, epitelin apikal bölümünde yer alan, yuvarlak veya dikdörtgen çekirdekleri ve kubbemsi luminal yüzeylerinde sınırlı sayıda bulunan stereosilyumları ile ayırt edilirler (Akbarsha vd., 2015; Robaire ve Hermo, 1988). Rat epididimisinde özellikle başlangıç segmentinde yoğun olarak bulunan bu hücrelerin, sıvı ve elektrolit taşınımı ile epididimal sıvının iyonik bileşiminin düzenlenmesinde rol aldığı bildirilmiştir (Adamali ve Hermo, 1996; Gao vd., 2025; Robaire ve Hinton, 2015). Ayrıca apikal hücrelerin, karbonik anhidraz II aktivitesi ve iyon taşınım mekanizmaları aracılığıyla luminal ortamın asidifikasyonuna dolaylı biçimde katkı sağladığı; böylece spermatozoonların olgunlaşması için gerekli olan lümen pH'sının korunmasına yardımcı olduğu belirtilmektedir (Brown vd., 1992; Kujala vd., 2007; Pietrement vd., 2006). Bunun yanı sıra apikal hücreler, lümen

içerisinde yer alan protein ve diğer moleküllerin endositoz yoluyla geri alınmasında görev olarak epididimal homeostazın sürdürülmesine katkıda bulunur (Gregory vd., 2024).

1.1.6.4. Şeffaf Hücreler

Şeffaf hücreler, birçok memeli türünde epididimisin kaput, korpus ve kauda segmentlerinde bulunan ve aktif endositoz yapan hücrelerdir (Breton vd., 2019; Robaire ve Hermo, 1988; Robaire ve Hinton, 2015). Morfolojik olarak bu hücrelerin apikal bölgelerinde çok sayıda vezikül, endozom, multiveziküler cisim bulunur; ayrıca çekirdeklerinin üzerinde yoğun granüler yapılar dikkati çeker (Hermo vd., 1988).

Şeffaf hücreler, epididimal lümenin asidik pH düzeyinin korunmasında önemli rol oynar (Da Silva vd., 2007; Park vd., 2017). Luminal asitleşme, bikarbonatın geri emilimi ve proton sekresyonu gibi birbirini tamamlayan iki mekanizmanın etkileşimiyle gerçekleşir. Proton sekresyonu, hücrelerin apikal membranında lokalize vakuolar H^+ -ATPaz (V-ATPaz) enzim kompleksi aracılığıyla sağlanır (Adamali ve Hermo, 1996; Battistone vd., 2019a; Belleanne vd., 2010; Roy vd., 2013; Shum vd., 2011). Bikarbonatın geri emilimi ise özellikle başlangıç segmentindeki prinsipal hücreler tarafından gerçekleştirilir (Breton vd., 2016; Pastor-Soler vd., 2003). Oluşan bu asidik luminal ortam, spermatozoonların prematür aktivasyonunu (erken kapasitasyon ve motilite aktivasyonu) önleyerek depolama süresince fonksiyonel bütünlüklerini korur (Breton ve Brown, 2013; Breton vd., 2016; Breton vd., 2019). Ayrıca optimum pH ortamı, epididimozomal veziküller aracılığıyla gerçekleşen protein ve lipid transferinin etkinliği açısından da öneme sahiptir (Guyonnet vd., 2011; Zhou vd., 2018).

Buna ek olarak şeffaf hücreler, epididimal epitelin immun mikroçevresinin düzenlenmesine katkıda bulunarak, spermatozoonların olgunlaşması ve depolanması için gerekli koşulların sürdürülmesine yardımcı olurlar (Battistone vd., 2024; Da Silva vd., 2015; Shum vd., 2011).

1.1.6.5. Halo Hücreleri

Halo hücreleri olarak adlandırılan intraepitelyal lenfositler ve makrofaj benzeri hücreler, epididimis epitelinin tüm segmentlerinde yer alan başlıca bağışıklık hücreleridir. Bu hücrelerin, epididimal dokuda bağışıklık yanıtını düzenleyerek spermatozoonların immun

sistem tarafından hedef alınmasını sınırlandırdığı ileri sürülmektedir (Da Silva ve Smith, 2015; Robaire ve Hermo, 1988; Robaire vd., 2006; Serre ve Robaire, 1999). Morfolojik olarak dar sitoplazmalı, küçük boyutlu hücreler olup epitel boyunca yaygın bir dağılım gösterirler (Flickinger vd., 1997).

1.1.6.6. Bazal Hücreler

Bazal hücreler, epididimis epitelinin tüm segmentlerinde bulunan ve sayıca ikinci büyük hücre grubunu oluşturan yapılardır. Yassı veya üçgen şekilli olan bu hücreler, epitelin bazal kısmında konumlanarak hücrel bir ağ yapısı meydana getirirler (Cornwall, 2009; Yeung vd., 1994). Hücrel yenilenme süreçlerinde önemli işlevleri olan bu hücrelerin (Ross ve Pawlina, 2011; Sharma vd., 1986), genellikle lümenle doğrudan teması bulunmaz; ancak erişkin ratlarda lümenle doğru ince sitoplazmik uzantılar geliştirdikleri gösterilmiştir (Kim vd., 2015; Shum vd., 2008; Shum vd., 2009; Shum vd., 2013). Bu uzantılarda bulunan anjiyotensin II tip 2 reseptörlerinin (AGTR2) luminal anjiyotensin II tarafından aktive edilmesi, komşu şeffaf hücrelerde proton (H^+) salınımını uyarak epididimal pH'nın düşük seviyelerde tutulmasına katkı sağlar (Shum vd., 2013).

Bazal hücreler ayrıca prinsipal ve şeffaf hücrelerin aktivitelerini düzenleyerek luminal mikroçevrenin homeostazını dolaylı olarak etkileyebilir (Arrighi, 2014; Leung vd., 2004). İn vitro koşullarda farklılaşabilmeleri ve epitel dokusunu yeniden oluşturabilmeleri, bu hücrelerin kök hücre benzeri bir potansiyel taşıdığını düşündürmektedir. Bunun yanı sıra kan-epididimis bariyerinin yapısal bütünlüğünün korunmasına katkıda bulundukları bildirilmiştir (Haucke ve Kozlov, 2018). Bazı araştırmalar, bazal hücrelerin bağışıklık hücresi benzeri işlevler üstlenebileceğini; sperm otoantijenlerine yanıt olarak sayılarında artış görülmesinin ve makrofaj belirteçlerinin ekspresyonunun bu olasılığı desteklediğini ortaya koymaktadır (Robaire vd., 2006).

1.1.6.7. Kan-Epididimis Bariyeri

Epididimis, spermatozoonların bağışıklık sistemi tarafından “yabancı” olarak tanınmasını engelleyerek otoimmün reaksiyonların gelişmesini önleyen karmaşık savunma mekanizmalarına sahiptir. Bu mekanizmalar, spesifik proteinlerin yanı sıra antioksidanların ve çeşitli konjuge enzimlerin sentezi ile salgılanmasını içeren bir koruma sistemidir. Epididimisteki immün koruma mekanizmasının merkezinde ise kan-epididimis bariyeri yer

alır. Bitişik prinsipal hücreler arasında bulunan sıkı bağlantılar (tight junctions) spermatozoonlara ait antijenlerin bağışıklık sistemine maruz kalmasını engelleyerek bu bariyerin temel yapısal bileşenini oluşturur. Özellikle başlangıç segmentinde bağlantı komplekslerinin büyük bölümünü sıkı bağlantıların oluşturduğu, dezmozomların ise daha sınırlı olduğu bildirilmiştir (Robaire ve Hermo, 1988; Robaire vd., 2006; Rowart vd., 2018). Ayrıca bazal hücrelerin adezyon molekülleri aracılığıyla bu bariyerin yapısal bütünlüğünü desteklediği gösterilmiştir (Arrighi, 2014). Adherens ve gap bağlantıları ise hücreler arası iletişimi düzenleyerek epididimis fonksiyonunun sürekliliğine katkıda bulunur (Dube ve Cyr, 2013).

Bu sıkı bağlantılar ve segmente özgü taşıyıcı proteinler tarafından oluşturulan özel ortam, spermlerin olgunlaşması, korunması ve depolanması açısından büyük önem taşır. Böylece spermatozoalar, epididimisin her bir segmentinden geçerken gelişim aşamalarına uygun bir ortamla karşılaşır (Hinton vd., 2011; Robaire vd., 2006; Turner, 1991).

1.1.7. Duktus Deferens

Duktus deferens (vas deferens), epididimis kaudasının devamı olarak başlar ve spermatik kordon (funikulus spermatikus) içerisinde testiküler arter, plexus pampiniformis (testiküler venler), lenfatik damarlar, sinir lifleri ve m. kremaster kası ile birlikte seyrederek. İnguinal kanaldan geçerek pelvik üretraya ulaşır (Chawla ve Jena, 2021; Ergün, 2010; Knoblaugh vd., 2018; Ross ve Pawlina, 2011).

Histolojik olarak epididimise benzer şekilde yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşenmiştir. Ancak burada bulunan stereosilyumlar, epididimise kıyasla daha kısa olup distal segmentlere doğru kademeli olarak kaybolur. Duktus deferensin en karakteristik özelliği, onu saran kalın üç katmanlı kas tabakasıdır. Bu tabakalar; içte ve dışta longitudinal ve ortada sirküler olarak düzenlenmiştir. Bu güçlü kas yapısı, ejakulasyon sırasında peristaltik kasılmalar oluşturarak epididimal içeriğin ileriye taşınmasını sağlar (Ergün, 2010; Ross ve Pawlina, 2011).

1.1.8. Testis ve Epididimisin Embriyolojik Gelişimi

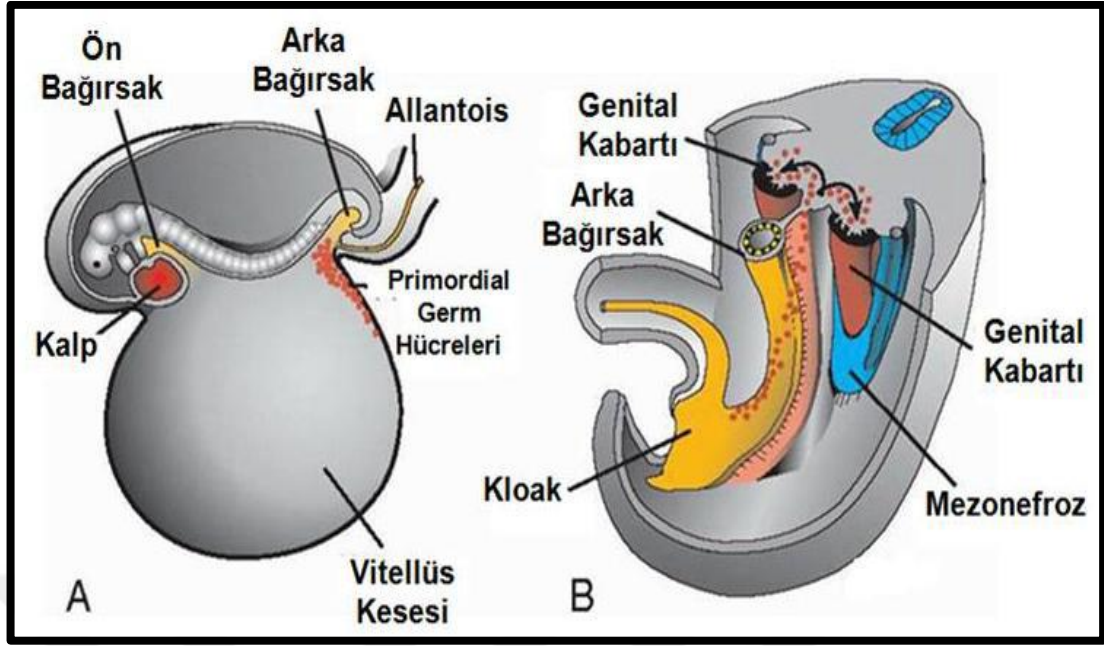
Fonksiyonel bir üreme sisteminin gelişimi, türün devamı açısından büyük önem taşır. Canlının genetik mirası, gelişmekte olan gonadlarda bulunan eşey hücreleri aracılığıyla

sonraki nesillere aktarılır (Pask, 2016). Cinsel gelişim, iki temel süreci kapsar: cinsiyetin belirlenmesi ve cinsiyetin farklılaşması. Cinsiyetin belirlenmesi, embriyonik gelişim sırasında canlının erkek ya da dişi yönünde gelişmesini sağlayan temel biyolojik süreçtir. Cinsiyetin farklılaşması ise farklılaşmamış embriyonik yapılardan erkek ya da dişi fenotiplerin gelişimini sağlayan bir süreçtir. Bu süreç genellikle embriyonun kromozomal cinsiyetiyle uyumlu ilerler ve kromozomal, gonadal, hormonal ve fenotipik düzeylerde gerçekleşir (She ve Yang, 2014).

Genetik düzeyde kromozomal cinsiyet, döllenme sonrasında oluşan kromozom seti tarafından belirlenir. XY kromozom dizilimi erkek cinsiyetini, XX dizilimi ise dişi cinsiyetini ifade eder. Bipotansiyel gonadlar, gelişimin erken evrelerinde morfolojik olarak ayırt edilemeyen, ancak ilk farklılaşan yapılardır. Bu gonadların testis ya da ovaryum yönünde gelişimi, cinsiyet farklılaşmasının kritik bir aşamasını oluşturur. İşlevsel bir gonadın gelişimi ve bu gonadın salgıladığı hormonlar, iç ve dış genital organlar ile sekonder cinsiyet özelliklerinin oluşumunu etkiler (Biaison-Lauber, 2016; Makiyan, 2016).

Memelilerde gonadlar, lumbal bölgedeki intermediyer mezoderminden köken alan ürogenital plakın farklılaşmasıyla gelişir. Bu bölgede, sölom epitelii kaynaklı bilateral kabartılar meydana gelir ve krista genitális olarak adlandırılan bu yapılar, testis ve ovaryumun öncül yapılarını oluşturur. Ancak, bu aşamada henüz cinsiyet hücreleri içermezler (Hassa ve Aştı, 1997; Özer vd., 2007).

Primordiyal eşey hücreleri (gonositler), vitellus kesesini çevreleyen viseral mezodermde, endodermal epitele komşu bölgede ortaya çıkar. Embriyonun katlanması sırasında bu hücreler, arka bağırsağın dorsal mezentere doğru aktif migrasyon göstererek mezenkimal doku üzerinden krista genitális'e ulaşırlar (Şekil 1.3.). Bu bölgede sölom epitelii altına yerleşerek çoğalırlar. Bu dönemde krista genitális ve buraya gelen primordiyal eşey hücreleri henüz farklılaşmamıştır ve her iki cinsiyet için de benzer yapıdadır. Bu nedenle bu yapılar "bipotansiyel gonad" olarak tanımlanır. Embriyonun cinsiyeti genetik olarak döllenme anında belirlenmiş olsa da erkek veya dişi özelliklerin ortaya çıkışı, hayvan türüne bağlı olarak gebeliğin farklı dönemlerinde gerçekleşir (Skinner ve Griswold, 2005; Swain ve Lovell-Badge, 1999). Bu süreçte cinsiyete özgü gonad gelişimi embriyonik dönemde başlasa da işlevsel olgunluk postnatal dönemde tamamlanır. Nitekim erkek ratlarda cinsel olgunluk yaklaşık 10. haftada sağlanır (Ojeda ve Skinner, 2006).



Şekil 1.3. A. Vitellus kesesi duvarında bulunan primordiyal eşey hücreleri B. Primordiyal eşey hücrelerinin, arka bağırsak ve dorsal mezenter boyunca, krista genitalise (genital çıkıntı) göçü (Sadler, 2021'den uyarlanmıştır)

Bipotansiyel gonadın testis yönünde farklılaşmasında ilk gözlenen morfolojik olay, sölom epitelinden Sertoli hücrelerinin farklılaşmasıdır. Sertoli hücreleri testiste farklılaşan ilk somatik hücrelerdir (Karl ve Capel, 1998; Pawar ve Wrobel, 1991). Bu hücreler, primordiyal eşey hücreleriyle kümeler oluştururlar (Skinner ve Griswold, 1983; Smith vd., 1987). Mezonefrozdan göç eden endotelyal ve preperitubular hücrelerin (öncü peritubular) bu kümeleri çevrelemesiyle primer seks kordonları oluşur. Bu kordonlar, ilerleyen gelişim evrelerinde seminifer kordonlara farklılaşır ve tubulus seminiferus kontortus, tubulus rektus ile rete testisi meydana getirir (Merchant-Larios ve Moreno-Mendoza, 1998; Nishino vd., 2001). Preperitubular hücreler, her seminifer kordonu çevreleyen tek sıralı bir tabaka oluşturarak yapısal bütünlük ve mekanik destek sağlar (Wang vd., 2002).

Seminifer kordonların oluşumunu takiben, testis içindeki diğer hücre tipleri de farklılaşmaya başlar. Vitellus kesesinden göç eden primordiyal eşey hücreleri spermatogonyumlara dönüşür (Ross ve Pawlina, 2011). Aynı zamanda, interstisyel bölgede FLC'ler gelişir. Bu hücrelerin mezonefrik mezenşim ve sölomik epitel kökenli olduğu bildirilmiştir (Ademi vd., 2022; Garcia-Alonso vd., 2022; Wang vd., 2022). Sertoli hücreleri, Leydig hücrelerinin farklılaşmasında düzenleyici rol oynar (Liu vd., 2016).

Kemirgenlerde ftal androjen üretiminin tek kaynağı FLC'lerdir. Buna karşılık insanlarda, ftal testis temel androjen kaynağı olmakla birlikte, adrenal bezlerden de sınırlı miktarda androjen öncülleri sağlanır. Erkek reme sisteminin gelişimi büyük oranda androjenlere bağımlı olmakla birlikte, testislerin skrotuma inişi hem FLC'lerden salgılanan INSL3 hormonuna hem de androjenlere ihtiyaç duyar (Keer ve Jrgensen, 2024; Kothandapani vd., 2020; Zimmermann vd., 1999).

Testis gelişiminde belirleyici moleküllerden biri Y kromozomu üzerinde yer alan ve testis belirleyici faktör (TDF) olarak bilinen SRY genidir. Embriyonik dönemin erken safhalarında eksprese olan bu gen, Sertoli hücrelerinin farklılaşmasını başlatarak embriyonun erkek yönünde gelişimini düzenler. Ayrıca, testis gelişimini takiben diğer erkek cinsiyet organlarının oluşumunu sağlayan genlerin ekspresyonuna da aracılık eder. SRY geninin yokluğunda Sertoli hücreleri farklılaşması ve dolayısıyla testis morfogenezi gerçekleşmez. SRY'nin yanı sıra SOX9, SF-1 ve DAX-1 gibi genlerin de uygun düzeyde ve zamanlamayla eksprese edilmesi testis gelişimi için zorunludur. Özellikle SOX9, testis gelişiminde kritik bir rol oynar ve AMH geninin ekspresyonunu doğrudan düzenler (Agrawal vd., 2009; Capel, 2000; Lovell-Badge, 1993; Ross ve Pawlina, 2011; Tres vd., 1986, Yamamoto vd., 2000). Sertoli hücreleri tarafından salgılanan AMH, Mller kanalının gerilemesine neden olarak dişi üreme organlarının oluşumunu engeller (Josso, 1990; Yamamoto vd., 2000). Aynı zamanda Leydig hücreleri tarafından salgılanan testosteron, mezonefrik (Wolff) kanalın erkek boşaltım sistemi yapılarına (epididimis, duktus deferens vb.) farklılaşmasını sağlar (Habert vd., 2001; Ross ve Pawlina, 2011). Bu süreçte, ftal Leydig hücrelerinin testosteron üretimi başlangıçta LH'dan bağımsız gerçekleşirken (Habert vd., 2001), ilerleyen evrelerde LH reseptörü taşıyan hücreler oluşur ve hormonal kontrol başlar (Migrenne vd., 2001).

Testis gelişimi sırasında, seminifer kordonların oluşturduğu tubulus seminiferus kontortuslar ile mezonefroz borucukları arasında geçici bağlantılar kurulur. Bu bağlantılar daha sonra rete testisi oluşturur. Mezonefroz borucukları ise duktuli eferentese farklılaşır. Mezonefrik (Wolff) kanalın testise komşu proksimal bölgesi zamanla kıvrımlı bir yapı kazanarak duktus epididimidis dönüşür. Bu bölgedeki bazı mezonefrik tubuller gelişen seminifer kordonlarla birleşerek duktuli eferentesi oluşturur ve böylece rete testis ile duktus epididimidis arasında bağlantı sağlanmış olur. Mezonefrik kanalın distal kısmı ise kalın bir düz kas tabakası geliştirerek duktus deferensini oluşturur (zer vd., 2007; Rodriguez vd., 2002; Tanyolaç, 1999). Embriyogeneizde mezonefrik kanal ve tubullerden köken alan epididimis, doğum sonrasında morfolojik ve fonksiyonel olgunlaşmasını sürdürür. Sonuç

olarak testis gelişimi; sölom epiteli, primordiyal eşey hücreleri, Sertoli ve Leydig hücreleri arasındaki kompleks ve zamana duyarlı etkileşimler sonucunda şekillenir. Bu süreç, erkek üreme sisteminin temel yapılarının oluşmasında hayati rol oynar (Ross ve Pawlina, 2011).

1.2. Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri, hücrelerin proliferasyonu, farklılaşması, göçü ve doku gelişimi gibi temel biyolojik süreçleri kontrolünde görev alan, biyolojik olarak aktif sinyal polipeptitleridir. Bu moleküller yalnızca hücre döngüsünü düzenlemekle kalmaz, aynı zamanda çeşitli hücresel işlevlerin sürdürülmesinde de rol oynarlar (Litwack, 2022). Genellikle hücre olgunlaşması ve farklılaşmasını desteklemelerine rağmen, etkileri hem büyüme faktörünün türüne ve hem de hedef hücreye göre değişiklik gösterebilir. Özellikle IGF ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi geniş etki alanına sahip olanlar, birçok epitelyal ve mezenkimal hücre tipini uyarabilir. Hormonlar ise hücresel fonksiyonların sürdürülmesinde önemli olmakla birlikte, büyüme faktörlerinden farklı olarak hücre proliferasyonunu genellikle doğrudan etkilemezler (Skinner, 1991; Skinner ve Griswold, 2005).

Memeli testisinde IGF, FGF, dönüştürücü büyüme faktörleri (TGF- α ve TGF- β) ve EGF gibi çok sayıda büyüme faktörü tanımlanmıştır. Bu ailelerin çoğu birden fazla üyeye sahiptir. Özellikle EGF ailesi, güçlü mitojenik etkileri ve hücre göçü, farklılaşma, apoptoz ve hücre hareketliliği gibi çok sayıda biyolojik süreci düzenlemesiyle dikkat çeker. Bu faktörler, aynı zamanda hücre proliferasyonunu destekleyerek doku büyümesini ve onarımını da uyarırlar (Berasain ve Avila, 2014; Carpenter ve Wahl, 1992; Massagué ve Pandiella, 1993; Pan vd., 2014; Prigent and Lemoine, 1992). Ayrıca, EGF ailesinin erkek üreme sistemi fizyolojisindeki önemli düzenleyicilerden biri olduğu çeşitli çalışmalarda vurgulanmıştır (Oliva-Hernandez ve Perez-Gutierrez, 2008).

Çok hücreli organizmalarda hücreler arası iletişim; farklılaşma, bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesi, hücre hareketliliği ve madde taşınımı gibi süreçlerin kontrolünde esastır. Bu iletişim, hedef hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak hücre içi sinyalleşmeyi başlatan ekstraselüler sinyal molekülleri aracılığıyla sağlanır. Sinyalleşme biçimi, hedef hücrelerin konumuna göre endokrin, parakrin, otokrin veya jukstakrin olarak sınıflandırılır. Endokrin sinyalleşmede sinyal molekülleri dolaşım sistemiyle uzak hücrelere taşınırken, parakrin sinyalleşmede komşu hücreler etkilenir. Otokrin sinyalleşmede sinyal, üretici hücreyi

etkilerken; jukstakrin iletişimde hücreler doğrudan temas kurar. Ayrıca testis ve epididimis arasında, seminifer tubul lümeni yoluyla gerçekleşen ve ‘lumikrin sinyal’ olarak tanımlanan özel bir iletişim biçiminin olduğu gösterilmiş olup, bu mekanizmanın epididimis fizyolojisinin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Hinton vd., 1998; Hinton vd., 2003; Turner ve Miller, 1997).

Büyüme faktörleri bu sinyal mekanizmaları aracılığıyla etki gösterir ve çoğunlukla tirozin kinaz aktivitesine sahip reseptörler üzerinden hücre içi sinyal iletimini başlatır. Ligand-reseptör etkileşimi sonucunda hücre içi sinyal yolları aktive olur, gen ekspresyonu düzenlenir ve bunun sonucunda mitojenik aktivite ortaya çıkar (Burges, 2022; Schlessinger, 2000; Sharma vd., 2018). Bu etkileşim, reseptörlerin dimerleşmesine ve sitoplazmik tirozin kalıntılarının otofosforilasyonuna yol açar. Ortaya çıkan bu fosforilasyon, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyal yolunu başlatır. MAPK ailesi, ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinazlar (ERK), c-Jun amino terminal kinazlar (JNK) ve p38 MAPK’lar olmak üzere üç ana alt gruptan oluşur (Johnson ve Lapadat, 2002). EGF gibi büyüme faktörleri çoğunlukla ERK yolunu aktive ederken, JNK ve p38 yolları daha çok hücre stres koşullarında devreye girer. Fosforillenmiş ERK’ler çeşitli hedef proteinleri aktive ederek proliferasyon, farklılaşma ve hücre hareketliliği gibi spesifik hücresel yanıtları tetikler (Tomsig ve Turner, 2006). MAPK sinyal yolunun, testis büyümesi, eşey hücre proliferasyonu ve farklılaşma, apoptoz ve testosteron sekresyonunda önemli bir düzenleyici olduğu bildirilmiştir (Luo vd., 2022).

Büyüme faktörlerinin çoğu suda çözünür peptit ya da protein yapısındadır ve yüksek afiniteyle plazma membranındaki özgül reseptörlerine bağlanarak hücre içi sinyal iletimini başlatır. Bu bağlanma, reseptörlerin tirozin kinaz aktivitesini tetikleyerek hedef proteinlerin fosforilasyonunu ve buna bağlı gen ekspresyonu değişikliklerini indükler. Ancak bazı istisna gruplarda, örneğin TGF- β ailesinde, reseptörler tirozin yerine serin veya treonin kalıntılarını fosforile eder (Saito vd., 2018).

Bununla birlikte, bazı büyüme faktörleri sitokin yapısında küçük peptitlerdir. Sitokinler genel olarak hücreler arası iletişimi düzenlerken, yalnızca hücre büyümesi veya farklılaşmasını etkileyenler büyüme faktörü olarak sınıflandırılır. Örneğin, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), kök hücrelerden beyaz kan hücrelerinin gelişimini desteklediği için sitokin kökenli bir büyüme faktörüdür. Protein yapısındaki büyüme

faktörlerine ise vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve özellikle EGF örnek verilebilir (Stone vd., 2023).

Son yıllarda yapılan araştırmalar, testis gelişimi ve fonksiyonunun yalnızca gonadotropinler (FSH ve LH) ve testosteron gibi endokrin hormonlarla değil, aynı zamanda testis içinde lokal olarak üretilen büyüme faktörleriyle de düzenlendiğini göstermiştir. Bu lokal faktörler hem fetal hem de postnatal dönemde spermatogenez, steroidogenez ve doku farklılaşması süreçlerinde önemli roller üstlenmektedir. Testis dokusunda bu faktörlerin ekspresyon düzeyleri ve hücresel lokalizasyonlarının belirlenmesi, onların hücre proliferasyonunu desteklediğini, doku farklılaşmasını düzenlediğini ve organogenez süreçlerini modüle ettiğini ortaya koymuştur (Abd-Elmaksoud ve Sinowatz, 2005; Huleihel ve Lunenfeld, 2004; Skinner, 1991).

1.2.1. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR)

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), tirozin kinaz aktivitesine sahip transmembran bir glikoprotein olup hücre proliferasyonu, farklılaşması ve hayatta kalma gibi çeşitli hücresel süreçleri düzenleyen bir sinyal reseptörüdür (Herbst, 2004). Gelişim biyolojisi, doku homeostazisi ve kanser biyolojisi alanlarında en kapsamlı biçimde araştırılan reseptörlerden biridir (Ceresa ve Peterson, 2014; Yarden ve Sliwkowski, 2001). Yapısal olarak ekstraselüler, transmembran ve intraselüler segmentlerden oluşur. Ekstraselüler bölgede iki ligand bağlayıcı alan ve bu bölgeler arasında yer alan sistein açısından zengin iki bölge bulunur. İntraselüler kısımda yaklaşık 250 amino asit uzunluğunda bir tirozin kinaz alanı ile karboksi-terminal uçta yer alan, yedisi fosforillenebilir özellikte olan tirozin kalıntıları bulunur. Bu fosfotirosin bölgeler, çeşitli sinyal iletim proteinlerinin bağlanmasına olanak tanıyarak aşağı akışlı (downstream) sinyal yollarını aktive eder (Ceresa ve Peterson, 2014; Lemmon ve Schlessinger, 2010; Yarden ve Sliwkowski, 2001).

EGFR aracılı sinyal iletimi dört basamakta gerçekleşir: (1) özgül ligandın reseptöre bağlanması, (2) reseptör dimerizasyonu, (3) dimer içindeki tirozin kalıntılarının karşılıklı fosforilasyonu (transfosforilasyon) ve (4) fosforillenmiş reseptör bölgelerine sinyal iletim proteinlerinin bağlanması. Bu olaylar, hücre içinde proliferasyon, farklılaşma, migrasyon ve hücre sağ kalımı gibi çok sayıda fizyolojik yanıtı başlatır (Lax vd., 1988; Lemmon ve Schlessinger, 2010; Yarden ve Sliwkowski, 2001).

EGFR'yi aktive edebilen endojen ligandlar arasında EGF, TGF- α , betasellülin, heparin bağlayıcı EGF benzeri büyüme faktörü (HB-EGF), amfiregulin (AREG), epigen ve epiregulin bulunur. Bu ligandların EGFR'ye olan bağlanma afiniteleri, dokuya özgü dağılımları ve ekspresyon profilleri farklılık gösterir (Derynck vd., 1984; Higashiyama vd., 1991; Jacobs vd., 2009; Shing vd., 1993; Shoyab vd., 1988; Strachan vd., 2001; Toyoda vd., 1995; Yarden ve Sliwkowski, 2001). Bu farklılıklar, EGFR aktivasyonunun süresi, yoğunluğu ve hücre içi lokalizasyonu üzerinde belirleyici rol oynar (Roepstorff vd., 2009).

EGF veya TGF- α gibi ligandların bağlanması, EGFR'de konformasyonel değişikliklere yol açarak reseptörün dimerizasyonunu başlatır. EGF ve TGF- α , EGFR üzerinde hem homodimerlerin hem de ErbB ailesinin diğer üyeleriyle heterodimerlerin oluşumunu tetikleyebilir (Lim vd., 1997). Dimerizasyon sırasında reseptörlerden birinin tirozin kinaz alanı, karşı reseptördeki tirozin kalıntılarını fosforile eder. Bu karşılıklı fosforilasyon (transfosforilasyon), sinyal iletimine aracılık eden proteinlerin bağlanabileceği fosfotirozin bölgelerinin oluşumuna neden olur (Lemmon ve Schlessinger, 2010; Qian vd., 1994; Yarden ve Sliwkowski, 2001). Fosforillenmiş tirozin kalıntıları, özgül hücre içi sinyal proteinlerinin bağlanma bölgelerini oluşturarak MAPK, PI3K/Akt ve JAK/STAT gibi sinyal iletim yollarını aktive eder (Ferguson, 2008; Litwack, 2022).

ErbB reseptör ailesi dört üyeden oluşur: ErbB1 (EGFR), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) ve ErbB4 (HER4) (Arteaga ve Engelman, 2014). Bu reseptörler, benzer yapısal organizasyona sahiptir ve hücrel proliferasyon ile farklılaşmayı düzenleyen fosforilasyon kaskadlarını başlatır (Herbst, 2004; Kleiman vd., 2011). ErbB2'nin bilinen doğal bir ligandı bulunmamakla birlikte, ligand bağlı diğer üyelerle heterodimerleşerek aktive olabilir. Bununla birlikte, bazı kanser türlerinde ErbB2'nin aşırı ekspresyonu, ligand olmaksızın homodimerleşme yoluyla sinyal aktivasyonuna neden olur (Yarden ve Sliwkowski, 2001).

ErbB3, zayıf ya da işlevsiz tirozin kinaz aktivitesine sahip olduğundan "psödokinaz" olarak sınıflandırılır; ancak genetik delesyonunun nöropatik fenotiplerle sonuçlanması, sinyal iletiminde dolaylı bir rolü olduğunu göstermektedir (Jura vd., 2009; Riethmacher vd., 1997). ErbB4 ise membran üzerinden veya proteolitik parçalanma sonrası çekirdeğe translokasyon yoluyla sinyal iletimini gerçekleştirebilme kapasitesiyle dikkat çeker (Linggi ve Carpenter, 2006).

Ayrıca, EGFR'nin hücre çekirdeğine transloke olabildiği ve burada proliferasyon, DNA replikasyonu, DNA onarımı ve transkripsiyon gibi temel süreçleri düzenleyebildiği bildirilmiştir (Wang ve Hung, 2012). Bu nükleer lokalizasyon yalnızca EGFR'ye özgü olmayıp, diğer ErbB ailesi üyelerinde de tanımlanmıştır (Xie ve Hung, 1994).

1.2.2. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)

EGF, aynı reseptörü paylaşan TGF- α , AREG, heparin-bağlayıcı EGF (HB-EGF) ve betasellulin gibi çeşitli ligandları içeren EGF ailesinin bir üyesidir (Berasain ve Avila, 2014; Carpenter ve Wahl, 1992; Massagué ve Pandiella, 1993). EGF ailesi üyeleri, plazma membranına yönlendirilmesini sağlayan bir sinyal dizisi içeren proproteinler şeklinde sentezlenir. Her bir proteinin tek bir membran geçişli bölgesi, molekülü hücre zarına bağlayarak bir N-terminal ekstrasellüler bölge ile bir sitoplazmik kuyruk oluşturur. Aktif ve çözünür formun serbest bırakılması, ADAM (disintegrin içeren ve metalloproteinaz aktivitesi olan protein ailesi) tarafından gerçekleştirilen ekstrasellüler bölgenin proteolitik kesilmesiyle sağlanır. Örneğin, ADAM17, HB-EGF, TGF- α ve amfiregulin'in çözünür forma dönüşmesinden sorumluyken; ADAM10, betasellulin'in salınmasını katalizler. Bu proteolitik süreç, hücre içi sinyal yolları tarafından sıkı biçimde düzenlenir; ancak bu düzenleme mekanizmalarının ayrıntıları henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır (Litwack, 2022).

EGF, hücre proliferasyonu, doku farklılaşması ve organogenez gibi temel biyolojik süreçlerde rol oynayan önemli bir büyüme faktörüdür. En yoğun olarak submandibular bezde sentezlense de testis, böbrek proksimal tubul epiteli, prostat, seminal vezikül, ön hipofiz ve mide gibi birçok dokuda da varlığı gösterilmiştir. Testiste başlıca kaynak Leydig hücreleridir (Boonstra vd., 1995; Yan vd., 1998).

EGF, testosteron biyosentezinde görevli enzimlerin aktivitesini düzenleyerek ve kolesterolün mitokondriye taşınımını artırarak gonadotropinlerin etkisini güçlendirir. Ayrıca, otokrin ve/veya parakrin mekanizmalar aracılığıyla spermatogenezi düzenlediği, eşey hücrelerinin farklılaşmasını teşvik ederken spermatogonyal proliferasyonu da baskılayabildiği bildirilmiştir (Wald, 2005). Bu bulgular, EGF-EGFR sisteminin testis gelişimi, spermatogenez ve steroid hormon sentezinde önemli bir düzenleyici rol oynadığını ortaya koymaktadır (Tsutsumi vd., 1986; Wong vd., 2000).

1.2.3. Amfiregulin (AREG)

AREG, EGF ailesine ait bir ligandır ve başta EGFR (ErbB1) olmak üzere ErbB2, ErbB3 ve ErbB4 reseptörleriyle etkileşim kurabilir (Roepstorff vd., 2009; Singh vd., 2022; Shoyab vd., 1988). AREG, EGFR'nin aktivasyonu aracılığıyla hücre proliferasyonunu ve farklılaşmayı düzenleyen sinyal yollarını uyarır (Berasain ve Avila, 2014). Yaklaşık 1,4 kb uzunluğunda bir mRNA tarafından kodlanmakta olup, 252 amino asitlik bir öncül protein (Pro-AREG) şeklinde sentezlenir. Pro-AREG, proteolitik olarak hücre dışına salınarak biyolojik olarak aktif AREG formuna dönüşür; bu aktif form EGFR'ye bağlanarak hücrel yanıtı başlatır (Fukuda vd., 2012; Levano ve Kenny, 2012).

AREG'in EGFR'ye bağlanması, reseptörün aktivasyonuna ve EGFR'nin ErbB ailesinin diğer üyeleri (ErbB2, ErbB3 ve ErbB4) ile dimerleşmesine yol açar. Bu dimerizasyon, hücre içi sinyal iletim yollarını (örneğin MAPK, PI3K/Akt ve JAK/STAT) aktive eder (Citri ve Yarden, 2006).

AREG, bağışıklık yanıtı, inflamasyon ve doku onarımı gibi birçok fizyolojik ve patolojik süreçte rol alan önemli bir büyüme faktörüdür. Doğal ve adaptif immün hücrelerde, farklı fizyolojik ya da inflamatuvar uyarılar altında AREG ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (Zaiss vd., 2013). Ayrıca, üriner, solunum, sindirim ve üreme sistemleri gibi birçok normal dokuda da AREG varlığı tespit edilmiştir (Chao vd., 2024).

AREG'in temel işlevi, EGFR aracılığıyla hücre proliferasyonu, doku onarımı ve rejenerasyonu teşvik etmektir. Bunun yanında, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi ve inflamatuvar yanıtların kontrolü üzerinde de etkili olduğu gösterilmiştir. Bu çok yönlü biyolojik roller, amfiregulin yara iyileşmesi, immün homeostazın sürdürülmesi ve kanser ile kronik inflamasyon gibi hastalık süreçlerinde potansiyel olarak önemli bir düzenleyici molekül haline getirmektedir (Shao ve Sheng, 2010).

1.2.4. Dönüştürücü Büyüme Faktörü Alfa (TGF- α)

TGF- α , EGF ailesine ait bir ligand olup EGFR'ye bağlanarak hücre proliferasyonunu tetikler. EGF ile aynı reseptörü kullanmasına rağmen biyolojik etkileri, etki gücü ve doku dağılımları bakımından farklılıklar göstermektedir (Derynck, 1992; Josso, 1990). Normal

hücrelerde belirgin proliferatif etki oluşturduğu ve bazı çalışmalarda EGF'ye kıyasla daha güçlü bir mitojen olduğu bildirilmiştir (Roepstorff vd., 2009; Spadaro vd., 2012).

TGF- α , embriyonik gelişim sırasında bazı fetal ve komşu maternal dokularda geçici olarak eksprese edilirken, erişkin dönemde de deri, böbrek, karaciğer, meme bezi gibi birçok dokuda bulunur (Derynck, 1992; Madtes vd., 1988; Salomon vd., 1990). Bu geniş dağılım, TGF- α 'nın doku homeostazı, hücre büyümesi ve rejenerasyon süreçlerinde parakrin ve otokrin düzenleyici olarak önemli rol oynadığını göstermektedir (Dickson vd., 1995).

Testis dokusunda ise TGF- α 'nın başlıca üretim kaynakları Sertoli hücreleri, peritubular miyoid hücreler ve Leydig hücreleridir (Skinner vd., 1989; Teerds vd., 1990). Sertoli hücrelerinde TGF- α , laktat, transferrin ve östrojen üretimi gibi çeşitli metabolik süreçleri düzenleyerek eşey hücrelerinin gelişimini dolaylı biçimde destekler (Mallea vd., 1986; Onoda ve Suarez-Quian, 1994). Benzer şekilde, EGF de Sertoli hücrelerinde inhibin, ABP ve transferrin sentezini artırarak testiküler fonksiyonların sürdürülmesine katkı sağlar. Bu etkilerin düzeyi, testisin gelişim evresine bağlı olarak değişkenlik gösterebilir (Skinner ve Griswold, 2005).

Sonuç olarak, TGF- α hem embriyonik hem de postnatal süreçte testiküler büyüme ve farklılaşmanın düzenlenmesinde önemli bir otokrin/parakrin faktör olarak görev yapmaktadır (Levine vd., 2000; Plowman vd., 1990).

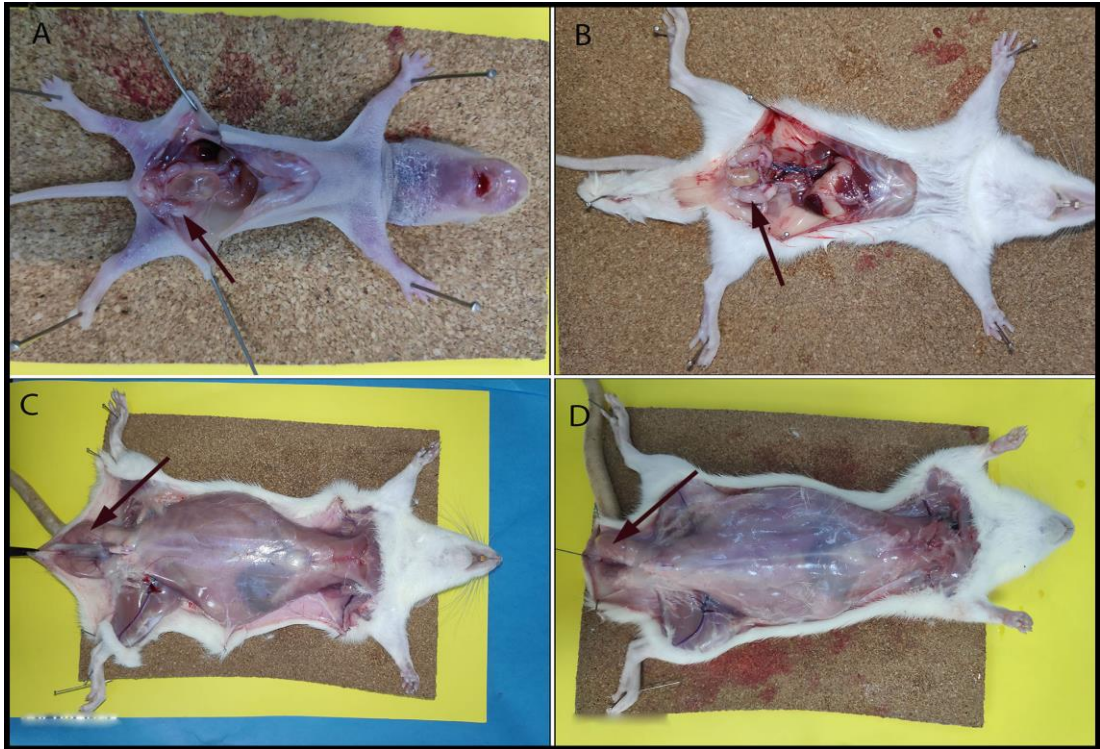
Bu çalışmanın amacı, Wistar albino erkek ratlarda neonatal, infantil, geç pubertal ve olgun dönemleri kapsayan postnatal süreç boyunca testis ve epididimis dokularının gelişimini incelemek ve bu gelişimle ilişkili olarak epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR/erbB1/HER1) ile ligandları EGF, TGF- α ve AREG'in hücreler ve segmental düzeydeki ekspresyon paternlerini ortaya koymaktır. Bu doğrultuda, söz konusu moleküllerin farklı spermatogenik evrelerdeki eşey hücreleri ile epididimisin tüm segmentlerinde sergilediği lokalizasyon özellikleri ve dönemsel değişimlerin belirlenmesi hedeflenmiştir. Elde edilen bulguların, EGFR ve ilişkili ligandlarının testis ve epididimis gelişimindeki potansiyel düzenleyici rollerine ışık tutarak erkek üreme sisteminin postnatal olgunlaşmasına ilişkin mevcut bilgi birikimine katkı sağlaması amaçlanmaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyali

Bu tez çalışması, Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı' nın 21.06.2023 tarihli ve 2023-12-108 sayılı onayı ile yürütüldü (Ek-1).

Çalışmada materyal olarak kullanılan Wistar albino ırkı erkek ratlar, Ankara Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'ndan sağlandı. Tüm bakım ve beslenme işlemleri, kurum standartlarına uygun şekilde yürütüldü. Ratlar, 20-24°C sıcaklık aralığında, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda, standart pelet yem ve çeşme suyu verilerek ad libitum olarak beslendi. Postnatal gelişimin farklı evrelerini değerlendirmek amacıyla toplam 24 hayvan, her biri altı rat içeren dört deney grubuna ayrıldı. Gruplar; neonatal (5 günlük, PND5), infantil (20 günlük, PND20), geç pubertal (50 günlük, PND50) ve olgun (70 günlük, PND70) dönemleri kapsamaktaydı. Her gruptaki altı rat, ksilazin-ketamin anestezisi altında ötenazi edildi; testis ve epididimis dokularından örnekler alındı (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Çalışma gruplarına ait testisler. A. Neonatal dönem, B. Infantil dönem, C. Geç pubertal dönem, D. Olgun dönem. Testis (ok)

2.2. Histokimyasal İncelemeler

Testis ve epididimis örnekleri Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında Bouin solüsyonu ile tespit edildikten sonra rutin histolojik işlem basamaklarından geçirilerek paraplast içine gömüldü ve bloklar hazırlandı. Bu bloklardan 5 mikrometre (μm) kalınlığında kesitler alınarak normal lamlara yerleştirildi. Histokimyasal değerlendirme amacıyla Crossmon'un modifiye üçlü boyası ile Periyodik Asit-Schiff (PAS) yöntemi (Bancroft ve Gamble, 2002; Crossmon, 1937) kullanıldı.

2.3. Yarı İnce Kesitlerin Elde Edilmesi ve İncelenmesi

Doku örnekleri, Karnovsky (1965) protokolüne uygun olarak, pH 7,4'te hazırlanmış glutaraldehid-paraformaldehid karışımı ile fikse edildi. Ardından, %1 ozmik asit çözeltisinde iki saat süreyle ikinci fiksasyon yapıldı. Sonraki aşamada, %1'lik uranil asetatı iki saat bekletildi, dereceli alkoller ve propilen oksitten geçirilerek Araldit M'ye gömüldü. Elde edilen bloklardan 1 μm kalınlığında yarı ince kesitler alınarak toluidin mavisi ile boyandı.

2.4. İmmunohistokimyasal İncelemeler

İmmunohistokimyasal incelemeler için Streptavidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) immünperoksidaz yöntemi (Bancroft ve Gamble, 2002) uygulandı. Paraplast bloklardan poly-L-lysine ile kaplı lamlara alınan 5 μm kalınlığındaki kesitler, deparafinizasyon ve dehidrasyon aşamalarının ardından fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak amacıyla kesitler, %3 hidrojen peroksit (H_2O_2) içeren %70 metanol/PBS çözeltisinde 20-30 dakika bekletildi.

PBS yıkamasını takiben antijenlerin yeniden ortaya çıkarılması için (antijen retrieval), kesitler sitrat tamponunda mikrodalga ile 20 dakika ısıtıldı ve aynı çözeltide 20 dakika soğutuldu. Bu işlemle antijen ile tespit solüsyonu arasındaki bağlar çözülerek epitop bölgeleri açığa çıktı. Sonrasında PBS ile yıkamanın ardından, non-spesifik bağlanmaların engellenmesi için kesitler %10 normal keçi serumu (Ultra V block- Epredia TP-125-HL) ile 5-10 dakika muamele edildi. Blokaaj adımının ardından, kesitler uygun dilüsyonda hazırlanmış primer antikorlarla (Çizelge 2.1.) 4°C'de bir gece boyunca inkubasyona bırakıldı. Primer antikor uygulamasının ardından kesitler PBS ile dört kez yıkandı. Daha

sonra, biotin ile konjuge edilmiş sekonder antikor (Biotinli anti rabbit/mouse sekonder antikor, Epredia TP-125-HL) 20 dakika oda sıcaklığında uygulandı. Ardından üç kez PBS yıkamasını takiben, HRP enzim konjugatlı streptavidin (Streptavidin-horseradish peroksidaz-Epredia TP-125-HL) çözeltisinde 20 dakika bekletildi. Streptavidin adımını izleyen PBS yıkamalarından sonra, kesitler 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) kromojen solüsyonunda (Ultra vision detect system/AEC Epredia TA-125-HA) 5-20 dakika inkübe edildi ve renk gelişimi mikroskop altında izlenerek uygun sürede sonlandırıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra kesitler distile su ile yıkanıp Gill's hematoksilen ile 3 dakika karşı boyama işlemi gerçekleştirildi. Nükleer yapıların mavileşmesinin ardından, kesitlere su bazlı yapıştırıcı (Aqueous mounting medium) damlatılarak lamelle kapatıldı.

Tüm boyama işlemleri nem kontrollü koşullarda gerçekleştirildi. Her protokolde pozitif ve negatif kontroller kullanıldı. Negatif kontrolde primer antikor eklenmeden yalnızca normal serum uygulandı ve diğer adımlar standart şekilde sürdürüldü. Pozitif kontrollerde EGF için beyin, EGFR için ovaryum, AREG için karaciğer, TGF- α için böbrek ve CYP11A1 için adrenal bez dokusu tercih edildi. Preparatlar Leica DM 2500 araştırma mikroskobunda incelenerek görüntülendi.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan primer antikorlar ve özellikleri

Primer Antikor	Ürün Kodu	Klon	Sulandırma Oranı	Üretici
Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR)	NBP1-84814	Poliklonal	1/300	Novus Biologicals
Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)	PA579188	Poliklonal	1/500	Thermo Fisher
Amfiregulin (AREG)	PA5102501	Poliklonal	1/100	Thermo Fisher
Dönüştürücü Büyüme Faktörü Alfa (TGF- α)	NBP1-87501	Poliklonal	1/100	Novus Biologicals
CYP11A1	NBP2-92879	Poliklonal	1/100	Novus Biologicals

2.5. İmmunohistokimyasal Boyamaların Değerlendirilmesi

Elde edilen kesitlerde boyanmalar, her hayvan için üç kesit ve her kesitte en az beş farklı alan incelenerek, bağımsız iki araştırmacı tarafından semikantitatif olarak değerlendirildi. Değerlendirme, immün reaksiyon yoğunluğunu temel alan “Yoğunluk skoru (IS)” sistemine göre yapıldı. Testis ve epididimis (dört segment) kesitlerinde boyanma yoğunluğu şu şekilde sınıflandırıldı.

0= Negatif boyanma: Boyanmanın yüksek büyütmede (40x) dahi görülememesi.

+ = Zayıf boyanma: Boyanmanın yalnızca yüksek büyütmede (40x) seçilebilmesi.

++ = Orta boyanma: Boyanmanın düşük büyütmede (10x) bile izlenebilmesi.

+++ = Kuvvetli boyanma: Boyanmanın düşük büyütmede (10x) belirgin şekilde görülebilmesi.

Elde edilen veriler ordinal ölçekte (0-3) olup, tanımlayıcı istatistikler "Medyan (Minimum-Maksimum)" değerleri ile sunuldu. Testis ve epididimisten elde edilen verilerin gruplar arasındaki farklılıklarının incelenmesinde Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Aynı epididimis dokusunun farklı segmentlerinden elde edilen verilerin grup içi karşılaştırmaları için ise Friedman testi uygulandı. Anlamlı farklılık tespit edilen durumlarda ileri analiz amacıyla Dunn's Bonferroni post-hoc testi yapıldı. Tüm istatistiksel değerlendirmelerde anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi. Analizler SPSS 21,0 paket programı kullanılarak gerçekleştirildi.

3. BULGULAR

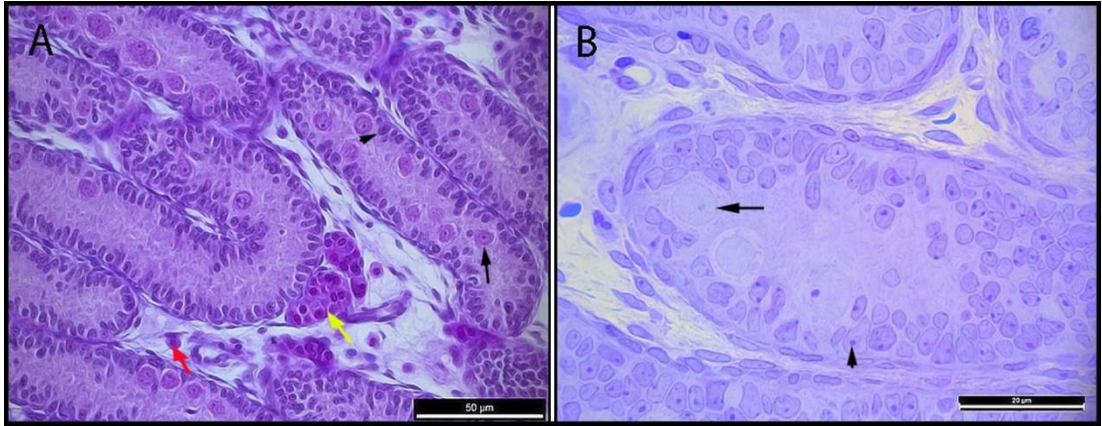
3.1. Testisin Yapısal Özellikleri

3.1.1. Neonatal dönem

Bu döneme ait histolojik bulgular, Crossmon'un modifiye üçlü boyama yöntemi ile hazırlanmış kesitler (Şekil 3.1. A) ve toluidin mavisiyle boyanmış yarı ince kesitlerden (Şekil 3.1. B) elde edildi.

Seminifer tubullerde, gonositler (prespermatogonyal hücreler) ile olgunlaşmamış Sertoli hücrelerinin bulunduğu gözlemlendi. Bazal membran boyunca sıralanan Sertoli hücreleri oval ya da uzamış morfolojide çekirdeklerle sahipken (Şekil 3.1. A ve B, ok başı), gonositler tubul merkezinde yerleşmiş olup iri çekirdekleri ve belirgin nükleoluslarıyla (Şekil 3.1. A ve B, ok) ayırt edildi. Bu dönemde seminifer tubullerde henüz lümen oluşumu izlenmedi.

İnterstisyel bölgede hem FLC'ler (Şekil 3.1. A, sarı ok) hem de ALC'lere benzer hücreler (ALC öncülleri) (Şekil 3.1. A, kırmızı ok) birlikte izlendi. FLC'lerin bazal lamina ile çevrili kümeler şeklinde organize olduğu görüldü.



Şekil 3.1. Neonatal döneme ait testis kesitleri. A. Seminifer tubullerde bazal membran boyunca dizilmiş olgunlaşmamış Sertoli hücreleri (ok başı) ve tubul merkezinde yerleşmiş gonositler (ok) görülmektedir. İnterstisyel alanda FLC (sarı ok) ile ALC'lere benzer morfoloji gösteren hücreler (ALC öncülleri) (kırmızı ok) birlikte izlenmektedir. Crossmon'un modifiye üçlü boyama yöntemi. Bar: 50 µm. B. Yarı ince kesitte gonositler (ok) ve Sertoli hücrelerinin çekirdekleri (ok başı) seçilmektedir. Toluidin mavisi. Bar: 50 µm.

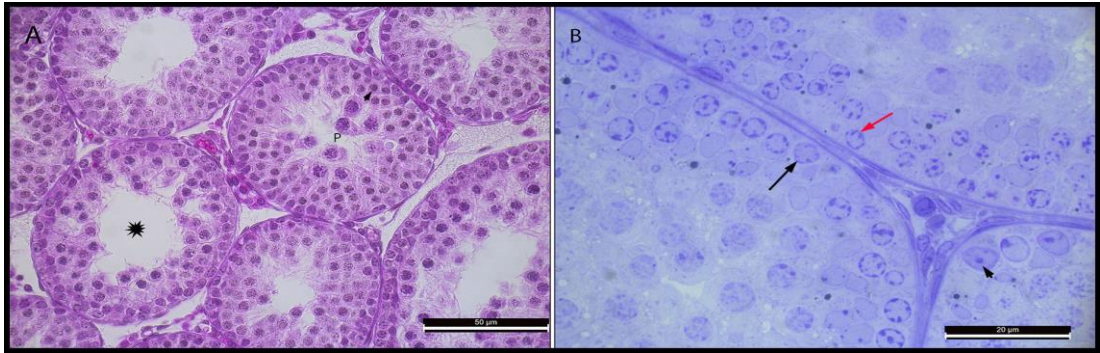
3.1.2. İnfantil dönem

Rat testislerinin infantil dönemine ait histolojik incelemede, seminifer tubullerin organizasyonunun neonatal döneme kıyasla daha gelişmiş olduğu ve lümen oluşumunun başladığı izlendi (Şekil 3.2. A,*). Gonositlerin büyük çoğunluğunun bazal membrana göç ettiği, burada çoğalarak tip A spermatogonyumlara farklılaştığı belirlendi (Şekil 3.2. B, ok).

Spermatogenez süreci başlamış olmakla birlikte henüz ileri evrelere ulaşmamıştı; bu nedenle tubul lümenlerinde spermiyumlara rastlanmadı. Leptoten/zigoten evresindeki spermatositler (Şekil 3.2. A, ok başı) yoğun kromatin yapılarıyla tanımlanırken, pakiten evresindeki spermatositler (Şekil 3.2. A, P) daha büyük, yuvarlak çekirdekleri ve gevşek kromatin organizasyonları ile karakterize edildi. Özellikle çok sayıda iri pakiten spermatositin varlığı, bu dönemin ayırt edici histolojik özelliklerinden biri olarak değerlendirildi.

Sertoli hücreleri, belirgin nükleolus içeren oval ya da üçgen biçimli çekirdekleriyle spermatogonyumlardan ayırt edildi (Şekil 3.2. B, ok başı). Tip A spermatogonyumlar ince ve dağınık kromatinli büyük yuvarlak çekirdekleriyle (Şekil 3.2. B, ok), tip B spermatogonyumlar ise daha küçük, periferik yerleşimli ve yoğun kromatinli çekirdekleriyle tanımlandı (Şekil 3.2. B, kırmızı ok).

Bu bulgular, infantil dönemde rat testisinde seminifer tubul gelişiminin ve erken spermatogenez sürecinin başladığını, ancak sürecin henüz tamamlanmadığını ortaya koydu.



Şekil 3.2. İnfantil döneme ait testis kesitleri. A. Seminifer tubullerde lümen oluşumu (*) başlamış olup, leptoten/zigoten evresindeki spermatositler (ok başı) ve pakiten evresindeki spermatositler (P)

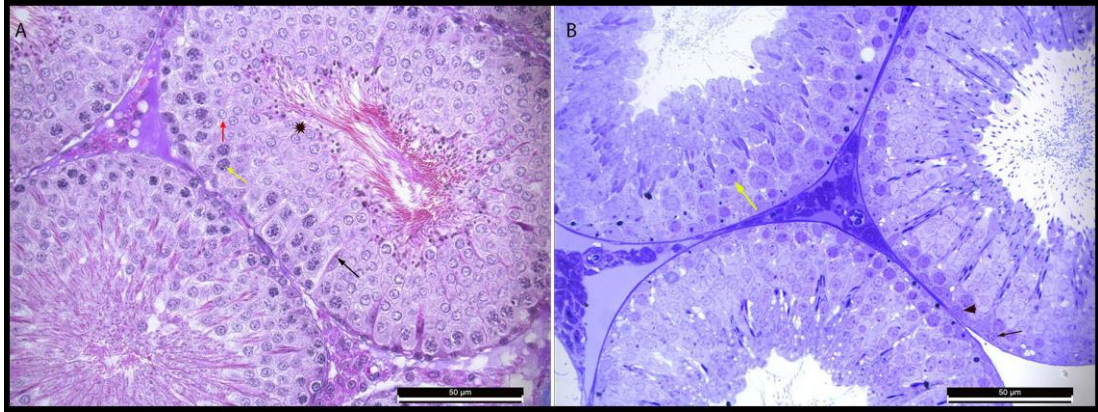
izlenmektedir. Crossmon'un modifiye üçlü boyama yöntemi. Bar: 50 µm. B. Yarı ince kesitte bazal membran boyunca dizilmiş tip A spermatogonyumlar (ok), tip B spermatogonyumlar (kırmızı ok) ve belirgin nükleolus içeren Sertoli hücre çekirdekleri (ok başı) görülmektedir. Toluidin mavisi boyama. Bar: 20 µm.

3.1.3. Geç Pubertal dönem

Geç pubertal dönem, pubertal sürecin başlangıcını temsil eden gelişim evresidir. Bu döneme ait testis kesitlerinde, seminifer tubullerde spermatogenezin farklı evrelerine ait hücrelerin bulunduğu izlendi (Şekil 3.3. A ve B).

Tubul epiteli tip A spermatogonyumlar (Şekil 3.3. B, ok başı) ve tip B spermatogonyumlar (Şekil 3.3. B, ok), primer spermatositler (Şekil 3.3. A, sarı ok), sekonder spermatositler (Şekil 3.3. A, kırmızı ok), spermatidler (Şekil 3.3. A,*) ve spermatozoonlardan oluşan çok katmanlı bir yapı sergilemekteydi. Sertoli hücreleri (Şekil 3.3. A, siyah ok), bazal membran boyunca konumlanmış olup, belirgin nükleolus içeren çekirdek morfolojileriyle ayırt edildi.

Yetişkin testislere kıyasla seminifer tubullerde hücre yoğunluğu daha düşük, elongasyona uğramış spermatid sayısı ise daha azdı.

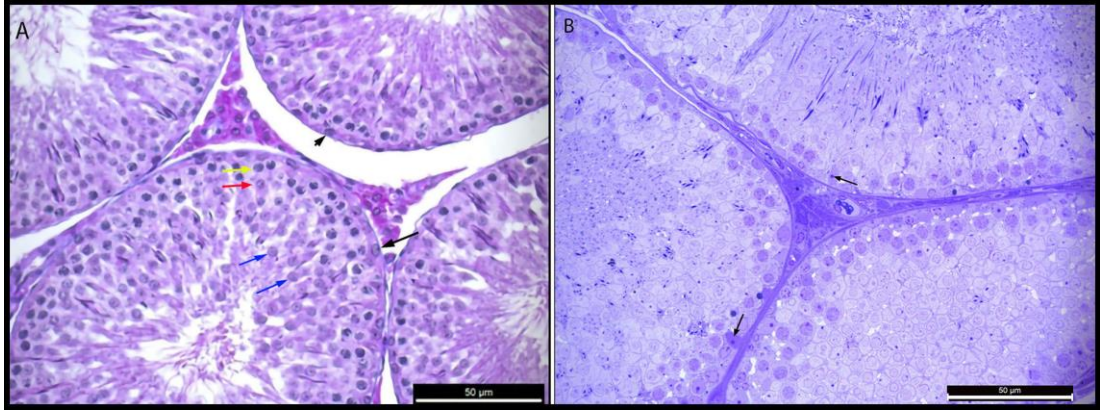


Şekil 3.3. Geç pubertal döneme ait testis kesitleri. A. Seminifer tubullerde spermatogenezin farklı evrelerine ait hücreler izlenmektedir. Sertoli hücreleri (ok), primer spermatositler (sarı ok), sekonder spermatositler (kırmızı ok), spermatidler (*) ve spermatozoonlar çok katmanlı bir epitel yapısı oluşturmaktadır. Crossmon'un modifiye üçlü boyama yöntemi. Bar: 50 µm. B. Yarı ince kesitte bazal membran boyunca dizilmiş tip A spermatogonyumlar (ok başı), tip B spermatogonyumlar (ok), primer spermatosit (sarı ok). Toluidin mavisi boyama. Bar: 50 µm.

3.1.4. Olgun dönem

Olgun rat testislerinin histolojik incelemesinde, seminifer tubullerin tam gelişmiş bir morfolojik yapıya ulaştığı ve düzenli bir spermatogenez süreci sergilediği izlendi. Tubullerde tip A ve B spermatogonyumlardan başlayarak spermatidler ile olgun spermatozoonlara kadar tüm eşey hücre serilerinin eksiksiz olarak yer aldığı saptandı (Şekil 3.4. A ve B). Ayrıca tubul çaplarının belirgin biçimde arttığı ve lümenlerin yoğun şekilde olgun spermatozoonlarla dolduğu dikkati çekti.

Bu bulgular, 70 günlük rat testisinde spermatogenezin tam fonksiyonel düzeye ulaştığını ve testisin cinsel olgunluk evresine eriştiğini ortaya koymaktadır.



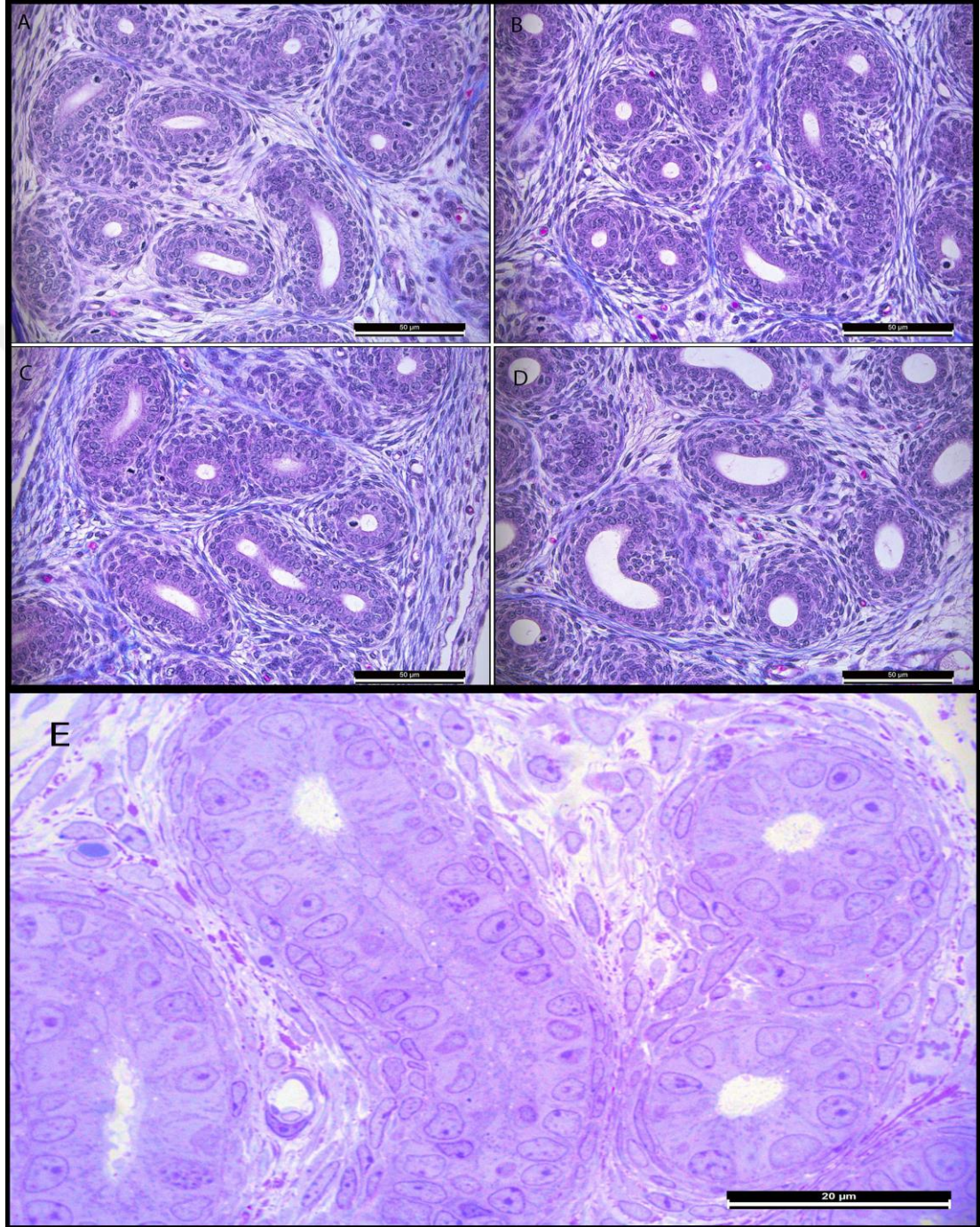
Şekil 3.4. Olgun döneme ait testis kesitleri. A. Seminifer tubullerde spermatogenezin farklı evrelerine ait hücreler izlenmektedir. Tip A spermatogonyumlar (ok), tip B spermatogonyumlar (ok başı), primer spermatositler (sarı ok), sekonder spermatositler (kırmızı ok), spermatidler (mavi ok) ve spermatozoonlar çok katmanlı bir epitel yapısı oluşturmaktadır. Crossmon'un modifiye üçlü boyama yöntemi. Bar: 50 µm. B. Yarı ince kesitte bazal membran boyunca yerleşmiş Sertoli hücreleri (ok) ve farklılaşma evresindeki eşey hücreleri görülmektedir. Toluidin mavisi boyama. Bar: 50 µm.

3.2. Epididimis

3.2.1. Neonatal Dönem

Farklılaşmamış evre olarak tanımlanan bu dönemde, epididimis tubullerinde epitel hücrelerinin farklılaşmasının henüz başlamadığı görüldü. Tüm segmentlerde tek sıralı küboidal ya da kısa kolumnar hücrelerden oluşan bir epitel tabakası mevcuttu. Hücreler arası sınırlar belirgin değildi ve stereosilyum oluşumu izlenmedi. Epitelin altında ince bir bağ dokusu tabakası olarak lamina propriya yer almaktaydı (Şekil 3.5. A: başlangıç segmenti, B:

kaput, C: korpus, D: kauda, E: yarı ince kesit). Lümen içerisinde spermatozoona rastlanmadı. Bu histolojik özellikler, neonatal dönemde epididimis yapısının hem morfolojik hem de fonksiyonel açıdan farklılaşmamış durumda olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 3.5. Neonatal döneme ait epididimis kesitleri. A. Başlangıç segmenti: Tek sıralı kısa kolumnar epitel hücrelerinden oluşan farklılaşmamış yapı. B. Kaput epididimis: Küboidal epitel hücreleri; hücre sınırları belirgin değildir, stereosilyum izlenmedi. C. Korpus epididimis: Tek sıralı epitel görünümü korunmakta olup farklılaşmanın erken evresindedir. D. Kauda epididimis: Geniş lümenli, ince bağ dokusu ile çevrili epitel tabaka. Crossmon'un modifiye üçlü boyama yöntemi. Bar: 50 µm. E. Yarı

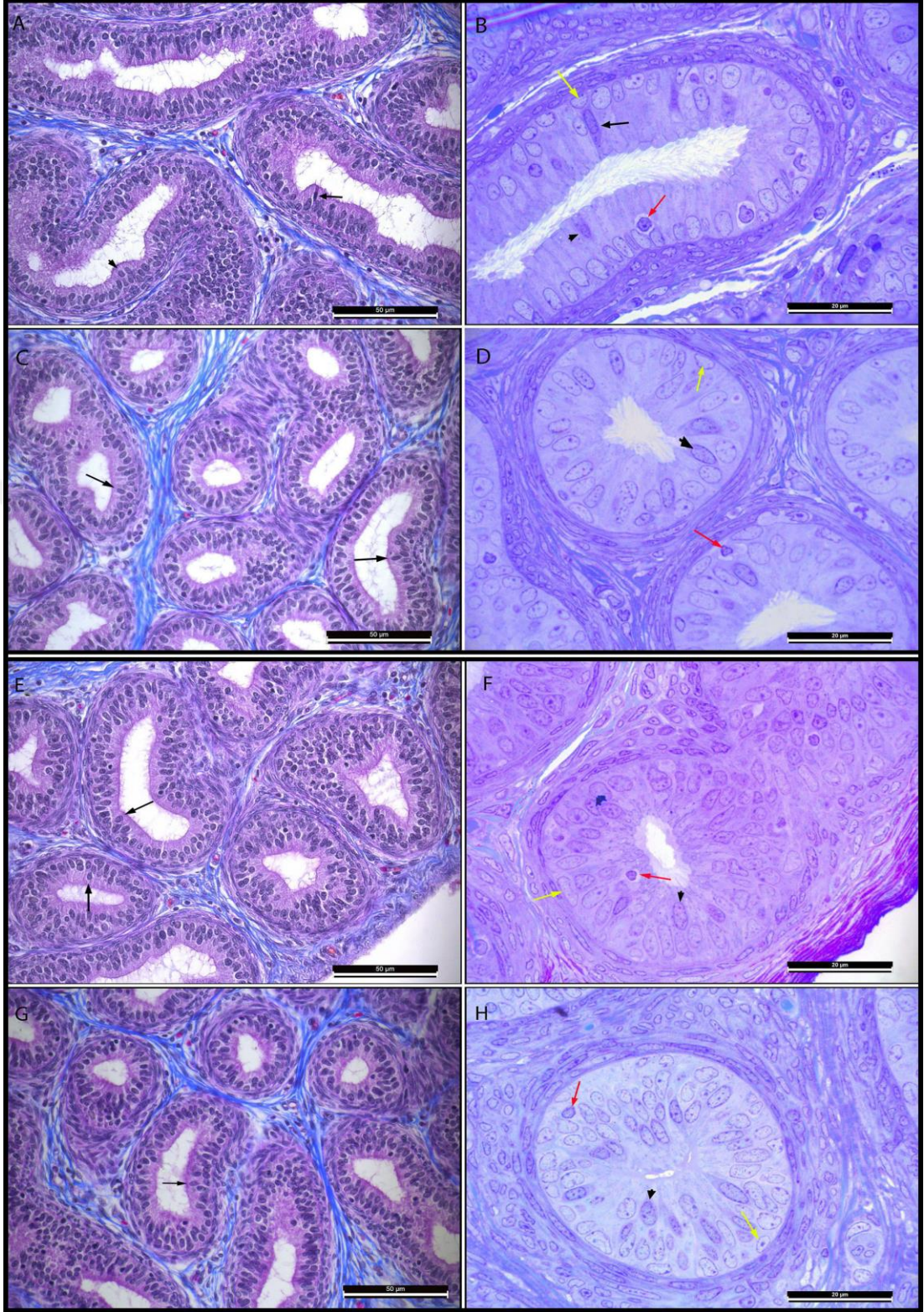
ince kesit: Epididimal tubul epitelini oluşturan hücrelerin morfolojisi ve epitel altında lamina propria tabakası izlenmektedir. Toluidin mavisi boyama. Bar: 50 µm.

3.2.2. İnfantil Dönem

Farklılaşma evresi olarak tanımlanan bu dönemde, epididimis epitelinde belirgin morfolojik değişiklikler görüldü. Epitel, özellikle korpus ve kaudada yalancı çok katlı prizmatik yapıya dönüştü ve başta prinsipal hücreler olmak üzere çeşitli hücre tipleri ayırt edildi. Bazı hücrelerde stereosilyum benzeri apikal uzantılar belirginleşirken, hücreler arası sınırlar daha belirgin hale geldi (Şekil 3.6. A ve B).

Başlangıç segmentinde, prinsipal hücrelerin yanı sıra kalem hücreleri (Şekil 3.6. A, B, ok) ve apikal hücreler (Şekil 3.6. A, B, ok başı) bulundu. Kalem hücreleri dar sitoplazmalarıyla prinsipal hücrelerden ayırt edildi. Apikal hücreler yalnızca başlangıç segmentinde değil, kaput (Şekil 3.6. C, ok; D, ok başı), korpus (Şekil 3.6. E, oklar; F, ok başı) ve kauda (Şekil 3.6. G, ok; H, ok başı) bölgelerinde de görüldü.

Ayrıca bu dönemde tüm segmentlerde halo hücreleri (Şekil 3.6. B, D, F, H, kırmızı ok) ve epitelin bazalinde bazal hücreler (Şekil 3.6. B, D, F, H, sarı ok) saptandı.



Şekil 3.6. İnfantil döneme ait epididimis kesitleri. A. Başlangıç segmentinde yalancı çok katlı prizmatik epitel yapısı: Kalem hücresi (ok), apikal hücre (ok başı). Crossmon'un modifiye üçlü boyama yöntemi. Bar: 50 µm. B: Kalem hücresi (ok), apikal hücre (ok başı), halo hücresi (kırmızı ok), bazal hücre (sarı ok). Toluidin mavisi boyama. Bar: 20 µm C. Kaput bölgesinde yalancı çok katlı prizmatik epitel yapısı: Apikal hücre (oklar). Crossmon'un modifiye üçlü boyama yöntemi. Bar: 50

µm. D. Apikal hücre (ok başı), halo hücresi (kırmızı ok), bazal hücre (sarı ok). Toluidin mavisi boyama. Bar: 20 µm. E. Korpus bölgesinde yalancı çok katlı prizmatik epitel yapısı: Apikal hücre (oklar). Crossmon'un modifiye üçlü boyama yöntemi. Bar: 50 µm. F. Apikal hücre (ok başı), halo hücresi (kırmızı ok), bazal hücre (sarı ok). Toluidin mavisi boyama. Bar: 20 µm. G. Kauda bölgesinde yalancı çok katlı prizmatik epitel yapısı: Apikal hücre (ok). Crossmon'un modifiye üçlü boyama yöntemi. Bar: 50 µm. H. Apikal hücre (ok başı), halo hücresi (kırmızı ok), bazal hücre (sarı ok). Toluidin mavisi boyama. Bar: 20 µm.

3.2.3. Geç Pubertal Dönem

Olgunlaşma evresi olarak tanımlanan bu dönemde, epididimis erişkin morfolojisine oldukça yakındı. Epitelin yalancı çok katlı prizmatik yapısı korunmuş olmakla birlikte, başlangıç segmenti, kaput, korpus ve kauda arasında epitel yüksekliği ve hücre tiplerinin dağılımında farklılıklar dikkati çekti. Stereosilyumlar belirginleşerek lümeneye doğru uzandı. Lümen içerisindeki spermatozoon yoğunluğunun artışı, epididimal geçişin aktifleştiğini ve mikroçevrenin sperm maturasyonuna uygun hâle geldiğini düşündürdü. Ayrıca peritubular düz kas tabakasının kalınlaşması, sperm taşınımını sağlayan peristaltik hareketlerin geliştiğini gösterdi.

Başlangıç segmentinde epitel yalancı çok katlı prizmatik yapıda olup, özellikle prinsipal hücrelerin yüksekliği belirgin şekilde artmıştır. Bu segmente özgü kalem hücreleri yaygın olarak gözlemlendi. Koyu boyanan sitoplazmaları ve apikal ya da orta yerleşimli oval çekirdekleriyle ayırt edilen bu hücreler, bazı kesitlerde bazal membrana ulaşmazken bazılarında şarap kadehi biçimli bir morfolojiyle (Şekil 3.7. A, B, ok) bazal membrana ulaşıyordu. Ayrıca bu segmentte bazal (Şekil 3.7. B, sarı ok), apikal (Şekil 3.7. A, ok başları) ve halo hücreleri (Şekil 3.7. B, kırmızı ok) de gözlemlendi.

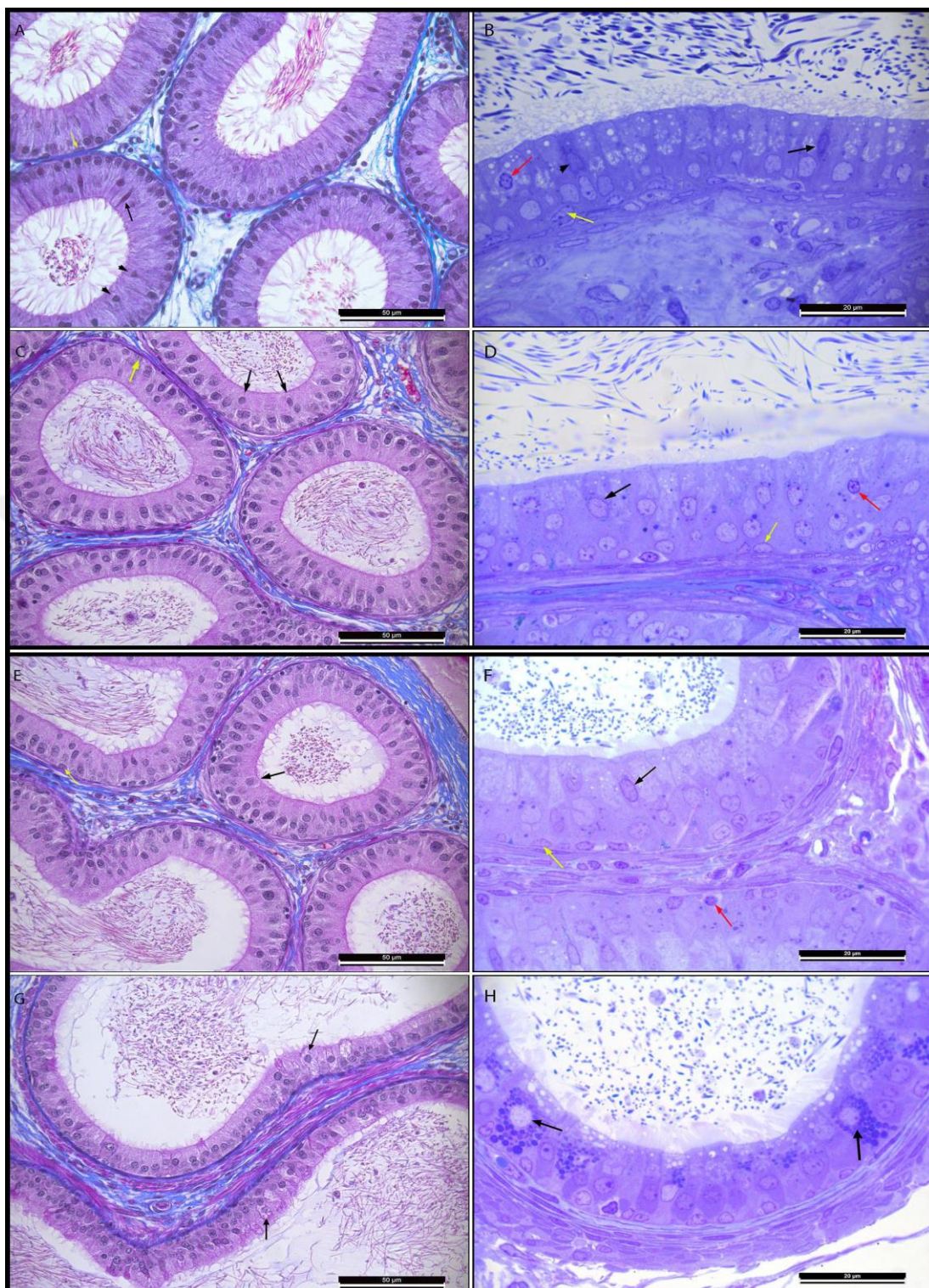
Kaput bölgesinde, prinsipal hücrelerin boylarının arttığı dikkati çekti. Bu segmentte apikal (Şekil 3.7. C, oklar; D, ok), bazal (Şekil 3.7. C, D, sarı ok) ve halo (Şekil 3.7. D, kırmızı ok) hücreleri saptandı. Korpus segmentinde epitel yüksekliği kaputa kıyasla azalmış olsa da hücresel yapı benzer şekilde korundu. Burada başlıca hücre tipi yine prinsipal hücrelerdi; apikal (Şekil 3.7. E, F, ok), bazal (Şekil 3.7. E, F, sarı ok) ve halo hücreleri (Şekil 3.7. F, kırmızı ok) gözlemlendi.

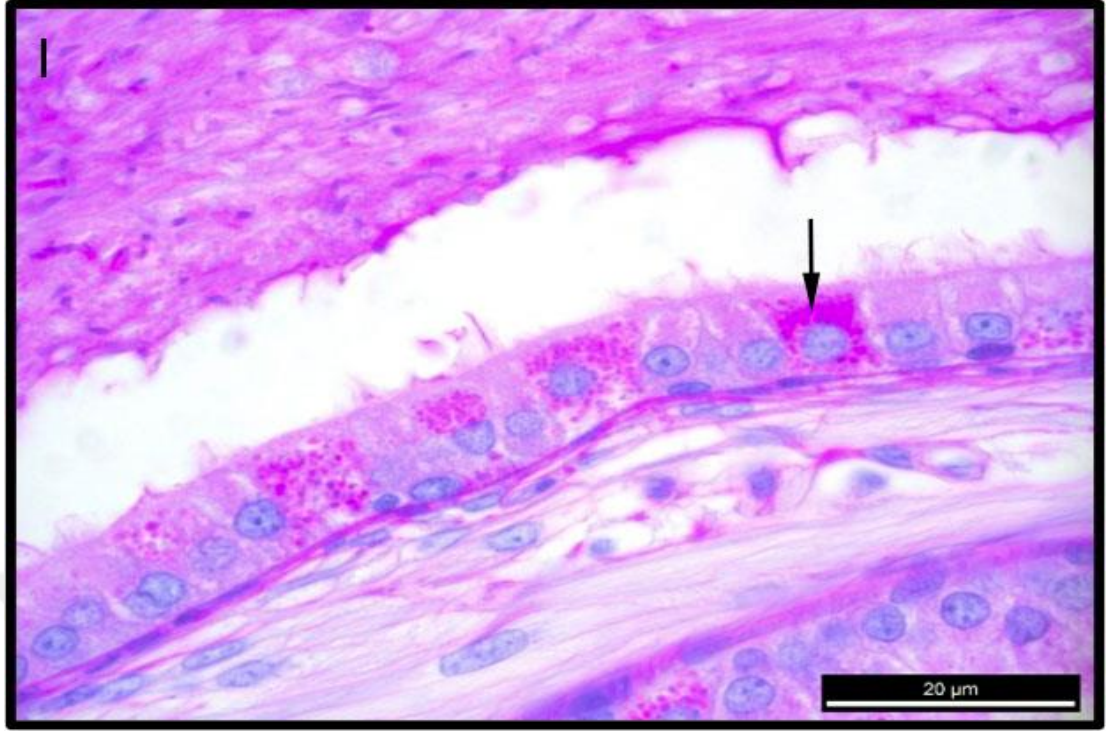
Kauda segmentinde ise epitel daha kısa yapıda olup, lümen çapı belirgin şekilde artmıştı. Bu bölgede spermatozoonların yoğun birikimi, kaudanın depo işlevini üstlenmeye başladığını ortaya koydu. Apikal hücreler bu segmentte izlenmezken, bazal ve halo hücreleri

mevcuttu. Ayrıca geç pubertal dönemde ilk kez kaudada Şeffaf hücreler görüldü. l boyamada açık sitoplazmaları ve belirgin çekirdekleriyle (Şekil 3.7. G, oklar) tanımlandı. Yarı ince kesitlerde apikal kısımlarında vakuoller, çekirdek üzerinde granüler yapılar (Şekil 3.7. H, oklar) izlendi. PAS boyasıyla bu granüllerin pozitif reaksiyon verdiği belirlendi (Şekil 3.7. I, ok). Bu hücrelerin geç pubertal dönemde kaudada ortaya çıkışı, epididimis segmentlerinin fonksiyonel olgunlaşma sürecine girdiğinin önemli bir göstergesi oldu.

Tüm bu bulgular, geç pubertal dönemde rat epididimisinin hem yapısal hem de işlevsel olarak olgunlaşma sürecine girdiğini ve sperm fonksiyonlarını destekleyen fizyolojik koşulların oluŐtuėunu ortaya koydu.







Şekil 3.7. Geç pubertal döneme ait epididimis kesitleri. A. Başlangıç segmentinde yalancı çok katlı prizmatik epitel yapısı: Kalem hücresi (ok), apikal hücre (ok başları), bazal hücre (sarı ok). Crossmon'un modifiye üçlü boyama yöntemi. Bar: 50 µm. B. Kalem hücresi (ok), apikal hücre (ok başı), bazal hücre (sarı ok), halo hücresi (kırmızı ok). Toluidin mavisi boyama. Bar: 20 µm. C. Kaput bölgesinde yalancı çok katlı prizmatik epitel yapısı: Apikal hücre (oklar), bazal hücre (sarı ok). Crossmon'un modifiye üçlü boyama yöntemi. Bar: 50 µm. D. Apikal hücre (ok), bazal hücre (sarı ok), halo hücresi (kırmızı ok). Toluidin mavisi boyama. Bar: 20 µm. E. Korpus bölgesinde yalancı çok katlı prizmatik epitel yapısı: Apikal hücre (ok), bazal hücre (sarı ok). Crossmon'un modifiye üçlü boyama yöntemi. Bar: 50 µm. F. Apikal hücre (ok), bazal hücre (sarı ok), halo hücresi (kırmızı ok). Toluidin mavisi boyama. Bar: 20 µm. G. Kauda bölgesinde yalancı çok katlı prizmatik epitel yapısı: Şeffaf hücre (oklar). Crossmon'un modifiye üçlü boyama yöntemi. Bar: 50 µm. H. Şeffaf hücre (oklar). Apikalinde vakuoller, çekirdek üzerinde granüler yapılar izlenmektedir. Toluidin mavisi boyama. Bar: 20 µm. I. Şeffaf hücre (ok). Apikal sitoplazmada küçük veziküller ve orta kısımda koyu boyanan granüller görülmektedir. PAS boyası. Bar: 20 µm.

3.2.4. Olgun Dönem

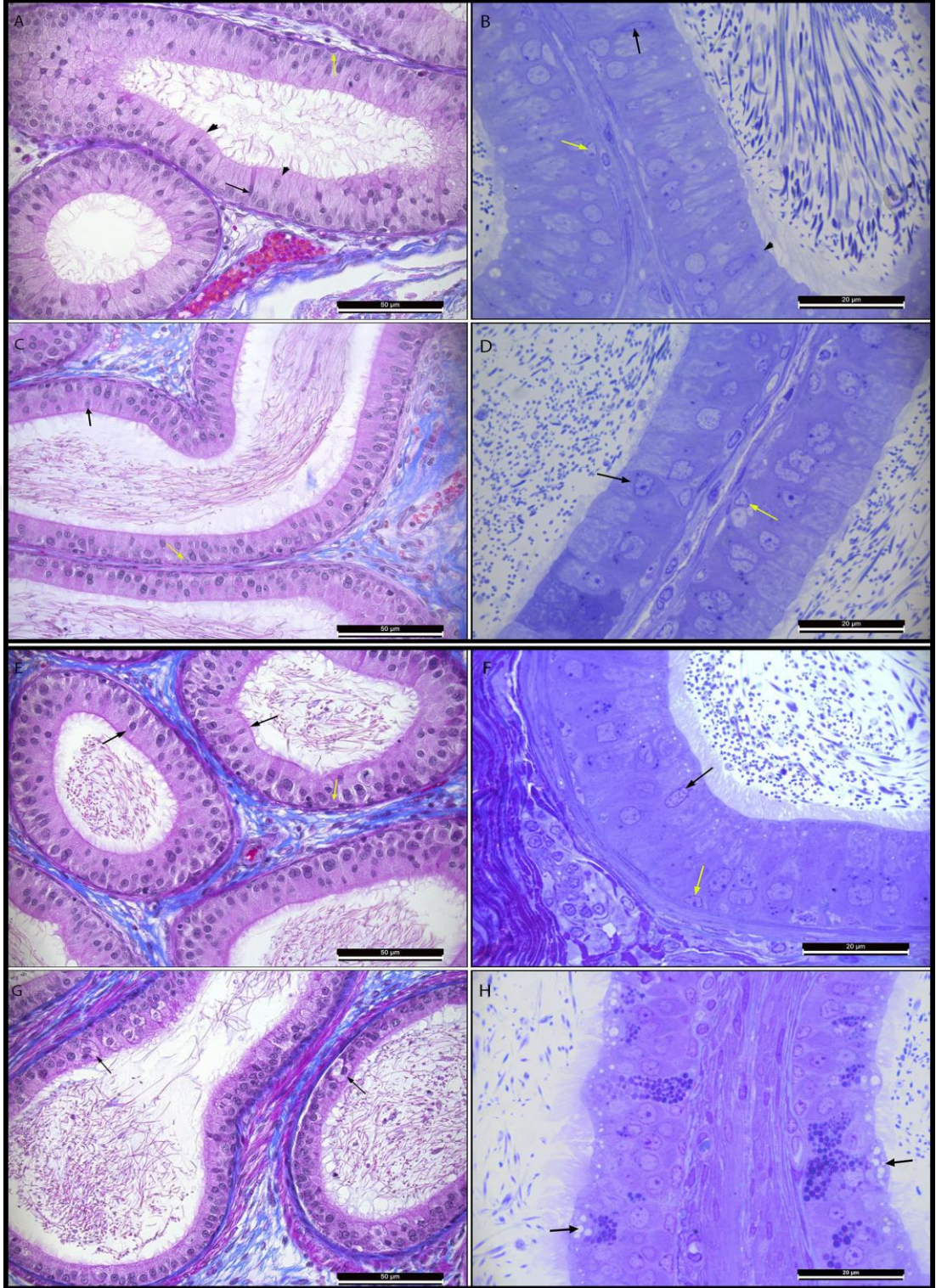
Bu dönemde rat epididimisi morfolojik olarak tam olgunlaşmış bir yapıya ulaşmıştı. Tüm segmentlerde epitel yalancı çok katlı prizmatik yapıdaydı. Lümeninde yoğun miktarda olgun spermatozoon birikimi gözlemlendi.

Başlangıç segmentinde özellikle prinsipal hücrelerin yüksekliğinin maksimum düzeye ulaştığı dikkat çekti. Bu segmentte prinsipal hücrelerin yanı sıra kalem hücreleri (Şekil 3.8. A, B, siyah ok), apikal hücreler (Şekil 3.8. A, ok başları; B, ok başı), bazal hücreler (Şekil 3.8. A, B, sarı ok) ve halo hücreleri tespit edildi.

Kaput ve korpus segmentlerinde apikal (Şekil 3.8. C-F, siyah ok), bazal (Şekil 3.8. C-F, sarı ok) ve halo hücreleri belirlendi. Prinsipal hücrelerin stereosilyumlarının lümenine doğru belirgin şekilde uzandığı gözlemlendi.

Kauda segmentinde ise epitel yüksekliği diğer segmentlere kıyasla azalmış, lümen çapı belirgin şekilde genişlemişti. Bu bölgede yoğun miktarda olgun spermatozoon depolandığı izlendi. Ayrıca açık boyanan sitoplazmalarıyla dikkat çeken şeffaf hücreler görüldü (Şekil 3.8. G, oklar). Bu hücrelerin apikal sitoplazmalarında vakuoller, çekirdek çevresinde granüller izlendi (Şekil 3.8. H, oklar) ve granüllerin PAS pozitif reaksiyon verdiği belirlendi. Kauda segmentinde ayrıca halo hücreleri de gözlemlendi.

Tüm bu bulgular, olgun rat epididimisinde segmental farklılaşmanın tamamlandığını ve epididimal fonksiyonların fizyolojik açıdan etkin biçimde sürdürüldüğünü ortaya koydu.



Şekil 3.8. Olgun döneme ait epididimis kesitleri. A. Başlangıç segmentinde yalancı çok katlı prizmatik epitel yapısı: Kalem hücresi (ok), apikal hücre (ok başları), bazal hücre (sarı ok). Crossmon'un modifiye üçlü boyama yöntemi. Bar: 50 µm. B. Kalem hücresi (ok), apikal hücre (ok başı), bazal hücre (sarı ok). Toluidin mavisi boyama. Bar: 20 µm. C. Kaput bölgesinde yalancı çok katlı prizmatik epitel yapısı: Apikal hücre (ok), bazal hücre (sarı ok). Crossmon'un modifiye üçlü boyama yöntemi. Bar: 50 µm. D. Apikal hücre (ok), bazal hücre (sarı ok). Toluidin mavisi boyama. Bar: 20 µm. E. Korpus bölgesinde yalancı çok katlı prizmatik epitel yapısı: Apikal hücre (oklar), bazal

hücre (sarı ok). Crossmon'un modifiye üçlü boyama yöntemi. Bar: 50 µm. F. Apikal hücre (ok), bazal hücre (sarı ok). Toluidin mavisi boyama. Bar: 20 µm. G. Kauda bölgesinde kısa epitel yapısı ve yoğun spermatozoon birikimi: Şeffaf hücre (oklar). Crossmon'un modifiye üçlü boyama yöntemi. Bar: 50 µm. H. Şeffaf hücre (oklar). Apikalde vakuoller, çekirdek çevresinde granüler yapılar. Toluidin mavisi boyama. Bar: 20 µm.

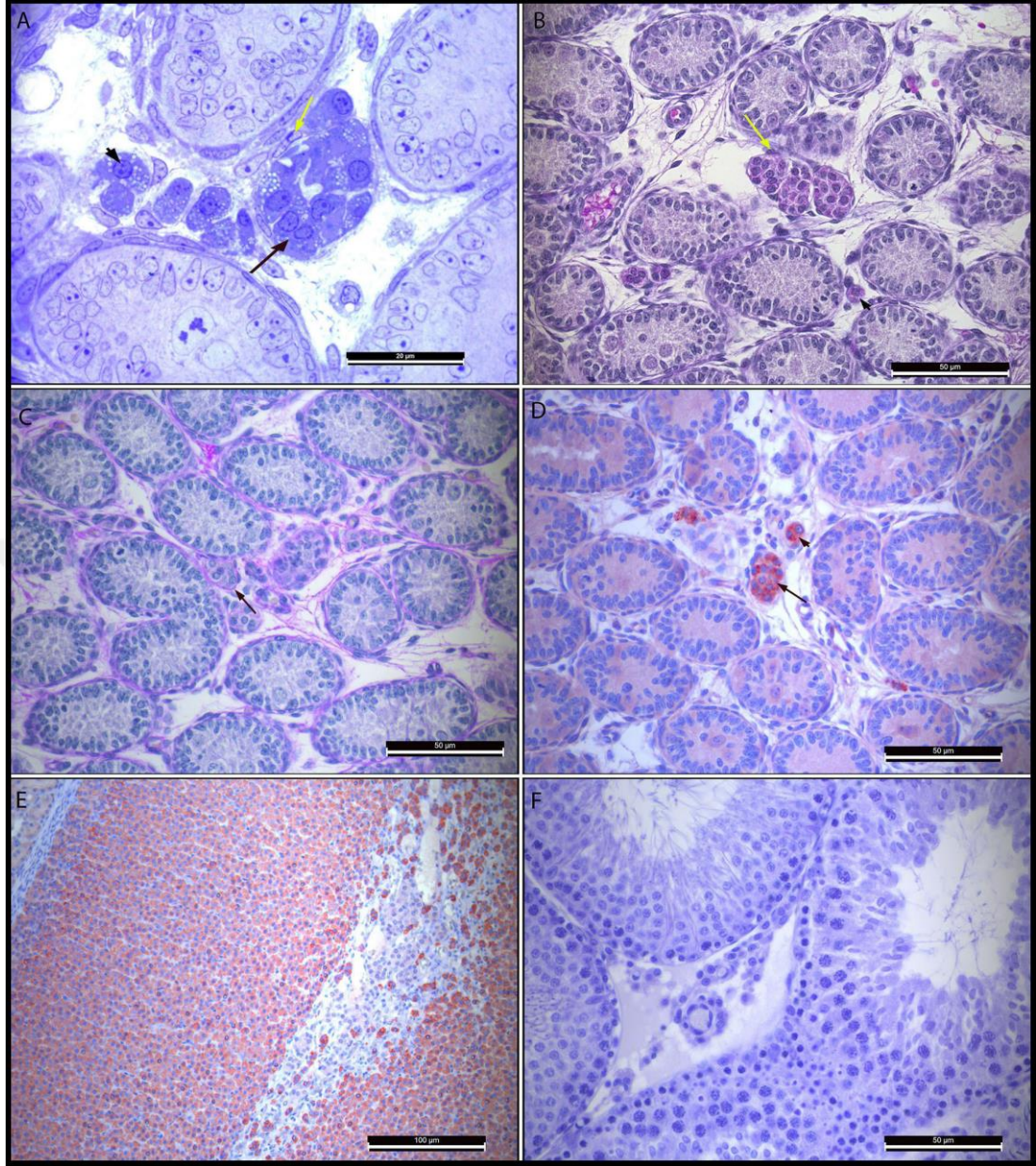
3.3. Leydig Hücreleri

Leydig hücreleri androjen sentezinden sorumlu olup, fetal (FLC) ve erişkin (ALC) olmak üzere iki farklı popülasyondan oluşur. Çalışmamızda neonatal ve infantil dönem rat testisi kesitlerinde interstisyel bölgede FLC ve ALC öncül hücreleri ayırt edilebildi. Geç pubertal dönemde de FLC ve ALC'lerin birlikte bulunduğu gözlemlendi. Bu dönemde FLC sayısı azalırken, ALC popülasyonu giderek daha belirgin hale geldi. Olgun dönemde ise yalnızca ALC'ler saptandı, FLC popülasyonu izlenmedi.

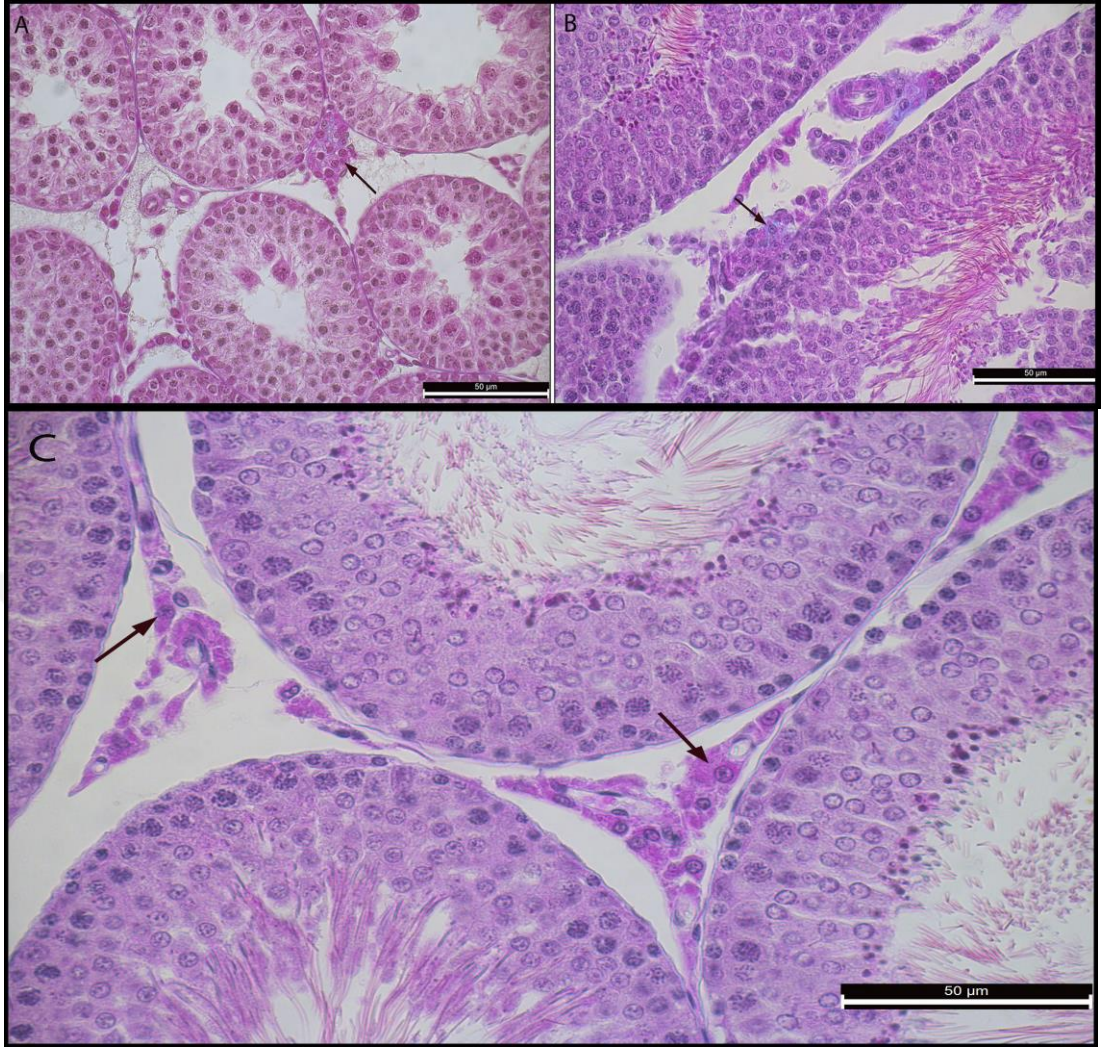
Toluidin mavisi ile boyanmış yarı ince kesitlerde FLC'ler; yoğun bazofilik sitoplazmaları, belirgin nükleoluslu çekirdekleri ve sitoplazmalarındaki lipid damlacıklarıyla karakterize edildi (Şekil 3.9. A, ok). Bu hücrelerin kümeler halinde bulunma eğiliminde oldukları ve bu kümelerin fibroblast benzeri hücreler tarafından kuşatıldığı hem yarı ince kesitlerde (Şekil 3.9. A, sarı ok) hem de Crossmon'un modifiye üçlü boyama yöntemiyle hazırlanan kesitlerde (Şekil 3.9. B, sarı ok) izlendi. Ayrıca, PAS boyası ile hazırlanmış kesitlerde FLC'leri çevreleyen bazal laminanın pozitif boyandığı dikkati çekti (Şekil 3.9. C, ok).

FLC'lerin aksine, ALC'ler (öncül) interstisyel bölgede daha dağınık bir yerleşim gösterdi (Şekil 3.9. A, ok başı). Infantil (Şekil 3.10. A, ok) ve geç pubertal (Şekil 3.10 B, ok) dönemlerde FLC varlığı doğrulanırken, olgun dönemde yalnızca ALC'ler gözlemlendi (Şekil 3.10. C, oklar). Bu bulgu, FLC'lerin yalnızca fetal dönemde bulunmadığını, postnatal erken dönemde de varlıklarını sürdürdüğünü ortaya koydu.

Steroidogeneze görev alan CYP11A1 enzimi için yapılan immunohistokimyasal boyamalarda hem FLC hem de ALC'lerde pozitif immunreaktivite saptandı (Şekil 3.9. D, ok ve ok başı). Pozitif ve negatif kontrol kesitleri ise sırasıyla Şekil 3.9. E ve 3.9. F'de gösterildi. Sonuç olarak, bulgularımız FLC'lerin postnatal erken dönemde de varlığını koruduğunu, ancak giderek azaldığını ve olgun dönemde yalnızca ALC popülasyonunun kaldığını ortaya koydu.



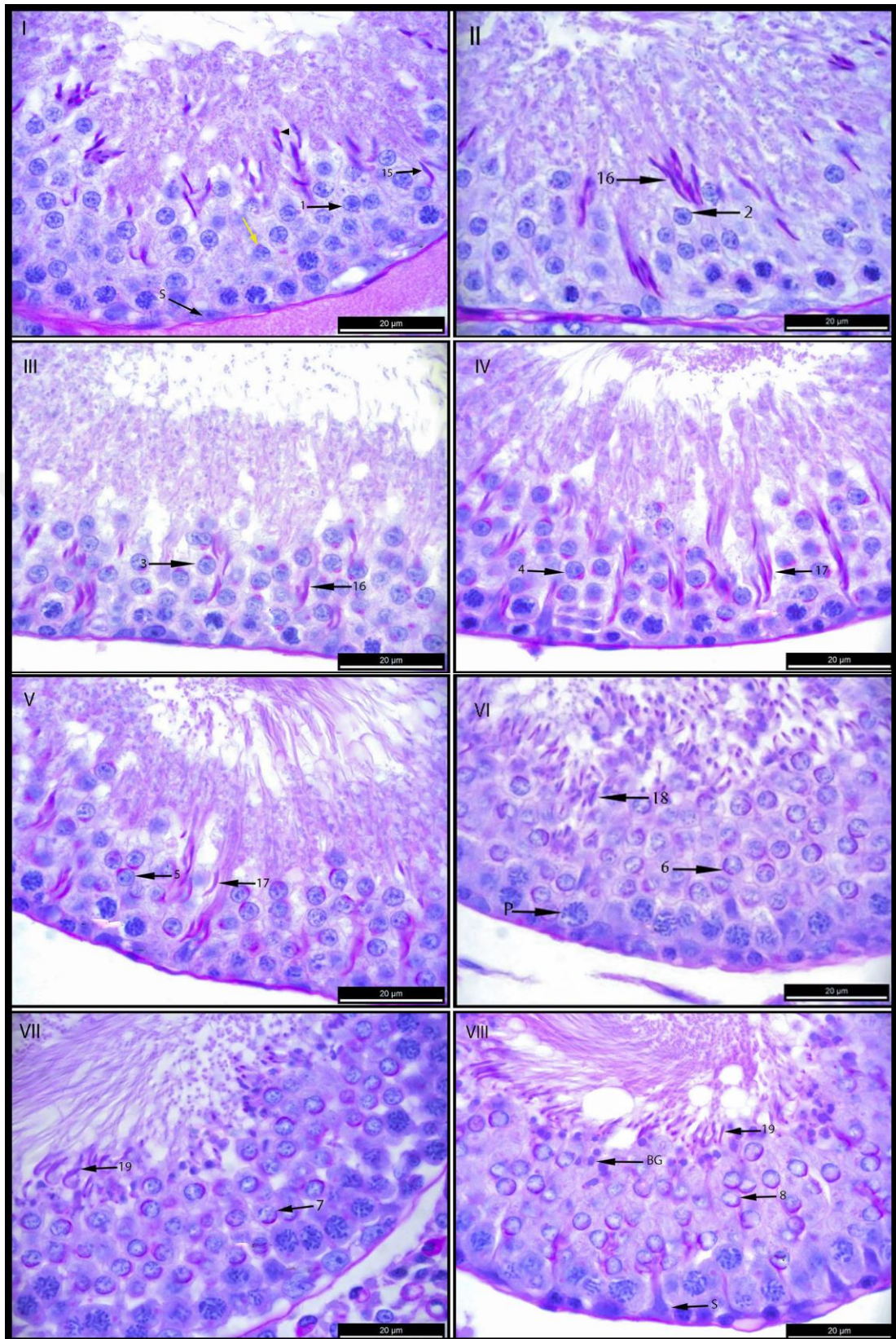
Şekil 3.9. Neonatal dönem rat testisinde Leydig hücrelerinin morfolojik ve immunohistokimyasal özellikleri. A. Yarı ince kesitte kümeler halinde izlenen bazofilik sitoplazmalı ve belirgin nükleoluslu FLC (siyah ok), FLC'yi çevreleyen fibroblast benzeri hücre (sarı ok) ve interstisyel alanda daha dağınık yerleşimli ALC (öncül) (ok başı). Toluidin mavisi boyama. Bar: 20µm. B. FLC'yi kuşatan fibroblast benzeri hücre (sarı ok) ve ALC (öncül) (ok başı). Crossmon'un modifiye üçlü boyama yöntemi. Bar: 50µm. C. FLC'leri çevreleyen bazal laminada pozitif boyanma (ok). PAS boyası. Bar: 50µm. D. CYP11A1 immunohistokimyasal boyamasında hem FLC (ok) hem de ALC (öncül) (ok başı) sitoplazmasında pozitif immunreaktivite. Bar: 50µm. E. CYP11A1 için kullanılan pozitif kontrol kesiti (olgun rat adrenal dokusu). Bar: 100 µm. F. Negatif kontrol kesiti. Bar: 50 µm.

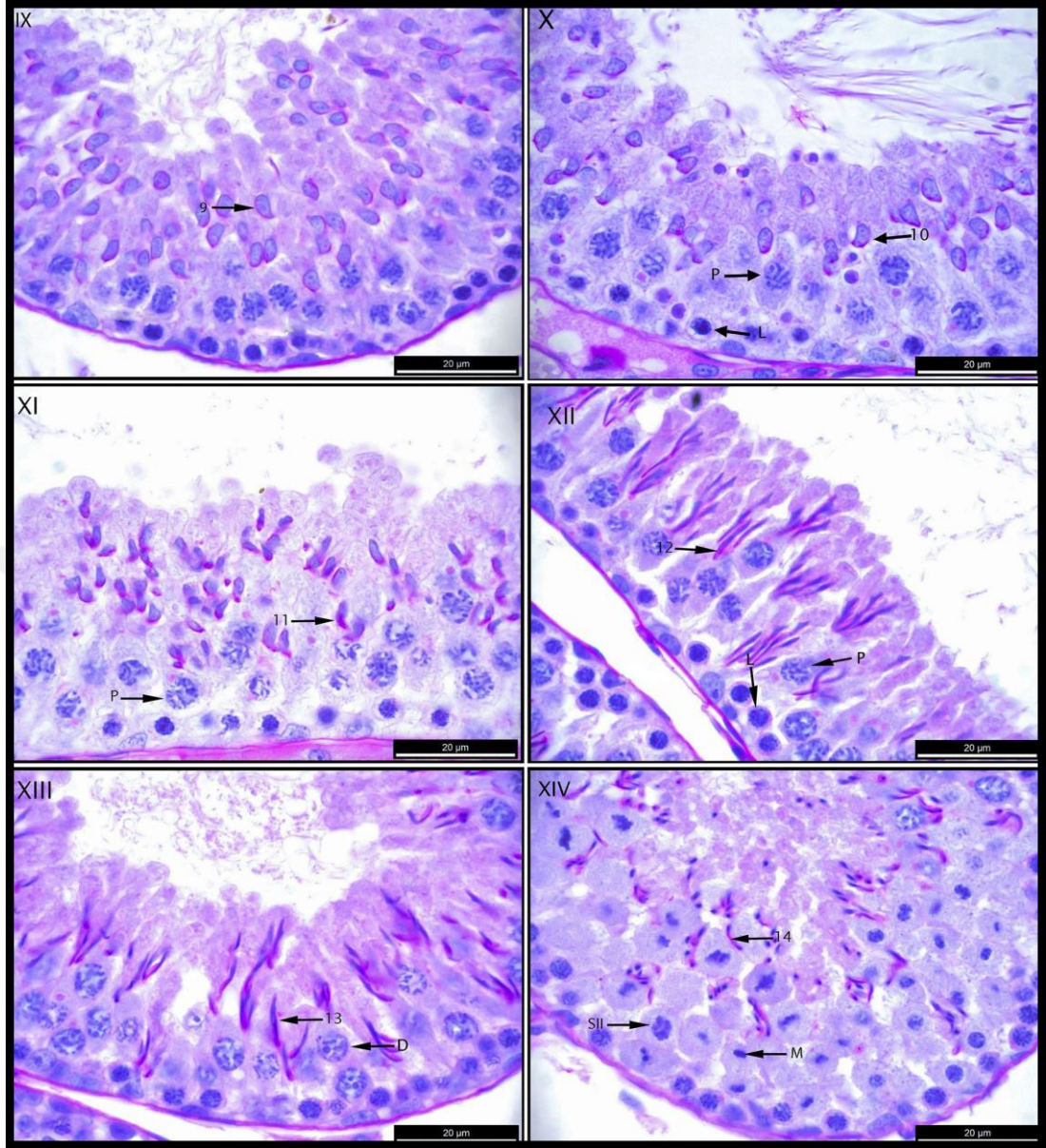


Şekil 3.10. Farklı gelişim dönemlerine ait rat testislerinde Leydig hücrelerinin dağılımı. A. İnfantil dönemde interstisyel bölgede FLC (ok) gözlemlendi. B. Geç pubertal dönemde interstisyel bölgede FLC (ok) varlığının devam ettiği belirlendi C. Olgun dönemde yalnızca ALC'ler (oklar) görüldü. Crossmon'un modifiye üçlü boyama yöntemi. Bar: 50 µm.

3.4. Spermatogenik Siklus Evreleri

PAS boyası ile boyanmış testis kesitlerinin histolojik incelemesinde, spermatogenik siklus evreleri; spermatid çekirdeklerinin morfolojik özellikleri, akrozom gelişim basamakları ve spermatogonyal hücrelerin mitotik aktiviteleri dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Rat testisinde seminifer tubul epitelinin hücresel organizasyonuna bağlı olarak tanımlanan 14 evre, genel bilgiler bölümünde ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Bu çalışmada ise, söz konusu evrelerin morfolojik özellikleri Şekil 3.11'de görsel olarak sunulmuştur.





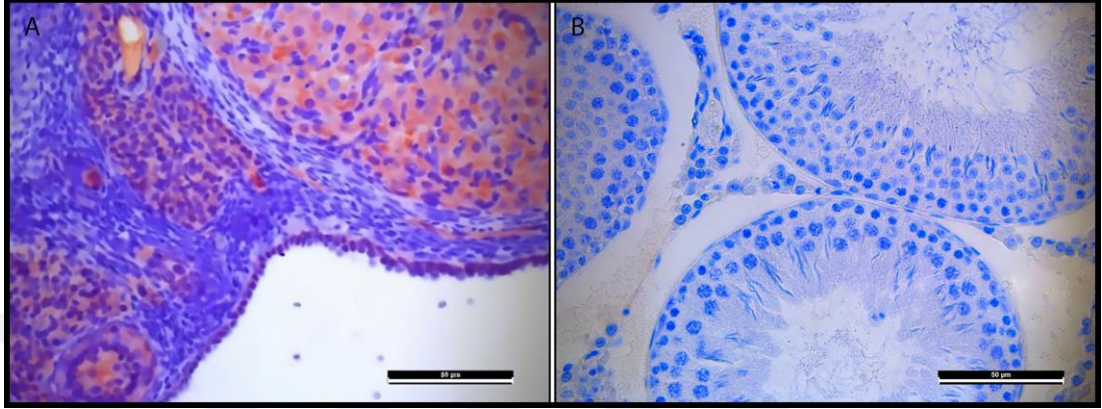
Şekil 3.11. Rat testisinde seminifer tubul epitelinde tanımlanan spermatogenik siklusun 14 evresine ait mikroskopik görüntüler. Her evre; spermatidlerin gelişim basamakları (1-19. adım), akrozomal yapıların morfolojik özellikleri, spermatositlerin mayotik evrelerine (leptoten, zigoten, pakiten, diploten vb.) göre ayırt edilmiştir. S: Sertoli hücresi, Sarı ok: İdizom, Ok başı: Yüzgeç benzeri yapı, P: Pakiten, BG: Bazofilik granül, L: Leptoten, D: Diploten, SII: Sekonder spermatosit, M: Mitotik figür. PAS boyası. Bar: 20 µm.

3.5. İmmunohistokimyasal Bulgular

3.5.1. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) Ekspresyonu

EGFR'nin testis ve epididimiste postnatal gelişimsel sürecindeki ekspresyon düzeyleri immunohistokimyasal yöntemle analiz edildi. Boyamaların özgüllüğü pozitif (Şekil 3.12. A)

ve negatif kontrol kesitleri (Şekil 3.12. B) ile doğrulandı. Pozitif kontrol olarak EGFR ekspresyonu bilinen ovaryum dokusu, negatif kontrol olarak ise primer antikor yerine PBS uygulanmış testis dokusu kullanıldı. Negatif kontrol kesitlerinde spesifik boyanma izlenmedi.



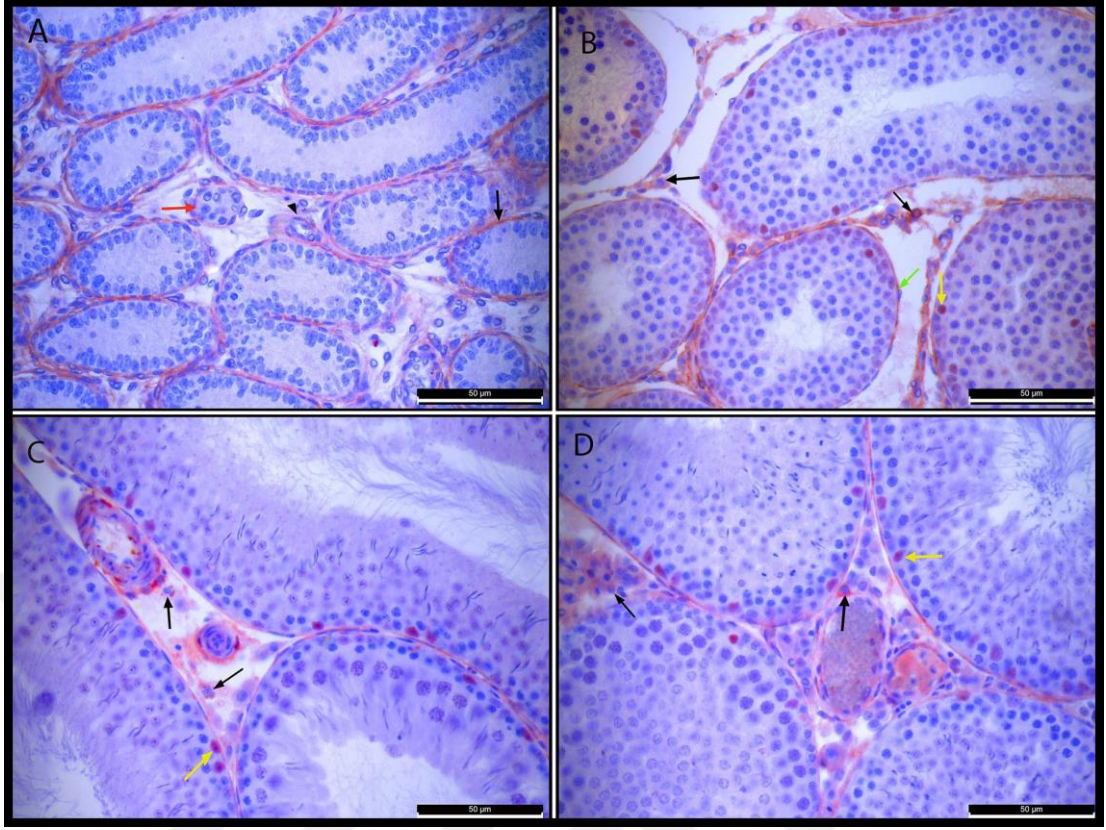
Şekil 3.12. EGFR immunohistokimyasal boyamasına ait kontrol kesitleri. A. Pozitif kontrol: Ovaryum dokusunda EGFR ekspresyonuna karşı pozitif immunreaktivite izlenmektedir. B. Negatif kontrol: Primer antikor yerine PBS uygulanmış testis dokusunda herhangi bir spesifik boyanma saptanmamıştır. Bar: 50 µm.

3.5.1.1. Testis

Neonatal dönemde peritubular miyoid hücrelerde (Şekil 3.13. A, siyah ok) ve damar duvarı düz kas hücrelerinde (Şekil 3.13. A, ok başı) orta düzeyde (++) boyanma saptandı. Fötal Leydig hücrelerinde ekspresyon izlenmezken (Şekil 3.13. A, kırmızı ok), erişkin tip Leydig hücrelerinde (ALC) zayıf-orta (+/++) düzeyde pozitiflik belirlendi.

İnfanıl dönemde Sertoli hücrelerinde güçlü (+++) ekspresyon gözlemlendi (Şekil 3.13. B, sarı ok). Leydig hücrelerinde zayıf-orta (+/++) düzeyde (Şekil 3.13. B, siyah oklar) pozitiflik devam ederken, peritubular miyoid (Şekil 3.13. B, yeşil ok) ve damar düz kas hücrelerindeki orta düzey (++) ekspresyon neonatal döneme benzer şekilde sürdü.

Geç pubertal ve olgun dönemlerde Sertoli hücrelerindeki güçlü (+++) boyanma (Şekil 3.13. C-D, sarı ok) korunmuş, Leydig hücrelerinde ise zayıf-orta (+/++) düzeyde ekspresyon devam etmiştir (Şekil 3.13. C-D, siyah oklar). Eşey hücresi (spermatogonyum, spermatosit, spermatid) boyanma izlenmemiştir. Peritubular miyoid ve damar düz kas hücrelerinde gözlenen orta düzey (++) ekspresyon tüm dönemlerde sabit kalmıştır.



Şekil 3.13. Farklı postnatal dönemlerde rat testisinde EGFR immunohistokimyasal boyaması. A. Neonatal dönemde peritubular miyoid hücrelerde (siyah ok) ve damar duvarı düz kas hücrelerinde (ok başı) pozitif reaksiyon izlenmektedir. Fötal Leydig hücrelerinde (kırmızı ok) boyanma görülmemektedir. B. İnfantil dönemde peritubular miyoid hücrelerde (yeşil ok), damar düz kas hücrelerinde ve Sertoli hücrelerinde (sarı ok) pozitif boyanma saptanmıştır. Leydig hücrelerinde de pozitiflik izlenmektedir (siyah oklar). C. Geç pubertal dönemde peritubular miyoid hücreler ve Sertoli hücrelerinde (sarı ok) pozitif reaksiyon devam etmektedir. Leydig hücrelerinde de pozitiflik görülmektedir (siyah oklar). D. Olgun dönemde peritubular miyoid hücreler, damar düz kas hücreleri ve Sertoli hücrelerinde (sarı ok) pozitiflik sürmektedir. Leydig hücrelerinde de ekspresyon devam etmektedir (siyah oklar). Eşey hücrelerinde (spermatogonyum, spermatosit, spermatid) boyanma izlenmemiştir. Bar: 50 µm.

3.5.1.2. Epididimis

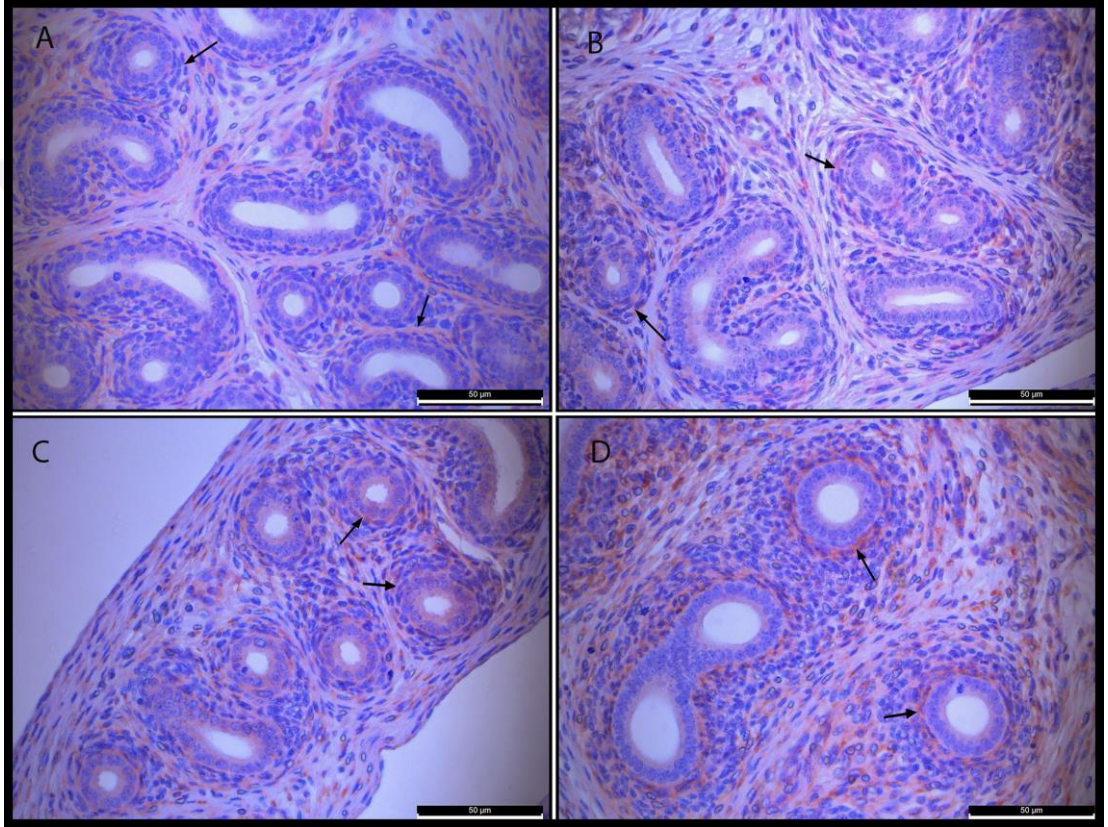
Neonatal dönemde kanal çevresindeki düz kas hücrelerinde zayıf (+) boyanma izlendi (Şekil 3.14. A-D, oklar). Epitel hücrelerinde ekspresyon belirlenmedi.

İnfantil dönemde düz kas hücrelerindeki zayıf (+) (Şekil 3.15. A-D, ok) boyanmaya ek olarak, tüm segmentlerde bazal hücrelerde orta düzey (++) ekspresyon belirlendi (Şekil 3.15. A-D, ok başı). Diğer epitel hücrelerinde boyanma saptanmadı.

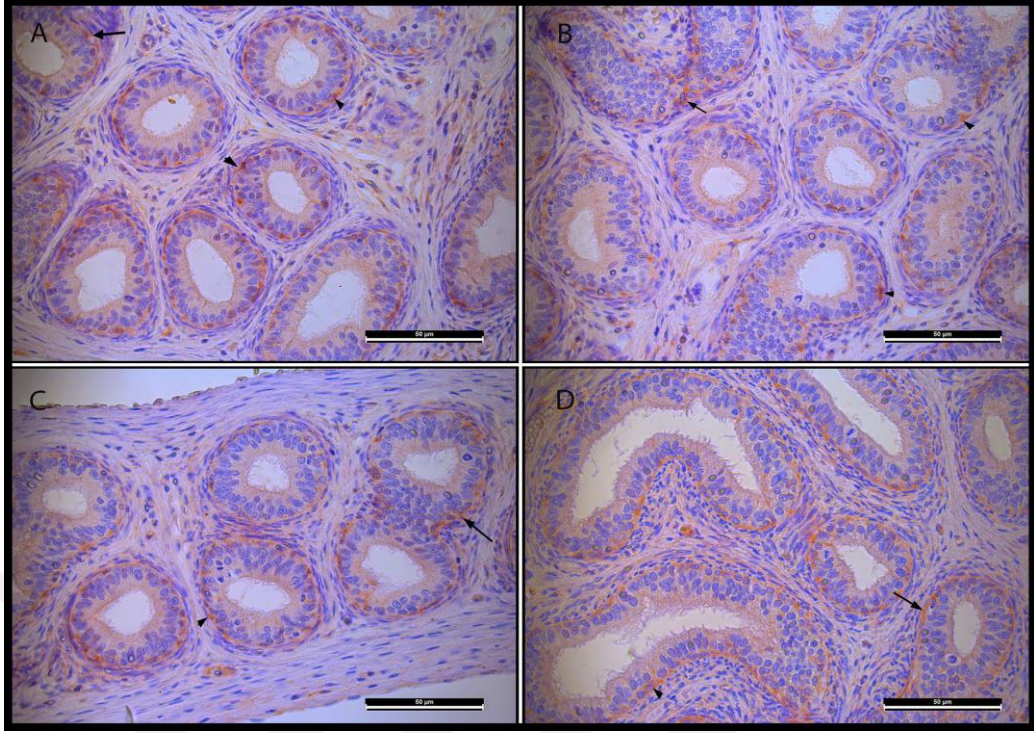
Geç pubertal dönemde düz kas hücrelerinde zayıf (+) boyanma sürerken, bazal hücrelerde başlangıç segmenti ve kaputta orta (++) , korpus ve kaudada güçlü (+++) (Şekil

3.16. A-D, ok) ekspresyon izlendi. Ayrıca kauda şeffaf hücre granüllerinde güçlü (+++) boyanma (Şekil 3.16. D, ok başı) gözlemlendi.

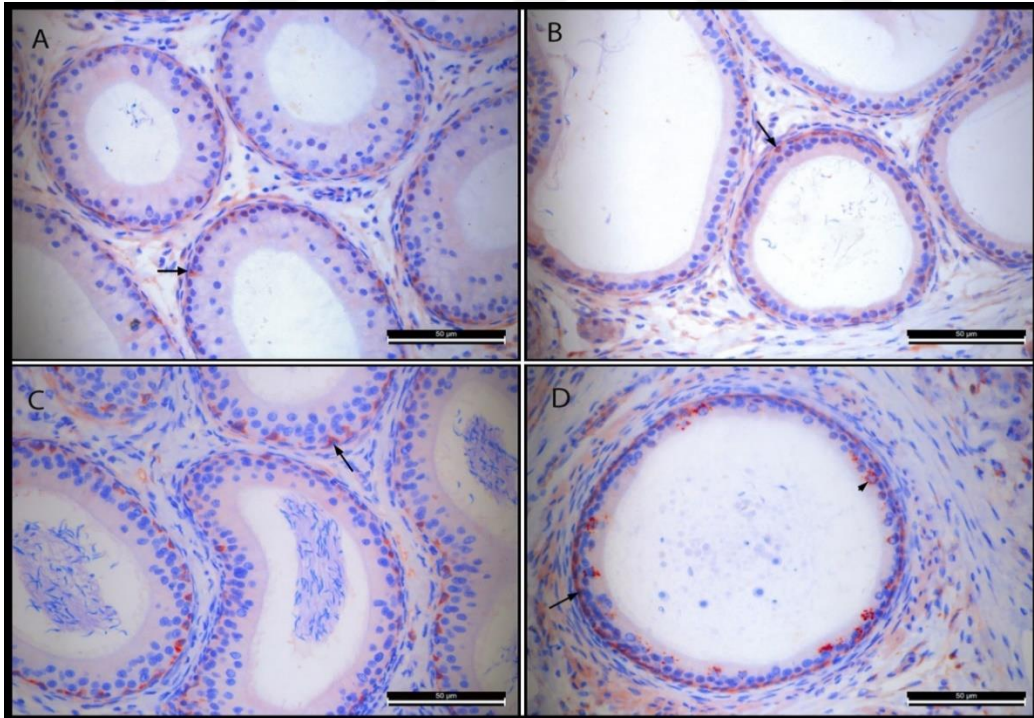
Olgun dönemde düz kas hücrelerinde zayıf (+) ekspresyon korundu. Bazal hücrelerde başlangıç segmenti ve kaputta orta (++), korpus ve kaudada güçlü (+++) ekspresyon devam etti (Şekil 3.17. A–D, ok). Kauda şeffaf hücre granüllerinde de güçlü (+++) boyanma belirlendi (Şekil 3.17. D, ok başı). Diğer epitel hücre tiplerinde ekspresyon izlenmedi.



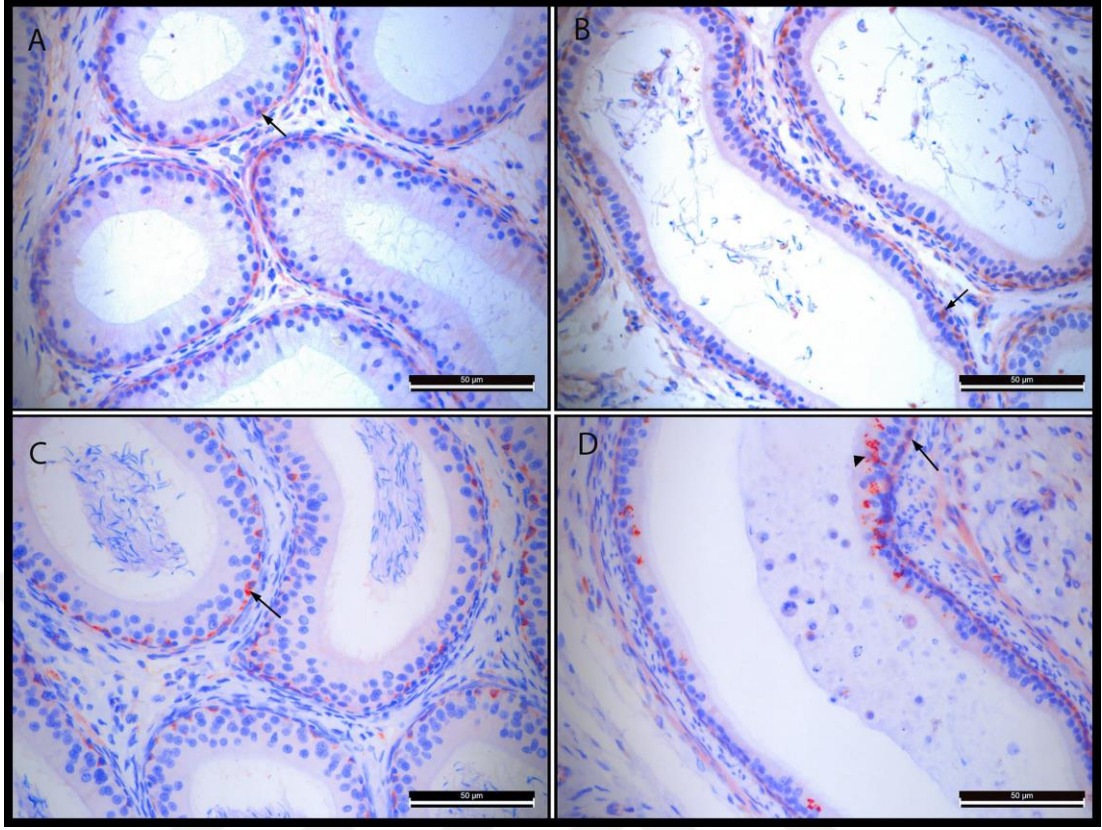
Şekil 3.14. Neonatal döneme ait epididimis bölgelerinde EGFR immunohistokimyasal boyaması. Başlangıç segmenti (A), kaput (B), korpus (C) ve kauda (D) bölgelerinin tümünde yalnızca kanal çevresindeki düz kas hücrelerinde (oklar) pozitif immunreaktivite izlenmektedir. Bar: 50µm.



Şekil 3.15. İnfanıl döneme ait epididimis bölgelerinde EGFR immunohistokimyasal boyaması. Başlangıç segmenti (A), kaput (B), korpus (C) ve kauda (D) bölgelerinde düz kas hücreleri (ok) ile bazal hücrelerin sitoplazmasında (ok başı) pozitif immunreaktivite izlenmektedir. Bar: 50 µm.



Şekil 3.16. Geç pubertal döneme ait epididimis bölgelerinde EGFR immunohistokimyasal boyaması. Başlangıç segmenti (A), kaput (B), korpus (C) ve kauda (D) bölgelerinde düz kas hücreleri ile bazal hücrelerin sitoplazmasında (ok) EGFR pozitif immunreaktivite izlenmektedir. Ayrıca, kauda epididimiste şeffaf hücre granüllerinde (ok başı) güçlü pozitif immunreaktivite görülmektedir. Bar: 50 µm.



Şekil 3.17. Olgun döneme ait epididimis bölgelerinde EGFR immunohistokimyasal boyaması. Başlangıç segmenti (A), kaput (B), korpus (C) ve kauda (D) bölgelerinde düz kas hücreleri ile bazal hücrelerin sitoplazmasında (ok) pozitif immunreaktivite izlenmektedir. Kauda epididimiste şeffaf hücre granüllerinde de (ok başı) güçlü EGFR pozitifliği gözlenmektedir. Bar: 50 µm.

İstatistiksel Değerlendirme:

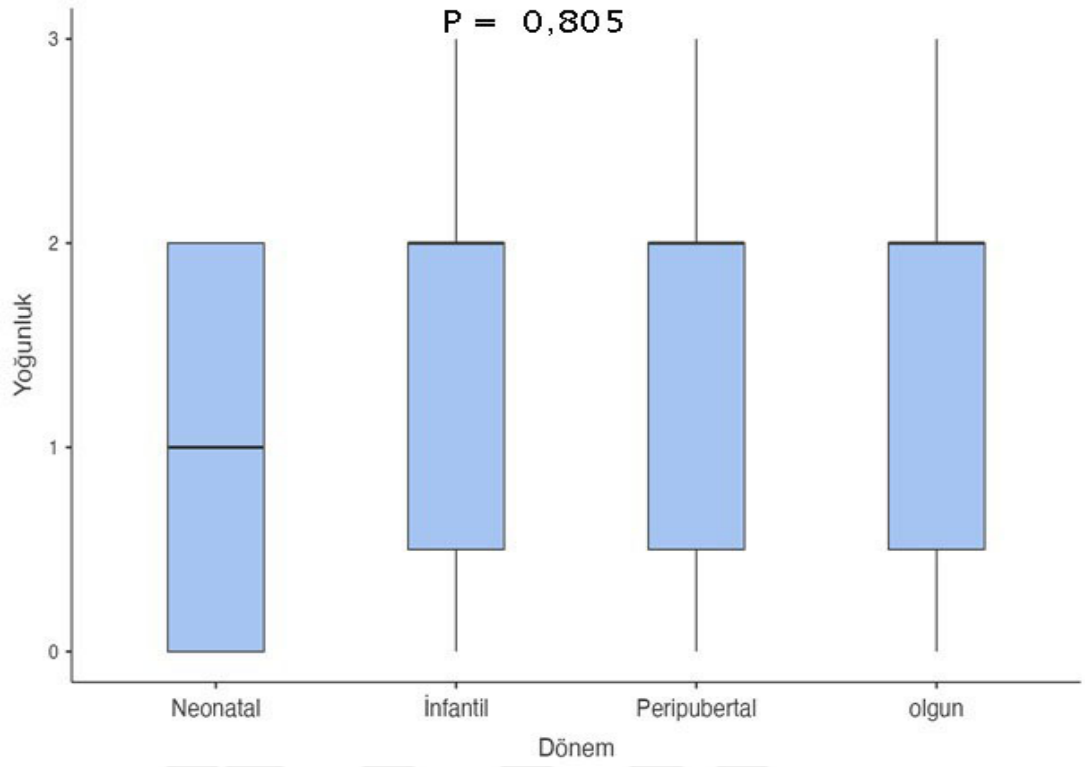
Testiste EGFR ekspresyonuna ait semikantitatif skorların dönemsel karşılaştırılmasında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p = 0,805$). (Şekil 3.18.). Epididimis dokusunda ise segmentler, her bir gelişim dönemi içinde karşılaştırılmış (Şekil 3.19.) ve her segment için dönemsel skorlar ayrıca analiz edilmiş olup her iki değerlendirmede de istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p > 0,05$) (Şekil 3.19. ve Şekil 3.20.).

Hücresel düzeydeki boyanma farklılıkları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

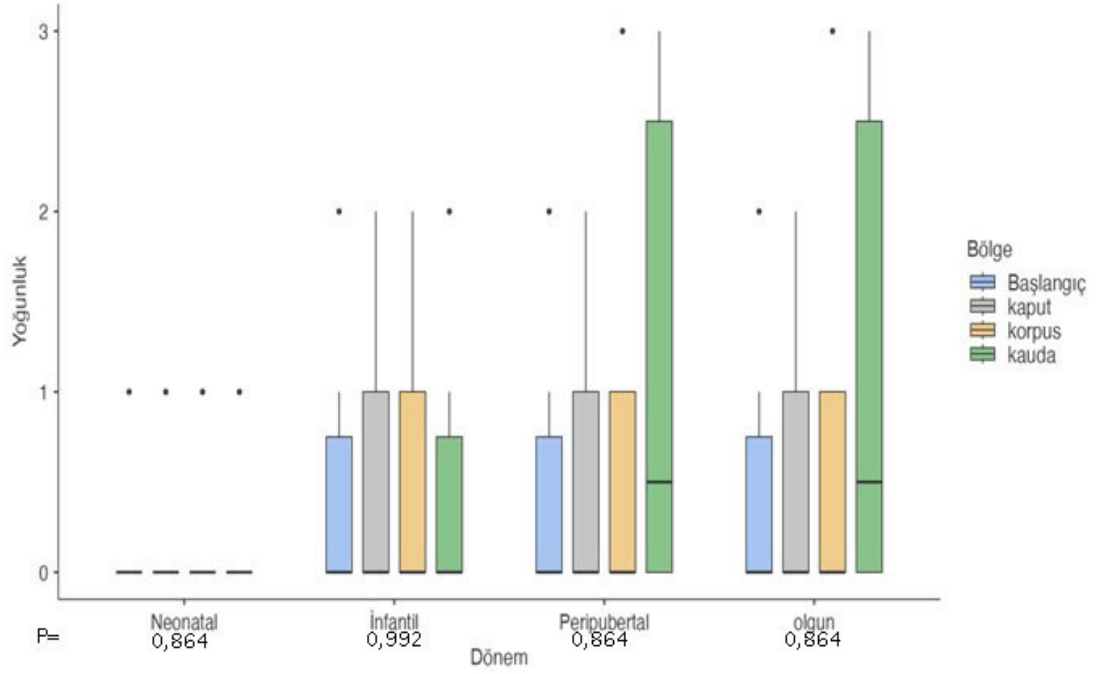
Çizelge 3.1. Testis ve epididimiste EGFR ekspresyonunun postnatal gelişim dönemlerine göre hücresel ve segmental dağılımının semikantitatif değerlendirmesi

Doku		Neonatal	İnfanıl	Geç pubertal	Olgun
Testis	Hücre tipi				
	Spermatogonyum	0 (Gonosit)	0	0	0
	Spermatosit/spermatid	-	0	0	0
	Sertoli hücreleri	0	+++	+++	+++
	Leydig hücreleri	FLC (0) ALC (+/+)	ALC +/+	ALC +/+	ALC +/+
	Peritubular myoid hücreler	++	++	++	++
Damar duvarı kası		++	++	++	++
Epididimis					
Başlangıç segmenti	Prinsipal hücreler	0	0	0	0
	Kalem hücreleri	-	0	0	0
	Bazal hücreler	-	++	++	++
	Apikal hücreler	-	0	0	0
	Halo hücreleri	-	0	0	0
	Kanal duvarındaki kas katmanı	+	+	+	+
Kaput epididimis	Prinsipal hücreler	0	0	0	0
	Bazal hücreler	-	++	++	++
	Apikal hücreler	-	0	0	0
	Halo hücreleri	-	0	0	0
	Kanal duvarındaki kas katmanı	+	+	+	+
Korpus epididimis	Prinsipal hücreler	0	0	0	0
	Bazal hücreler	-	++	+++	+++
	Apikal hücreler	-	0	0	0
	Halo hücreleri	-	0	0	0
	Kanal duvarındaki kas katmanı	+	+	+	+
Kauda epididimis	Prinsipal hücreler	0	0	0	0
	Bazal hücreler	-	++	+++	+++
	Apikal hücreler	-	0	-	-
	Halo hücreleri	-	0	0	0
	Şeffaf hücreler	-	-	+++	+++
	Kanal duvarındaki kas katmanı	+	+	+	+

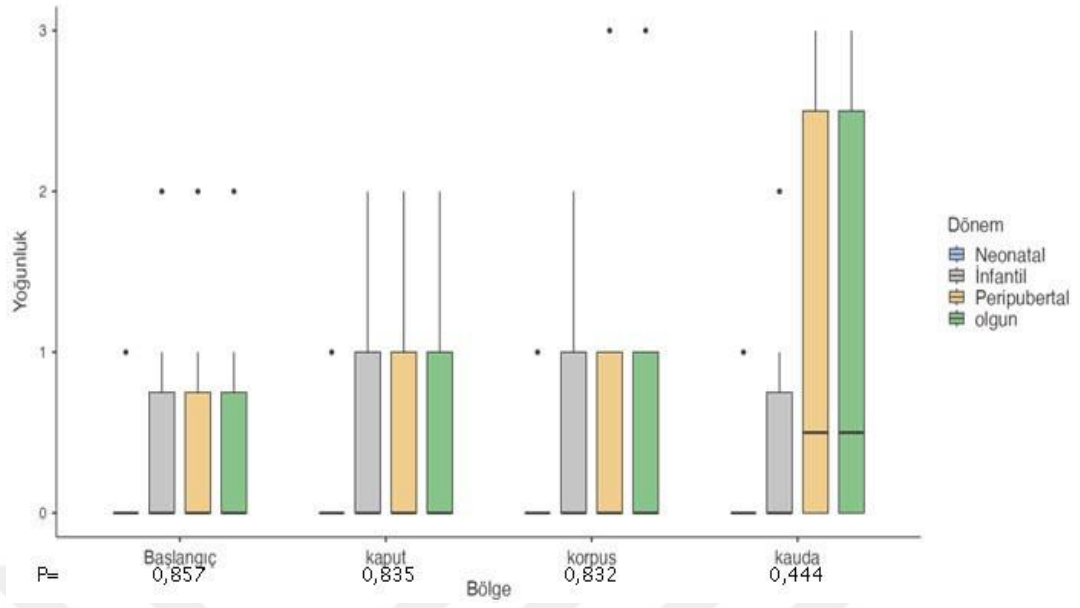
0 (boyanma yok), + (zayıf boyanma), ++ (orta boyanma), +++ (güçlü boyanma), - (hücre tipi farklılaşmamış veya yoktur).



Şekil 3.18. Testiste EGFR ekspresyonuna ait dönemsel karşılaştırma grafiği (p = 0,805)



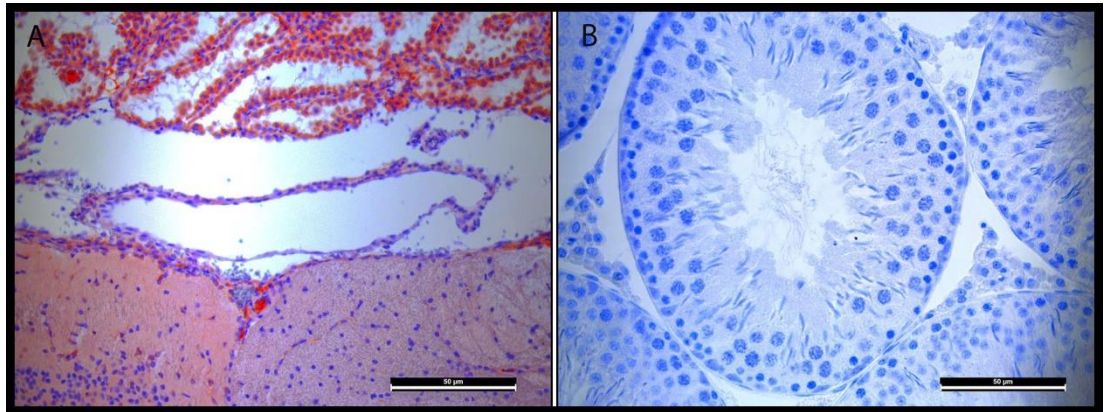
Şekil 3.19. Her bir gelişim dönemi içinde epididimis segmentlerine ait EGFR immunreaktivite yoğunluklarının karşılaştırılma grafiği (p > 0,05)



Şekil 3.20. Epididimis segmentlerinde postnatal gelişim dönemlerine ait EGFR immunreaktivite yoğunluklarının karşılaştırılma grafiği ($p > 0,05$)

3.5.2. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) Ekspresyonu

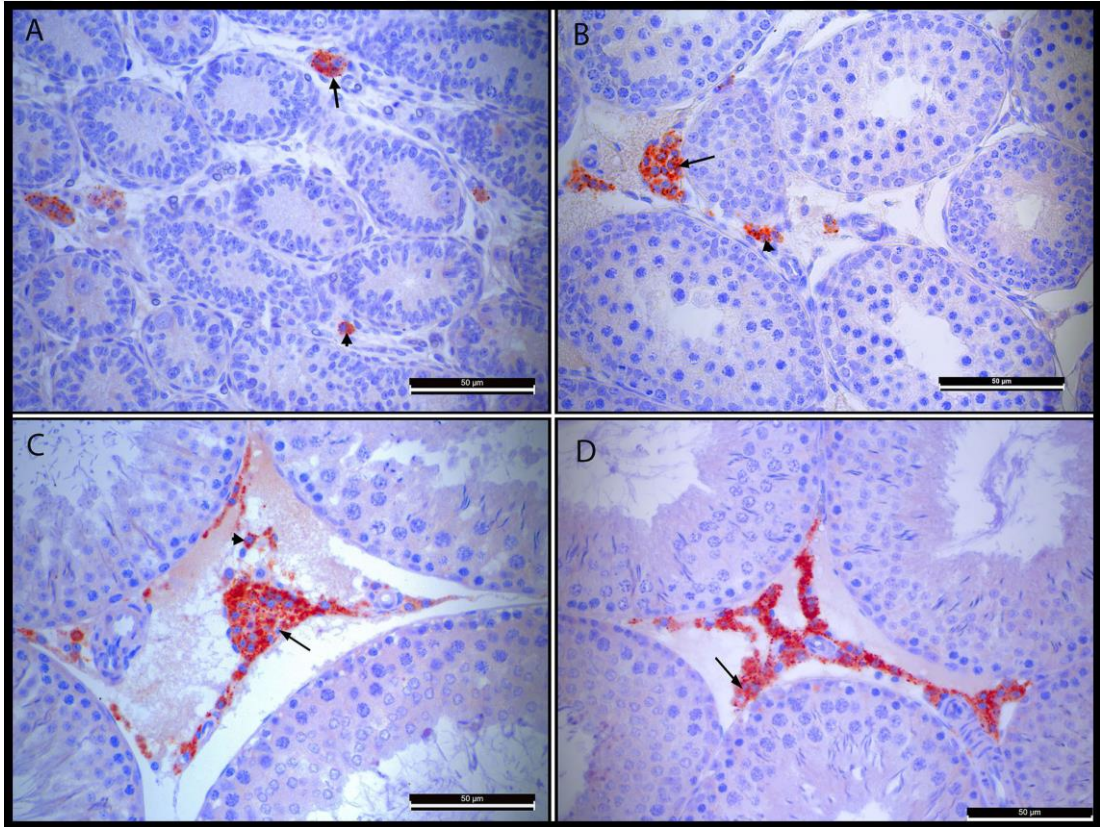
EGF'nin testis ve epididimis dokularındaki postnatal gelişimsel ekspresyonu immunohistokimyasal yöntemle değerlendirildi. Her dönem için pozitif (Şekil 3.21. A) ve negatif kontrol kesitleri (Şekil 3.21. B) kullanılarak boyamaların özgüllüğü doğrulandı. Pozitif kontrol olarak EGF ekspresyonu bilinen beyin dokusu, negatif kontrolde ise primer antikor yerine PBS uygulanmış testis dokusu kullanıldı. Negatif kontrol kesitlerinde herhangi bir spesifik boyanma izlenmedi.



Şekil 3.21. EGF immunohistokimyasal boyamasına ait kontrol kesitleri. (A) Pozitif kontrol: Beyin (pleksus koroideus) dokusunda EGF ekspresyonuna karşı güçlü immunreaktivite izlenmektedir. (B) Negatif kontrol: Primer antikor yerine PBS uygulanmış testis dokusunda herhangi bir spesifik boyanma saptanmamıştır. Bar: 50 µm.

3.5.2.1. Testis

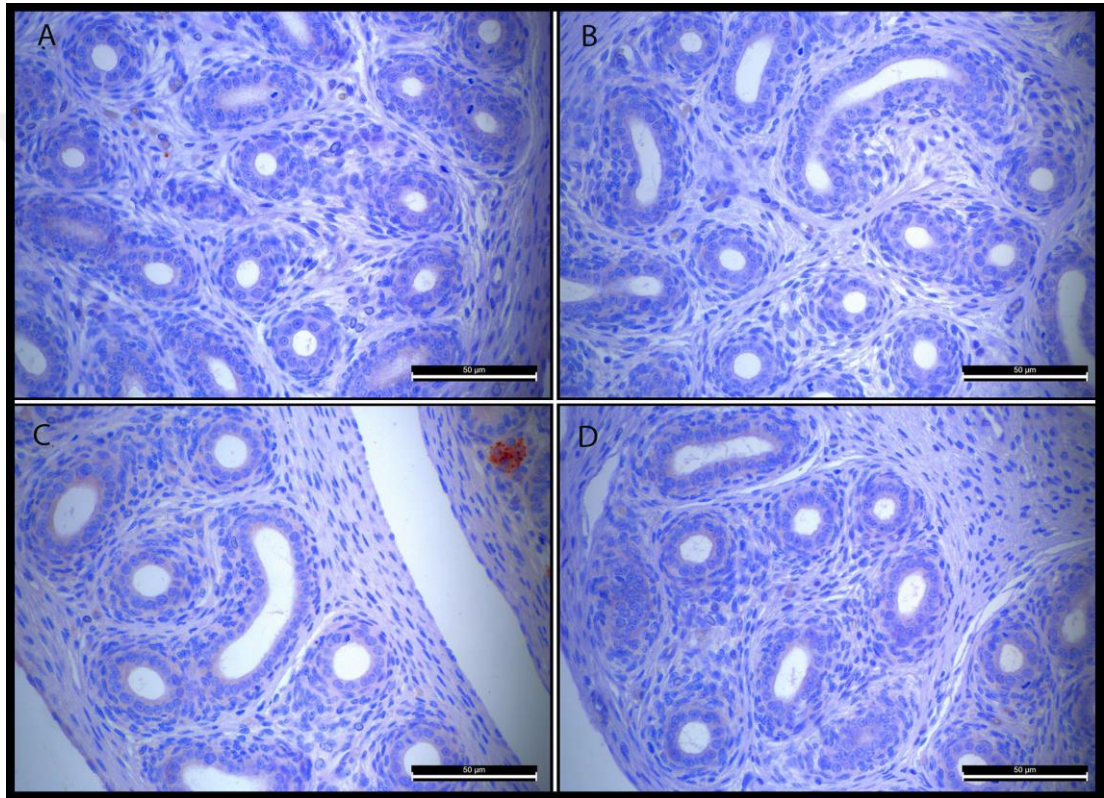
Neonatal, infantil, geç pubertal ve olgun dönemlerde EGF ekspresyonu yalnızca Leydig hücrelerinde güçlü (+++) düzeyde saptandı. Neonatal, infantil ve geç pubertal dönemlerde hem FLC'lerde (Şekil 3.22. A-C, ok) hem de ALC'lerde (Şekil 3.22. A-C, ok başı) belirgin pozitif reaksiyon izlenirken, olgun dönemde güçlü boyanma ALC'lerde (Şekil 3.22. D, ok) devam etti. Sertoli hücreleri, peritubular miyoid hücreler, damar duvarı düz kas hücreleri ve eşey hücrelerinde (spermatogonyum, spermatosit ve spermatid) ekspresyon belirlenmedi. Bu bulgular, EGF'nin testiste hücre tipine özgü bir dağılım sergilediğini ve muhtemelen Leydig hücresi olgunlaşması ile steroidogenez süreçlerinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir.



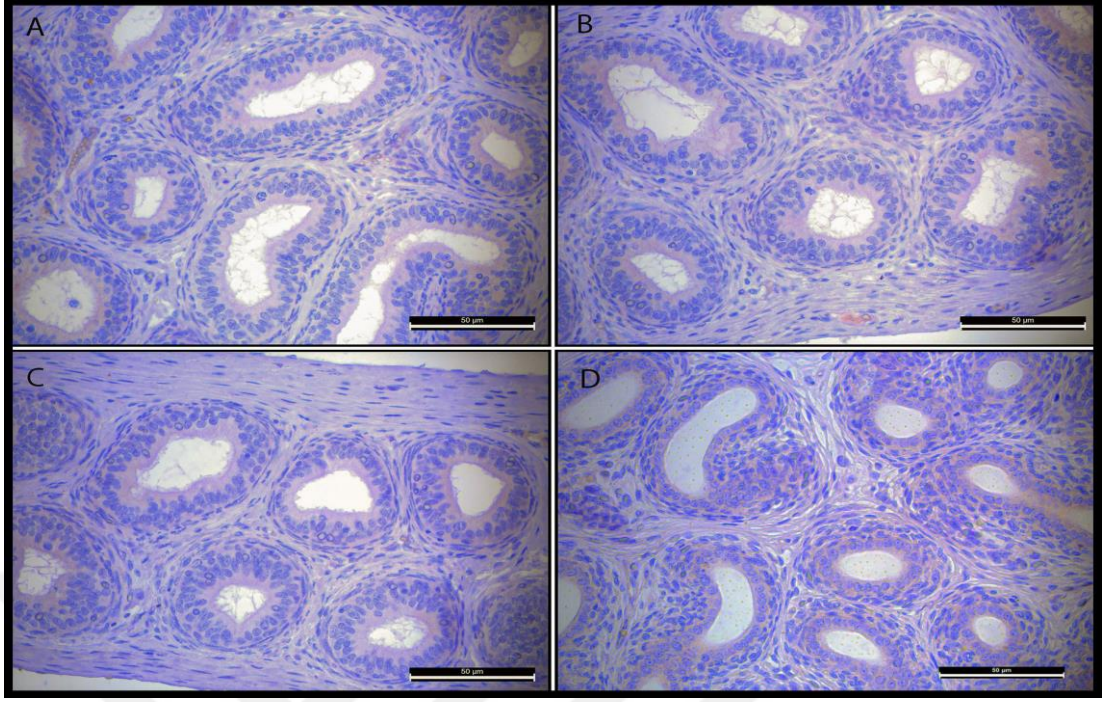
Şekil 3.22. Farklı postnatal dönemlerde rat testisinde EGF immunohistokimyasal boyaması. A. Neonatal dönemde FLC (ok) ve ALC'lerde (ALC öncülleri) (ok başı) pozitif reaksiyon izlenmektedir. B. Infantil dönemde FLC (ok) ve ALC'lerde (ALC öncülleri) (ok başı) benzer şekilde pozitif reaksiyon gözlenmektedir. C. Geç pubertal dönemde FLC (ok) ve ALC'lerde (ok başı) pozitif reaksiyon devam etmektedir. D. Olgun dönemde ise yalnızca ALC'lerde (ok) pozitif reaksiyon saptanmaktadır. Sertoli hücreleri, peritubular miyoid hücreler, damar düz kas hücreleri ve eşey hücrelerinde (spermatogonyum, spermatosit, spermatid) boyanma izlenmemiştir. Bar: 50 µm.

3.5.2.2. Epididimis

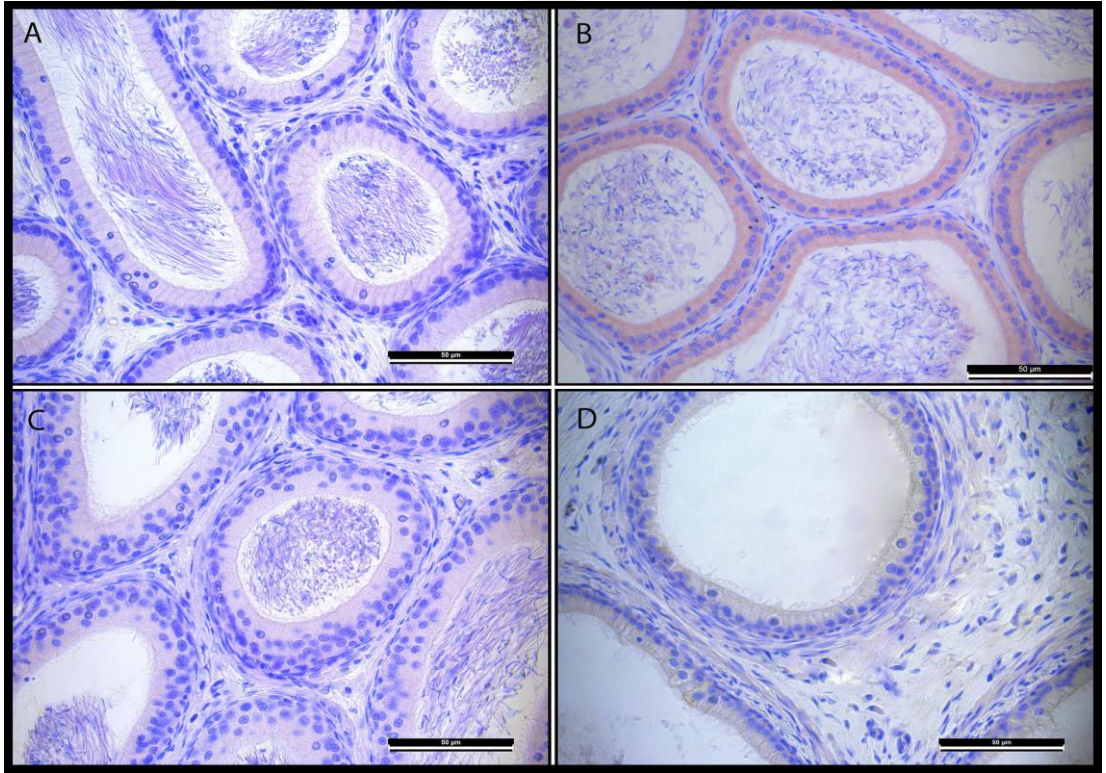
Epididimiste EGF ekspresyonu testise kıyasla daha sınırlı ve segmental bir dağılım gösterdi. Neonatal (Şekil 3.23. A-D) ve infantil dönemlerde (Şekil 3.24. A-D) başlangıç segmenti, kaput, korpus ve kauda bölgelerinde boyanma saptanmadı. Geç pubertal (Şekil 3.25. B) ve olgun dönemde (Şekil 3.26. B) ise yalnızca kaput epididimisteki prinsipal, apikal ve bazal hücrelerde zayıf (+) düzeyde ekspresyon belirlendi. Diğer segmentlerde (başlangıç segmenti, korpus ve kauda) tüm hücre tipleri negatifti.



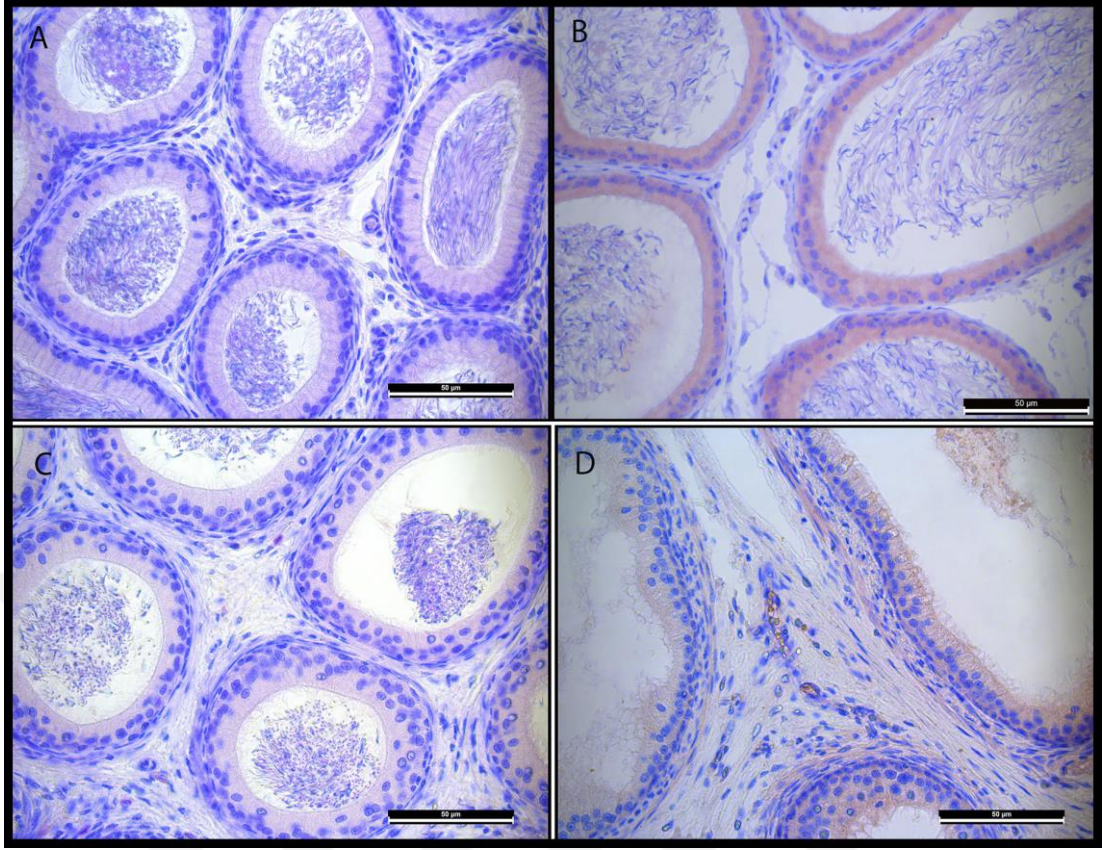
Şekil 3.23. Neonatal dönemde rat epididimisinde EGF immunohistokimyasal boyaması. Başlangıç segmenti (A), kaput (B), korpus (C) ve kauda (D) bölgelerinde pozitif immunreaktivite izlenmemektedir. Bar: 50 µm.



Şekil 3.24. İnfantil dönemde rat epididimisinde EGF immunohistokimyasal boyaması. Başlangıç segmenti (A), kaput (B), korpus (C) ve kauda (D) bölgelerinde pozitif immunreaktivite izlenmemektedir. Bar: 50 µm.



Şekil 3.25. Geç pubertal dönemde rat epididimisinde EGF immunohistokimyasal boyaması. (A) Başlangıç segmenti, (C) korpus ve (D) kauda bölgelerinde EGF ekspresyonu izlenmemektedir. (B) Kaput bölgesindeki epitel hücrelerinde zayıf düzeyde pozitif reaksiyon saptanmaktadır. Bar: 50 µm.



Şekil 3.26. Olgun dönemde rat epididimisinde EGF immunohistokimyasal boyaması (A). Başlangıç segmenti, (C) korpus ve (D) kauda bölgelerinde EGF ekspresyonu izlenmemektedir. (B) Kaput bölgesindeki epitel hücrelerinde zayıf düzeyde pozitif reaksiyon saptanmaktadır. Bar: 50 µm.

İstatistiksel Değerlendirme:

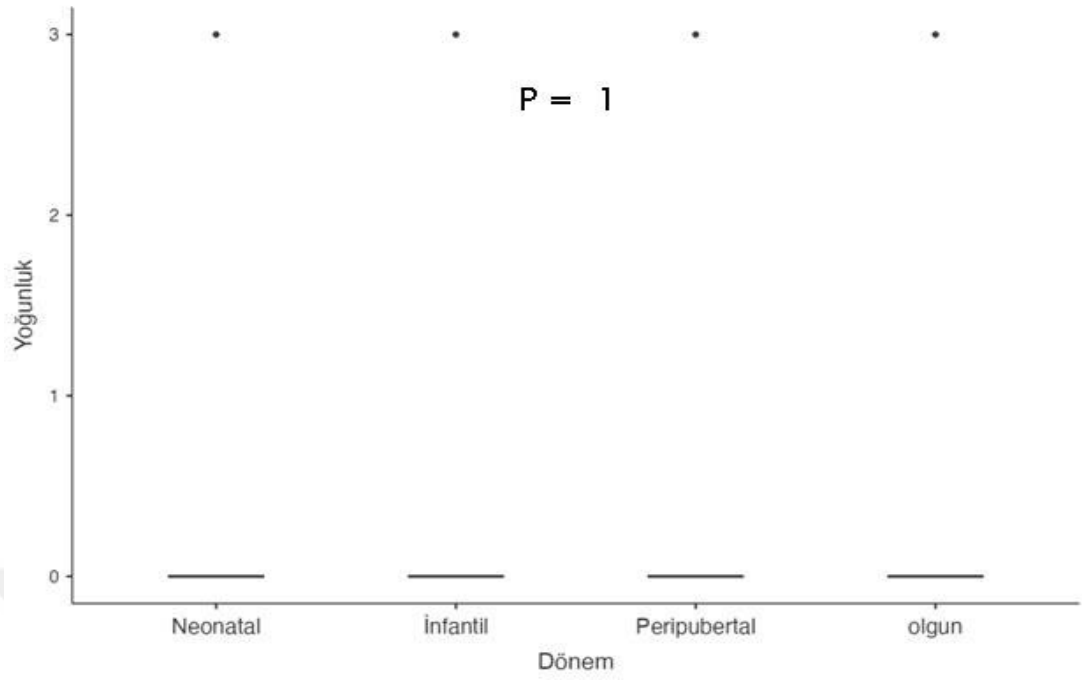
Testiste EGF ekspresyonuna ait semikantitatif skorların dönemsel karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p = 1,000$). (Şekil 3.27.). Epididimis dokusunda ise EGF ekspresyonunun semikantitatif skorlarının dönemsel karşılaştırılmasında yalnızca kaput segmentinde anlamlı fark saptanmıştır ($p = 0,043$). Çoklu karşılaştırma analizine göre neonatal ve infantil dönemler benzer düzeyde boyanma gösterirken (b), geç pubertal ve olgun dönemlerde ekspresyon anlamlı olarak artmıştır (a). (Şekil 3.28.). Geç pubertal ve olgun dönemlerde yapılan segment karşılaştırmalarında kaput segmentinin diğer segmentlere göre anlamlı düzeyde daha yüksek EGF ekspresyonu gösterdiği belirlenmiştir ($p = 0,01$) (Şekil 3.29.).

Hücresele düzeydeki boyanma farklılıkları Çizelge 3.2’de verilmiştir.

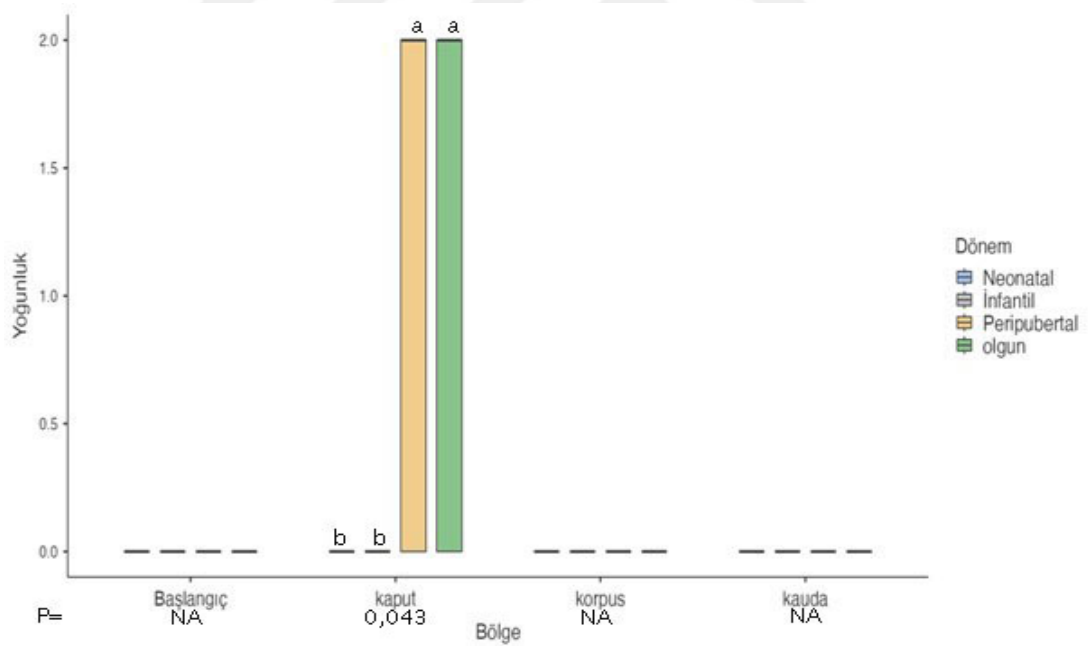
Çizelge 3.2. Testis ve epididimiste EGF ekspresyonunun postnatal gelişim dönemlerine göre hücresel ve segmental dağılımının semikantitatif değerlendirmesi

Doku		Neonatal	İnfanıl	Geç pubertal	Olgun
Testis	Hücre tipi				
	Spermatogonyum	0 (Gonosit)	0	0	0
	Spermatosit/spermatid	-	0	0	0
	Sertoli hücreleri	0	0	0	0
	Leydig hücreleri	+++	+++	+++	+++
	Peritubular myoid hücreler	0	0	0	0
	Damar duvarı kası	0	0	0	0
Epididimis					
Başlangıç segmenti	Prinsipal hücreler	0	0	0	0
	Kalem hücreleri	-	0	0	0
	Bazal hücreler	-	0	0	0
	Apikal hücreler	-	0	0	0
	Halo hücreleri	-	0	0	0
	Kanal duvarındaki kas katmanı	0	0	0	0
Kapus epididimis	Prinsipal hücreler	0	0	+	+
	Bazal hücreler	-	0	+	+
	Apikal hücreler	-	0	+	+
	Halo hücreleri	-	0	0	0
	Kanal duvarındaki kas katmanı	0	0	0	0
Korpus epididimis	Prinsipal hücreler	0	0	0	0
	Bazal hücreler	-	0	0	0
	Apikal hücreler	-	0	0	0
	Halo hücreleri	-	0	0	0
	Kanal duvarındaki kas katmanı	0	0	0	0
Kauda epididimis	Prinsipal hücreler	0	0	0	0
	Bazal hücreler	-	0	0	0
	Apikal hücreler	-	0	-	-
	Halo hücreleri	-	0	0	0
	Şeffaf hücreler	-	-	0	0
	Kanal duvarındaki kas katmanı	0	0	0	0

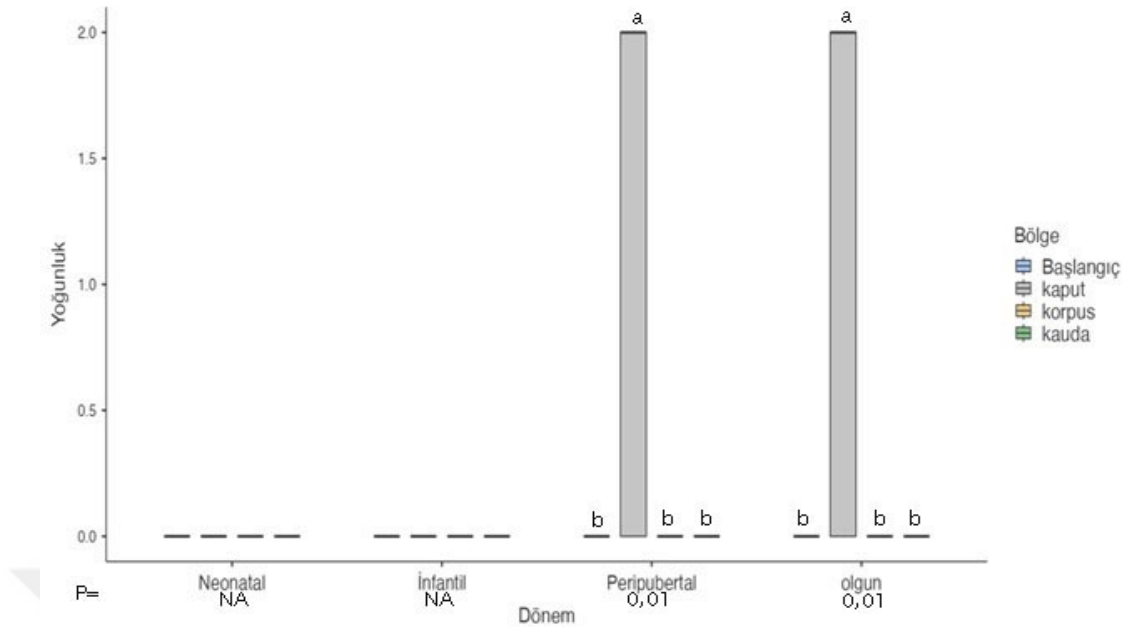
0 (boyanma yok), + (zayıf boyanma), ++ (orta boyanma), +++ (güçlü boyanma), - (hücre tipi farklılaşmamış veya yoktur).



Şekil 3.27. Testiste EGF ekspresyonuna ait dönemsel karşılaştırma grafiği (p = 1,000)



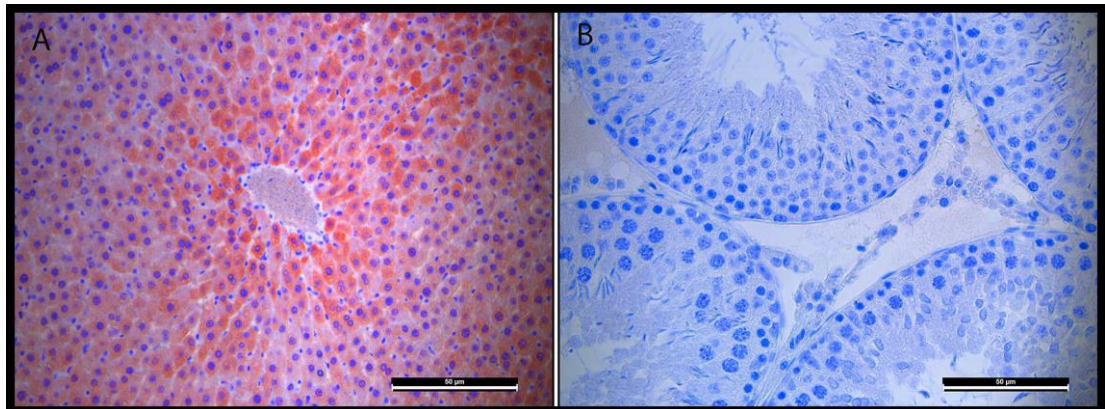
Şekil 3.28. Kaput segmentinde EGF ekspresyonunun postnatal gelişim dönemleri arasında karşılaştırılma grafiği (p = 0,043)



Şekil 3.29. Geç pubertal ve olgun dönemlerde epididimis segmentleri arasında EGF ekspresyonunun karşılaştırılma grafiği (p = 0,01)

3.5.3. Amfiregulin (AREG) Ekspresyonu

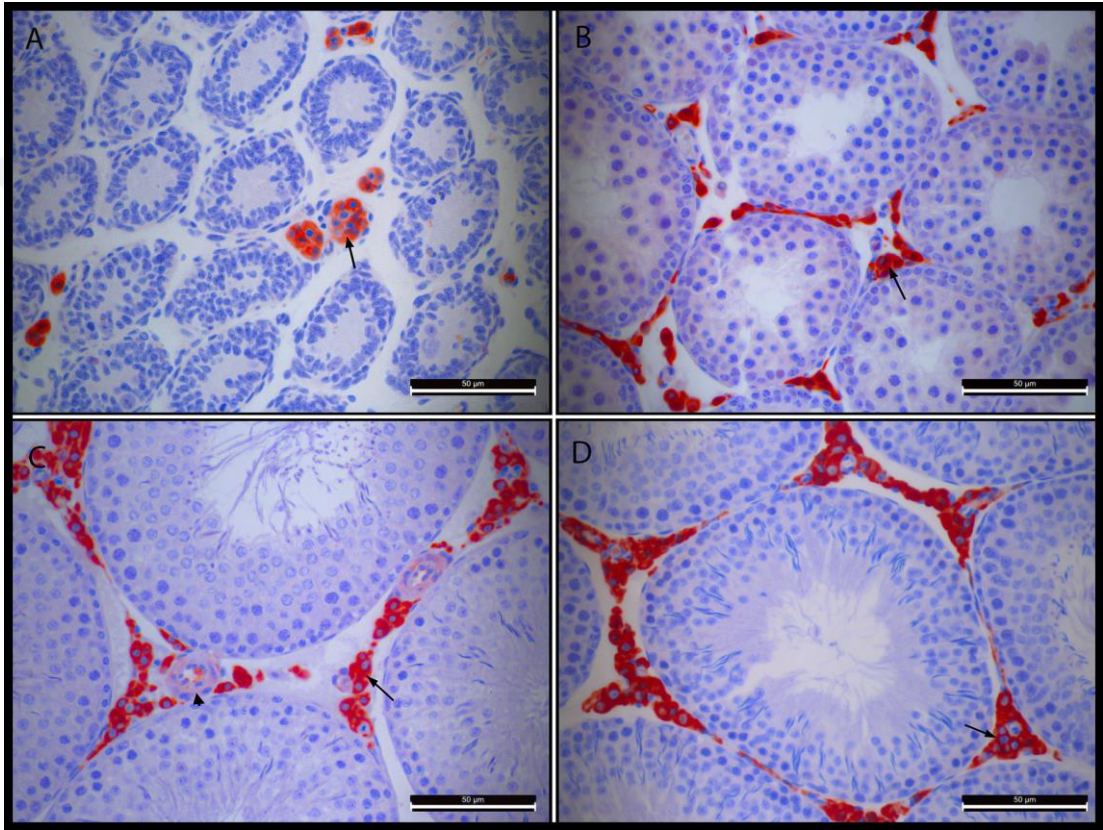
AREG'in testis ve epididimis dokularındaki postnatal gelişimsel ekspresyonu immunohistokimyasal yöntemle değerlendirildi. Boyamaların özgülüğü pozitif (Şekil 3.30. A) ve negatif kontrol kesitleriyle (Şekil 3.30. B) doğrulandı. Pozitif kontrolde karaciğer dokusunda güçlü AREG immunreaktivitesi izlendi; negatif kontrol kesitlerinde ise primer antikor yerine PBS uygulandı ve spesifik boyanma gözlenmedi.



Şekil 3.30. AREG immunohistokimyasal boyasına ait kontrol kesitleri. A. Pozitif kontrol: Karaciğer dokusunda AREG ekspresyonuna karşı güçlü immunreaktivite izlenmektedir. B. Negatif kontrol: Primer antikor yerine PBS uygulanmış testis dokusunda herhangi bir spesifik boyanma saptanmamıştır. Bar: 50 µm.

3.5.3.1. Testis

Tüm postnatal dönemlerde AREG ekspresyonu başlıca Leydig hücrelerinde güçlü (+++) düzeyde saptandı (Şekil 3.31. A-D, ok). Bununla birlikte damar duvarı düz kas hücrelerinde zayıf (+) boyanma da izlendi (Şekil 3.31. C, ok başı). Sertoli hücreleri, peritubular miyoid hücreler ve eşey hücrelerinde (spermatogonyum, spermatosit, spermatid) pozitiflik izlenmedi.



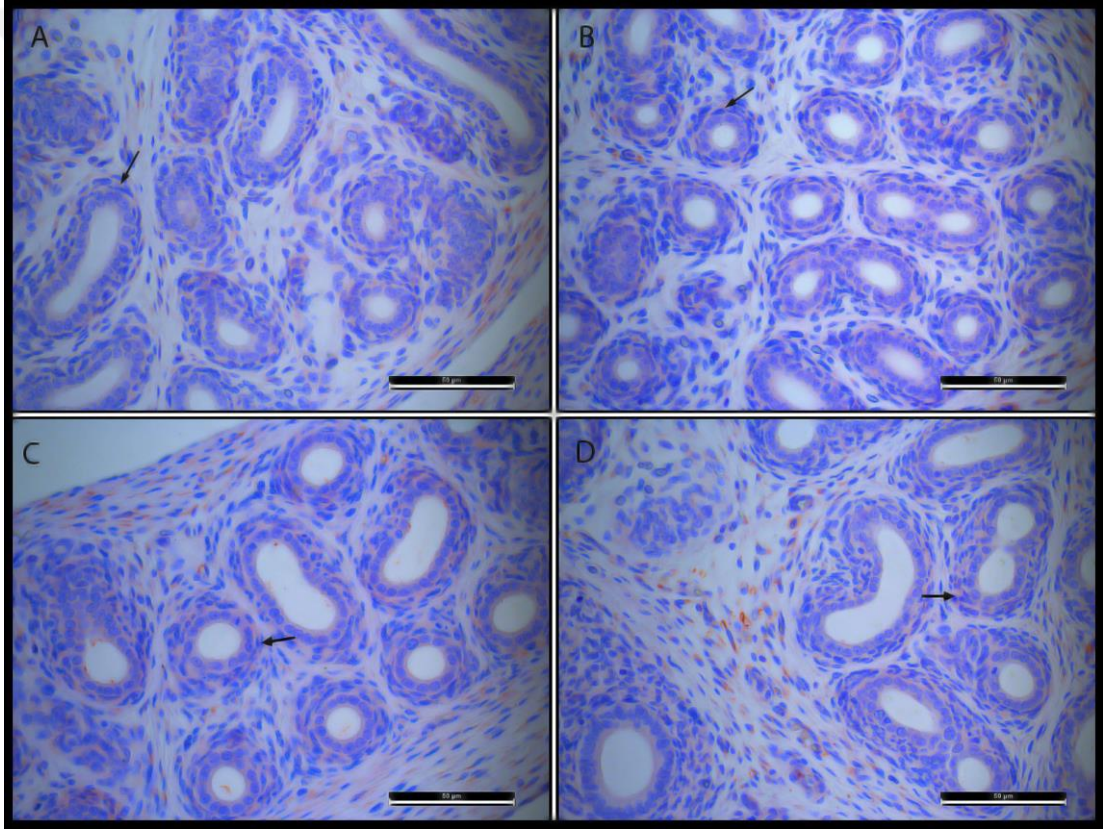
Şekil 3.31. Farklı postnatal dönemlerde rat testisinde AREG immunohistokimyasal boyaması. A. Neonatal (A), infantil (B), geç pubertal (C) ve olgun (D) dönemlerde tüm Leydig hücrelerinde (ok) ve damar duvarı düz kas hücrelerinde (C, ok başı) pozitiflik izlenmektedir. Sertoli hücreleri, peritubular miyoid hücreler ve eşey hücrelerinde (spermatogonyum, spermatosit, spermatid) boyanma saptanmamıştır. Bar: 50 µm.

3.5.3.2. Epididimis

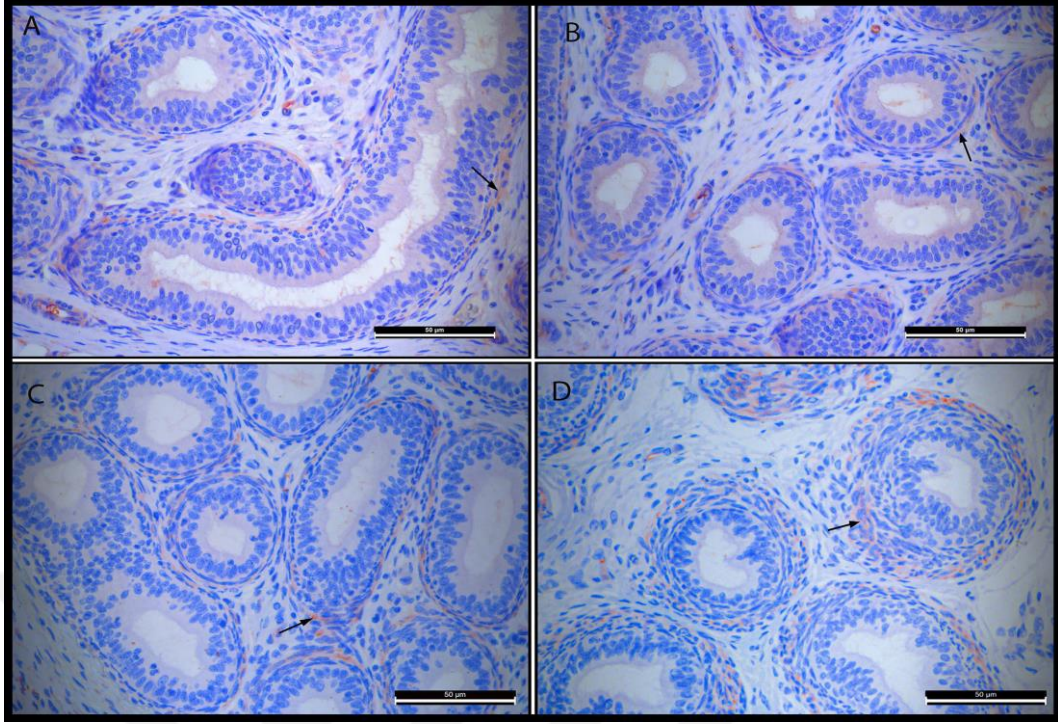
Epididimis dokusunda AREG ekspresyonu sınırlı hücre popülasyonlarıyla kısıtlı kaldı ve gelişim evrelerine bağlı olarak farklı şiddetlerde izlendi. Neonatal dönemde yalnızca kanal duvarı düz kas hücrelerinde zayıf (+) pozitiflik saptandı (Şekil 3.32. A-D, ok). İnfantil dönemde düz kas hücrelerindeki zayıf (+) boyanma devam etti (Şekil 3.33. A-D, ok).

Geç pubertal dönemde bazal hücrelerde başlangıç segmenti ve kaputta orta (++) , korpus ve kaudada güçlü (+++) düzeyde boyanma belirlendi (Şekil 3.34. A-D, ok). Ayrıca kauda epididimiste şeffaf hücrelerde güçlü (+++) ekspresyon gözlemlendi (Şekil 3.34. D, ok başı). Düz kas hücrelerinde ise zayıf pozitiflik (+) tüm dönemlerde sabit kaldı.

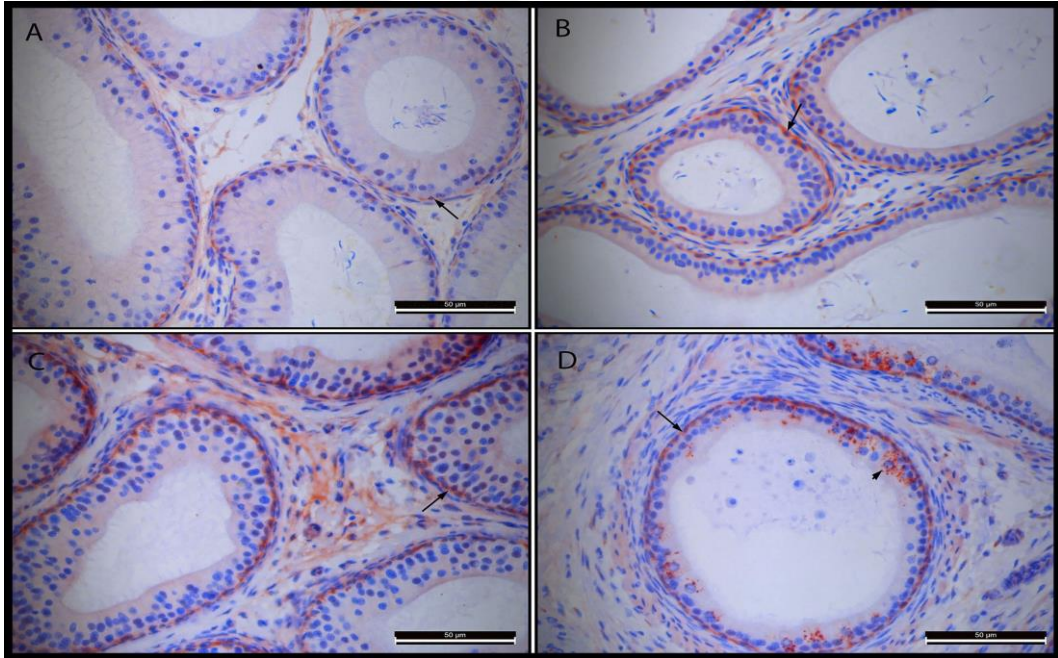
Olgun dönemde bazal hücrelerdeki AREG pozitifliği geç pubertal döneme benzer şekilde sürdü; başlangıç segmenti ve kaputta orta (++) , korpus ve kaudada güçlü (+++) ekspresyon devam etti (Şekil 3.35. A-D, ok). Kauda şeffaf hücrelerinde (Şekil 3.35. D, ok başı) gözlenen güçlü (+++) boyanma da korundu. Kanal duvarındaki düz kas hücrelerinde tüm gelişim evrelerinde olduğu gibi zayıf (+) ekspresyon devam etti.



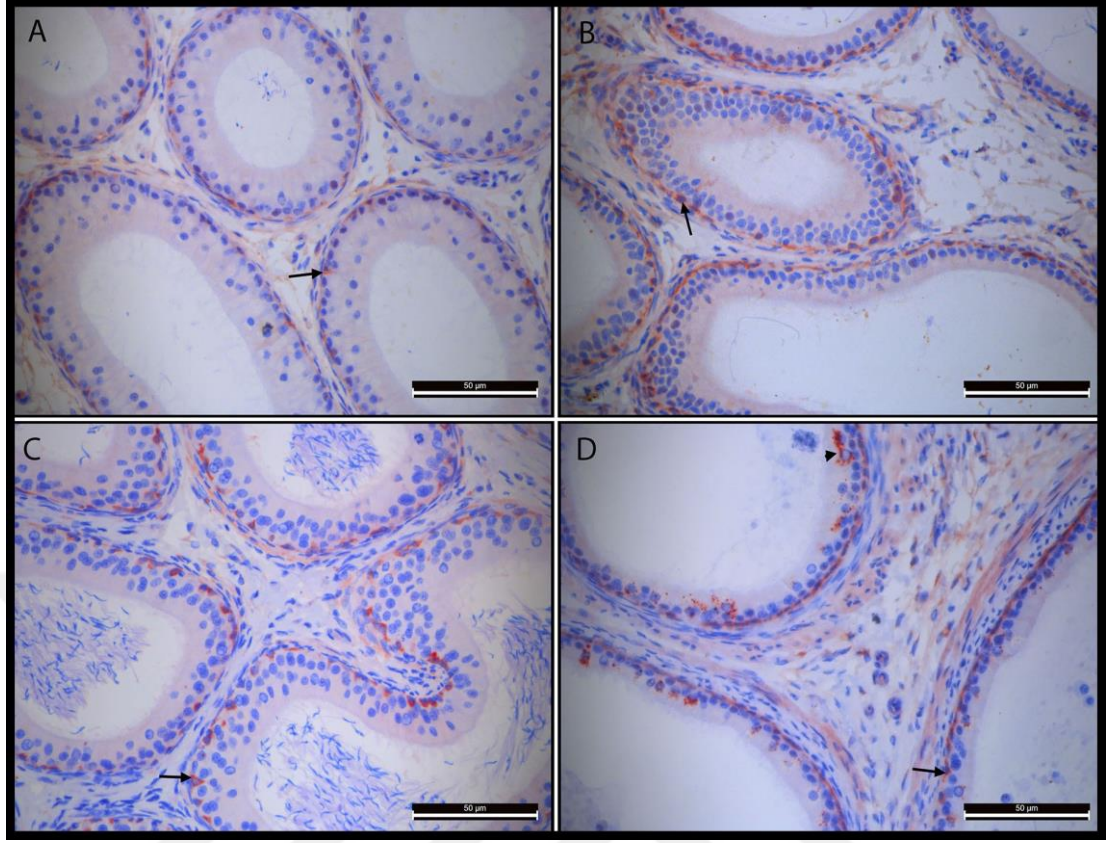
Şekil 3.32. Neonatal dönemde rat epididimisinde AREG immunohistokimyasal boyaması. Başlangıç segmenti (A), kaput (B), korpus (C) ve kauda (D) bölgelerinde yalnızca kanal duvarındaki düz kas hücrelerinde (ok) pozitif reaksiyon izlenmektedir. Epitel hücrelerinde herhangi bir boyanma saptanmamıştır. Bar: 50 µm.



Şekil 3.33. İnfantil dönemde rat epididimisinde epididimis AREG immunohistokimyasal boyaması. Başlangıç segmenti (A), kaput (B), korpus (C) ve kauda (D) bölgelerinde kanal duvarındaki düz kas hücrelerinde (ok) pozitif reaksiyon devam etmektedir. Epitel hücrelerinde herhangi bir boyanma saptanmamıştır. Bar: 50 µm.



Şekil 3.34. Geç pubertal dönemde rat epididimisinde AREG immunohistokimyasal boyaması. Başlangıç segmenti (A) ve kaputta (B) bazal hücrelerde (ok) pozitif reaksiyon izlenmektedir. Korpus (C) ve kaudada (D) bölgelerinde bazal hücrelerde (ok) daha güçlü pozitiflik saptanmıştır. Kauda epididimiste ayrıca şeffaf hücrelerde (ok başı) pozitif reaksiyon gözlenmektedir. Tüm segmentlerde kanal duvarındaki düz kas hücrelerinde boyanma devam etmektedir. Bar: 50 µm.



Şekil 3.35. Olgun dönemde rat epididimisinde AREG immunohistokimyasal boyaması. Başlangıç segmenti (A) ve kaput (B) bölgelerinde bazal hücrelerde (ok) pozitif reaksiyon izlenmektedir. Korpus (C) ve kauda (D) bölgelerinde bazal hücrelerde (ok) pozitif reaksiyon saptanmıştır. Kauda epididimiste ayrıca şeffaf hücrelerde (ok başı) güçlü boyanma gözlenmektedir. Tüm segmentlerde kanal duvarındaki düz kas hücrelerinde immunreaktivite devam etmektedir. Bar: 50 µm.

İstatistiksel Değerlendirme:

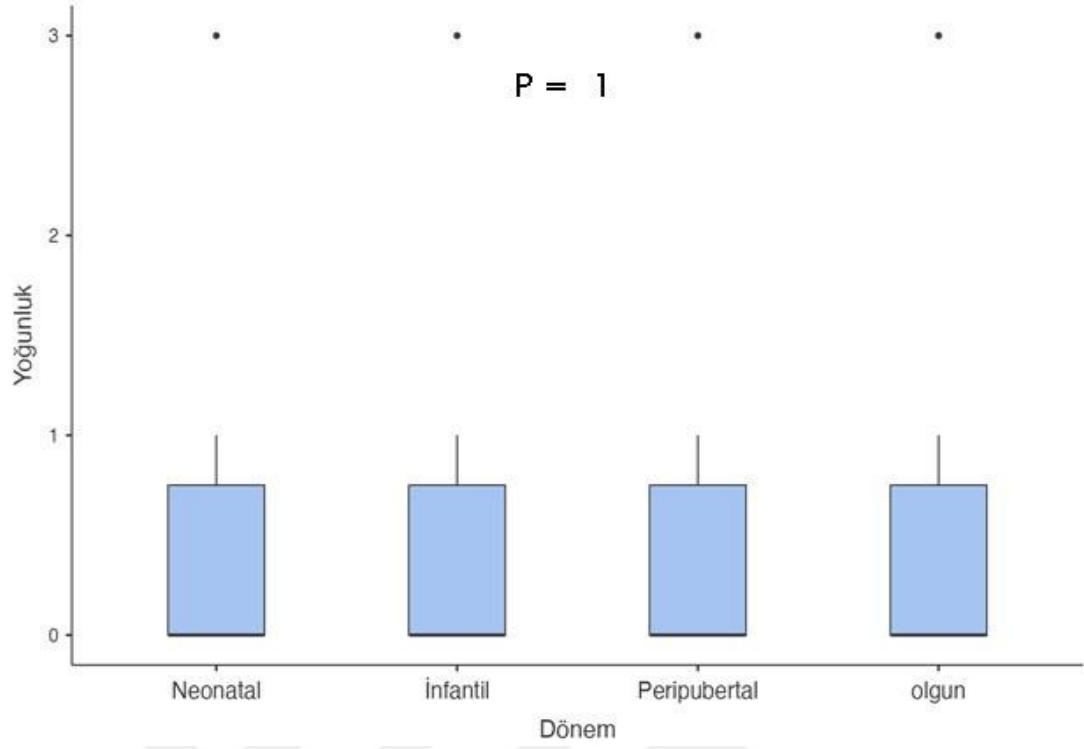
Testiste AREG ekspresyonuna ait semikantitatif skorların dönemsel karşılaştırılmasında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p = 1,000$). (Şekil 3.36.). Epididimis dokusunda yapılan analizlerde ise, gerek dönemsel karşılaştırmalarda (Şekil 3.37.) gerekse dönem içi segment karşılaştırmalarında (Şekil 3.38.) anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p > 0,05$). Bu bulgular, AREG ekspresyonunun tüm segmentlerde ve tüm gelişim dönemlerinde benzer düzeylerde seyrettiğini göstermektedir.

Hücresel düzeydeki boyanma farklılıkları Çizelge 3.3'te verilmiştir.

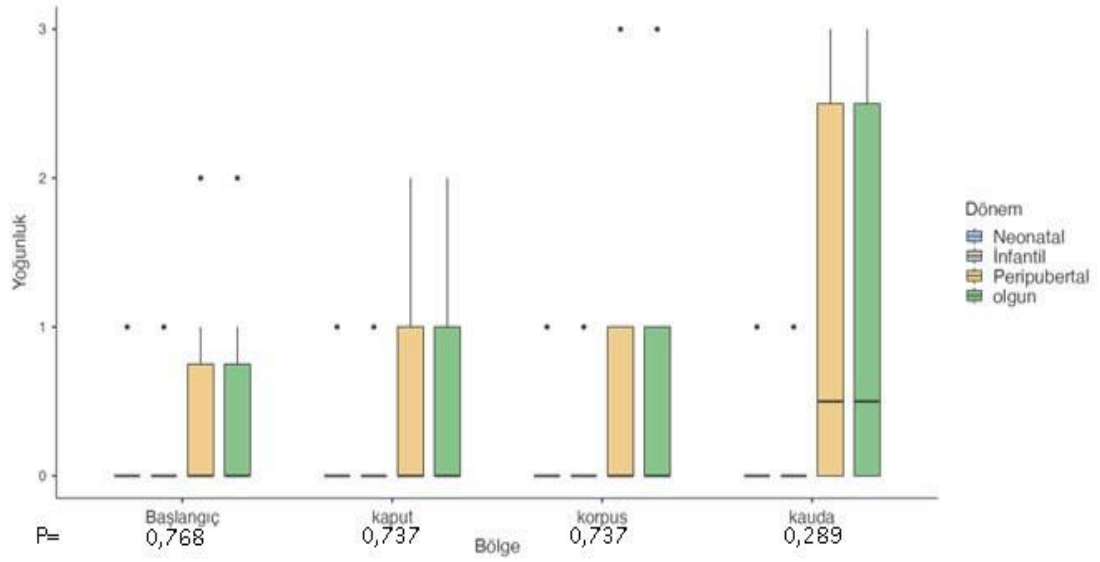
Çizelge 3.3. Testis ve epididimiste AREG ekspresyonunun postnatal gelişim dönemlerine göre hücresel ve segmental dağılımının semikantitatif değerlendirilmesi

Doku		Neonatal	İnfanıl	Geç pubertal	Olgun
	Hücre tipi				
Testis	Spermatogonyum	0 (Gonosit)	0	0	0
	Spermatosit/spermatid	-	0	0	0
	Sertoli hücreleri	0	0	0	0
	Leydig hücreleri	+++	+++	+++	+++
	Peritubular myoid hücreler	0	0	0	0
Damar duvarı kası		+	+	+	+
Epididimis					
Başlangıç segmenti	Prinsipal hücreler	0	0	0	0
	Kalem hücreleri	-	0	0	0
	Bazal hücreler	-	0	++	++
	Apikal hücreler	-	0	0	0
	Halo hücreleri	-	0	0	0
	Kanal duvarındaki kas katmanı	+	+	+	+
Kaput epididimis	Prinsipal hücreler	0	0	0	0
	Bazal hücreler	-	0	++	++
	Apikal hücreler	-	0	0	0
	Halo hücreleri	-	0	0	0
	Kanal duvarındaki kas katmanı	+	+	+	+
Korpus epididimis	Prinsipal hücreler	0	0	0	0
	Bazal hücreler	-	0	+++	+++
	Apikal hücreler	-	0	0	0
	Halo hücreleri	-	0	0	0
	Kanal duvarındaki kas katmanı	+	+	+	+
Kauda epididimis	Prinsipal hücreler	0	0	0	0
	Bazal hücreler	-	0	+++	+++
	Apikal hücreler	-	0	-	-
	Halo hücreleri	-	0	0	0
	Şeffaf hücreler	-	-	+++	+++
	Kanal duvarındaki kas katmanı	+	+	+	+

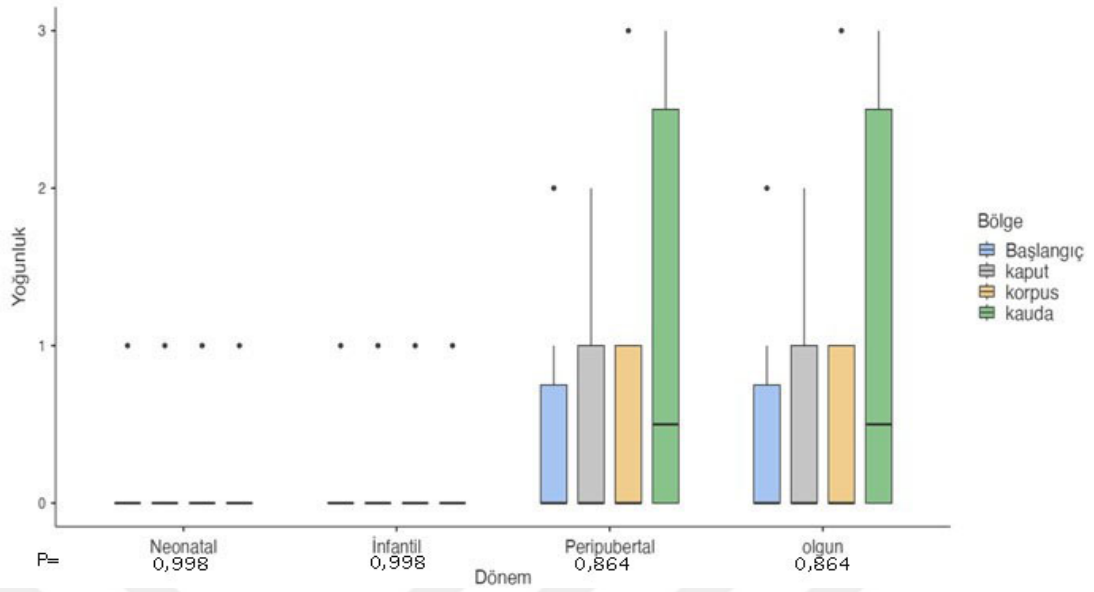
0 (boyanma yok), + (zayıf boyanma), ++ (orta boyanma), +++ (güçlü boyanma), - (hücre tipi farklılaşmamış veya yoktur).



Şekil 3.36. Testiste AREG ekspresyonunun dönemsel karşılaştırılma grafiği (p = 1,000)



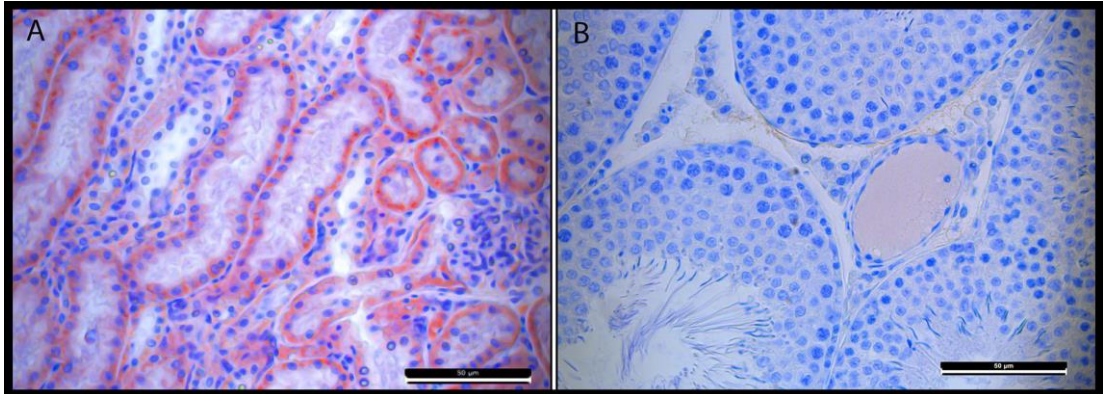
Şekil 3.37. Epididimis segmentlerinde AREG ekspresyonunun postnatal gelişim dönemleri arasında karşılaştırılma grafiği (p > 0,05)



Şekil 3.38. Her bir postnatal dönemde epididimis segmentleri arasında AREG ekspresyonunun karşılaştırılma grafiği ($p > 0,05$)

3.5.4. Dönüştürücü Büyüme Faktörü Alfa (TGF- α) Ekspresyonu

TGF- α 'nın testis ve epididimis dokularındaki postnatal gelişimsel ekspresyonu immunohistokimyasal yöntemle değerlendirildi. Her dönem için pozitif (Şekil 3.39. A) ve negatif kontrol kesitleri (Şekil 3.39. B) kullanılarak boyamaların özgüllüğü doğrulandı. Pozitif kontrol olarak TGF- α ekspresyonunun bulunduğu böbrek dokusu, negatif kontrolde ise primer antikor yerine PBS uygulanmış testis dokusu kullanıldı. Negatif kontrol kesitlerinde herhangi bir spesifik boyanma izlenmedi.



Şekil 3.39. TGF- α immunohistokimyasal boyamasına ait kontrol kesitleri. A. Pozitif kontrol: Böbrek dokusunda TGF- α ekspresyonuna karşı güçlü immunreaktivite izlenmektedir. B. Negatif kontrol: Primer antikor yerine PBS uygulanmış testis dokusunda herhangi bir spesifik boyanma saptanmamıştır. Bar: 50 μ m.

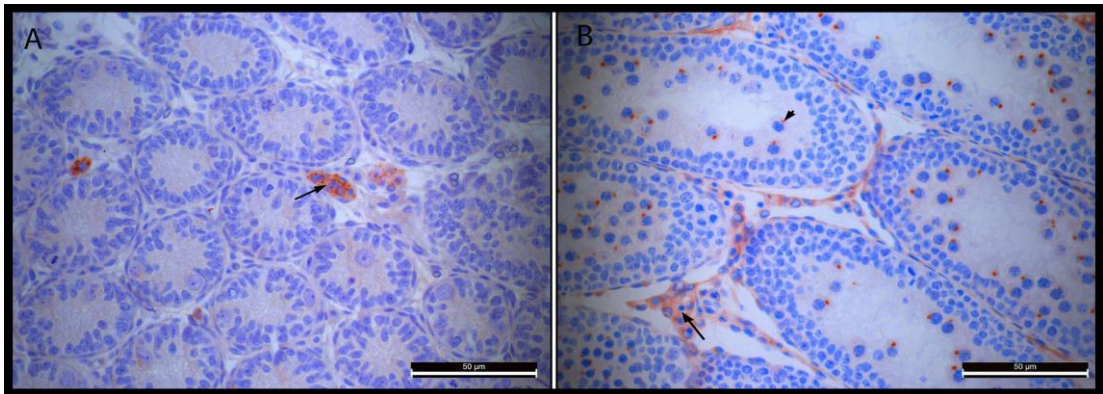
3.5.4.1. Testis

TGF- α proteininin ekspresyonu, postnatal gelişim evreleri (neonatal, infantil, geç pubertal, olgun) boyunca farklılıklar gösterdi. Neonatal dönemde seminifer tubullerde gonositler, Sertoli hücreleri, peritubular miyoid ve damar düz kas hücrelerinde pozitiflik izlenmezken, yalnızca Leydig hücrelerinde zayıf-orta (+/++) düzeyde boyanma saptandı (Şekil 3.40. A, ok).

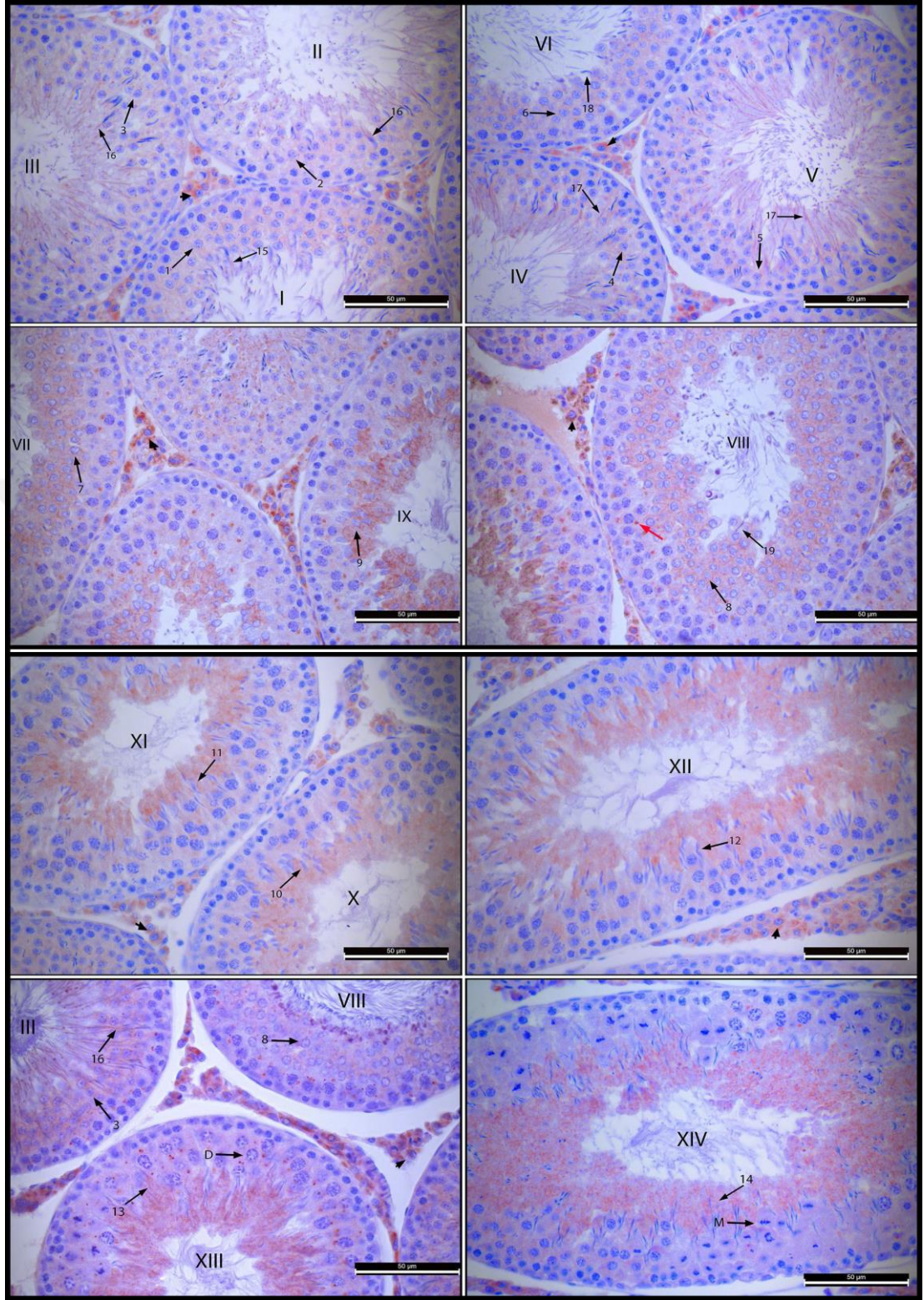
İnfantil dönemde Leydig hücrelerindeki pozitiflik zayıf-orta (+/++) düzeyde devam etti (Şekil 3.40. B, ok) Ayrıca pakiten spermatositlerin perinükleer bölgesinde orta (++) ekspresyon gözlemlendi (Şekil 3.40. B, ok başı).

Geç pubertal dönemde seminifer epitel evrelerine göre yapılan incelemede, evre I-VIII'deki erken (1-8. adım) ve geç (15-19. adım) spermatidlerde zayıf (+), evre IX-XIV'teki orta (9-14. adım) spermatidlerde ise orta (++) pozitiflik belirlendi (Şekil 34). Primer spermatositlerin perinükleer bölgesinde (Şekil 3.41. kırmızı ok) orta (++) boyanma izlenirken, Leydig hücrelerinde orta ile güçlü (++) arasında değişen ekspresyon dikkati çekti (Şekil 3.41. ok başı).

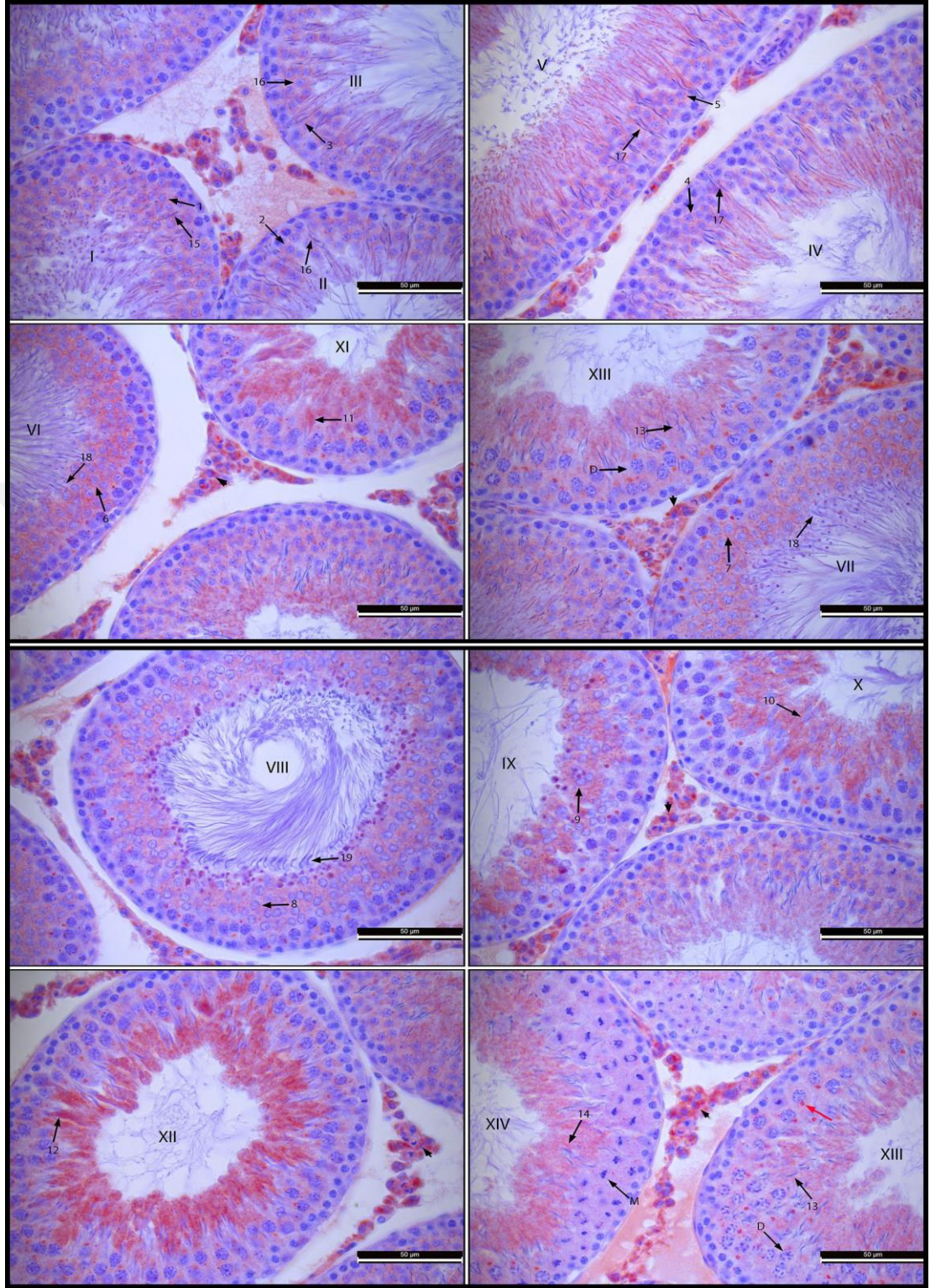
Olgun dönemde primer spermatositlerde perinükleer ekspresyon orta (++) düzeyde korundu. Evre I-VIII'deki erken ve geç spermatidlerde orta (++) , evre IX-XIV'teki orta spermatidlerde ise güçlü (+++) pozitiflik saptandı (Şekil 3.42.). Leydig hücrelerinde de güçlü (+++) ekspresyon gözlemlendi (Şekil 3.42. ok başı).



Şekil 3.40. Neonatal ve infantil döneme ait testis dokusunda TGF- α immunohistokimyasal boyaması. A. Neonatal dönemde yalnızca Leydig hücrelerinde (ok) pozitif reaksiyon izlenmektedir. B. İnfantil dönemde Leydig hücrelerinde (ok) pozitiflik devam etmekte olup, ayrıca pakiten spermatositlerin perinükleer bölgesinde (ok başı) pozitif boyanma saptanmaktadır. Bar: 50 μ m.



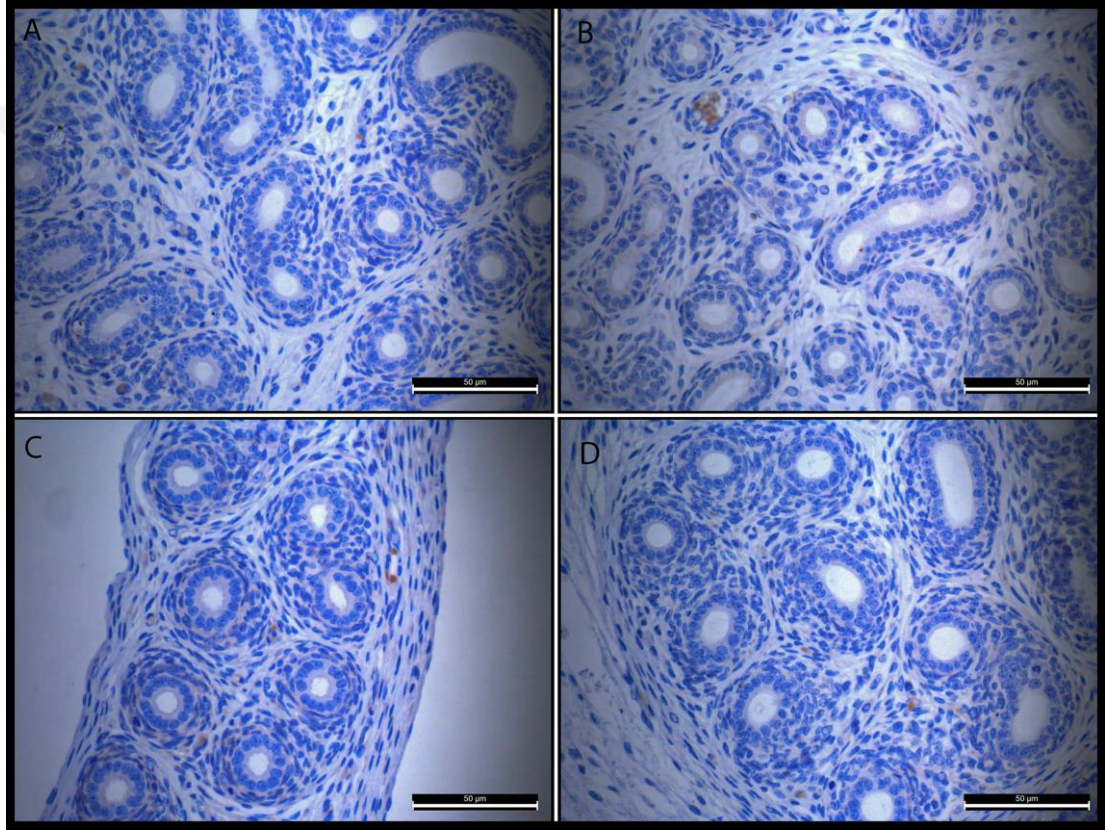
Şekil 3.41. Geç pubertal döneme ait testis dokusunda TGF- α immunohistokimyasal boyaması. Evre I-VIII'de erken (1-8. adım) ve geç (15-19. adım) spermatidlerde zayıf, evre, IX-XIV'te ise orta (9-14. adım) spermatidlerde orta düzeyde pozitif reaksiyon izlenmektedir. Boyanma spermatidlerin sitoplazmasında lokalizedir. Ayrıca primer spermatositlerin perinükleer bölgesinde (kırmızı ok) pozitif reaksiyon saptanmaktadır. Leydig hücrelerinde (ok başı) ise orta-güçlü düzeyde pozitif reaksiyon görülmektedir Bar: 50 μ m.



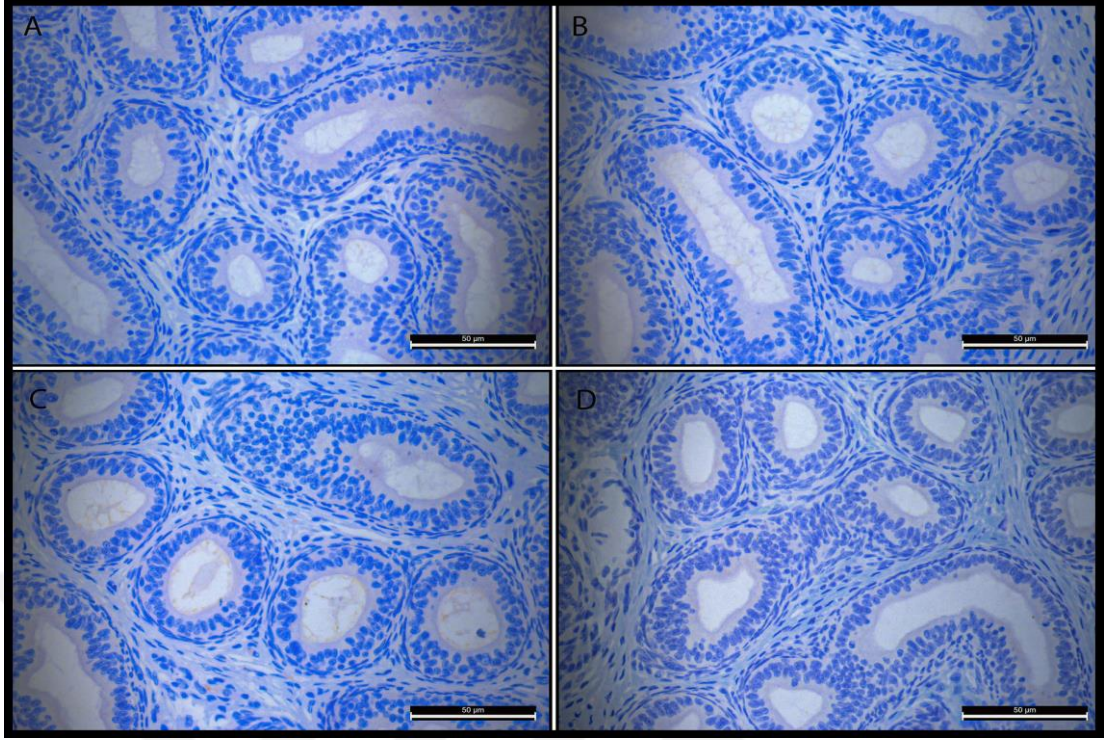
Şekil 3.42. Olgun döneme ait testis dokusunda TGF- α immunohistokimyasal boyaması. Primer spermatositlerin perinükleer bölgesinde (kırmızı ok) pozitif reaksiyon izlenmektedir. Evre I-VIII'de erken (1-8. adım) ve geç (15-19. adım) spermatidlerde orta, evre IX-XIV'te ise orta (9-14. adım) spermatidlerde güçlü boyanma saptanmaktadır. Leydig hücrelerinde (ok başı) belirgin pozitif reaksiyon dikkati çekmektedir. M: Mitoz, D: Diploten. Bar: 50 μ m.

3.5.4.2. Epididimis

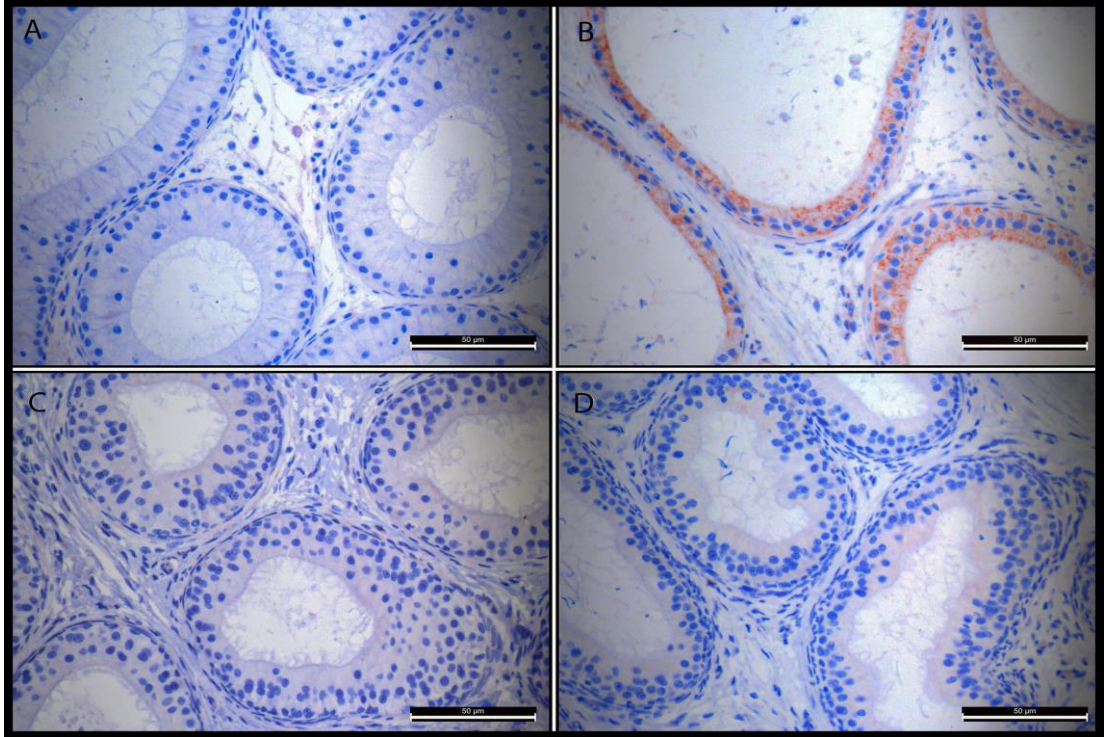
Neonatal ve infantil dönemlerde başlangıç segmenti, kaput, korpus, kauda ve kanal duvarındaki düz kas tabakası dahil olmak üzere tüm segmentlerde TGF- α ekspresyonu negatiftir (Şekil 3.43. ve 3.44. A-D). Geç pubertal ve olgun dönemlerde ise yalnızca kaput bölgesinde prinsipal, apikal ve bazal hücrelerde orta (++) düzeyde pozitiflik saptandı (Şekil 3.45.-3.46. B). Diğer segmentlerde ve kanal duvarı düz kas tabakasında ekspresyon izlenmedi.



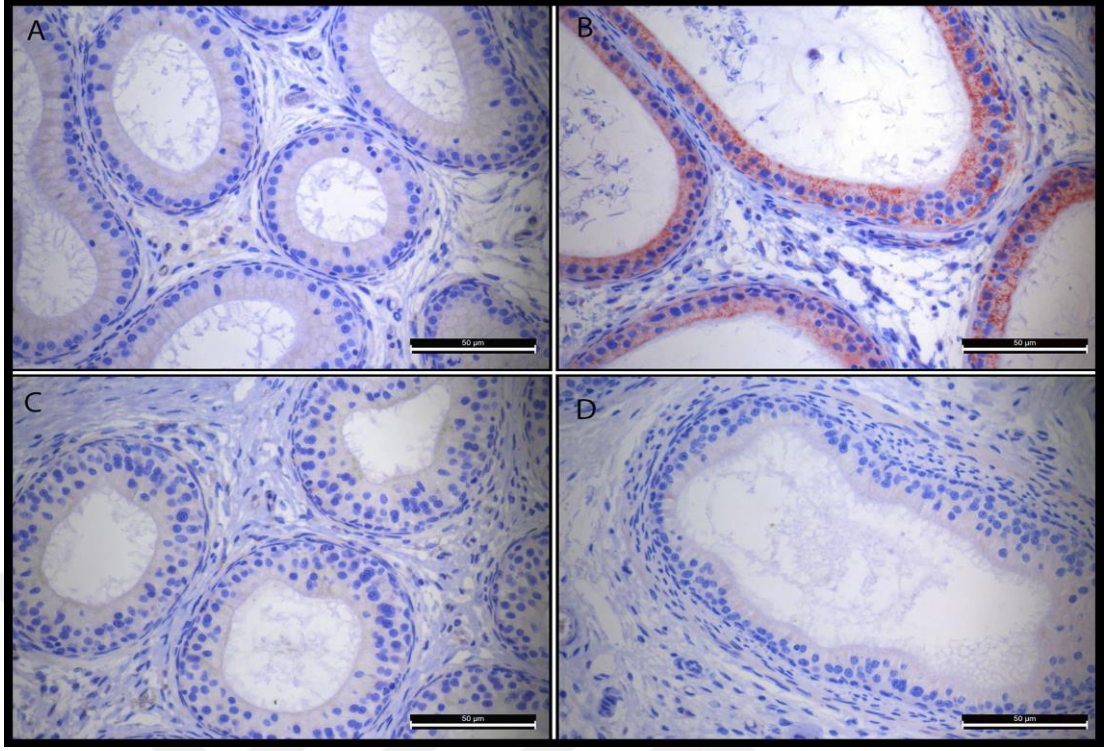
Şekil 3.43. Neonatal dönemde rat epididimisinde TGF- α immunohistokimyasal boyaması. (A–D) Epididimal farklılaşma henüz tamamlanmamış olup başlangıç segmenti, kaput, korpus ve kauda bölgelerinde herhangi bir pozitif reaksiyon saptanmamıştır. Bar: 50µm.



Şekil 3.44. İnfanıl dönemde rat epididimisinde TGF- α immunohistokimyasal boyaması. (A–D) Başlangıç segmenti, kaput, korpus ve kauda bölgelerinde herhangi bir pozitif reaksiyon saptanmamıştır. Bar: 50 μ m.



Şekil 3.45. Geç pubertal dönemde rat epididimisinde TGF- α immunohistokimyasal boyaması. (B) Kaput bölgesindeki epitel hücrelerinde pozitif reaksiyon izlenmektedir. Diğer epididimal bölgelerde (A, C ve D) herhangi bir boyanma saptanmamıştır. Bar: 50 μ m.



Şekil 3.46. Olgun dönemde rat epididimisinde TGF- α immunohistokimyasal boyaması. (B) Kaput bölgesindeki epitel hücrelerinde pozitif reaksiyon izlenmektedir. Diğer epididimal bölgelerde (A, C ve D) herhangi bir boyanma saptanmamıştır. Bar: 50 μ m.

İstatistiksel Değerlendirme:

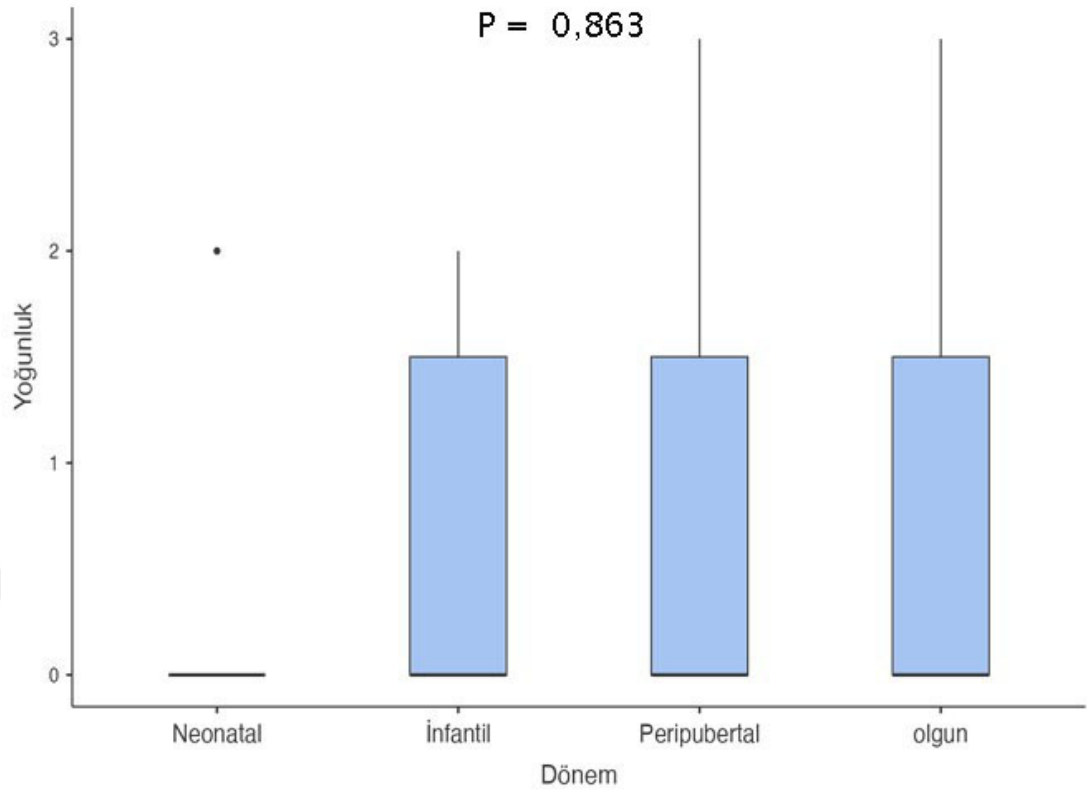
Testiste TGF- α ekspresyonuna ait semikantitatif skorların dönemsel karşılaştırılmasında, neonatal dönemden olgun döneme doğru artış eğilimi görülmesine rağmen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0,863$) (Şekil 3.47.). Epididimis dokusunda yapılan dönemsel karşılaştırmalarda ise yalnızca kaput segmentinde anlamlı bir fark belirlenmiştir ($p = 0,043$). Çoklu karşılaştırma sonuçlarına göre neonatal ve infantil dönemler benzer ekspresyon düzeylerinde seyretmiş (b), geç pubertal ve olgun dönemlerde ise TGF- α ekspresyonu anlamlı şekilde artmıştır (a) (Şekil 3.48.). Geç pubertal ve olgun dönemlerde gerçekleştirilen segment karşılaştırmalarında kaput segmentinin diğer segmentlere kıyasla anlamlı derecede daha yüksek TGF- α pozitifliği gösterdiği saptanmıştır ($p = 0,01$) (Şekil 3.49.). Buna karşılık başlangıç, korpus ve kauda segmentlerinde dönemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik izlenmemiştir ($p > 0,05$).

Hücresel düzeydeki boyanma farklılıkları Çizelge 3.4’de verilmiştir.

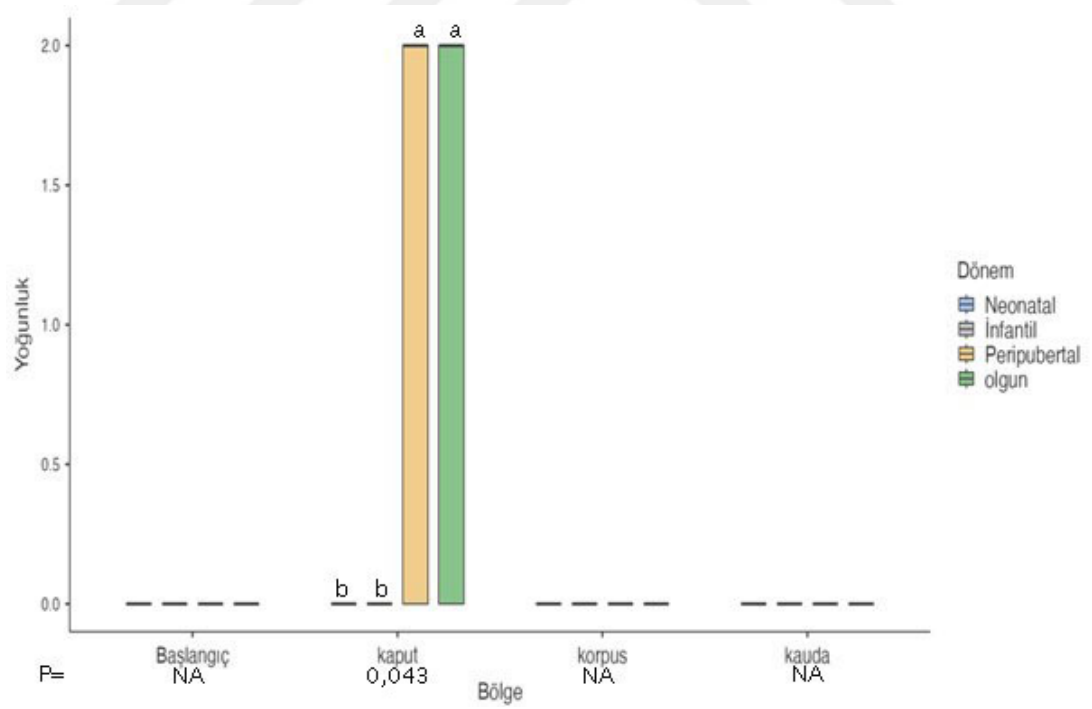
Çizelge 3.4. Testis ve epididimiste TGF- α ekspresyonunun postnatal gelişim dönemlerine göre hücresel ve segmental dağılımının semikantitatif değerlendirmesi. (Spermatidler evrelere göre sınıflandırılmıştır: erken = adım 1–8, orta = adım 9–14, geç = adım 15–19)

Doku		Neonatal	İnfanıl	Geç pubertal	Olgun
Testis	Hücre tipi				
	Spermatogonyum	0 (Gonosit)	0	0	0
	Spermatosit	-	Pakiten spermatosit perinükleer ++	Pakiten spermatosit perinükleer ++	Pakiten spermatosit perinükleer ++
	Spermatid (erken, adım 1-8; evre I- VIII))	-	-	+	++
	Spermatid (orta, adım 9-14; evre IX-XIV)	-	-	++	+++
	Spermatid (geç, adım 15-19; evre I-VIII))	-	-	+	++
	Sertoli hücreleri	0	0	0	0
	Leydig hücreleri	+/++	+/++	++/+++	+++
	Peritubular miyoid hücreler	0	0	0	0
	Damar duvarı kası	0	0	0	0
Epididimis					
Başlangıç segmenti	Prinsipal hücreler	0	0	0	0
	Kalem hücreleri	-	0	0	0
	Bazal hücreler	-	0	0	0
	Apikal hücreler	-	0	0	0
	Halo hücreleri	-	0	0	0
	Kanal duvarındaki kas katmanı	0	0	0	0
Kaput epididimis	Prinsipal hücreler	0	0	++	++
	Bazal hücreler	-	0	++	++
	Apikal hücreler	-	0	++	++
	Halo hücreleri	-	0	0	0
	Kanal duvarındaki kas katmanı	0	0	0	0
Korpus epididimis	Prinsipal hücreler	0	0	0	0
	Bazal hücreler	-	0	0	0
	Apikal hücreler	-	0	0	0
	Halo hücreleri	-	0	0	0
	Kanal duvarındaki kas katmanı	0	0	0	0
Kauda epididimis	Prinsipal hücreler	0	0	0	0
	Bazal hücreler	-	0	0	0
	Apikal hücreler	-	0	-	-
	Halo hücreleri	-	0	0	0
	Şeffaf hücreler	-	-	0	0
	Kanal duvarındaki kas katmanı	0	0	0	0

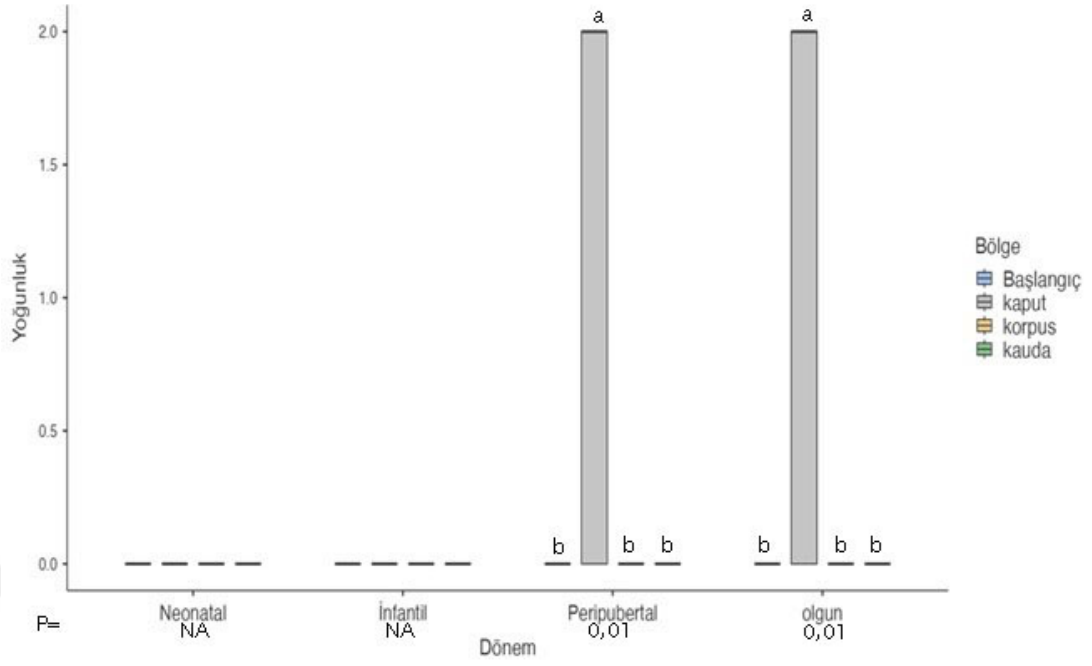
0 (boyanma yok), + (zayıf boyanma), ++ (orta boyanma), +++ (güçlü boyanma), - (hücre tipi farklılaşmamış veya yoktur).



Şekil 3.47. Testiste TGF- α ekspresyonunun dönemsel karşılaştırılma grafiği (p = 0,863)



Şekil 3.48. Epididimis kaput segmentinde postnatal gelişim dönemleri arasında TGF- α ekspresyonunun karşılaştırılma grafiği (p = 0,043)



Şekil 3.49. Geç pubertal ve olgun dönemlerde epididimis segmentleri arasında TGF- α ekspresyonunun karşılaştırılma grafiği ($p = 0,01$)

4. TARTIŞMA

Postnatal dönemde testis ve epididimis gelişimi, birbirini tamamlayan hücresel ve moleküler mekanizmaların koordinasyonu ile gerçekleşmektedir. Bu süreçte hormonlar, büyüme faktörleri, sitokinler ve parakrin etkili sinyal molekülleri, hücre çoğalması, farklılaşma, organogenez ve fonksiyonel olgunlaşmayı düzenleyen başlıca etmenlerdir (He vd., 2009). Büyüme faktörlerinin testiküler fonksiyonlarda, özellikle spermatogenez ve steroidogenezde, tek başına ya da hormonal ve sitokin aracılı sinyallerle birlikte etkili olabildiği bildirilmiştir (Abd-Elmaksoud ve Sinowatz, 2005; Gnessi vd., 1997; Huleihel ve Lunenfeld, 2004). Ayrıca bu etkilerin çoğunun otokrin veya parakrin mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştiği ve lokal sinyal ağlarının hücre proliferasyonu, farklılaşma ve fonksiyonel olgunlaşmada önemli rol oynadığı belirtilmektedir (Wald, 2005).

Önceki çalışmalar genellikle embriyonik veya erişkin dönemlere odaklanmakta olup, postnatal dönemin farklı evrelerine ilişkin hücresel lokalizasyon ve ekspresyon verileri oldukça sınırlıdır. Çalışmamızda, Wistar albino ratların testis ve epididimis dokularının postnatal gelişimsel özellikleri ile birlikte EGFR, EGF, TGF- α ve AREG'in dönemsel, hücresel ve spermatogenik siklus aşamalarına göre ekspresyon paternleri immunohistokimyasal olarak incelenmiştir; ayrıca Leydig hücre popülasyonlarının (FLC ve ALC) postnatal dağılım ve farklılaşma özellikleri de değerlendirilmiştir.

Epididimis dokusu hem postnatal gelişimdeki morfolojik farklılaşmalar hem de segmental özellikleri açısından önem taşımaktadır. Spermatozoonların taşınması, depolanması ve fonksiyonel olgunlaşmasında merkezi role sahiptir. Epididimise özgü proteinler ve bunlara ait mRNA'ların tanımlanmasına yönelik çalışmalar, birçok molekülün epididimisin farklı segmentlerinde seçici olarak eksprese edildiğini ve bu segmental dağılımın organın bölgesel fizyolojik işlevlerinin düzenlenmesinde önemli olduğunu göstermiştir (Dacheux vd., 2005; Robaire ve Hinton, 2015). Bununla birlikte büyüme faktörlerinin epididimis segmentlerindeki özgül işlevleri hâlen tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Dolayısıyla bu moleküllerin segmental ve hücresel düzeyde karakterizasyonunun, epididimis fizyolojisi ve spermatozoa olgunlaşmasını düzenleyen mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına önemli katkılar sağlayabileceği düşünülmektedir.

Farklı türlerde gerçekleştirilen araştırmalar, EGF ve EGFR'nin testis fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynadığını ve hücresel lokalizasyonlarının türler arasında

değişiklik gösterebildiğini ortaya koymuştur. EGFR'yi aktive eden diğer ligandların da doku dağılımları ve ekspresyon paternlerinin türler arasında farklılık sergileyebildiği bildirilmektedir (Abd-Elmaksoud ve Sinowatz, 2005; He vd., 2009; Huleihel ve Lunenfeld, 2004; Kassab vd, 2007; Radhakrishnan vd., 1992; Tomsig ve Turner, 2006; Yan vd., 1998).

Transmembran bir glikoprotein olan EGFR, ligand bağlanması ardından aktive ettiği sinyal yolları aracılığıyla hücrel iletişim, proliferasyon, farklılaşma, göç ve membran trafiği gibi çok sayıda biyolojik süreci düzenler (Ceresa ve Peterson, 2014; Hynes ve Lane, 2005; Yarden ve Sliwkowski, 2001). Çalışmamızda EGFR ekspresyonunun esas olarak somatik hücrelerle sınırlı olduğu belirlenmiş; Sertoli hücrelerinde güçlü, peritubular miyoid ve damar düz kas hücrelerinde orta, Leydig hücrelerinde ise zayıf-orta düzeyde pozitiflik gözlenmiştir. Eşey hücrelerinde ekspresyon saptanmamıştır. Dönemsel karşılaştırma analizinde testis dokusunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p = 0,805$). Özellikle neonatal dönemden itibaren tüm postnatal evrelerde peritubular miyoid hücrelerde izlenen EGFR pozitifliği, bu hücrelerin yalnızca yapısal destek sağlayan kontraktıl hücreler olmadığını, erken gelişim evrelerinden itibaren EGFR aracılı sinyal yolları üzerinden testiküler çevrenin homeostazı ile parakrin etkileşimlerin düzenlenmesine katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir. He vd. (2009) alpakada, Pan vd. (2014) ise Tibet sığır testisinde peritubular miyoid hücrelerde EGF/EGFR pozitifliğini yalnızca postpubertal dönemde bildirmiştir. Bu bulgular, bazı türlerde EGF/EGFR sisteminin puberte sonrası aktive olduğunu göstermektedir.

Farklı türlerde yapılan çalışmalar, EGFR'nin testiste hücre tipi ve gelişim dönemine özgü dağılımlar sergilediğini göstermektedir. Caussanel vd. (1996) domuz testisinde EGFR'nin hem somatik hem de eşey hücrelerinde bulunduğunu; somatik hücrelerde (Leydig ve Sertoli) immunreaktivitenin daha zayıf, buna karşın eşey hücrelerinde seminifer epitel döngüsüne bağlı olarak daha yoğun olduğunu bildirmiştir. Özellikle pakiten spermatositler, sekonder spermatositler ve evre IV'teki spermatidler belirgin pozitiflik göstermiş; elongasyon aşamasındaki spermatidler ile olgun spermatozoonlarda boyanma yoğunluğunun arttığı belirtilmiştir. Araştırmacılar, EGFR'nin bu çok yönlü dağılımının testiküler gelişim sürecinde farklı hücrelerin EGF ve TGF- α aracılı sinyallere potansiyel hedef oluşturduğunu; ayrıca reseptörün mayoz ve spermiyogenez sırasında lokal düzenleyici bir işlev üstlenebileceğini ileri sürmüşlerdir.

Kassab vd. (2007) boğa testisinde EGFR ekspresyonunun esas olarak eşey

hücrelerinde yoğunlaştığını, somatik hücrelerde ise belirgin bir boyanma olmadığını rapor etmiş; özellikle evre I, II ve V-VII’de tip A spermatogonyumlar, spermatositler ve yuvarlak spermatidlerde güçlü pozitiflik bildirmiştir. Köpek testisinde Tamada vd. (2016) EGFR’nin mRNA düzeyinde eksprese edildiğini, protein düzeyinde ise özellikle Leydig hücrelerinde güçlü, seminifer epitel ve Sertoli hücrelerinde zayıf immunreaktivite bulunduğunu belirtmişlerdir. Bu yönüyle çalışmamızda Sertoli hücrelerinde saptanan güçlü pozitiflik, Tamada vd. (2016)’nın bildirdiği zayıf ekspresyonla farklılık göstermektedir. He vd. (2009) alpaka testisinde prepubertal (12 ay) dönemde EGFR’nin yalnızca Leydig hücrelerinde bulunduğunu; postpubertal (24 ay) dönemde ise Leydig, peritubular miyoid ve Sertoli hücrelerinin yanı sıra bazal kompartmandaki spermatogonyumlarda güçlü, adluminal bölgede yer alan eşey hücrelerinde ise zayıf pozitiflik tespit ettiklerini bildirmiştir. Bu sonuçlar, EGFR’nin puberteyle birlikte seminifer epitelin farklı hücrelerinde etkin hale geldiğini göstermektedir. Pan vd. (2014) Tibet sığırında puberte öncesinde EGFR ekspresyonunun sınırlı olduğunu, postpubertal dönemde belirgin şekilde arttığını; Leydig, Sertoli, peritubular miyoid ve bazı eşey hücrelerinde ekspresyon bulunduğunu ve boyanmanın özellikle bazal bölgede yoğunlaştığını vurgulamışlardır. Benzer şekilde, Radhakrishnan ve Suarez-Quian (1992) maymun testisinde Leydig, Sertoli ve peritubular hücrelerde EGFR immunpozitifliği bildirmiştir.

EGFR yalnızca EGF tarafından değil, aynı zamanda TGF- α , AREG ve HB-EGF gibi farklı ligandlar tarafından da aktive edilir (Miyamoto vd., 2006; Wee ve Wang, 2017; Yarden ve Sliwkowski, 2001). Bu durum, testisteki sinyal ağlarının çeşitliliğini ve EGFR aracılı mekanizmaların çok yönlülüğünü ortaya koymaktadır. Bulgularımız, EGFR’nin hem yapısal hem de kontraktıl hücrelerde eksprese edilmesinin testiküler mikroçevrenin organizasyonunda çok yönlü bir rol üstlenebileceğini göstermektedir. Sertoli hücrelerinde gözlenen güçlü EGFR pozitifliği, Tamada vd. (2016)’nın bildirdiği zayıf ekspresyonla farklılık göstermektedir. Ayrıca fare testisinde de Sertoli hücrelerinde EGFR immunpozitifliği rapor edilmiştir (Suárez-Quian ve Niklinski, 1990). Sertoli hücre çekirdeklerinde izlenen immunreaktivitenin, kullandığımız sitoplazmik epitopa özgül primer nedeniyle doğrudan EGFR varlığından ziyade, membran kaynaklı EGFR sinyalinin çekirdeğe taşınmasına bağlı bir boyanmayı yansıtır olabileceği düşünülmektedir. Nitekim EGFR aracılı MAPK, PI3K/Akt ve STAT yollarının çekirdeğe iletilerek gen ekspresyonunu düzenlediği ve hücre proliferasyonu, farklılaşması ile apoptoz gibi süreçleri kontrol ettiği bilinmektedir (Ceresa ve Peterson, 2014; Hynes ve Lane, 2005; Yarden ve Sliwkowski, 2001).

Sonuç olarak, bulgularımız EGFR'nin testiste hücre tipi ve gelişim dönemine özgü bir dağılım sergilediğini göstermektedir. Sertoli ve peritubular miyoid hücrelerdeki yoğun ekspresyon, bu reseptörün spermatogenezin sürdürülebilmesi için gerekli mikroçevrenin düzenlenmesinde rol alabileceğine işaret etmektedir. Leydig hücrelerinde gözlenen daha zayıf pozitiflik ise EGFR'nin steroidogenezdeki olası katkısının türler arasında farklılık gösterebileceğini düşündürmektedir. Nitekim insan testisinde de Leydig hücrelerinde EGFR ekspresyonu rapor edilmiştir (Nakazumi vd., 1996). Bu gözlemler, Leydig hücrelerindeki ekspresyonun türler arasında değişkenlik gösterebileceğini desteklemektedir. Eşey hücrelerinde ekspresyon saptanmamış olması ise, domuz (Caussanel vd., 1996), boğa (Kassab vd., 2007), alpaka (He vd., 2009) ve Tibet sığırı (Pan vd., 2014) gibi türlerde bildirilen bulgularla farklılık göstermektedir.

Epididimis dokusu açısından değerlendirildiğinde, çalışmamızda EGFR ekspresyonu bazal hücreler, şeffaf hücreler ve kanal çevresindeki düz kas tabakası ile sınırlı bulunmuştur. Segmentler ve gelişim dönemleri arasında gözlemsel bazı farklılıklar izlenmiş olmakla birlikte, bu değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). Bazal hücrelerde infantil dönemle başlayan pozitifliğin, özellikle korpus ve kauda segmentlerinde geç pubertal ve olgun dönemlerde daha belirgin hale geldiği görülmüştür. Kauda segmentinde şeffaf hücrelerde geç pubertal ve olgun evrelerde güçlü EGFR pozitifliği dikkati çekmiş; düz kas hücrelerinde ise tüm segmentlerde zayıf immunreaktivite izlenmiştir. Domuz epididimisinde EGFR'nin kolumnar ve bazal hücrelerde yaygın biçimde eksprese edildiği bildirilmiştir (Oliva-Hernandez ve Perez-Gutierrez, 2008). Radhakrishnan vd. (1992) primatlarda EGFR'nin yalnızca testiste değil, epididimis boyunca da dağıldığını belirtmiştir. Shum vd. (2009) ve Shum vd. (2011) ise C₃H farelerinde EGFR dağılımının segmentler arasında farklılık gösterdiğini ve hücre içi lokalizasyonunun değişkenlik sergilediğini ortaya koymuştur. Fare epididimisinde özellikle şeffaf hücrelerde yoğun EGFR immunreaktivitesi tespit edilmesi, kauda segmentinde gözlediğimiz güçlü pozitiflik ile uyumludur. Sonuç olarak, EGFR'nin rat epididimisinde hücre tipi ve segmente özgü bir dağılım gösterdiği görülmektedir. Bazal hücreler ile kauda segmentindeki şeffaf hücrelerde izlenen belirgin pozitiflik, bu hücrelerin epitel fonksiyonlarının düzenlenmesi ve epididimal mikroçevrenin şekillendirilmesinde EGFR aracılı sinyallere yanıt verebileceğini düşündürmektedir.

EGF ilk olarak erişkin fare submandibular bezinden izole edilmiş, 53 amino asit içeren ve yaklaşık 6 kDa moleküler ağırlığa sahip bir proteindir (Carpenter ve Cohen, 1990). Tsutsumi vd. (1986) submandibular bezin çıkarılmasıyla (sialoadenektomi) dolaşımdaki

EGF düzeylerinin azaldığını, bunun spermatogenezin mayotik fazını inhibe ettiğini ve dışarıdan EGF uygulanmasıyla bu etkinin ortadan kalktığını bildirmiştir. Bu bulgular, EGF'nin özellikle spermatogenezin mayotik evresinde düzenleyici bir rol üstlenebileceğine işaret etmektedir. Çalışmamızda testis dokusunda EGF ekspresyonunun postnatal gelişim boyunca yalnızca Leydig hücreleriyle sınırlı olduğu ve tüm dönemlerde güçlü düzeyde pozitiflik gösterdiği belirlenmiştir. Sertoli, peritubular miyoid, damar düz kas ve eşey hücrelerinde boyanma saptanmamıştır. Bu bulgu, EGF'nin testiste öncelikle steroidogenez ve Leydig hücresi fonksiyonlarıyla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Dönemler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmaması ($p=1,000$), EGF ekspresyonunun gelişimsel dalgalanmalardan bağımsız olarak benzer düzeylerde seyrettiğini göstermektedir. Eşey hücrelerinde ekspresyon izlenmemiş olmakla birlikte, EGF'nin spermatogenez üzerindeki etkilerinin sistemik kaynaklı ya da Leydig hücrelerinden salınan parakrin faktörler aracılığıyla, EGFR pozitif Sertoli hücreleri üzerinden dolaylı olarak gerçekleşebileceği düşünülmektedir.

Türler arası karşılaştırmalar, EGF'nin testisteki hücresel dağılımında belirgin farklılıklar olduğunu ortaya koymaktadır. Caussanel vd. (1996) domuz testisinde EGF'nin perinatal dönemde Sertoli hücrelerinde yoğun, Leydig hücrelerinde zayıf ve spermatogonyumlarda hafif düzeyde pozitiflik gösterdiğini; erişkin dönemde ise Sertoli hücrelerinde orta-güçlü, Leydig hücrelerinde zayıf ve spermatogonyumlarda zayıf immunreaktivitenin sürdüğünü, buna karşın spermatosit ve spermatidlerde anlamlı boyanma olmadığını bildirmiştir. Araştırmacılar, Sertoli hücrelerindeki yoğun pozitifliğin EGF'nin seminifer epitelde parakrin mekanizmalar aracılığıyla hücre proliferasyonu ve farklılaşmayı düzenleyebileceğine işaret ettiğini vurgulamıştır. Kassab vd. (2007) erişkin boğa testisinde EGF ekspresyonunun esas olarak eşey hücrelerine özgü olduğunu, somatik hücrelerde (Leydig, Sertoli ve miyofibroblastlar) belirgin immunreaktivite saptanmadığını bildirmiş; ayrıca, EGF pozitifliğinin seminifer epitel döngüsünün evrelerine göre değişkenlik gösterdiğini belirtmiştir. Buna göre, döngünün ilk yarısında (evre I–IV) tip A spermatogonyumların çekirdeklerinde orta düzeyde, adluminal bölgedeki yuvarlak spermatid çekirdeklerinde güçlü EGF pozitifliği izlenmiş; evre II–IV'te pozitiflik leptoten, zigoten ve pakiten evresindeki spermatositlerle sınırlı kalmış, döngünün ikinci yarısında (evre V–VIII) ise tip A spermatogonyumlar, pakiten spermatositler ve yuvarlak spermatidlerde devam etmiş; elongasyon aşamasındaki ve olgun spermatidlerde boyanma saptanmamıştır. Araştırmacılar, spermatogonyumlarda EGF lokalizasyonunun bu hücrelerin proliferasyonunun EGF aracılığıyla düzenlenebileceğini; in vitro ortamda EGF'nin

spermatogonyum mitozunu uyardığını gösteren Wahab-Wahlgren vd. (2003) bulgularının bu görüşü desteklediğini ifade etmiştir. EGF/EGFR sisteminin yalnızca mitotik değil, mayotik fazda da etkin olabileceği ve spermatogenez sürecinde potansiyel bir parakrin/otokrin düzenleyici olarak işlev görebileceği öne sürülmüştür. Benzer biçimde, Radhakrishnan vd. (1992) fare testisinde spermatosit ve spermatidlerde EGF pozitifliği bildirmiş; bu büyüme faktörünün testiste olası bir immun baskılayıcı işlev üstlenebileceğini ve özellikle kan-testis bariyerinin bozulduğu durumlarda lokal immun yanıtları şekillendirebileceğini ileri sürmüşlerdir. Buna karşılık Tamada vd. (2016) köpek testisinde EGF'nin ağırlıklı olarak Leydig hücrelerinde lokalize olduğunu, seminifer epitel ve Sertoli hücrelerinde ise immunreaktivitenin oldukça zayıf olduğunu bildirmiştir. Çalışmada ayrıca EGF'nin spermatogenezi doğrudan etkilemekten çok, Leydig hücreleri aracılığıyla testiküler mikroçevrenin düzenlenmesinde rol oynadığı vurgulanmıştır.

He vd. (2009) alpaka testisinde prepubertal dönemde (12 ay) EGF immunreaktivitesi saptamazken, postpubertal dönemde (24 ay) Leydig, Sertoli, peritubular miyoid ve eşey hücrelerinde pozitiflik bildirmiş; özellikle adluminal kompartmandaki eşey hücrelerinde güçlü, bazal kompartmandaki spermatogonyumlarda ise zayıf boyanma olduğunu belirtmiştir. Bu bulgular, puberte ile birlikte EGF'nin testiste lokal olarak eksprese edilmeye başladığını ve spermatogenez sürecinde doğrudan rol üstlenebileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, puberte öncesi dönemde lokal EGF ekspresyonunun saptanmamasının, bu molekülün işlevsiz olduğu anlamına gelmediği; sistemik kaynaklı EGF'nin testiste düzenleyici etkiler gösterebileceği ortaya konmuştur. Ayrıca EGF ailesine ait diğer ligandların da bu süreçte etkili olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır (Tsutsumi vd., 1986; Wong vd., 2000; Xian, 2007).

Çalışmamızda ise Sertoli ve eşey hücrelerinde pozitiflik izlenmemiştir; bu durum He vd. (2009) tarafından bildirilen postpubertal alpaka bulgularından farklılık göstermektedir. Pan vd. (2014) Tibet sığırında puberte öncesinde EGF'nin yalnızca Leydig hücrelerinde bulunduğunu; postpubertal dönemde ise Leydig hücreleri başta olmak üzere peritubular miyoid, Sertoli ve eşey hücrelerinde de pozitiflik saptandığını, ayrıca seminifer tubuluslarda EGF'nin adluminal bölgede yoğunlaştığını belirtmiştir. Zhang vd. (1997) fare testisinde EGF gen ekspresyonunun testiküler olgunlaşma ve Leydig hücre proliferasyonu ile paralellik gösterdiğini; Verhoeven ve Cailleau (1986) ise *in vitro* koşullarda EGF'nin Leydig hücrelerinde steroidogenezi uyardığını göstermiştir. Bu çalışmalar, EGF'nin testis dokusundaki hücresel lokalizasyonunun türler arasında değişkenlik gösterdiğini ortaya

koymaktadır. Literatürde bazı türlerde Sertoli ve eşey hücrelerinde pozitiflik bildirilmiş olsa da çalışmamızda bu hücrelerde ekspresyon saptanmamış; EGF'nin Leydig hücrelerine özgü bir dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Bu farklılık, türler arası biyolojik çeşitlilik ya da yöntemsel ayrımlardan kaynaklanabilir. Bulgularımız, köpek (Tamada vd., 2016) ve fare (Zhang vd., 1997) testislerinde bildirilen Leydig hücre odaklı ekspresyonla uyumludur; ayrıca insan testisinde EGF'nin esas olarak Leydig hücrelerinde lokalize olduğunu bildiren verilerle de örtüşmektedir (Nakazumi vd., 1996).

Genel olarak değerlendirildiğinde, çalışmamızda EGF'nin Leydig hücrelerinde güçlü ve süreklilik gösteren lokalizasyonu, bu büyüme faktörünün testiste steroidogenez odaklı parakrin ya da otokrin bir düzenleyici olarak rol alabileceğini düşündürmektedir. Sertoli ve eşey hücrelerinde ekspresyonun saptanmamış olması ise EGF'nin bu hücreler üzerindeki olası etkilerinin doğrudan değil, Leydig hücrelerinden salınan sinyaller aracılığıyla dolaylı şekilde gerçekleşebileceğine işaret etmektedir. Ayrıca EGF'nin kemirgen, domuz ve insan testislerinde Leydig hücrelerinde steroidogenezi uyarıcı etkisi in vitro olarak da gösterilmiştir (Sordoillet vd., 1991; Syed vd., 1991; Verhoeven ve Cailleau, 1986).

Epididimis açısından değerlendirildiğinde, Wistar albino ratlarda EGF ekspresyonunun postnatal gelişim boyunca segmental sınırlılık sergilediği görülmüştür. Neonatal ve infantil dönemlerde başlangıç segmenti, kaput, korpus ve kauda dahil tüm segmentlerde boyanma izlenmezken, geç pubertal ve olgun dönemlerde yalnızca kaput segmentindeki prinsipal, apikal ve bazal hücrelerde zayıf düzeyde pozitiflik ortaya çıkmıştır. Kaput segmentinde gerçekleştirilen dönemsel karşılaştırmalarda, geç pubertal ve olgun dönemlerdeki EGF ekspresyonunun neonatal ve infantil dönemlere göre anlamlı şekilde arttığı saptanmıştır ($p=0,043$). Ayrıca bu dönemlerde yapılan segment karşılaştırmalarında, kaput segmentinin diğer segmentlere kıyasla anlamlı derecede yüksek EGF pozitifliği gösterdiği ortaya konmuştur ($p=0,01$).

Domuz epididimisi üzerine yapılan bir çalışmada, EGF'nin prinsipal hücrelerin apikal sitoplazmasında yoğun şekilde lokalize olduğu, bazal hücrelerde ise boyanmanın saptanmadığı bildirilmiştir (Oliva-Hernandez ve Perez-Gutierrez, 2008). Ancak bu çalışmada segmentler düzeyinde bir değerlendirme yapılmamıştır. Kaput segmenti, iyon taşınımı, protein sekresyonu ve epididimal epitelde gerçekleşen parakrin etkileşimler yoluyla spermatozoonların fonksiyonel olgunlaşmasını destekleyen bir mikroçevre oluşturur (Breton vd., 2019; Shum vd., 2008). Çalışmamızda bu segmentte düşük düzeyde saptanan EGF

pozitifliği ise epididimal mikroçevrenin düzenlenmesine sınırlı bir katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir.

AREG, EGF ailesine ait bir ligand olup EGFR'yi aktive ederek MAPK ve PI3K/Akt yollarını uyarmaktadır (Hynes ve Lane, 2005; Wee ve Wang, 2017). Çalışmamızda AREG ekspresyonunun testis dokusunda yalnızca Leydig hücreleriyle sınırlı olduğu ve tüm postnatal gelişim evrelerinde güçlü düzeyde pozitiflik gösterdiği belirlenmiştir. Damar duvarındaki düz kas hücrelerinde zayıf düzeyde boyanma izlenmiş olup, bu bulgu AREG'in vasküler mikroçevrede olası parakrin etkilerine işaret etmektedir. Sertoli hücreleri, peritubular miyoid hücreler ve eşey hücrelerinde (spermatogonyum, spermatosit, spermatid) ise ekspresyon saptanmamıştır. Testiste AREG ekspresyonunun dönemsel olarak anlamlı bir değişiklik göstermemesi ($p=1,000$), bu ligandın gelişim süreci boyunca dalgalanmalar göstermediğini düşündürmektedir. Leydig hücrelerinde gözlenen güçlü pozitiflik, AREG'in testiküler mikroçevrede Leydig hücre işlevleriyle ilişkili olabilecek süreçlerde yer alabileceğine işaret etmektedir. Literatürde AREG'in testis fizyolojisindeki rolüne ilişkin verilerin sınırlı olması, elde ettiğimiz bulguların mevcut bilgi birikimine özgün katkılar sağladığını göstermektedir.

Epididimis dokusunda AREG ekspresyonunun segment ve hücre tipine özgü bir dağılım sergilediği belirlenmiştir. Neonatal ve infantil dönemlerde epitel hücrelerinde pozitiflik izlenmezken, kanal duvarındaki düz kas tabakasında zayıf boyanma saptanmıştır. Geç pubertal ve olgun dönemlerde ise ekspresyonda belirgin bir artış gözlenmiş; başlangıç segmenti ve kaput bazal hücrelerinde orta, korpus ve kauda bazal hücrelerinde ise güçlü pozitiflik ortaya çıkmıştır. Ayrıca kauda şeffaf hücrelerinde güçlü ekspresyon dikkati çekmiştir. Bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Bazal ve şeffaf hücrelerde yoğunlaşan ekspresyon, AREG'in epididimal mikroçevrenin düzenlenmesine yönelik hücreler arası iletişim süreçlerinde yer alabileceğine işaret etmektedir. Düz kas tabakasında tüm dönemlerde gözlenen zayıf fakat devamlı pozitiflik ise, bu büyüme faktörünün epididimal kontraktilite ve sperm taşınımına dolaylı katkı sağlayabileceği olasılığını düşündürmektedir. Sonuç olarak, AREG'in epididimis dokusunda gelişimsel dönem, segment ve hücre tipine özgü bir ekspresyon paterni sergilediği; özellikle postpubertal dönemde bazal ve şeffaf hücrelerde gözlenen belirgin pozitifliğin, bu büyüme faktörünün epididimal fonksiyonların düzenlenmesinde olası bir role sahip olabileceğine işaret ettiği görülmüştür.

TGF α , EGF ile aynı reseptörü (EGFR) aktive etmesine rağmen biyolojik etkileri ve dokuya özgü dağılımı bakımından farklılık gösteren bir EGF ailesi üyesidir (Derynck, 1988; Josso, 1990). Çalışmamızda TGF- α ekspresyonu, Leydig hücrelerinde neonatal dönemden itibaren giderek artmış ve özellikle geç pubertal ile olgun dönemlerde belirginleşmiştir. Geç pubertal dönemde evre I–VIII'deki erken (1-8. adım) ve geç (15-19. adım) spermatidlerde zayıf; evre IX–XIV'teki orta (9-14. adım) spermatidlerde ise orta düzeyde pozitiflik izlenmiştir. Olgun dönemde evre I–VIII'deki erken ve geç spermatidlerde orta, evre IX–XIV'teki orta spermatidlerde ise güçlü düzeyde pozitiflik saptanmıştır. Sertoli hücrelerinde herhangi bir boyanma izlenmemiştir. Bu bulgular, TGF- α ekspresyonunun spermatogenik siklus evreleri ve spermatid farklılaşma adımlarıyla ilişkili belirgin bir hücresel dağılım gösterdiğine işaret etmektedir. Bununla birlikte semikantitatif skorların dönemsel karşılaştırmasında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p=0,863$).

Eşey hücrelerinde EGFR pozitifliği saptanmamış olmakla birlikte, Leydig hücrelerindeki TGF- α ve zayıf EGFR ekspresyonu, bu ligandın testiste esas olarak parakrin mekanizmalarla işlev görebileceğini düşündürmektedir. Geç pubertal ve olgun dönemlerde spermatidlerde tespit edilen TGF- α pozitifliği ise, spermatidlerin bu molekül için potansiyel bir kaynak olabileceğine işaret etmektedir. Bu TGF- α 'nın, EGFR-pozitif Sertoli, peritubular miyoid ve damar düz kas hücreleri üzerinde parakrin etki göstererek seminifer epitelin yapısal bütünlüğü ile eşey hücre farklılaşmasının düzenlenmesinde rol oynayabileceği değerlendirilmektedir. Bu sonuçlarla, TGF- α 'nın yalnızca steroidogeneizde değil, aynı zamanda spermatid maturasyonu ve spermatogenik siklusun düzenlenmesinde de rol oynayabileceği öne sürülebilir.

Önceki çalışmalar, TGF- α 'nın türler ve gelişim evreleri arasında farklılıklar sergilediğini ortaya koymuştur. Caussanel vd. (1996) domuz testisinde TGF- α 'nın perinatal dönemde fetal Leydig hücrelerinde yoğun, erişkin dönemde ise Sertoli hücrelerinde belirgin immunreaktivite gösterdiğini; buna karşılık eşey hücrelerinde boyanma saptanmadığını bildirmiştir. Bulgularımız, Leydig hücrelerindeki ekspresyon açısından Caussanel vd. (1996) ile uyumlu olmakla birlikte Sertoli hücrelerinde pozitiflik gözlenmemesi ve spermatidlerde belirgin TGF- α ekspresyonu izlenmesi bakımından söz konusu çalışmadan ayrılmaktadır. Tamada vd. (2016) köpek testisinde TGF- α 'nın mRNA düzeyinde eksprese olduğunu, protein düzeyinde ise özellikle Leydig hücrelerinde yoğunlaştığını; seminifer epitelde ve Sertoli hücrelerinde zayıf immunreaktivite saptandığını ve boyanmanın spermatogenez

evrelerine özgü bir dağılım göstermediğini bildirmiştir. Petersen vd. (2001) ise in vitro koşullarda TGF- α 'nın Sertoli hücrelerinde proliferatif etki oluşturduğunu göstermiştir. Bu nedenle çalışmamızda Sertoli hücrelerinde ekspresyon saptanmamış olsa da bu hücrelerin TGF- α 'ya reseptör aracılı ya da dolaylı parakrin mekanizmalar üzerinden yanıt verebilme olasılığı göz ardı edilmemelidir.

Epididimis dokusunda TGF- α ekspresyonu belirgin bir segmental ve dönemsel sınırlılık sergilemiştir. Neonatal ve infantil dönemlerde tüm segmentlerde epitel hücreleri ile kanal duvarındaki düz kas tabakası negatif bulunmuş; geç pubertal ve olgun dönemlerde ise yalnızca kaput segmenti epitelinde orta düzeyde pozitiflik saptanmıştır. Epididimiste TGF- α 'ya ilişkin bilgiler sınırlı olmakla birlikte, Oliva-Hernandez ve Perez-Gutierrez (2008) domuz epididimisinde prinsipal ve bazal hücrelerde TGF- α pozitifliği bildirmiş ve aynı hücrelerde EGFR varlığını göstererek intrakrin/otokrin iletişim mekanizmalarının mümkün olabileceğini ileri sürmüştür. Çalışmamızda kaput segmentindeki TGF- α pozitifliği ile aynı bölgede bazal hücrelerde gözlenen EGFR pozitifliğinin örtüşmesi, bu segmentte TGF- α -EGFR ilişkisine dayalı lokal parakrin süreçlerin olasılığını desteklemektedir. Genel olarak değerlendirildiğinde, TGF- α ekspresyonunun yalnızca kaput segmentinde ve gelişimin geç pubertal-olgun dönemlerinde anlamlı düzeyde artış göstermesi ($p=0,043$), bu büyüme faktörünün epididimal mikroçevrenin bölgesel düzenlenmesinde döneme özgü bir rol üstlenebileceğini desteklemektedir. Literatürdeki sınırlı verilerle birlikte değerlendirildiğinde, bu bulgular TGF- α 'nın epididimal gelişim ve spermatozoonların fonksiyonel olgunlaşmasındaki potansiyel rollerine yönelik anlamlı katkılar sunmaktadır.

Çalışmamızın bir diğer önemli boyutunu, steroid hormon sentezindeki rolleri nedeniyle testisin gelişim ve fonksiyonlarının merkezinde yer alan Leydig hücreleri oluşturmaktadır. Bu nedenle hem embriyolojik kökenleri hem de erişkin döneme kadar geçirdikleri farklılaşma süreçleri, testis biyolojisinin anlaşılması açısından önem taşımaktadır (Haider, 2004; Skakkebaek vd., 2016). Doğum sonrası FLC'lerin tamamen ortadan kalkıp kalkmadığı tartışmalıdır. Bazı araştırmalar, erişkin testiste düşük sayıda FLC'nin varlığını sürdürebildiğini, ancak steroidogeneze anlamlı katkı sağlamadığını bildirmektedir (Barsoum vd., 2013; Habert vd., 2001; Shima ve Morohashi, 2017; Zirkin ve Papadopoulos, 2018). Sprague-Dawley ratlarda FLC'lerin 90. güne kadar korunduğu ve dejenerasyona uğramadığı rapor edilmiştir (Ariyaratne ve Mendis-Handagama, 2000; Kerr ve Knell, 1988). Wistar Albino ratlarda yaptığımız çalışmada FLC'ler neonatal dönemde belirgin, infantil ve geç pubertal dönemlerde azalmıştır. Olgun dönemde ise yalnızca ALC'den oluşan bir

populasyon gözlenmiş, FLC morfolojisine sahip hücrelere rastlanmamıştır. Bu durum, Wistar soyundaki FLC'lerin Sprague-Dawley soyuna kıyasla daha erken kaybolduğunu ve soylar arasındaki biyolojik farklılıkların belirleyici olabileceğini düşündürmektedir.

Fonksiyonel açıdan değerlendirildiğinde, çalışmamızda hem FLC hem de ALC benzeri hücrelerde CYP11A1 pozitifliği saptanmıştır. Kolesterolün pregnenolona dönüşümünü katalizleyen ilk basamak enzim olan CYP11A1'in varlığı, bu hücrelerin steroidogenik kapasiteye sahip olduğunu göstermektedir (Culty vd., 2015; Shih vd., 2011). Neonatal ve infantil dönemlerde hem FLC hem de ALC benzeri hücrelerde saptanan CYP11A1 pozitifliği, bu dönemlerde farklı iki steroidogenik populasyonun eşzamanlı olarak varlık gösterdiğini düşündürmektedir. Bu bulgular, Ariyaratne ve Mendis-Handagama (2000)'nın postnatal 1-7. günlerde FLC'lerin tek steroidogenik populasyon olduğunu bildiren verileriyle tam olarak örtüşmemektedir; çünkü çalışmamızda aynı dönemlerde ALC benzeri hücrelerde de CYP11A1 pozitifliği gözlenmiştir. Ayrıca bazı çalışmalarda ALC populasyonunun doğum sonrası yaklaşık 10. günden itibaren belirginleştiği bildirilmektedir (Mendis-Handagama vd., 1987; Mendis-Handagama vd., 1998). Buna karşın verilerimiz, öncül ALC gelişiminin daha erken, hatta neonatal dönemde başlayabileceğine işaret etmektedir.

Son yıllarda elde edilen bulgular, FLC-ALC ilişkilerinin sanılandan daha karmaşık olduğunu ve Leydig hücre gelişiminin çoklu progenitor kaynakları içerebileceğini göstermektedir (Barsoum vd., 2013; Kumar ve DeFalco, 2018). FLC'lerin yalnızca tek bir hücre hattından değil; sölomik epitel, nöral krest hücreleri, Notch sinyal yolunun aktif olduğu Nestin-pozitif perivasküler hücreler ve steroidogenik faktör 1 (SF1) pozitif progenitörlerden köken alabileceği bildirilmiştir (Bhattacharya ve Dey, 2023; Kumar ve DeFalco, 2018). FLC populasyonunun postnatal dönemde hızla azalmasına rağmen, erişkin testiste küçük bir subpopulasyonun (%5-20) varlığını sürdürerek ALC gelişimi için potansiyel progenitor kaynağı oluşturabileceği öne sürülmektedir (Bhattacharya ve Dey, 2023; Shima ve Morohashi, 2017). Çalışmamızda postnatal 20 ve 50. günlerde FLC ve ALC'lerde gözlenen CYP11A1 pozitifliği bu görüşle uyumlu olmakla birlikte, bu bulgunun hücresel köken ilişkilerine doğrudan kanıt oluşturmadığı göz önünde bulundurulmalıdır.

Farklı türlerde yapılan araştırmalar da bu çeşitliliği doğrulamaktadır. Örneğin farelerde FLC sayısının postnatal 7. günden itibaren hızla azaldığı bildirilmiştir (Hazra vd., 2013; Wen vd., 2016). Ayrıca FLC'lerin tür ve soy özelliklerine bağlı olarak postnatal

dönemde daha uzun süre kalabildiği de rapor edilmiştir (Habert vd., 2001; Haider, 2004). Wistar ratlarda elde ettiğimiz bulgular, FLC'lerin geç pubertal döneme kadar izlenebildiğini, olgun dönemde ise ortadan kalktığını göstermektedir. Her ne kadar bazı çalışmalarda erişkin testiste küçük bir FLC subpopulasyonunun varlığını sürdürebildiği bildirilmiş olsa da (Bhattacharya ve Dey, 2023; Shima ve Morohashi, 2017), verilerimiz bu durumu desteklememektedir. Bununla birlikte bulgularımız, FLC'lerin dejenerasyona uğramak yerine kısmen ALC populasyonuna farklılaşarak katkıda bulunabileceği yönündeki hipotezle (Kumar ve DeFalco, 2018; Shima ve Morohashi, 2017) uyumlu görünmektedir. Sonuç olarak, çalışmamız Wistar albino ratlarda FLC'lerin puberte dönemine kadar varlığını sürdürdüğünü, bu dönemden sonrasında ise FLC morfolojisine sahip hücrelerin ortadan kalktığını göstermektedir. Ayrıca bulgularımız, ALC gelişiminin daha erken başlayabileceğini ve bu sürecin tür ve soy farklılıklarına bağlı olarak değişebileceğini desteklemektedir.

Epididimis dokusunun postnatal morfolojik olgunlaşması, erkek üreme fonksiyonlarının sürdürülmesi açısından önemlidir. Epididimis, memelilerde üreme stratejilerindeki çeşitliliğe uyum sağlayacak biçimde yapısal ve fonksiyonel olarak özelleşmiş bir organdır (Sullivan vd., 2019). Epididimal segmentlerin gelişiminde meydana gelen bozuklukların infertiliteyle sonuçlanabileceği bildirilmiştir (Kierszenbaum, 2006). Bu gelişim süreci postnatal dönemde üç evrede incelenmektedir: farklılaşmamış dönem (1–15. gün), farklılaşma dönemi (16–44. gün) ve olgunlaşma dönemi (44. günden yetişkinliğe kadar) (Breton vd., 2016; Cornwall, 2009; Meng vd., 2020; Murashima vd., 2015; Picut ve Remick, 2017; Robaire ve Hinton, 2015; Shum vd., 2013). Farklılaşmamış dönemde epitel hücreleri henüz belirgin bir morfolojik ayrışma göstermemekte, tubulus çapları özellikle kaput bölgesinde daha geniş izlenmektedir. Farklılaşma döneminde epitel tabakasında prinsipal, kalem, apikal, bazal, şeffaf ve halo hücrelerine özgü morfolojik özellikler ayırt edilmektedir (Picut ve Remick, 2017). Olgunlaşma döneminde tubuluslar hacim kazanmakta, lümenleri spermatozoalarla dolmakta ve epitel yüksekliği segmentler arasında farklılık göstermektedir (Picut vd., 2018; Prevot, 2015). Çalışmamızda gözlenen yapısal özellikler, postnatal gelişim evrelerini tanımlayan bu morfolojik kriterlerle büyük ölçüde uyumludur.

Segmental morfolojik olgunlaşmanın yanı sıra, özellikle şeffaf ve apikal hücrelerin türler arası dağılım özellikleri de dikkat çekicidir. Şeffaf hücrelerin segmental dağılımı ve morfolojik özellikleri türler arasında farklılıklar göstermektedir. Domuz ve yarasa

epididimisinde şeffaf hücreler çanak biçimli iken, farede kaput ve korpus segmentlerinde çanak, kauda bölgesinde ise kübik morfoloji bildirilmiştir (Castro vd., 2017; Park vd., 2020; Shum vd., 2009, 2011). Domuzda bu hücrelerin yalnızca kaput segmentiyle sınırlı olduğu, yarasada ise tüm segmentlerde dağıldığı rapor edilmiştir (Castro vd., 2017; Park vd., 2020). Çalışmamızda şeffaf hücreler yalnızca kauda segmentinde, küboidal morfolojiye benzer bir görünümde saptanmıştır. Bu durum, diğer türlerde bildirilen segmental dağılım paternlerinden farklılık göstermektedir. Ayrıca çalışmamızda apikal hücreler, başlangıç segmenti, kaput, korpus ve infantil dönemde kauda bölgelerinde belirlenmiştir. Bu bulgu, Zhou vd. (2018)'nin apikal hücrelerin esas olarak başlangıç segmentinde yoğunlaştığını bildiren sonuçlarından farklılık göstermektedir. Çalışmamızda gözlenen segmental ve hücrel farklılıklar, epididimis gelişiminde hem dönemsel değişimlerin hem de türler arası farklılıkların belirleyici olduğunu göstermektedir.

Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, testis ve epididimis dokularında EGF ailesi büyüme faktörleri ile reseptörü EGFR'nin postnatal döneme, hücre tipi ve segmente özgü bir dağılım sergilediği görülmüştür. Bu dağılım, EGF ailesi üyelerinin özellikle testiste steroidogenez ve spermatogenez, epididimiste ise mikroçevresel düzenleme ve segmental fonksiyonlarla ilişkili olabileceğini göstermektedir. Ayrıca FLC–ALC farklılaşması ile epididimisin segmental morfolojik olgunlaşmasına ilişkin verilerimiz, tür ve soy farklılıklarına bağlı gelişimsel çeşitliliği vurgulamakta ve mevcut literatüre özgün katkılar sunmaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, Wistar albino ratların testis ve epididimis dokularında EGF ailesi üyeleri (EGF, TGF- α , AREG) ile reseptörü EGFR'nin postnatal gelişim süreci boyunca hücre tipi ve segmentlere özgü ekspresyon paternleri sergilediğini ortaya koymuştur. Elde edilen bulgular, bu moleküllerin erkek üreme sisteminin gelişimsel süreçlerinde hücreler arası etkileşimlerin düzenlenmesinde rol alabileceğini göstermektedir.

Testiste EGFR'nin özellikle Sertoli, peritubular miyoid ve damar düz kas hücrelerinde eksprese edilmesi, bu reseptörün spermatogenezi destekleyen somatik mikroçevrede rol oynayabileceğini düşündürmektedir. EGF'in yalnızca Leydig hücrelerinde tespit edilmesi, bu ligandın steroidogeneizde otokrin veya parakrin düzeyde etkili olabileceğini desteklemektedir. AREG'in Leydig hücrelerinde güçlü, damar düz kas hücrelerinde ise zayıf düzeyde ekspresyonu hem steroidogeneiz hem de testisin vasküler mikroortamı üzerinde etkili olabileceğine işaret etmektedir. TGF- α 'nın Leydig hücrelerinde giderek artan ekspresyonu, steroidogeneizle ilişkili olabileceğini; spermatidlerde evreye bağlı pozitifliği ise, bu faktörün spermatid maturasyonu ile ilişkili süreçlerde görev alabileceğini göstermektedir.

Epididimiste EGFR ekspresyonu bazal ve şeffaf hücrelerde dönemsel artış göstermiş, özellikle kauda segmentindeki şeffaf hücrelerde belirgin pozitiflik saptanmıştır. EGF ekspresyonunun düşük düzeyde ve kaput segmentiyle sınırlı olması, bu faktörün epididimal mikroçevrenin belirli aşamalarında sınırlı bir düzenleyici rol üstlenebileceğini göstermektedir. TGF- α 'nın yine kaput segmentinde orta düzeyde pozitiflik sergilemesi, bu bölgeye özgü lokal etkileşimlerin varlığına işaret etmektedir. AREG'in geç pubertal ve olgun dönemlerde epididimal bazal ve şeffaf hücrelerde güçlü ekspresyonu ise, bu ligandın epididimal fonksiyonların düzenlenmesinde önemli bir role sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, EGF ailesi ligandları ve EGFR'nin testis ve epididimis dokularında hücre tipi, segment ve gelişim dönemine bağlı olarak değişken ekspresyon paternleri sergilediği belirlenmiştir. Bulgular, bu moleküllerin otokrin ve/veya parakrin etkileşimlerle ilişkili olabileceğini destekleyici niteliktedir. Özellikle Leydig hücrelerinde tespit edilen güçlü EGF ve AREG pozitifliği, bu faktörlerin steroidogeneizdeki

düzenleyici rollerini vurgulamaktadır. Epididimiste AREG'in bazal ve şeffaf hücrelerdeki belirgin ekspresyonu ise spermatozoa olgunlaşması ve epididimal mikroçevrenin dinamik düzenlenmesi süreçlerinde olası katkılarına işaret etmektedir.

Bu çalışma, testis ve özellikle epididimis dokusunda EGF ailesi büyüme faktörlerinin hücresel ve segmental dağılımına ilişkin literatüre katkı sağlayabilecek nitelikte veriler sunmaktadır. Elde edilen bulgular, erkek infertilitesinin moleküler temellerinin anlaşılmasına yönelik gelecek araştırmalar için yararlı bir referans niteliğindedir. Farklı türlerde ve deneysel modeller üzerinde yürütülecek karşılaştırmalı çalışmaların, EGF ailesine ait büyüme faktörlerinin fizyolojik ve patolojik koşullardaki rollerini daha kapsamlı biçimde ortaya koyacağı öngörülmektedir.



KAYNAKLAR

- Abd-Elmaksoud, A. and Sinowatz, F. (2005). Expression and localization of growth factors and their receptors in the mammalian testis. *Anatomia Histologia Embryologia*, 34(5), 319–334.
- Abe, K., Takano, H. & Ito, T. (1984). Interruption of the luminal flow in the epididymal duct of the corpus epididymidis in the mouse, with special reference to differentiation of the epididymal epithelium. *Archives of Histology and Cytology*, 47(2), 137–147.
- Adamali, H. I. and Hermo, L. (1996). Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis. *Journal of Andrology*, 17(3), 208–222.
- Ademi, H., Djari, C., Mayère, C., Neirijnck, Y., Sararols, P., Rands, C. M., Stévant, I., Conne, B. & Nef, S. (2022). Deciphering the origins and fates of steroidogenic lineages in the mouse testis. *Cell Reports*, 39(11), 110935.
- Agrawal, R., Wessely, O., Anand, A., Singh, L. & Aggarwal, R. K. (2009). Male-specific expression of Sox9 during gonad development of crocodile and mouse is mediated by alternative splicing of its proline-glutamine-alanine rich domain. *FEBS Journal*, 276(15), 4184–4196. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07127.x>
- Akbarsha, M. A., Kunnathodi, F. & Radha, A. (2015). The epididymis: Structure and function. In: S. K. Singh (Ed.), *Mammalian endocrinology and male reproductive biology* (pp.115–166). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Al-Agha, O. M. and Axiotis, C. A. (2007). An in-depth look at Leydig cell tumor of the testis. *Archives of Pathology Laboratory Medicine*, 131(2), 311–317.
- Anni, N., Motoki, S., Teguh, B., Toshio, T., Masatsugu, S. & Nobuo, K. (2019). An immunohistochemical study on testicular steroidogenesis in the Sunda porcupine (*Hystrix javanica*). *Journal of Veterinary Medicine Science*, 81(9), 1285–1290. <https://doi.org/10.1292/jvms.19-0167>
- Ariyaratne, H. B. S. and Mendis-Handagama, S. M. L. C. (2000). Changes in the testis interstitium of Sprague Dawley rats from birth to sexual maturity. *Biology of Reproduction*, 62(3), 680–690.
- Arrighi, S. (2014). Are the basal cells of the mammalian epididymis still an enigma? *Reproduction Fertility and Development*, 26(7), 1061–1071.
- Avellar, M. C. W., Ribeiro, C. M., Dias da Silva, M. R. & Silva, E. J. R. (2019). In search of new paradigms for epididymal health and disease: Innate immunity, inflammatory mediators, and steroid hormones. *Andrology*, 7, 690–702. <https://doi.org/10.1111/andr.12654>
- Axnér, E. (2006). Sperm maturation in the domestic cat. *Theriogenology*, 66(1), 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.03.022>
- Bancroft, J. D. and Gamble, M. (2002). *Theory and practice of histological techniques* (5th ed.). Churchill Livingstone.

- Barsoum, I. B., Kaur, J., Ge, R. S., Cooke, P. S. & Yao, H. H. C. (2013). Dynamic changes in fetal Leydig cell populations influence adult Leydig cell populations in mice. *The FASEB Journal*, 27(7), 2657–2666.
- Bartles, J. R., Wierda, A. & Zheng, L. (1996). Identification and characterization of espin, an actin binding protein localized to the F-actin-rich junctional plaques of Sertoli cell ectoplasmic specializations. *Journal of Cell Science*, 109(Pt 6), 1229–39. <https://doi.org/10.1242/jcs.109.6.1229>
- Battistone, M. A., Elizagaray, M. L., Barrachina, F., Ottino, K., Mendelsohn, A. C. & Breton, S. (2024). Immunoregulatory mechanisms between epithelial clear cells and mononuclear phagocytes in the epididymis. *Andrology*, 12, 949–963. <https://doi.org/10.1111/andr.13509>
- Battistone, M. A., Mendelsohn, A. C., Spallanzani, R. G., Brown, D., Nair, A.V. & Breton, S. (2020). Region-specific transcriptomic and functional signatures of mononuclear phagocytes in the epididymis. *Molecular Human Reproduction*, 26(1), 14–29. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaz059>
- Battistone, M. A., Merkulova, M., Park, Y. J., Peralta, M. A., Gombar, F., Brown, D. & Breton, S. (2019a). Unravelling purinergic regulation in the epididymis: Activation of V-ATPase-dependent acidification by luminal ATP and adenosine. *Journal of Physiology*, 597(7), 1957–1973. <https://doi.org/10.1113/jp277565>
- Battistone, M. A., Spallanzani, R. G., Mendelsohn, A. C., Capen, D., Nair, A.V., Brown, D. & Breton, S. (2019b). Novel role of proton-secreting epithelial cells in sperm maturation and mucosal immunity. *Journal of Cell Science*, 133, 5. <https://doi.org/10.1242/jcs.233239>
- Bedford, J. M. (2015). Human spermatozoa and temperature: The elephant in the room. *Biology of Reproduction*, 93(4), 97.
- Belleannee, C., Da Silva, N., Shum, W.W., Brown, D. & Breton, S. (2010). Role of purinergic signaling pathways in V-ATPase recruitment to apical membrane of acidifying epididymal clear cells. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 298, 817–830. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00460.2009>
- Belleannée, C., Thimon, V. & Sullivan, R. (2012). Region-specific gene expression in the epididymis. *Cell Tissue Research*, 349, 717–731. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1381-0>
- Berasain, C. and Avila, M. A. (2014). Amphiregulin. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 28, 31–41.
- Bernal, A., Torres, J., Reyes, A. & Rosado, A. (1980). Presence and regional distribution of sialyl transferase in the epididymis of the rat. *Biology of Reproduction*, 23(2), 290–293.
- Bhattacharya, I. and Dey S. (2023). Emerging concepts on Leydig cell development in fetal and adult testis. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 1086276. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1086276>
- Biason-Lauber, A. (2016). The Battle of the Sexes: Human Sex Development and Its Disorders. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 58, 337–382.
- Björkgren, I. and Sipilä, P. (2019). The impact of epididymal proteins on sperm function.

Reproduction, 158(5), 155-167. <https://doi.org/10.1530/rep-18-0589>

Bloom, W. and Fawcett, D. W. (1994). *A textbook of histology (12th ed.)*. New York, Chapman & Hall.

Boonstra, J., Rijken, P., Humbel, B., Cremers, F., Verkleij, A. & van Bergen en Henegouwen, P. (1995). The epidermal growth factor. *Cancer Treatment Reviews*, 19(5), 413–430.

Breton, S. and Brown, D. (2013). Regulation of luminal acidification by the V-ATPase. *Physiology (Bethesda)*, 28(5), 318–329.

Breton, S., Nair, A. V. & Battistone, M. A. (2019). Epithelial dynamics in the epididymis: Role in the maturation, protection, and storage of spermatozoa. *Andrology*, 7(6), 631–643. <https://doi.org/10.1111/andr.12632>

Breton, S., Ruan, Y. C., Park, Y.-J. & Kim, B. (2016). Regulation of epithelial function, differentiation, and remodeling in the epididymis. *Asian Journal of Andrology*, 18(1), 3–9. <https://doi.org/10.4103/1008-682x.165946>

Brown, D., Lui, B., Gluck, S. & Sabolić, I. (1992). A plasma membrane proton ATPase in specialized cells of rat epididymis. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 263(4), 913–916. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1992.263.4.c913>

Burges, A. W. (2022). Regulation of signaling from the epidermal growth factor family. *The Journal of Physical Chemistry B*, 126, 7575–7485. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.2c04156>

Capel, B. (2000). The battle of the sexes. *Mechanisms of Development*, 92(1), 89–103.

Carpenter, G. and Cohen, S. (1990). Epidermal growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 7709–7712.

Carpenter, G. and Wahl, M. I. (1992). The epidermal growth factor family. In M. B. Sporn & A. B. Roberts (Eds.), *Peptide growth factors and their receptors* (pp. 69–171). Springer.

Castro, M. M., Kim, B., Hill, E., Fialho, M. C. Q., Puga, L. C. H. P., Freitas, M. B., Breton, S. & Machado-Neves, M. (2017). The expression patterns of aquaporin 9, vacuolar H (+)-ATPase, and cytokeratin 5 in the epididymis of the common vampire bat. *Histochemistry and Cell Biology*, 147, 39–48.

Caussanel, V., Tabone, E., Mauduit, C., Dacheux, F. & Benahmed, M. (1996). Cellular distribution of EGF, TGF- α and their receptor during postnatal development and spermatogenesis of the boar testis. *Journal of Endocrinology*, 123(1), 61–69. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(96\)03893-2](https://doi.org/10.1016/0303-7207(96)03893-2)

Ceresa, B. P. and Peterson, J. L. (2014). Cell and molecular biology of epidermal growth factor receptor. *International Review of Cell Molecular Biology*, 313, 145–178.

Chao, S., Xiaoping, F., Yueyan, M. & Junsheng, J. (2024). Amphiregulin in lung disease: A review. *Medicine*, 103(8), e37292.

- Chawla, S. and Jena, S. (2021). The anatomy and physiology of the laboratory rat. In P. Nagarajan, R. Gudde & R. Srinivasan (Eds.), *Essentials of laboratory animal science: Principles and practices* (p:187-209). Academic press.
- Chen, H., Alves, M. B. R. & Belleannée, C. (2021). Contribution of epididymal epithelial cell functions to sperm epigenetic changes and the health of progeny. *Human Reproduction Update*, 28(1), 51–66.
- Cheng, C. Y., Wong, E. W., Lie, P. P., Li, M. W., Mruk, D. D., Yan, H. H., Mok, K. W., Mannu, J., Mathur, P. P., Lui, W. Y., Lee, W. M., Bonanomi, M. & Silvestrini, B. (2011). Regulation of blood-testis barrier dynamics by desmosome, gap junction, hemidesmosome and polarity proteins: An unexpected turn of events. *Spermatogenesis*, 1(2), 105-15.
- Chojnacka, K., Zarycka, M. & Mruk, D. D. (2016). Biology of the Sertoli cell in the fetal, pubertal, and adult mammalian testis. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 58, 225–251.
- Citri, A. and Yarden, Y. (2006). EGF–ERBB signalling: towards the systems level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(7), 505–516.
- Cooper, T. G. (1998). Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 53, 119–136.
- Cornwall, G. A. (2009). New insights into epididymal biology and function. *Human Reproduction Update*, 15(2), 213–227.
- Creasy, D. M. and Chapin, R. E. (2018). Male reproductive system. In W. M. Haschek, C. G. Rousseaux, & M. A. Wallig (Eds.), *Fundamentals of toxicologic pathology* (3rd ed., pp. 459–516). San Diego, CA: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809841-7.00017-4>
- Crossmon, G. (1937). A modification of Mallory’s connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *Anatomical Record*, 69, 33-38.
- Culty, M., Liu, Y., Manku, G., Chan, W. & Papadopoulos, V. (2015). Expression of steroidogenesis-related genes in murine male germ cells. *Steroids*, 103, 105–114.
- Da Silva, N. and Barton, C. R. (2016). Macrophages and dendritic cells in the post-testicular environment. *Cell and Tissue Research*, 363, 97–104.
- Da Silva, N. and Smith, T. B. (2015). Exploring the role of mononuclear phagocytes in the epididymis. *Asian Journal of Andrology*, 17(4), 591–596.
- Da Silva, N., Cortez-Retamozo, V., Reinecker, H. C., Wildgruber, M., Hill, E., Brown, D., Swirsk, F. K., Pittet M, J. & Breton, S. (2011). A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. *Reproduction*, 141(5), 653–663.
- Da Silva, N., Shum, W. W. C. & Breton, S. (2007). Regulation of vacuolar proton pumping ATPase-dependent luminal acidification in the epididymis. *Asian Journal of Andrology*, 9, 476–482.
- Dacheux, J. L., Castella, S. & Gatti, J. L. (2005). Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology*, 63, 319–341.

- Delva, E., Tucker, D.K. & Kowalczyk, A.P. (2009). The desmosome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(2), a002543.
- Derynck, R. (1988). Transforming growth factor alpha. *Cell*, 54(5), 593–595.
- Derynck, R. (1992). The physiology of transforming growth factor- α . *Advances in Cancer Research*, 58, 27–52.
- Derynck, R., Roberts, A. B., Winkler, M. E., Chen, E. Y. & Goeddel, D. V. (1984). Human transforming growth factor-alpha: Precursor structure and expression in *E. coli*. *Cell*, 38(1), 287–297.
- Dickson, M. C., Martin, J. S., Cousins, F. M., Kulkarni, A. B., Karlsson, S. & Akhurst, R. J. (1995). Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor- β 1 knockout mice. *Development*, 121(6), 1845–1854.
- Domeniconi, R. F., Souza, A. C. F., Xu, B., Washington, A. M. & Hinton, B. T. (2016). Is the epididymis a series organs placed side by side. *Biology of Reproduction*, 95, 1–8.
- Dube, E. and Cyr, D. G. (2013). The blood-epididymis barrier and human male fertility. In C. Y. Cheng (Ed.), *Biology and regulation of blood-tissue barriers* (pp. 218–236). New York, NY: Springer.
- El-Gehani, F., Zhang, F.P., Pakarinen, P., Rannikko, A. & Huhtaniemi, I. (1998). Gonadotropin-independent regulation of steroidogenesis in the fetal rat testis. *Biology of Reproduction*, 58, 116–123.
- Ergün, L. (2010). Erkek genital sistem. In A. Özer (Ed.), *Veteriner özel histoloji*. (2. Baskı, ss. 251–268). Ankara: Nobel Yayın Dağıtım.
- Eşrefoğlu, M. (2021). *Özel histoloji* (3. Baskı). İstanbul: İstanbul Kitap Evleri.
- Ferguson, K. M. (2008). Structure-based view of epidermal growth factor receptor regulation. *Annual Review of Biophysics*, 37, 353–373.
- Flickinger, C. J., Bush, L. A., Howards, S. S. & Herr, J. C. (1997). Distribution of leukocytes in the epithelium and interstitium of four regions of the Lewis rat epididymis. *Anatomical Record*, 248(3), 380–390.
- Fukuda, S., Nishida-Fukuda, H., Nakayama, H., Inoue, H. & Higashiyama, S. (2012). Monoubiquitination of pro-amphiregulin regulates its endocytosis and ectodomain shedding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 420(2), 315–320.
- Gadea, J., Parrington, J., Kashir, J. & Coward, K. (2013). The male reproductive tract and spermatogenesis. In *Sperm Biology: An Evolutionary Perspective* (pp. 18–26). Cambridge University Press.
- Gao, D. D., Liu, G. Q., Chen, Y. L., Ding, N. & Zhong, J. H. (2025). Cellular mechanism underlying leptin-induced anion secretion of rat epididymal epithelial cells. *Andrology*, Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/andr.13656>

- Garcia-Alonso, L., Lorenzi, V., Mazzeo, C.I., Alves-Lopes, J. P., Roberts, K., Sancho-Serra, C., Engelbert, J., Marečková, M., Gruhn, W. H., Botting, R. A., Li, T., Crespo, B., van Dongen, S., Kiselev, V.Y., Prigmore, E., Herbert, M., Moffett, A., Chédotal, A., Bayraktar, O. A., Surani, A., Haniffa, M. & Vento-Tormo, R. (2022). Single-cell roadmap of human gonadal development. *Nature*, 60(7919), 540–547.
- Gervasi, M. G. and Visconti, P. E. (2017). Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. *Andrology*, 5(2), 204-218.
- Gnessi, L., Fabbri, A. & Spera, G. (1997). Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment. *Endocrine Reviews*, 18(4), 541-609.
- Gregory, M., Dufresne, J., Pinel, L. & Cyr, D. G. (2024). Three-dimensional cell culture of epididymal basal cells and organoids: A novel tool for toxicology. *Current Protocols*, 4(1), e975. <https://doi.org/10.1002/cpz1.975>
- Griswold, M. D. (2016). Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiological Reviews*, 96(1), 1–17. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2015>
- Griswold, M. D. (2018). 50 years of spermatogenesis: Sertoli cells and their interactions with germ cells. *Biology of Reproduction*, 99(1), 87–100.
- Gurung, P., Yetiskul, E. & Jialal, I. (2023). *Physiology, male reproductive system*. In StatPearls. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538429/>
- Guyonnet, B., Dacheux, F., Dacheux, J.-L. & Gatti, J.-L. (2011). The epididymal transcriptome and proteome provide some insights into new epididymal regulations. *Journal of Andrology*, 32(6), 651–664.
- Habert, R., Lejeune, H. & Saez, J. M. (2001). Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 179(1-2), 47–74
- Haider, S. G. (2004). Cell biology of Leydig cells in the testis. *International Review of Cytology*, 233, 181–241.
- Hassa, O. and Aştı, R. N. (1997). *Embriyoloji* (genişletilmiş 3. Baskı). Ankara: Yorum Basın Yayım.
- Haucke, V. and Kozlov, M. M. (2018). Membrane remodeling in clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Cell Science*, 131, jcs216812.
- Hazra, R., Jimenez, M., Desai, R., Handelsman, D. J. & Allan, C. M. (2013). Sertoli cell androgen receptor expression regulates temporal fetal and adult Leydig cell differentiation, function, and population size. *Endocrinology*, 154(9), 3410-3422.
- He, J., Dong, C., You, R., Zhu, Z., Lv, L. & Smith, G. W. (2009). Localization of epidermal growth factor (EGF) and its receptor (EGFR) during postnatal testis development in the alpaca (*Lama pacos*). *Animal Reproduction Science*, 116, 155–161.
- Herbst, R. S. (2004). Review of epidermal growth factor receptor biology. *International Journal of*

- Hermo, L. and Robaire, B. (2002). Epididymis cell types and their function. In B. Robaire & B. T. Hinton (Eds.), *The epididymis: From molecules to clinical practice* (pp. 81–102). New York, NY: Kluwer Academic/Plenum.
- Hermo, L., Dworkin, J. & Oko, R. (1988). Role of epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa. *American Journal of Anatomy*, 183(2), 107–124.
- Hermo, L., Oko, R. & Morales, C. R. (1994). Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: A role in sperm maturation. *International Review of Cytology*, 154, 106–189.
- Hess, R. A. (1990). Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: light microscopic observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testes. *Biology of Reproduction*, 43(3), 525–542.
- Hess, R. A. and França, L. R. (2008). Spermatogenesis in rat testis. *Male Reproductive Toxicology*, 636, 1–24.
- Higashiyama, S., Abraham, J. A., Miller, J., Fiddes, J. C. & Klagsbrun, M. (1991). A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science*, 251(4996), 936–939.
- Hinton, B. T., Galdamez, M. M., Sutherland, A., Bomgardner, D., Xu, B., Abdel-Fattah, R. & Yang, L. (2011). How do you get six meters of epididymis inside a human scrotum? *Journal of Andrology*, 32(6), 558–564.
- Hinton, B. T., Lan, Z. J., Rudolph, D. B., Labus, J. C. & Lye, R. J. (1998). Testicular regulation of epididymal gene expression. *Journal of Reproduction and Fertility*, 53 (suppl), 47–57.
- Hoeben, E., Briers, T., Vanderstichele, H., De Smet, W., Heyns, W., Deboel, L., Vanderhoydonck, F. & Verhoeven, G. (1995). Characterization of newly established testicular peritubular and prostatic stromal cell lines: Potential use in the study of mesenchymal-epithelial interactions. *Endocrinology*, 136, 2862–2873.
- Hofmann, M. C. and McBeath, E. (2022). Sertoli cell-germ cell interactions within the niche: Paracrine and juxtacrine molecular communications. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 897062.
- Holdcraft, R. W. and Braun, R. E. (2004). Hormonal regulation of spermatogenesis. *International Journal of Andrology*, 27(6), 335–342. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2004.00502.x>
- Huleihel, M. and Lunenfeld, E. (2004). Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Asian Journal of Andrology*, 6(3), 259–268.
- Hynes, N. E. and Lane, H. A. (2005). ERBB receptors and cancer: The complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews Cancer*, 5, 341–354.
- Inoue, M., Shima, Y., Miyabayashi, K., Tokunaga, K., Sato, T., Baba, T., Ohkawa, Y., Akiyama, H.,

- Suyama, M. & Morohashi, K. (2016). Isolation and characterization of fetal Leydig progenitor cells of male mice. *Endocrinology*, 157(3), 1222–1233.
- Jacobs, B., De Roock, W., Piessevaux, H., Van Oirbeek, R., Biesmans, B., De Schutter, J., Fieuws, S., Vandesompele, J., Peeters, M., Van Laethem, J.-L., Humblet, Y., Pénault-Llorca, F., De Hertogh, G., Laurent-Puig, P., Van Cutsem, E. & Tejpar, S. (2009). Amphiregulin and epiregulin mRNA expression in primary tumors predicts outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab and irinotecan. *Journal of Clinical Oncology*, 27(30), 5068–5074.
- James, E. R., Carrell, D. T., Aston, K. I., Jenkins, T. G., Yeste, M. & Salas-Huetos, A. (2020). The role of the epididymis and the contribution of epididymosomes to mammalian reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5377.
- Jensen, L. J., Stuart-Tilley, A. K., Peters, L. L., Lux, S. E., Alper, S. L. & Breton, S. (1999). Immunolocalization of AE2 anion exchanger in rat and mouse epididymis. *Biology of Reproduction*, 61(4), 973–980.
- Johnson, G. L. and Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, 298, 1911–1912.
- Johnston, D. S., Jelinsky, S. A., Bang, H. J., DiCandeloro, P., Wilson, E., Kopf, G. S. & Turner, T. T. (2005). The mouse epididymal transcriptome: Transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. *Biology of Reproduction*, 73(3), 404–413.
- Josso, N. (1990). Anti-mullerian hormone: Hormone or growth factor? *Progress in Growth Factor Research*, 2(3), 169–179.
- Junqueira, L. C. and Carneiro, J. (2015). *Basic histology: Text and atlas* (13th ed.). New York, NY: McGraw-Hill Education.
- Junqueira, L. C., Carneiro, J. & Kelley, R. O. (2018). *Junqueira's basic histology: Text and atlas* (15th ed.). New York, NY: McGraw-Hill Education.
- Jura, N., Shan, Y., Cao, X., Shaw, D. E. & Kuriyan, J. (2009). Structural analysis of the catalytically inactive kinase domain of the human EGF receptor 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106(51), 21608–21613.
- Kaftanovskaya, E. M., Lopez, C., Ferguson, L., Myhr, C. & AgoulNIK, A. I. (2015). Genetic ablation of androgen receptor signaling in fetal Leydig cell lineage affects Leydig cell functions in adult testis. *The FASEB Journal*, 29(6), 2327–2337.
- Karl, J. and Capel, B. (1998). Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Developmental Biology*, 203(2), 323–333.
- Karnovsky, M. J. (1965): A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 27, 137A-138A.
- Kassab, M., Abd-Elmaksoud, A. & Ali, M. A. (2007). Localization of the epidermal growth factor (EGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in the bovine testis. *Journal of Molecular Histology*, 38(3), 207–214. <https://doi.org/10.1007/s10735-007-9089-2>

- Keer Jiang, K. and Jørgensen, J. S. (2024). Fetal Leydig cells: What we know and what we don't. *Molecular Reproduction and Development*, 91, e23739.
- Kerr, J. B. and Knell, C. M. (1988). The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Development*, 103(3), 535–544.
- Kierszenbaum, A. L. (2006). *Histoloji ve hücre biyolojisi*. (R. Demir, Çev. Ed., ss. 552–554). Palme Yayıncılık.
- Kim, B., Roy, J., Shum, W. W. C., Da Silva, N. & Breton, S. (2015). Role of testicular luminal factors on basal cell elongation and proliferation in the mouse epididymis. *Biology of Reproduction*, 92, 1–11.
- Kim, J. H., Chung, J. S. & Lee, K. Y. (2013). Ultrastructural characteristics of the testis, spermatogenesis and taxonomic values of sperm morphology in male *Ruditapes philippinarum* in western Korea. *Development and Reproduction*, 17(2), 121–132. <https://doi.org/10.12717/DR.2013.17.2.121>
- Kirchhoff, C. (1999). Gene expression in the epididymis. *International Review of Cytology*, 188, 133–202.
- Kleiman, L. B., Maiwald, T., Conzelmann, H., Lauffenburger, D. A. & Sorger, P. K. (2011). Rapid phospho-turnover by receptor tyrosine kinases impacts downstream signaling and drug binding. *Molecular Cell*, 43(5), 723–737.
- Knoblaugh, S. E., True, L., Tretiakova, M. & Hukkanen, R. R. (2018). Male reproductive system. In: P. M. Treuting, S. M. Dintzis, & K. S. Montine (Eds.), *Comparative anatomy and histology: A mouse, rat and human atlas* (2nd ed., pp 335–363). San Diego, CA: Academic Press.
- Kothandapani, A., Lewis, S. R., Noel, J. L., Zacharski, A., Krellwitz, K., Baines, A., Winske, S., Vezina, C. M., Kaftanovskaya, E. M., AgoulNIK, A. I., Merton, E. M., Cohn, M. J. & Jorgensen, J. S. (2020). GLI3 resides at the intersection of hedgehog and androgen action to promote male sex differentiation. *PLoS Genetics*, 16(6), e1008810.
- Kotian, S. R., Pandey, A. K., Padmashali, S., Jaison, J. & Kalthur, S. G. (2016). A cadaveric study of the testicular artery and its clinical significance. *Journal Vascular Brasileiro*, 15(4), 280–286. <https://doi.org/10.1590/1677-5449.007516>
- Kujala, M., Hihnala, S., Tienari, J., Kaunisto, K., Hästbacka, J., Holmberg, C., Kere, J. & Höglund, P. (2007). Expression of ion transport-associated proteins in human efferent and epididymal ducts. *Reproduction*, 133(4), 775–784.
- Kumar, D. L. and DeFalco, T. (2018). A perivascular niche for multipotent progenitors in the fetal testis. *Nature Communications*, 9(1), 4519.
- Lax, I., Burgess, W. H., Bellot, F., Ullrich, A., Schlessinger, J. & Givol, D. (1988). Localization of a major receptor-binding domain for epidermal growth factor by affinity labeling. *Molecular and Cellular Biology*, 8(4), 1831–1834.
- Leblond, C. P. and Clermont, Y. (1952a). Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 55(4), 548–573.

- Leblond, C. P. and Clermont, Y. (1952b). Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique. *American Journal of Anatomy*, 90(2), 167–215. <https://doi.org/10.1002/aja.1000900202>
- Lemmon, M. A. and Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141(7), 1117–1134.
- Leung, G. P. H., Cheung, K. H., Leung, T., Tsang, M. W. & Wong, P. Y. D. (2004). Regulation of epididymal principal cell functions by basal cells: Role of transient receptor potential (Trp) proteins and cyclooxygenase-1 (COX-1). *Molecular and Cellular Endocrinology*, 216(1–2), 5–13.
- Levano, K. S. and Kenny, P. A. (2012). Clarification of the C-terminal proteolytic processing site of human amphiregulin. *FEBS Letters*, 586(21), 3500–3502.
- Levine, E., Cupp, A. S., Miyashiro, L. & Skinner, M. K. (2000). Role of transforming growth factor- α and the epidermal growth factor receptor in embryonic rat testis development. *Biology of Reproduction*, 62(3), 477–490.
- Li, L., Zirkin, B. R. and Papadopoulos, V. (2018). *Leydig cell androgen synthesis*. In M. Skinner (Ed.), *Encyclopedia of reproduction* (2nd ed., Vol. 1, pp. 215–221). San Diego, CA: Academic Press.
- Lie, P. P., Cheng, C. Y. & Mruk, D. D. (2011). The biology of the desmosome-like junction a versatile anchoring junction and signal transducer in the seminiferous epithelium. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 286, 223–269.
- Liebich, H.-G. (2019). *Veterinary histology of domestic mammals and birds: Textbook and colour atlas* (5th ed.). Stuttgart: Schattauer.
- Lim, H., Dey, S. K. & Das, S. K. (1997). Differential expression of the erbB2 gene in the periimplantation mouse uterus: potential mediator of signaling by epidermal growth factor-like growth factors. *Endocrinology*, 138(4), 1328–1337.
- Linggi, B. and Carpenter, G. (2006). ErbB receptors: New insights on mechanisms and biology. *Trends in Cell Biology*, 16(12), 649–656
- Litwack, G. (2022). Growth factors. In G. Litwack (Ed.), *Hormones* (4th ed., pp. 403–420). San Diego, CA: Academic Press.
- Liu, C., Rodriguez, K. & Yao, H. H. C. (2016). Mapping lineage progression of somatic progenitor cells in the mouse fetal testis. *Development*, 143(20), 3700–3710.
- Lovell-Badge, R. (1993). Sex determining gene expression during embryogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Science*, 339(1288), 159–164.
- Luo, D., He, Z., Yu, C. & Guan, Q. (2022). Role of p38 MAPK Signalling in Testis Development and Male Fertility. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 6891897. doi: [10.1155/2022/6891897](https://doi.org/10.1155/2022/6891897).

- Madtes, D. K., Rubenfeld, F. B., Wysocki, J., Staunton, D. E. & Martin, T. R. (1988). Induction of transforming growth factor- α in activated human alveolar macrophages. *Cell*, 53(2), 285–293.
- Maekawa, M., Kamimura, K. & Nagano, T. (1996). Peritubular myoid cells in the testis: Their structure and function. *Archives of Histology and Cytology*, 59, 1.
- Magnanti, M., Gandini, O., Giuliani, L., Gazzaniga, P., Marti, H. H., Gradilone, A., Frati, L., Agliano, A. M. & Gassman, M. (2001). Erythropoietin expression in primary rat Sertoli and peritubular myoid cells. *Blood*, 98(9), 2872–2874.
- Makiyan, Z. (2016). Studies of gonadal sex differentiation. *Organogenesis*, 12(1), 42–51. <https://doi.org/10.1080/15476278.2016.1145318>
- Mallea, L. E., Machado, A. J., Navaroli, F. & Rommerts, F. F. (1986). Epidermal growth factor stimulates lactate production and inhibits aromatization in cultured Sertoli cells from immature rats. *International Journal of Andrology*, 9(3), 201–208.
- Mao, B., Bu, T., Mruk, D., Li, C., Sun, F. Cheng, & C. Y. (2020). Modulating the blood-testis barrier towards increasing drug delivery. *Trends in Pharmacological Sciences*, 41(10), 690–700.
- Martin-DeLeon, P. A. (2015). Epididymosomes: transfer of fertility-modulating proteins to the sperm surface. *Asian Journal of Andrology*, 17(5), 720–725.
- Massagué, J. and Pandiella, A. (1993). Membrane-anchored growth factors. *Annual Review of Biochemistry*, 62, 515–541. [doi: 10.1146/annurev.bi.62.070193.002503](https://doi.org/10.1146/annurev.bi.62.070193.002503).
- Méar, L. O. Tsai, P. S. Tamessar, C. T. Schjenken, J. E. & Nixon, B. (2024). Epididymosomes: Composition and functions for sperm maturation. *Advances in Anatomy Embryology Cell Biology*, pp:1-16. [doi: 10.1007/102_2024_7](https://doi.org/10.1007/102_2024_7).
- Mendelsohn, A. C., Sanmarco, L. M., Spallanzani, R. G., Brown, D., Quintana, F. J., Breton, S. & Battistone, M. A. (2020). From initial segment to cauda: A regional characterization of mouse epididymal CD11c (+) mononuclear phagocytes based on immune phenotype and function. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 319(6), 997–1010.
- Mendis-Handagama, S. M. L. C. Risbridger, G. P. & de Kretser, D. M. (1987). Morphometric analysis of the components of the neonatal and the adult rat testis interstitium. *International Journal of Andrology*, 10, 525–534.
- Mendis-Handagama, S. M. L. C., Ariyaratne, H. B. S., Teunissen van Manen, K. R. & Haupt, R. L. (1998). Differentiation of adult Leydig cells in the neonatal rat testis is arrested by hypothyroidism. *Biology of Reproduction*, 59, 351–357.
- Meng, L. J., Wang, W.Y., Xu, Y. J., Gong, T. & Yang, Y. (2020). Postnatal differentiation and regional histological variations in the ductus epididymidis of the Congjiang Xiang pig. *Tissue Cell*, 67, 101411.
- Merchant-Larios, H. and Moreno-Mendoza, N. (1998). Mesonephric stromal cells differentiate into Leydig cells in the mouse fetal testis. *Experimental Cell Research*, 244(1), 230–238.

- Mescher, A. L. (2016). *Junqueira's basic histology: Text and atlas* (14th ed.). New York, NY: McGraw-Hill Education.
- Migrenne, S., Pairault, C., Racine, C., Livera, G., Géloso, A. & Habert, R. (2001). Luteinizing hormone-dependent activity and luteinizing hormone-independent differentiation of rat fetal Leydig cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 172(1-2), 193–202.
- Miller, W. L. and Auchus, R. J. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Reviews*, 32(1), 81–151. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0013>
- Miyabayashi, K., Shima, Y., Inoue, M., Sato, T., Baba, T., Ohkawa, Y., Suyama, M. & Morohashi, K. (2017). Alterations in fetal Leydig cell gene expression during fetal and adult development. *Sexual Development*, 11(2), 53–63.
- Miyamoto, S., Yagi, H., Yotsumoto, F., Kawarabayashi, T. & Mekada, E. (2006). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a novel targeting molecule for cancer therapy. *Cancer Science*, 97(5), 341–347.
- Mok, K.W., Mruk, D. D., Lee, W. M. & Cheng, C.Y. (2012). Spermatogonial stem cells alone are not sufficient to re-initiate spermatogenesis in the rat testis following adjuvin-induced infertility. *International Journal of Andrology*, 35(1), 86–101.
- Mruk, D.D. and Cheng, C.Y. (2015): The mammalian blood-testis barrier: Its biology and regulation. *Endocrine Reviews*, 36(5), 564–591.
- Murashima, A., Xu, B. & Hinton, B. T. (2015). Understanding normal and abnormal development of the Wolffian/epididymal duct by using transgenic mice. *Asian Journal of Andrology*, 17(5), 749–755.
- Nakazumi, H., Sasano, H., Maehara, I. & Orikasa, S. (1996). Transforming growth factor- α , epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptor in human testis obtained from biopsy and castration: Immunohistochemical study. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 178(4), 381–388. <https://doi.org/10.1620/tjem.178.381>
- Nishino, K., Yamanouchi, K., Naito, K. & Tojo, H. (2001). Characterization of mesonephric cells that migrate into the XY gonad during testis differentiation. *Experimental Cell Research*, 267(2), 225–232.
- Nistal, M. and Paniagua, R. (1984). Development of the male genital tract. In M. Nistal & R. Paniagua (Eds.), *Testicular and epididymal pathology* (pp. 1–13). New York, NY: Thieme Stratton.
- Nixon, B., De Iuliis, G. N., Hart, H. M., Zhou, W., Mathe, A., Bernstein, I. R., Anderson, A. L., Stanger, S. J., Skerrett-Byrne, D. A., Jamaluddin, M. F. B., Almazi, J. G., Bromfield, E. G., Larsen, M. R. & Dun, M. D. (2019). Proteomic profiling of mouse epididymosomes reveals their contributions to post-testicular sperm maturation. *Molecular and Cellular Proteomics*, 18(Suppl. 1), 91–108.
- O'Shaughnessy, P. J., Baker, P. J., Heikkilä, M., Vainio, S. & McMahon, A. P. (2000). Localization of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase isoform expression in the developing mouse testis—Androstenedione is the major androgen secreted by fetal/neonatal

- Leydig cells. *Endocrinology*, 141(7), 2631–2637.
- Ojeda, S. R. and Skinner, M. K. (2006). Puberty in the rat. In J. D. Neill (Ed.), *Knobil and Neill's physiology of reproduction* (3rd ed., Vol. 3, pp. 2061–2126). San Diego, CA: Academic Press.
- Oliva-Hernandez, J. and Perez-Gutierrez, J. F. (2008). Localization of the epidermal growth factor (EGF) in the epididymis and accessory genital glands of the boar and functional effects on spermatozoa. *Theriogenology*, 70, 1159–1169.
- Onoda, M. and Suarez-Quian, C. A. (1994). Modulation of transferrin secretion by epidermal growth factor in immature rat Sertoli cells in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 100(2), 541–550.
- Orth, J. M. (1982). Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: A quantitative autoradiographic study. *The Anatomical Record*, 203(4), 485–492.
- Özer, A. (Ed.). (2007). *Veteriner embriyoloji*. (3. baskı). Ankara: Nobel Yayın Dağıtım Ltd.Şti.
- Pan, Y., Cui, Y., Yu, S., Zhang, Q., Fan, J., Abdul Rasheed, B. & Yang, K. (2014). The expression of epidermal growth factor (EGF) and its receptor (EGFR) during post-natal testes development in the yak. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(6), 970–976. <https://doi.org/10.1111/rda.12416>
- Park, Y. J., Battistone, M. A., Kim, B. & Breton, S. (2017). Relative contribution of clear cells and principal cells to luminal pH in the mouse epididymis. *Biology of Reproduction*, 96(2), 366–375.
- Park, Y. J., Kim, J. H., Kim, H. Y., Park, H. B., Choe, J., Kim, G. W., Baek, S. Y., Chung, H. J., Park, Y. J. & Kim, B. (2020). The expression and localization of V-ATPase and cytokeratin 5 during postnatal development of the pig epididymis. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 33, 1077–86.
- Pask, A. (2016). *The Reproductive System*. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. PMID: 26659484 DOI: [10.1007/978-94-017-7417-8_1](https://doi.org/10.1007/978-94-017-7417-8_1)
- Pastor-Soler, N., Beaulieu, V., Litvin, T. N., Da Silva, N., Chen, Y., Brown, D., Buck, J., Levin, L. R. & Breton, S. (2003). Bicarbonate-regulated adenylyl cyclase (sAC) is a sensor that regulates pH-dependent V-ATPase recycling. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 49523–49529.
- Pawar, H. S. and Wrobel, K. H. (1991). The Sertoli cell of the water buffalo (*Bubalus bubalis*) during the spermatogenic cycle. *Cell and Tissue Research*, 265, 43–50.
- Petersen, C., Boitani, C., Fröysa, B. & Söder, O. (2001). Transforming growth factor- α stimulates proliferation of rat Sertoli cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 181(1–2), 221–227.
- Picut, C. A. and Remick, A. K. (2017). Impact of age on the male reproductive system from the pathologist's perspective. *Toxicologic Pathology*, 45(1), 195–205. <https://doi.org/10.1177/0192623316672744>
- Picut, C. A., Ziejewski, M. K. & Stanislaus, D. (2018). Comparative aspects of pre- and postnatal

development of the male reproductive system. *Birth Defects Research*, 110, 190–227.

Pietrement, C., Sun-Wada, G. H., Da Silva, N., McKee, M., Marshansky, V., Brown, D., Futai, M. & Breton, S. (2006). Distinct expression patterns of different subunit isoforms of the V-ATPase in the rat epididymis. *Biology of Reproduction*, 74(1), 185–194.

Plowman, G. D., Green, J. M., Culouscou, J. M., Carlton, G. W., Rothwell, V. M. & Buckley, S. (1990). The amphiregulin gene encodes a novel epidermal growth factor-related protein with tumor-inhibitory activity. *Molecular and Cellular Biology*, 10(5), 1969–1981.

Prevot, V. (2015). Puberty in mice and rats. In: Plant T. M. and Zeleznik A. J. (Eds.), *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. (4th ed., pp. 1395–1439). New York, NY: Academic Press.

Prigent, S. A. and Lemoine, N. R. (1992). The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands. *Progress in Growth Factor Research*, 4(1), 1–24.

Prisco, M., Rosati, L., Morgillo, E., Mollica, M. P., Agnese, M., Andreuccetti, P. & Valiante, S. (2020). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) and its receptors in *Mus musculus testis*. *General and Comparative Endocrinology*, 286, 113297.

Qian, X., Dougall, W. C., Hellman, M. E. & Greene, M. I. (1994). Kinase-deficient neu proteins suppress epidermal growth factor receptor function and abolish cell transformation. *Oncogene*, 9(5), 1507–1514.

Radhakrishnan, B. and Suarez-Quian, C. A. (1992). Characterization of epidermal growth factor receptor in testis, epididymis and vas deferens of non-human primates. *Journal of Reproduction and Fertility*, 96(1), 13–23. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0960013>

Radhakrishnan, B., Oke, B. O., Papadopoulos, V., DiAugustine, R. P. & Suarez-Quian, C. A. (1992). Characterization of epidermal growth factor in mouse testis. *Endocrinology*, 131(6), 3091–3099.

Riethmacher, D., Sonnenberg-Riethmacher, E., Brinkmann, V., Yamaai, T., Lewin, G. R. & Birchmeier, C. (1997). Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature*, 389(6652), 725–730.

Rinaldi, V. D., Donnard, E., Gellatly, K., Rasmussen, M., Kucukural, A., Yukselen, O., Garber, M., Sharma, U. & Rando, O. J. (2020). An atlas of cell types in the mouse epididymis and vas deferens. *eLife*, 9, e55474. <https://doi.org/10.7554/eLife.55474>

Robaire, B. and Hermo, L. (1988). Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: Structure, functions, and their regulation. In E. Knobil and J. Neill (Eds.), *In the physiology of reproduction* (pp. 999–1080). New York, NY: Raven Press.

Robaire, B. and Hinton, B. T. (2015). The epididymis. In T. M. Plant & A. J. Zeleznik (Eds.), *Physiology of reproduction* (4th ed., pp. 691–771). Philadelphia, PA: Elsevier.

Robaire, B., Hinton, B. T. & Orgebin-Crist, M.-C. (2006). The epididymis. In J. D. Neill (Ed.), *Knobil and Neill's physiology of reproduction* (3rd ed., Vol. 1, pp. 1071–1148). Philadelphia, PA: Elsevier.

- Rodriguez, C. M., Kirby, J. L. & Hinton, B. T. (2002). The development of the epididymis. In B. Robaire and B. T. Hinton (Eds.) *The epididymis: From molecules to clinical practice* (pp. 251-267). New York, NY: Kluwer Academic/Plenum.
- Roepstorff, K., Grandal, M. V., Henriksen, L., Knudsen, S. L. J., Lerdrup, M., Grøvdal, L., Willumsen, B. M. & van Deurs, B. (2009). Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor. *Traffic*, 10(8), 1115–1127.
- Ross, M. H. and Pawlina, W. (2011). *Histology: A text and atlas: With correlated cell and molecular biology* (6th ed.). Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Rowart, P., Wu, J., Caplan, M. J. & Jouret, F. (2018). Implications of AMPK in the formation of epithelial tight junctions. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 2040.
- Roy, J.W., Hill, E., Ruan, Y.C., Vedovelli, L., Păunescu, T. G., Brown, D. & Breton, S. (2013). Circulating aldosterone induces the apical accumulation of the proton pumping V-ATPase and increases proton secretion in clear cells in the caput epididymis. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 305, 436–446.
- Sadler, T.W. (2021). *Langman tıbbi embriyoloji* (14. Baskı). Ankara: Palme Yayıncılık.
- Saito, A., Horie, M. & Nagase, T. (2018). TGF- β signaling in lung health and disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2460.
- Salomon, D. S., Kim, N., Saeki, T. & Ciardiello, F. (1990). Transforming growth factor-alpha: an oncodevelopmental growth factor. *Molecular Reproduction and Development*, 2(12), 389–397.
- Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 103, 211–225.
- Segatelli, T. M., Batlouni, S. R. & França, L. R. (2009). Duration of spermatogenesis in the bullfrog. *Theriogenology*, 72(7), 894–901.
- Seidl, K., Buchberger, A. & Erck, C. (1996). Expression of nerve growth factor and neurotrophin receptors in testicular cells suggest novel roles for neurotrophins outside the nervous system. *Reproduction Fertility and Development*, 8(7), 1075–1087.
- Serre, V. and Robaire, B. (1999). Distribution of immune cells in the epididymis of the aging Brown Norway rat is segment-specific and related to the luminal content. *Biology of Reproduction*, 61(3), 705–714.
- Setchell, B. P. (2008). Blood-testis barrier, junctional and transport proteins and spermatogenesis. In: C.Y. Cheng (Ed.), *Molecular mechanisms in spermatogenesis*. (pp. 212–233). Springer.
- Shao, J. and Sheng, H. (2010). Amphiregulin promotes intestinal epithelial regeneration: Roles of intestinal subepithelial myofibroblasts. *Endocrinology*, 151(8), 3728–3737.
- Sharma, D., Jaggi, A. S. & Bali, A. (2018). Clinical evidence and mechanisms of growth factors in idiopathic and diabetes-induced carpal tunnel syndrome. *European Journal of Pharmacology*, 837, 156–163.

- Sharma, S. K., Ramkrishna, V., Tiwari, G. P. & Chauhan, R. A. S. (1986). Histomorphoenzymic studies on the epididymis and its contents in goat. *Indian Journal of Animal Science*, 56, 849–853.
- She, Z. Y. and Yang, W. X. (2014). Molecular mechanisms involved in mammalian primary sex determination. *Journal of Molecular Endocrinology*, 53(1), 21–37. <https://doi.org/10.1530/JME-14-0018>
- Shih, M., Chiu, Y., Hu, M., Guo, I. & Chung, B. (2011). Regulation of steroid production: Analysis of Cyp11a1 promoter. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 336(1-2), 80–84.
- Shima Y., Matsuzaki, S., Miyabayashi, K., Otake, H., Baba, T., Kato, S., Huhtaniemi, I. & Morohashi K. (2015). Fetal Leydig cells persist as an androgen-independent subpopulation in the postnatal testis. *Molecular Endocrinology*, 29(11), 1581-1593.
- Shima, Y. and Morohashi, K-I. (2017). Leydig progenitor cells in fetal testis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 15, 55–64.
- Shing, Y., Christofori, G., Hanahan, D., Ono, Y., Sasada, R., Igarashi, K. & Folkman, J. (1993). Betacellulin: A mitogen from pancreatic β -cell tumors. *Science*, 259(5101), 1604–1607.
- Shoyab, M., McDonald, V. L., Bradley, J. G. & Todaro, G. J. (1988). Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(18), 6528–6532.
- Shum, W.W., Hill, E., Brown, D. & Breton, S. (2013). Plasticity of basal cells during postnatal development in the rat epididymis. *Reproduction*, 146(5), 455-469. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0510>
- Shum, W. W., Da Silva, N., McKee, M., Smith, P. J., Brown, D. & Breton, S. (2008). Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. *Cell*, 135(6), 1108–1117.
- Shum, W.W. C., Da Silva, N., Brown, D. & Breton, S. (2009). Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. *Journal of Experimental Biology*, 212, 1753–61.
- Shum, W. W. C., Ruan, Y. C., Da Silva, N. & Breton, S. (2011). Establishment of cell-cell cross review talk in the epididymis: Control of luminal acidification. *Journal of Andrology*, 32, 576–586.
- Singh, S. S., Chauhan, S. B., Kumar, A., Kumar, S., Engwerda, C. R., Sundar, S. & Kumar, R. (2022). Amphiregulin in cellular physiology, health, and disease: Potential use as a biomarker and therapeutic target. *Journal of Cellular Physiology*, 237,1143–56.
- Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E., Buck Louis, G. M., Toppari, J., Andersson, A. M., Eisenberg, M. L., Jensen, T. K., Jørgensen, N., Swan, S. H., Sapra, K. J., Ziebe, S., Priskorn, L. & Juul, A. (2016). Male reproductive disorders and fertility trends: Influences of environment and genetic susceptibility. *Physiological Reviews*, 96(1), 55–97.

- Skinner, M. K. (1991). Cell-cell interactions in the testis. *Endocrine Reviews*, 12(1), 45–77.
- Skinner, M. K. and Griswold, M. D. (2005). *Sertoli cell biology*. Elsevier Academic Press, USA.
- Skinner, M., Takacs, K. & Coffey, R. (1989). Cellular localization of transforming growth factor- α gene expression and action in the seminiferous tubule: Peritubular cell-Sertoli cell interactions. *Endocrinology*, 124, 845–854.
- Skinner, M. K. and Griswold, M. D. (1983). Multiplication stimulating activity (MSA) can substitute for insulin to stimulate the secretion of testicular transferrin by cultured Sertoli cells. *Cell Biology International Reports*, 7(6), 441–446.
- Smith, E. P., Svoboda, M. E., Van Wyk, J. J., Kierszenbaum, A. L. & Tres, L. L. (1987). Partial characterization of a somatomedin like peptide from the medium of cultured rat Sertoli cells. *Endocrinology*, 120(1), 186–193.
- Smith, T. B., Cortez-Retamozo, V., Grigoryeva, L. S., Hill, E., Pittet, M. J. & DaSilva, N. (2014). Mononuclear phagocytes rapidly clear apoptotic epithelial cells in the proximal epididymis. *Andrology*, 2(5), 755–762.
- Sordollet, C., Chauvin, M. A., de Peretti, E., Morera, A. M. & Benahmed, M. (1991). Epidermal growth factor directly stimulates steroidogenesis in primary cultures of porcine Leydig cells: Actions and sites of action. *Endocrinology*, 128, 2160–2168.
- Spadaro, D., Tapia, R., Pulimeno, P. & Citi, S. (2012). The control of gene expression and cell proliferation by the epithelial apical junctional complex. *Essays in Biochemistry*, 53, 83–93.
- Standring, S. (Ed.). (2021). *Gray's anatomy: The anatomical basis of clinical practice* (42nd ed.). Philadelphia, PA: Elsevier.
- Stone, W. L., Leavitt, L. & Varacallo, M. (2023). Physiology, growth factor. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442024/>
- Strachan, L., Murison, J. G., Prestidge, R. L., Sleeman, M. A., Watson, J. D. & Kumble, K. D. (2001). Cloning and biological activity of epigen, a novel member of the epidermal growth factor superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 276(21), 18265–18271.
- Su, L. and Cheng, C. Y. (2004). Sertoli cell–spermatid junctions in the testis: Cell adhesion dynamics and implications in spermatogenesis. *Biology of Reproduction*, 71(3), 767–776.
- Suárez-Quian, C. A. and Niklinski, W. (1990). Immunocytochemical localization of the epidermal growth factor receptor in mouse testis. *Biology of Reproduction*, 43(6), 1087–1097. <https://doi.org/10.1095/biolreprod43.6.1087>
- Sullivan, R., Frenette, G. & Girouard, J. (2007). Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian Journal of Andrology*, 9, 483–491.
- Sullivan, R., Legare, C., Lamontagne-Proulx, J., Breton, S. & Soulet, D. (2019). Revisiting structure /functions of the human epididymis. *Andrologia*, 7, 748–757.

- Swain, A. and Lovell-Badge, R. (1999). Mammalian sex determination: A molecular drama. *Genes and Development*, 13(7), 755–767.
- Swingen, T. and Koopman, P. (2013). Building the mammalian testis: Origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. *Genes and Development*, 27(22), 2409–2426.
- Syed, V., Khan, S. A. & Nieschlag, E. (1991). Epidermal growth factor stimulates testosterone production of human Leydig cells in vitro. *Journal of Endocrinological Investigation*, 14, 93–97.
- Tamada, H., Takemoto, K., Tominaga, M., Kawate, N., Takahashi, M., Hatoya, S., Matsuyama, S., Inaba, T. & Sawada, T. (2016). Expression and localization of epidermal growth factor, transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor in the canine testis. *Journal of Reproduction and Development*, 62(1), 59–64. <https://doi.org/10.1262/jrd.2015-079>
- Tanyolaç, A. (1999). *Özel histoloji*. Yorum Basın Yayın Sanayi Ltd. Şti, s: 144-151, Ankara.
- Taylor, A., Robson, A., Houghton, B. C., Jepson, C. A., Ford, W. C. L. & Frayne, J. (2013). Epididymal specific, selenium-independent GPX5 protects cells from oxidative stress-induced lipid peroxidation and DNA mutation. *Human Reproduction*, 28(9), 2332-2342.
- Teerds, K. J. and Huhtaniemi, I. T. (2015). Morphological and functional maturation of Leydig cells: from rodent models to primates. *Human Reproduction Update*, 21(3), 310–28.
- Teerds, K. J., Rommerts, F. F. G. & Dorrington, J. H. (1990). Immunohistochemical detection of transforming growth factor- α in Leydig cells during the development of the rat testis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 69(1), R1–R6.
- Tiwana, M. S. and Leslie, S. W. (2023). *Anatomy, abdomen and pelvis: Testes*. In StatPearls. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470201/>
- Tomsig, J. L. and Turner, T. T. (2006). Growth factors and the epididymis. *Journal of Andrology*, 27, 348–357.
- Toyoda, H., Komurasaki, T., Uchida, D., Takayama, Y., Isobe, T., Okuyama, T. & Hanada, K. (1995). Epiregulin A novel epidermal growth factor with mitogenic activity for rat primary hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 7495–7500.
- Tres, L. L., Smith, E. P., Van Wyk, J. J. & Kierszenbaum, A. L. (1986). Immunoreactive sites and accumulation of somatomedin- C in rat Sertoli-spermatogenic cell co-cultures. *Experimental Cell Research*, 162(1), 33–50.
- Tsutsumi, O., Kurachi, H. & Oka, T. (1986). A physiological role of epidermal growth factor in the male reproductive function. *Science*, 233(4766), 975–977.
- Turner, T. T. (1991). Spermatozoa are exposed to a complex microenvironment as they traverse the epididymis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 637, 364–383.
- Turner, T. T., Bomgardner, D., Jacobs, J. P. & Nguyen, Q. A. (2003). Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction*,

125(6), 871–878.

- Turner, T.T. and Miller, D.W. (1997). On the synthesis and secretion of rat seminiferous tubule proteins in vivo after ischemia and germ cell loss. *Biology of Reproduction*, 57, 1275–1284.
- Ulkay, B. (2005). *Erkek ratlarda sentetik östrojen ve fitoöstrojenin (Trifolium Pratense) genital sistem üzerindeki etkileri*. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul.
- Verhoeven, G. and Cailleau, J. (1986). Stimulatory effects of epidermal growth factor on steroidogenesis in Leydig cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 47, 99–106.
- Von Engelhardt, W., Breves, G., Diener, M. & Gotthold, G. (2020). *Veteriner Fizyoloji*. Çeviri editörü: Hakan Öztürk. Ankara Nobel Tıp Kitapevleri Ltd.Şti, Ankara.
- Wahab-Wahlgren, A., Martinelle, N., Holst, M., Jahnukainen, K., Parvinen, M. & Söder, O. (2003). EGF stimulates rat spermatogonial DNA synthesis in seminiferous tubule segments in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 201(1–2), 39–46. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(03\)00002-9](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(03)00002-9)
- Wald, M. (2005). Epidermal growth factor and spermatogenesis. *Journal of Urology*, 174(6), 2089–2090.
- Wang, J. M., Li, Z. F. & Yang, W. X. (2022). What does androgen receptor signaling pathway in Sertoli cells during normal spermatogenesis tell us? *Frontiers in Endocrinology*, 13, 838858.
- Wang, C., Xie, Y., Liu, J., Xie, Q., Kang, Y., Dong, X. & Huang, D. (2024). Recent advances in the study of the structure and function of the epididymis. *Exploratory Immunology*, 4, 309–324. <https://doi.org/10.37349/ei.2024.00142>
- Wang, M., Yang, Y., Cansever, D., Wang, Y., Kantores, C., Messiaen, S., Moison, D., Livera, G., Chakarov, S., Weinberger, T., Stremmel, C., Fijak, M., Klein, B., Pleuger, C., Lian, Z., Ma, W., Liu, Q., Klee, K., Händler, K., ... & Bhushan, S. (2021). Two populations of self-maintaining monocyte-independent macrophages exist in adult epididymis and testis. *Proceedings National Academy of Sciences of USA*, 118(1), e2013686117.
- Wang, Y. N. and Hung, M. C. (2012). Nuclear functions and subcellular trafficking mechanisms of the epidermal growth factor receptor family. *Cell and Bioscience*, 2(13). <https://doi.org/10.1186/2045-3701-2-13>
- Wang, Z.Q., Watanabe, Y., Toki, A. & Itano, T. (2002). Altered distribution of Sertoli cell vimentin and increased apoptosis in cryptorchid rats. *Journal of Pediatric Surgery*, 37(4), 648–652.
- Wee, P. and Wang, Z. (2017). Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. *Cancers (Basel)*, 9, 52.
- Wen, Q., Cheng, C.Y. & Liu, Y.-X. (2016). Development, function and fate of fetal Leydig cells. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 59, 89–98.
- Wijayarathna, R., Pasalic, A., Nicolas, N., Biniwale, S., Ravinthiran, R., Genovese, R., Muir, J. A.,

- Loveland, K. L., Meinhardt, A., Fijak, M. & Hedger, M. P. (2020). Region-specific immune responses to autoimmune epididymitis in the murine reproductive tract. *Cell and Tissue Research*, 381(2), 351–360.
- Wong, C. H. and Cheng, C.Y. (2005). The blood-testis barrier: Its biology, regulation, and physiological role in spermatogenesis. *Current Topics in Developmental Biology*, 71, 263–296.
- Wong, R. W., Kwan, R. W., Mak, P. H., Mak, K. K., Sham, M. H. & Chan, S. Y. (2000). Overexpression of epidermal growth factor induced hypospermatogenesis in transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*, 275(24), 18297–18303.
- Xian, C. J. (2007). Roles of epidermal growth factor family in the regulation of postnatal somatic growth. *Endocrine Reviews*, 28, 284–296.
- Xiao, X., Mruk, D. D., Tang, E. I. & Cheng, C. Y. (2014). Cellular events in the mammalian testis and their regulation by hormones and chemical toxicants. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 811, 1–49.
- Xie, Y. and Hung, M.-C. (1994). Nuclear localization of p185neu tyrosine kinase and its association with transcriptional transactivation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 203(3), 1589–1598.
- Yamamoto, H., Ochiya, T., Takahama, Y., Ishii, Y., Osumi, N., Sakamoto, H. & Terada, M. (2000). Detection of spatial localization of Hst-1/Fgf-4 gene expression in brain and testis from adult mice. *Oncogene*, 19(33), 3805–3810.
- Yan, Y. C., Sun, Y. & Zhang, M. (1998). Testis epidermal growth factor and spermatogenesis. *Cellular and Molecular Biology Research*, 40(2), 133–146. <https://doi.org/10.3109/01485019808987936>
- Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(2), 127–137. <https://doi.org/10.1038/35052073>
- Yeung, C. H., Nashan, D., Sorg, C., Oberpenning, F., Schulze, H., Nieschlag, E. & Cooper, T. G. (1994). Basal cells of the human epididymis—antigenic and ultrastructural similarities to tissue-fixed macrophages. *Biology of Reproduction*, 50(4), 917–926.
- Young, J.S., Guttman, J.A., Vaid, K.S., Shahinian, H. & Vogl, A.W. (2009). Cortactin (CTTN), N WASP (WASL), and clathrin (CLTC) are present at podosome-like tubulobulbar complexes in the rat testis. *Biology of Reproduction*, 80(1), 153–161.
- Young, J. S. and Vogl, A. W. (2012). Focal adhesion proteins zyxin and vinculin are co-distributed at tubulobulbar complexes. *Spermatogenesis*, 2(1), 63–68.
- Zaiss, D. M. W., van Loosdregt, J., Gorlani, A., Bekker, C. P. J., Gröne, A., Sibilio, M., van Bergen en Henegouwen, P. M. P., Roovers, R. C., Coffey, P. J. & Sijts, A. J. A. M. (2013). Amphiregulin enhances regulatory T cell-suppressive function via the epidermal growth factor receptor. *Immunity*, 38(2), 275–284. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.09.023>
- Zhang, F. P., Poutanen, M., Wilbertz, J. & Huhtaniemi, I. (2001). Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice.

Molecular Endocrinology, 15(1), 172–183. <https://doi.org/10.1210/me.15.1.172>

Zhang, M. L., Yan, Y. C., Sun, Y. P. & Koide, S. S. (1997). Identification and expression of epidermal growth factor gene in mouse testis. *Cell Research*, 7(1), 51–59. <https://doi.org/10.1038/cr.1997.6>

Zhixiang, M, Yawei, L., Jian, Z., Bo, Z. & Jinxing, L.V. (2022). Drug transport across the blood-testis barrier. *American Journal of Translational Research*, 14(9), 6412–6423.

Zhou, W., De luliis, G. N., Dun, M. D. & Nixon, B. (2018). Characteristics of the epididymal luminal environment responsible for sperm maturation and storage. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00059>

Zimmermann, S., Steding, G., Emmen, J. M. A., Brinkmann, A. O., Nayernia, K., Holstein, A. F., Engel, W. & Adham, I. M. (1999). Targeted disruption of the *Insl3* gene causes bilateral cryptorchidism. *Molecular Endocrinology*, 13(5), 681–691.

Zirkin, B. R. and Papadopoulos, V. (2018). Leydig cells: Formation, function, and regulation. *Biology of Reproduction*, 99(1), 101–111. <https://doi.org/10.1093/biolre/iroy059>

EKLER

Ek-1: Etik Kurul Kararı



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 21/06/2023
TOPLANTI NO : 2023-12
DOSYA NO : 2023-80
KARAR NO : 2023-12-108

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Histoloji – Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Emel Ergün'ün yaptığı, araştırmacı olarak Yahy Abood Kareem Alesawi'nin katıldığı "Rat (Wistar Albino) Testis ve Epididimisinin Postnatal Gelişimi ve Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü ile Ligandlarının Gelişimsel ve Spermatogenik Siklusa Bağlı Ekspresyonları Üzerinde Araştırmalar" başlıklı çalışma Üniversite senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi" ne göre değerlendirilmiş ve çalışmanın aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasının uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Sıçan
Hayvan Sayısı : 24
Geçerlilik Süresi : 01/12/2023-01/12/2025

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof. Dr. Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr. Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof. Dr. Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü	Ziraat Fakültesi	K	
Prof. Dr. Halit KANCA (Üye)	Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	

Doç. Dr. Gülnur GÖLLÜ BAHADIR (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Doç. Dr. Neşe Nuray TOPRAK (Üye)	Yemler ve Hayvan Besleme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	K	
Dr. Vet. Hek. Nigar YERLİKAYA (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	K	
Dr. Vet. Hek. Gürbüz ERTÜRK (Üye)	Active Veteriner Sağlık Merkezi	Serbest	E	
Uzm. Vet. Hek. Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	
Uzm. Vet. Hek. Attila İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Fatma Aysun COŞKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K	

