

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

(DOKTORA TEZİ)

**DENEYSEL TEKTARAFI KRIPTORŞİDİZM
OLUŞTURULMUŞ RATLARDA SERTOLİ HÜCRELERİ VE
BAĞLANTI KOMPLEKSLERİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN
HİSTOLOJİK YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

MEHMET TÜRKER

**DANIŞMAN
PROF.DR. FARUK ALKAN**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2010

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

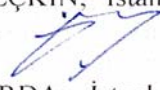
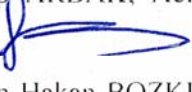
27 / 04 / 2010


Prof. Dr. Tamer DEMİR ALP
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ PROGRAMI
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☐ Doktora ☒
Anabilim Dalı : CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ A.D.
Tez Sahibi : MEHMET TÜRKER
Tez Başlığı : DENEYSEL TEKTARAFILİ KRİPTORŞİDİZM OLUŞTURULMUŞ RATLARDA SERTOLİ HÜCRELERİ VE BAĞLANTI KOMPLEKSLERİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN HİSTOLOJİK YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ
Sınav Yeri : Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 14 / 04 / 2010

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

- 1.Prof.Dr. Faruk ALKAN; İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.D. 
- 2.Prof.Dr. İsmail SEÇKİN; İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.D. 
- 3.Prof.Dr. Oktay ARDA; İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.D. 
- 4.Prof.Dr. Serap ARBAK; Acıbadem Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.D. 
- 5.Prof.Dr. Hasan Hakan BOZKURT; İstanbul Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.D. 

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

**Mehmet TÜRKER**

İTHAF

Tezimi

Annem Sayın **DÜRDANE TÜRKER** ve Babam Sayın **NAİL TÜRKER**'e
ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

En başta ve en önce sevgili annem Sayın DÜRDANE TÜRKER ve babam Sayın NAİL TÜRKER'e sonsuz teşekkürler borçluyum. Onlar olmasaydı bu tez hiçbir zaman olmayacaktı. Doktora yıllarım boyunca bütün maddi ihtiyaçlarımı karşıladılar ve doktoramı ancak onlar sayesinde tamamlayabildim. Kendilerine sonsuz şükranlarımı ve en derin minnetlerimi sunuyorum.

Doktora eğitimime katkıları olan sayın hocalarım, başta danışmanım Sayın Prof. Dr. Faruk ALKAN olmak üzere Prof. Dr. Oktay ARDA'ya, Prof. Dr. İsmail SEÇKİN'e, Prof. Dr. Mustafa TAŞYÜREKLİ'ye, Prof. Dr. Hüseyin OKTAR'a ve Prof. Dr. Şenol ERTÜRKOĞLU'na hepsine tek tek teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Doktoramın son senesinde aylık bir burs ile destek olan hocam Sayın Prof. Dr. Hüsrev HATEMİ Bey'e ve bu bursu temin eden Sayın Doç. Dr. Handan TUNCEL'e teşekkürler ediyorum. Doktora yaptığım yıllar içinde gösterdikleri yardımseverlik için amcam Sayın Mustafa TÜRKER ve kuzenim Sayın Hasan TÜRKER'e, değerli arkadaşlarım Sayın Ayşe Müesser KARLI ve Sayın Mevhibe ULAŞ'a ve motosiklet ustam Sayın Selahattin KAYNAŞ'a teşekkürleri bir borç bilirim; hakikaten zor günlerimde onların destekleri birer can simidi yerine geçti.

Tezimin kuruluş aşamasında yol gösterici yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç.Dr. Nezih HEKİM Bey'e, morfometrik çalışma metodlarını öğreten Sayın Prof.Dr. Hasan Hakan BOZKURT Bey'e ve istasitsik sonuçlarının hazırlanmasında yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Ahmet DİRİCAN Bey'e teşekkürlerimi bir borç bilirim. Tezimin hayvan çalışmaları sırasında büyük yardımlarını gördüğüm İstanbul Üniversitesi DETAE'den Dr. Aydın ÇELİK ve Dr. Rivaze BULUT'a, ayrıca hayvan laboratuvarı çalışanlarına teşekkürleri bir borç bilirim. Tezimin elektron mikroskopi parçalarının hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen bölümümüz teknisyenleri Sayın Azize HARDAL GÜMÜŞYAZICI ve Sayın Ercüment BOZTAŞ'a ve elektron mikroskopi kesitlerimi resimlerken yardımcı olan Çapa Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı teknisyeni Sayın Ebru KARABULUT'a, teşekkürler ederim. Tezimin son nüshalarını okuyarak düzeltmelerini yapan sevgili arkadaşım Sayın Tuğçe Sevgi ERTEKİN'e, kaynakça listesini hazırlarken büyük emeği geçen sevgili arkadaşım Sayın Birgül UÇAR'a, arkadaşlarım Sayın Hande KALEM ve Sayın Kübra CİĞERİM'e burada teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje no: **T-94/15122006**

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	X
GRAFİKLER LİSTESİ.....	Xİ
ŞEKİLLER – RESİMLER LİSTESİ	Xİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XVİİİ
ÖZET	XİX
ABSTRACT	XX
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Testisin Embriyolojisi	3
2.1.1. Farklılaşmamış Gonad	4
2.1.2. Testislerin Gelişimi	6
2.1.3. İnguinal Kanalların Gelişimi ve Testislerin İnişi	9
2.2. Testisin Histolojisi	14
2.2.1. İnterstisyel Doku - Tunika propria	15
2.2.2. Seminifer Tübüller	16
2.2.3. Spermatogenik Hücreler	18
2.2.4. Spermatogenez	18
2.2.4.1. Spermatogonyum fazı (mitoz).....	18
2.2.4.2. Spermatozit fazı (mayoz).....	20
2.2.4.3. Spermatid fazı (spermiyogenez).....	20
2.2.5. Seminifer Epitel Döngüsü	22
2.3. Sertoli Hücresi.....	25
2.3.1. Sertoli Hücresi Kökeni ve Embriyonal Gelişimi	25
2.3.2. Sertoli Hücresi Morfolojisi	26
2.3.2.1. Hücre İskeleti	29
2.3.2.2. Bağlantı Kompleksleri.....	36

2.3.3. Sertoli Hücresi Fonksiyonları.....	67
2.3.3.1. Yapısal Desteklik.....	67
2.3.3.2. Bariyer Oluşturması	68
2.3.3.3. Germ Hücresi Hareketi Ve Spermiasyon	69
2.3.3.4. Fagositoz, Pinositoz, Reseptör-Aracılı Endositoz.....	70
2.3.3.5. Salgı Fonksiyonları	71
2.3.3.6. Besin Sağlama	72
2.4. Kriptorşidizm.....	74
2.4.1. Kriptorşidizmin Testis Üzerindeki Etkileri	76
2.4.2. Kriptorşidizmin Etiyolojisi ve Bilinen Risk Faktörleri	78
2.4.2.1. Androjenler.....	79
2.4.2.2. Müllerian Inhibiting Substance - Anti-Müllerian Hormon.....	80
2.4.2.3. İnsulin-Like Factor-3	81
2.4.2.4. Östrojenler.....	82
2.4.2.5. Transkripsiyon Faktörü Hox	83
2.4.2.6. Genitofemoral Sinir ve “Calcitonin Gene Related Peptid” (CGRP).....	83
2.4.2.7. Çevresel Faktörler.....	84
2.5. Deneysel Model	86
2.5.1. Kriptorşid Hayvan Elde Etmek için Kullanılan Deneysel Modeller	87
2.5.1.1. Cerrahi Yöntemler	87
2.5.1.2. Östrojenle oluşturulmuş kriptorşidizm.....	88
2.5.1.3. Genetik modeller	89
2.5.1.4. Spontan kriptorşidizmi olan hayvan soyları	89
3. GEREÇ VE YÖNTEM	91
3.1. Gereçler	91
3.2. Yöntem.....	94
3.2.1. Operasyon	95
3.2.2. Işık Mikroskopisi	100
3.2.2.1. Perfüzyon Fiksasyonu	100
3.2.2.2. Parafin Takibi ve Kesit.....	105
3.2.2.3. Genel Işık Mikroskobu.....	105
3.2.2.4. İmmünohistokimya	106
3.2.2.5. Apoptoz Tayini	108

3.2.2.6. Değerlendirme	110
3.2.3. Geçirimli Elektron Mikroskopisi	112
3.2.3.1. Perfüzyon Fiksasyonu ve Lanthan'la İşaretleme	112
3.2.3.2. Araldit Takibi ve Kesit	114
3.2.3.3. Kontrastlama	115
3.2.3.4. Değerlendirme	115
3.2.4. İstatistiki Yöntemler	116
3.2.5. Çalışma Düzeni ve Deney Gruplarının Oluşturulması	117
4. BULGULAR	118
4.1. Morfometrik Bulgular	118
4.1.1. Testis Ağırlıkları ve Ağırlık Farkları	118
4.1.2. Apoptotik Hücreler	118
4.1.3. Seminifer Tübül Duvar Kalınlığı	122
4.1.4. Germ Hücreleri	122
4.2. Genel Işık Mikroskobu Bulguları	125
4.2.1. Birinci Gün Bulguları	125
4.2.2. Üçüncü Gün Bulguları	127
4.2.3. Yedinci Gün Bulguları	129
4.2.4. Ondördüncü Gün Bulguları	131
4.3. İmmünohistokimya Bulguları	133
4.3.1. Tübülin	133
4.3.2. Vimentin	138
4.3.3. Koneksin 43	143
4.4. Geçirimli Elektron Mikroskobu Bulguları	148
4.4.1. Birinci Gün Bulguları	148
4.4.2. Üçüncü Gün Bulguları	151
4.4.3. Yedinci Gün Bulguları	154
4.4.4. Ondördüncü Gün Bulguları	158
5. TARTIŞMA	165
5.1. Yöntem	165
5.2. Genel Morfoloji	165
5.3. Apoptoz	167
5.4. Hücre İskeleti	168

5.4.1. Mikrotübüller.....	168
5.4.2. Vimentin	170
5.5. Hücre Bağlantıları.....	172
5.5.1. Kan-Testis Bariyeri ve Adezyon Bağlantıları	172
5.5.2. İletişim bağlantıları - Koneksin 43.....	175
5.6. Sertoli Hücresi İşlevselliği	177
5.7. Kontralateral Skrotal Testis.....	179
5.8. SONUÇ ve ÖNERİLER	182
KAYNAKLAR	183
ETİK KURUL KARARI	211
ÖZGEÇMİŞ	212

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Testiste Bulunan Ara Filamanlar.....	33
Tablo 4-1: Testis Ağırlık Ortalamaları.....	119
Tablo 4-2: Sağ-Sol Testis Ağırlık Farkları.....	120
Tablo 4-3: Apoptotik Hücre Sayımı Ortalamaları.....	121
Tablo 4-4: Seminifer Tübül Ortalama Duvar Kalınlığı.....	123
Tablo 4-5: Germ Hücresi Sayımı Ortalamaları.....	124

GRAFİKLER LİSTESİ

Grafik 4-1: Testis Ağırlık Ortalamaları.....	119
Grafik 4-2: Sağ-Sol Testis Ağırlık Farkları.....	120
Grafik 4-3: Apoptotik Hücre Sayımı Ortalamaları.....	121
Grafik 4-4: Seminifer Tübül Ortalama Duvar Kalınlığı.....	123
Grafik 4-5: Germ Hücresi Sayımı Ortalamaları.....	124

ŞEKİLLER – RESİMLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Testislerin gelişimi.....	5
Şekil 2-2: Dorsal ve ventral asıcı ligamentlerin farklılaşması.....	6
Şekil 2-3: Mezonefrik Wolff kanalı ve Paramezonefrik Müller kanalının dönüşümü.....	7
Şekil 2-4 : İnguinal kanallar ve inmemiş testisin skrotum dışındaki yerleşim yerleri	9
Şekil 2-5: Testisin inişi basamakları.....	11
Şekil 2-6: Testis, lobüler yapısı, seminifer tübül duvarı ve interstisyum.....	17
Şekil 2-7: Sıçanlarda seminifer epitel döngüsünün 14 basamağı.....	23
Şekil 2-8: Sıçanlarda hücrel olarak seminifer epitel döngüsü basamakları.....	24
Şekil 2-9: Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücrelerle ilişkisi.....	28
Şekil 2-10: Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücrelerle ilişkisi.....	28
Şekil 2-11: Sertoli hücresi ince yapısı.....	31
Şekil 3-1: Çalışmada kullanılan sıçanlardan bir örnek.....	94
Şekil 3-2: Deride yapılan kesi sonucu ortaya çıkan gubernakulum.....	96
Şekil 3-3: Gubernakulum izole edildikten sonra.....	96
Şekil 3-4: Gubernakulum ters-yüz edilip abdominal kavite içine itildikten sonra.....	97
Şekil 3-5: Gubernakulum dikildikten sonra.....	97
Şekil 3-6: İnguinal bölgedeki kesi kapatıldıktan sonra.....	98
Şekil 3-7 - Şekil 3-8 - Şekil 3-9: Kriptorşid hayvana ait testislerin görünümü.....	99
Şekil 3-10: LKB Bromma Multiperpex 2115 peristaltik pompa.....	102
Şekil 3-11: Perfüzyonu işlemleri için kullanılan tekne.....	102
Şekil 3-12 – 3-15 Perfüzyon basamakları.....	103
Şekil 3-16 - 3-19 Perfüzyon basamakları.....	104
Şekil 3-20: 14. gün sağ skrotal testise ait kesitin TUNEL boyaması.....	109
Şekil 3-21: 14. gün sol kriptorşid testise ait kesitin TUNEL boyaması.....	109
Şekil 3-22: TUNEL testi negatif kontrol ve TUNEL+ boyanma.....	111
Şekil 3-23: Stereolojik sayımda kullanılan 100 noktalı sayım gratikülü.....	111
Şekil 3-24: Sayım gratikülü noktalarının hücrelerin üzerindeki görünüşü.....	111

Şekil 4-1: ışık mikroskobu 1. gün kontrol grubu testis kesiti.....	126
Şekil 4-2: ışık mikroskobu 1. gün sol kriptorşid testis kesiti.....	126
Şekil 4-3: ışık mikroskobu 1. gün sağ skrotal testis kesiti.....	126
Şekil 4-4: ışık mikroskobu 3. gün kontrol grubu testis kesiti.....	128
Şekil 4-5: ışık mikroskobu 3. gün sol kriptorşid testis kesiti.....	128
Şekil 4-6: ışık mikroskobu 3. gün sağ skrotal testis kesiti.....	128
Şekil 4-7: ışık mikroskobu 7. gün kontrol grubu testis kesiti.....	130
Şekil 4-8: ışık mikroskobu 7. gün sol kriptorşid testis kesiti.....	130
Şekil 4-9: ışık mikroskobu 7. gün sağ skrotal testis kesiti.....	130
Şekil 4-10: ışık mikroskobu 14. gün kontrol grubu testis kesiti.....	132
Şekil 4-11: ışık mikroskobu 14. gün sol kriptorşid testis kesiti.....	132
Şekil 4-12: ışık mikroskobu 14. gün sağ skrotal testis kesiti.....	132
Şekil 4-13: 1. gün kontrol grubu testis kesitinde tübülün boyaması ve negatif kontrol.....	134
Şekil 4-14: 1. gün sol kriptorşid testis kesitinde tübülün boyaması.....	134
Şekil 4-15: 1. gün sağ skrotal testis kesitinde tübülün boyaması.....	134
Şekil 4-16: 3. gün kontrol grubu testis kesitinde tübülün boyaması.....	135
Şekil 4-17: 3. gün sol kriptorşid testis kesitinde tübülün boyaması.....	135
Şekil 4-18: 3. gün sağ skrotal testis kesitinde tübülün boyaması.....	135
Şekil 4-19: 7. gün kontrol grubu testis kesitinde tübülün boyaması.....	136
Şekil 4-20: 7. gün sol kriptorşid testis kesitinde tübülün boyaması.....	136
Şekil 4-21: 7. gün sağ skrotal testis kesitinde tübülün boyaması.....	136
Şekil 4-22: 14. gün kontrol grubu testis kesitinde tübülün boyaması.....	137
Şekil 4-23: 14. gün sol kriptorşid testis kesitinde tübülün boyaması.....	137
Şekil 4-24: 14. gün sağ skrotal testis kesitinde tübülün boyaması.....	137

Şekil 4-25: 1. gün kontrol grubu testis kesitinde vimentin boyaması ve negatif kontrol.....	139
Şekil 4-26: 1. gün sol kriptorşid testis kesitinde vimentin boyaması.....	139
Şekil 4-27: 1. gün sağ skrotal testis kesitinde vimentin boyaması.....	139
Şekil 4-28: 3. gün kontrol grubu testis kesitinde vimentin boyaması.....	140
Şekil 4-29: 3. gün sol kriptorşid testis kesitinde vimentin boyaması.....	140
Şekil 4-30: 3. gün sağ skrotal testis kesitinde vimentin boyaması.....	140
Şekil 4-31: 7. gün kontrol grubu testis kesitinde vimentin boyaması.....	141
Şekil 4-32: 7. gün sol kriptorşid testis kesitinde vimentin boyaması.....	141
Şekil 4-33: 7. gün sağ skrotal testis kesitinde vimentin boyaması.....	141
Şekil 4-34: 14. gün kontrol grubu testis kesitinde vimentin boyaması.....	142
Şekil 4-35: 14. gün sol kriptorşid testis kesitinde vimentin boyaması.....	142
Şekil 4-36: 14. gün sağ skrotal testis kesitinde vimentin boyaması.....	142
Şekil 4-37: 1. gün kontrol grubu testis kesitinde koneksin boyaması ve negatif kontrol.....	144
Şekil 4-38: 1. gün sol kriptorşid testis kesitinde koneksin boyaması.....	144
Şekil 4-39: 1. gün sağ skrotal testis kesitinde koneksin boyaması.....	144
Şekil 4-40: 3. gün kontrol grubu testis kesitinde koneksin boyaması.....	145
Şekil 4-41: 3. gün sol kriptorşid testis kesitinde koneksin boyaması.....	145
Şekil 4-42: 3. gün sağ skrotal testis kesitinde koneksin boyaması.....	145
Şekil 4-43: 7. gün kontrol grubu testis kesitinde koneksin boyaması.....	146
Şekil 4-44: 7. gün sol kriptorşid testis kesitinde koneksin boyaması.....	146
Şekil 4-45: 7. gün sağ skrotal testis kesitinde koneksin boyaması.....	146
Şekil 4-46: 14. gün kontrol grubu testis kesitinde koneksin boyaması.....	147
Şekil 4-47: 14. gün sol kriptorşid testis kesitinde koneksin boyaması.....	147
Şekil 4-48: 14. gün sağ skrotal testis kesitinde koneksin boyaması.....	147

Şekil 4-49: 1. gün kontrol grubu testiste seminifer tübül duvarından genel görünüm.....	149
Şekil 4-50: 1 gün kontrol grubu seminifer tübül duvarında germ hücreleri arasında yer alan Sertoli hücresi sitoplazması.....	149
Şekil 4-51: 1 gün kontrol grubunda Sertoli hücresi bazal ektoplazmik özelleşme ve sıkı bağlantı kompleksleri.....	149
Şekil 4-52: 1 gün sol kriptorşid testiste seminifer tübül duvarından genel görünüm.....	150
Şekil 4-53: 1 gün sol kriptorşid testiste germ hücreleri arasında yer alan Sertoli hücresi sitoplazması.....	150
Şekil 4-54: 1 gün sol kriptorşid testiste lanthan sızmış hücrelerarası alan.....	150
Şekil 4-55: 3. gün kontrol grubu testiste seminifer tübül duvarından genel görünüm.....	152
Şekil 4-56: 3. gün kontrol grubu seminifer tübül duvarında germ hücreleri arasında yer alan Sertoli hücresi sitoplazması.....	152
Şekil 4-57: 3. gün kontrol grubu seminifer tübül duvarında bazal bölümde Sertoli hücreleri arasındaki normal görünümlü bağlantı kompleksi.....	152
Şekil 4-58: 3. gün sol kriptorşid testiste seminifer tübül duvarından genel görünüm ve lanthan sızmış hücrelerarası alan.....	153
Şekil 4-59: 3 gün sol kriptorşid testiste seminifer tübülün bazal kısmında sıkı bağlantı kompleksinde dejenerasyon ve açılmalarla.....	153
Şekil 4-60: 3 gün sol kriptorşid testiste lanthan sızmış hücreler arası alan ve Sertoli hücresinde vakuollenmeler.....	153
Şekil 4-61: 7. gün kontrol grubu testiste seminifer tübül duvarından genel görünüm.....	155
Şekil 4-62: 7 gün kontrol grubu germ hücreleri arasındaki normal görünümlü Sertoli hücresi sitoplazması ve bağlantı kompleksi.....	155
Şekil 4-63: 7. gün kontrol grubu bazal ektoplazmik özelleşme bağlantısında aktin filamanlar ve ER sisternaları.....	155

Şekil 4-64: 7 gün sol kriptorşid testiste seminifer tübülün bazal kısmında lanthan sızmış hücreler arası alanlar.....	156
Şekil 4-65: 7. gün sol kriptorşid testiste seminifer tübül bazalinde Sertoli hücrelerinden ayrılmış germ hücreleri.....	156
Şekil 4-66: 7. gün sol kriptorşid testiste bazal ektoplazmik özelleşme bağlantısında dejenere alan, ER sisternaları ve aktin filamanları.....	156
Şekil 4-67: 7. gün sol kriptorşid testiste Sertoli hücreleri arasındaki bazal ektoplazmik özelleşmelerde meydana gelen ayrılma.....	157
Şekil 4-68: 7. gün sol kriptorşid testiste Sertoli hücreleri bağlantı kompleksinde meydana gelen dejenerasyon.....	157
Şekil 4-69: 7. gün sol kriptorşid testiste Sertoli hücreleri bağlantı kompleksinde meydana gelen dejenerasyon.....	157
Şekil 4-70: 14. gün kontrol grubu testiste seminifer tübül duvarından genel görünüm.....	159
Şekil 4-71: 14. gün kontrol grubu germ hücreleri arasındaki normal görünümlü Sertoli hücresi sitoplazması.....	159
Şekil 4-72: 14. gün kontrol grubu normal görünümlü seminifer tübül bazalinde lanthan parçacıklarını tutmuş bir bağlantı kompleksi.....	159
Şekil 4-73: 14. gün sol kriptorşid testiste seminifer tübül duvarından genel görünüm.....	160
Şekil 4-74: 14. gün sol kriptorşid testiste seminifer tübül duvarında vakuoller, seminifer epitelden ayrılan spermatositler, spermatositlerin dökülmesi sonucu oluşan boşluk.....	160
Şekil 4-75: 14. gün sol kriptorşid testiste seminifer tübül duvarından uzamış Sertoli hücresi çekirdeği, seminifer epitelden ayrılmış spermatosit ve bağlantı kompleksinde açılmalar.....	160

- Şekil 4-76: 14. gün sol kriptorşid testiste Sertoli hücrelerinden ayrılmış spermatositler ve bazal membrandan ayrılmış bir spermatogonyum.....161
- Şekil 4-77: 14. gün sol kriptorşid testiste bazal membrandan ayrılmış Sertoli hücresi sitoplazmik uzantıları ve spermatogonyum.....161
- Şekil 4-78: 14. gün sol kriptorşid testiste seminifer tübül duvarından dejeneratif alan, vakuoller, parçalar halinde bağlantı kompleksleri.....161
- Şekil 4-79: 14. gün sol kriptorşid testiste seminifer tübül duvarından dejeneratif alan; dilate olmuş ER sisternaları vakuoller, membransı yapılar.....162
- Şekil 4-80: 14. gün sol kriptorşid testiste seminifer tübül duvarından dejeneratif alan; multiveziküler cisimcik.....162
- Şekil 4-81: 14. gün sol kriptorşid testiste seminifer tübül duvarının apikal kısımlarında birbirinden ayrılmış ve dağılmış hücre bölümleri, dilate olmuş ER sisternaları ve membransı yapı.....162
- Şekil 4-82: 14. gün sol kriptorşid testiste seminifer tübül duvarından iki Sertoli hücresi arasındaki bağlantı kompleksinde açılmalar.....163
- Şekil 4-83: 14. gün sol kriptorşid testiste seminifer tübül duvarında iki Sertoli hücresi arasındaki bağlantı kompleksinde açılmalar ve Sertoli hücresinden ayrılmış spermatosit.....163
- Şekil 4-84: 14. gün sol kriptorşid testiste ektoplazmik özelleşme bağlantı kompleksinin sağ tarafında endoplazmik retikulumun yok olması sonucu dağılan aktin filamanları ve dilate olmuş ER sisternaları.....163
- Şekil 4-85: 14. gün sol kriptorşid testiste seminifer tübül duvarından Sertoli hücreleri arasında lanthan parçacıkları sızmış hücreler arası alanlar.....164
- Şekil 4-86: 14. gün sol kriptorşid testis seminifer tübül duvarından Sertoli hücreleri arasında lanthan parçacıkları sızmış alan ve Sertoli hücresinde dejenerasyon.....164

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

KTB	kan-testis bariyeri
MIS	Mullerian İnhibiting Substance
AMH	Anti Mullerian Hormon
Cn	Koneksin
Cn43	Koneksin 43
SCO	Sertoli Cell Only
FSH	Folikül Stimulan Hormon
LH	Lüteinizan Hormon
ABP	Androjen Bağlayıcı Protein
ER	Endoplazmik Retikulum
GER	Granüllü Endoplazmik Retikulum
DER	Düz Endoplazmik Retikulum
CIS	Carsinoma In-situ Cells
INSL3	Insulin Like Factor 3 – İnsülin Benzeri Faktör 3
MDCK	Madine-Darby Canine Kidney - Madine-Darby Köpek Böbreği
H-E	Hematoksilen ve Eozin

ÖZET

Türker M. Deneysel Tektarafli Kriptorşidizm Oluşturulmuş Ratlarda Sertoli Hücreleri ve Bağlantı Komplekslerindeki Değişikliklerin Histolojik Yöntemlerle İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi. İstanbul. 2010.

Sunulan çalışmada, cerrahi inguinokrotal yöntemle prepubertal sıçanlarda deneysel tek tarafli kriptorşidizm modeli oluşturularak, bu model üzerinde kriptorşid ve skrotal testislerin Sertoli hücrelerinde meydana gelen değişikliklerin, kriptorşid testislerde gözlenen apoptoz olgusu etrafında değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Sol gubernakulumları dikilerek bağlanan hayvanlar sağ testislerinin skrotuma inişinden itibaren 1., 3., 7. ve 14. günlerde perfüzyon fiksasyonu ile sakrifiye edildi; geçirimli elektron mikroskopisi için lanthanum nitrat içeren fiksatif kullanıldı. Apoptotik hücrelerin tayini için TUNEL testi kullanıldı. Skrotal testislerin ağırlıkları kriptorşid ve kontrol testislere nazaran artmıştı ama bu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmadı. Stereolojik ölçümler sonucunda, apoptotik hücrelerin sayısı kriptorşid testislerde kontrol ve skrotal testislere nazaran anlamlı oranda artmış bulundu, ama skrotal testisle kontrol testisleri arasında anlamlı fark yoktu. Germ hücrelerinin sayısı hem kriptorşid hem de skrotal testislerde kontrol grubuna nazaran anlamlı oranda düşmüş bulundu. Seminifer tübül duvar kalınlıkları skrotal testislerde, gerek kriptorşid testislere gerekse kontrol testislere nazaran anlamlı şekilde daha kalın bulundu. Kriptorşid testislerde alfa-tübülin, ve koneksin 43 immünreaktivitesinin 1. günden itibaren bozulmuş olduğu, vimentin immünreaktivitesinin çalışmanın bütün gruplarında bozulmadan kaldığı gözlemlendi. Elektron mikroskopisi düzeyinde kriptorşid testislerde kan-testis bariyerinin açılmalar ve dilatasyonlarla bozulmuş olduğu ve bunun neticesi olarak hücreler arası alana lanthan partiküllerinin sızdığı, bazal ektoplazmik özelleşmeleri destekleyen aktin ve endoplazmik retikulum yapılarında dejenerasyon olduğu, Sertoli hücreleri sitoplazmik elemanlarında yaygın dejenerasyon meydana geldiği, germ hücrelerinin Sertoli hücrelerinden ayrıldıkları, Sertoli hücrelerinin de bazal membrandan ayrılmalar gösterdikleri gözlemlendi. Sonuç olarak, Kriptorşidizmin Sertoli hücrelerinde yaygın dejenerasyona neden olduğu, hücre iskeletlerini ve bağlantı komplekslerini bozduğu, germ hücrelerinin apoptoza uğrayarak seminifer epitelden ayrılmasına neden olduğu, kontralateral skrotal testisleri de etkileyerek spermatogenezi olumsuz yönde etkilediği kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: Kriptorşidizm, Sertoli hücresi, bağlantı kompleksi, mikrotübül, vimentin.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje no: **T-94/15122006**

ABSTRACT

Turker M. Histological Examination of Alterations in the Sertoli Cell Cytoskeleton and Junctions After Experimental Unilateral Cryptorchidism. Istanbul University, Institute of Medical Sciences, Histology and Embryology Department Doctorate Thesis. Istanbul. 2010.

In the present study it is aimed to create a unilateral cryptorchidism model on prepubertal rats via surgical inguinoscrotal method and to evaluate the changes in the Sertoli cells of cryptorchid and contralateral scrotal testicles around the apoptosis phenomenon which appears in the cryptorchid testicles. Rats of which left gubernaculum fixed by sutures sacrificed via perfusion fixation on the 1., 3., 7. and 14. days after descent of the right testicle to the scrotum; fixatives containing lanthanum nitrate used for animals destined to be used for electron microscopic evaluations. Apoptotic cells detected via TUNEL test. Weights of the scrotal testicles were higher than that of the both cryptorchid and control testicles, but this increase was not statistically significant. According to stereological estimations, the number of the apoptotic cells of cryptorchid testicles was significantly higher than that of the both control and scrotal testicles, but there wasn't any significant difference between the control and the scrotal testicles. The number of the germ cells both in cryptorchid and scrotal testicles were significantly lower than that of the control testicles. Seminiferous epithelial walls of the scrotal testicles were significantly thicker than that of the both control and cryptorchid testicles. Immunoreactivity of both alpha-tubulin and connexin 43 decreased in the cryptorchid testicles by the 1. day and later on, but the immunoreactivity of vimentin did not change throughout the study. Electron microscopic examinations revealed that, blood-testis barrier of the cryptorchid testicles had dilatations and partial degenerations which caused leakage of the lanthanum particles to the intercellular space; and that, basal ectoplasmic specializations had severe degenerations of actin filaments and of endoplasmic reticulum cisterns that support these structures; and that, Sertoli cells had cytoplasmic degenerations; and that germ cells detached from the Sertoli cells while Sertoli cells detached from the basal membrane. It is concluded that, cryptorchidism had widespread degenerative effects on Sertoli cells, and caused damages on the cytoskeletal and junctional structures, and this situation caused germ cells to be detached from the seminiferous epithelium because of cell death via apoptosis. Cryptorchidism also effected the contralateral testicles and caused spermiogenesis to decrease in this testicles.

Key words: Cryptorchidism, Sertoli cell, junctions, microtubule, vimentin

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University.
Project No: **T-94/15122006**

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kriptorşidizm, doğumda testislerin skrotuma inmemiş olması ile karakterize olan ve erkek yeni doğanları en yaygın şekilde etkileyen doğumsal bir kusurdur.

İnmemiş testisin etiyolojisi hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Multifaktöryel olduğu yönünde bulgular mevcuttur. Vakaların çoğunluğundaki anomalinin, gebeliğin ikinci yarısında yeterli testosteron üretiminin uyarılması için gerekli olan plasental koriyonik gonadotropin eksikliğine bağlı olarak gubernakulum ve testisin inguinal bölgeden skrotum içine göçünün gerçekleşmemesi olduğundan şüphelenilmektedir. Testosteron, MIS ve Ins13 üretimindeki hormonal bozukluklar testiküler iniş anomalilerine sebep olabilmektedir ancak bunların hep birlikte meydana gelmesi nadirdir (1,2,3,4,5,6).

Testislerin doğumdan sonra skrotuma inişinin sekteye uğramış olması testisin fizyolojisinde ve biyokimyasında ilerleyen anomalilere sebep olur. Skrotal testisin ısısı merkezi vücut ısısından 4 derece daha düşüktür ve testis fizyolojisi doğumdan sonra bu düşük sıcaklıkta çalışmak üzere programlanmıştır. Testisin bu sıcaklıkta olmamasının testiste, hormon üretimi ve fizyolojisi ile germ hücrelerinin gelişimiyle ilgili ikincil anomalilere sebep olduğu kabul edilmektedir. (1,2,3,4,6, 7,8,9).

Batı toplumlarında inmemiş testis, erken doğumlarda %30, zamanında gerçekleşmiş doğumlarda ise %2-6 oranında görülmektedir. Bununla birlikte inmemiş testislerin önemli bir bölümü doğumdan sonraki ilk 3 ay zarfında spontan olarak inmektedir. Puberte çağında ise yaklaşık %1-2 oranında inmemiş testis vakası bulunur. Bunlar skrotuma göç fazını tamamlayamamış gonadlardır ve konjenital inmemiş testis olarak adlandırılırlar. Vakaların %85 kadarı tek taraflı inmemiş testis olarak ortaya çıkar (3,4,10,11,12,13,14,15,16).

Yapılan araştırmalarda kriptorşidizmin germ hücrelerinde kayba sebep olduğu bunun ise temel olarak apoptoz yoluyla gerçekleştiği ifade edilmektedir. Bununla birlikte germ hücreleri apoptozunun altında yatan nedenler tam olarak aydınlatılabilmiş değildir (10,11,14,15,17,18,19,20,21,22,23,24).

Apopitoza yol açan çeşitli etkenler arasında gerek germ hücrelerine gerekse Sertoli hücrelerine ait hücre iskelet yapısını oluşturan aktin ve ara filamanlar ile mikrotübüllerin yapılarının dejenere olması veya hücre içi dağılımlarının bozulması (21,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34), iletişim bağlantılarının ortadan kalkması (35,36,37,38,39,40), sıkı bağlantı komplekslerinin bozulması sayılabilmektedir (38,41,42,43).

Amaç

Kriptorşidizmin germ hücreleri ve Sertoli hücreleri üzerindeki etkileri halen tam olarak anlaşılamamış yoğun ilgi ve araştırma konusudur. Kriptorşidizmin Sertoli hücrelerinin bağlantı kompleksleri üzerine etkilerini inceleyen araştırmalar sınırlı kalmış, ancak az sayıda yayına rastlanılabilmektedir (44,45,46,47).

Sunulan çalışmada Sertoli hücreleri ince yapısı, kriptorşidizm ve apopitoz konularındaki mevcut verilerden yola çıkılarak, deneysel cerrahi yöntemle oluşturulmuş tek taraflı sol inmemiş testis modelinde, kriptorşidizmin Sertoli hücresi iskelet yapısı ve bağlantı kompleksleri üzerinde meydana getirdiği değişikliklerin stereolojik, immünohistokimyasal ve elektronmikroskopik yöntemlerle incelenmesi amaçlanmıştır. Diğer yandan Sertoli hücrelerinde meydana gelen bu değişikliklerin inmemiş testisteki apopitoz olgusu ile ilişkisi tartışılmıştır.

Tek taraflı kriptorşidizm vakalarında kontralateral skrotal testisin de eşzamanlı olarak herhangi bir dejeneratif etkiye uğrayıp uğramadığı tartışma konusudur (4,17,48,49,50,51). Bu nedenle abdominal kriptorşid testisler için uygulanan histolojik teknikler skrotal testisler için de kullanılarak, inmemiş ve inmiş her iki taraftaki testis bulgularının hem kendi aralarında hem de kontrol grubu bulguları ile karşılaştırılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testisin Embriyolojisi

Cinsiyetin Belirlenmesi

Genetik cinsiyet döllenme ile belirlenir. X kromozomu taşıyan ovumun X veya Y kromozomu taşıyan sperm ile döllenmesine bağlıdır. X kromozomu taşıyan sperm ile döllenme sonucunda XX, y kromozomu taşıyan sperm ile döllenme sonucu ise XY cinsiyet kromozomu kompleksi taşıyan embriyolar gelişir (52,53,54,55,56).

Cinsiyetin belirlenmesi ve erkek fenotipinin gelişimi için Y kromozomunun kısa kolu son derece kritiktir. Y kromozomunu kısa kolundaki “Cinsiyet-Belirleme Bölgesi”nde (Sex-Determining Region) bulunan SRY geni tarafından kodlanan özel bir DNA-bağlayıcı protein olan “Testis Belirleyici Faktör” (Testis-Determining Factor (TDF)) testis gelişimi ve farklılaşmasının başlıca sorumlusudur. Bu düzenleyici faktörün etkisi altında, primitif cinsiyet kordonları seminifer tübüllere farklılaşırlar (52,53,54,55,56).

Primordial Germ Hücreleri

Yuvarlak biçimli primitif cinsiyet hücreleri 4. hafta başında yolk kesesi duvarında, allantoisin başlangıç yerine yakın, endodermal hücreler arasında ortaya çıkarlar. Embriyonun katlanmaları sırasında, yolk kesesinin dorsal parçası embriyo içerisine dahil olur. Bu olurken, primordial germ hücreleri, arka barsağın dorsal mezenteri boyunca gonadal kabartılara göç ederler (Şekil 2-1a). 5. haftada primordial germ hücreleri gonadal kabartı mezenşimi içerisine girerler. Primordial germ hücrelerinin genital kabartılara göçü, ürogenital kabartıdaki mezodermal hücrelerin ve sölomik mezotel hücrelerinin çoğalmasına neden olur ve primitif cinsiyet kordonlarının oluşumuna yol açar (Şekil 2-1b). Çoğalan sölomik mezotel hücreleri ve primordial germ hücreleri

kümelenerek primitif cinsiyet kordonlarını oluştururken göç eden mezodermal hücreler bu primitif cinsiyet kordonlarını sararlar. 6. haftadan itibaren primordial germ hücreleri bu primitif cinsiyet kordonlarının içinde bulunurlar (Şekil 2-1c,d) (53,54,56,57,58).

2.1.1. Farklılaşmamış Gonad

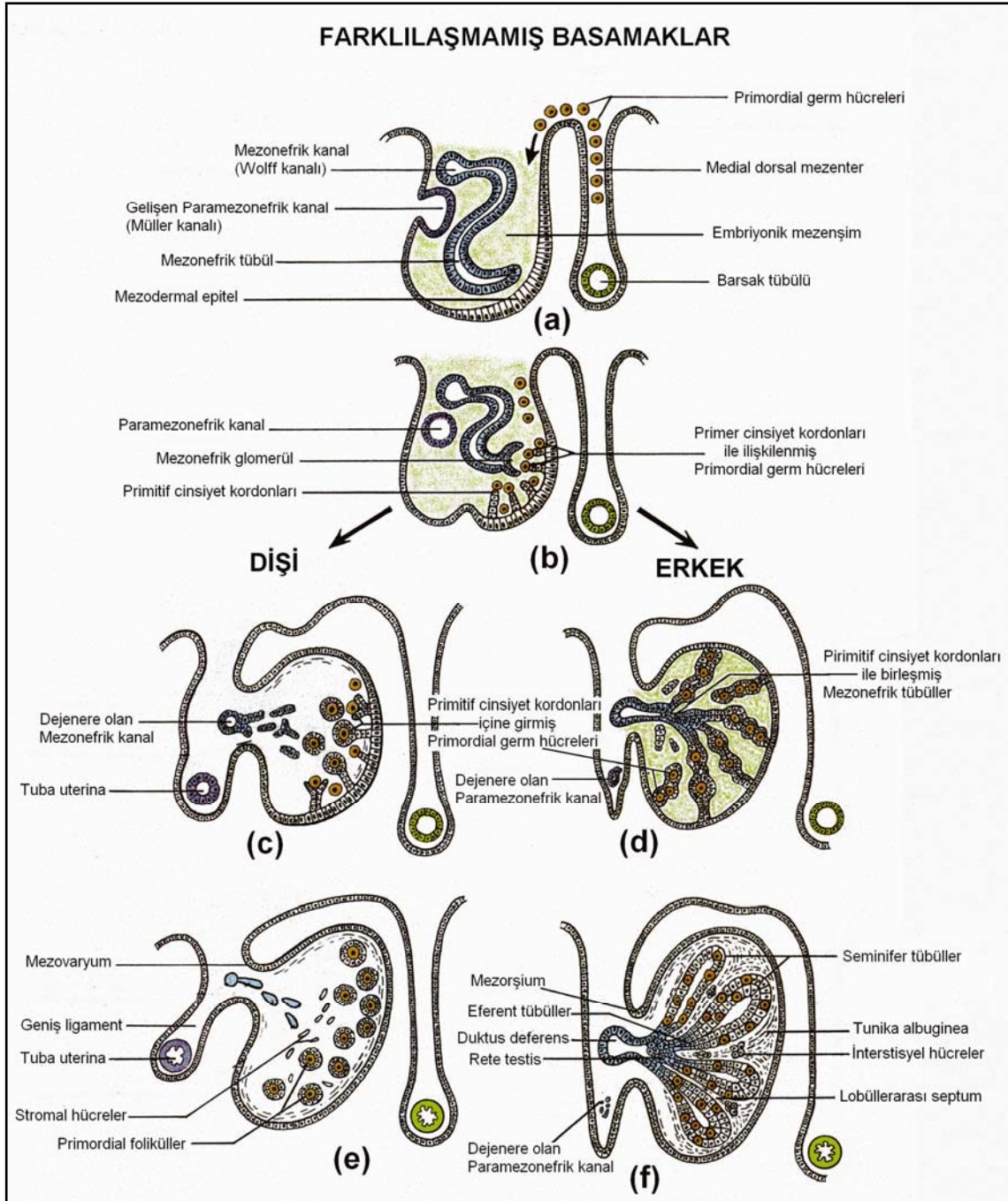
Gonadal gelişimin ilk safhaları 5. haftada ortaya çıkar. Retroperitoneal bölgede karın duvarının arka tarafında mezonefrozun medialinde, epitelin ve altındaki mezenşimin çoğalması ile bir kabarıklık, yani gonadal kabartı meydana gelir (Şekil 2-1a). Bu yapı üç farklı doku ihtiva etmektedir; birincisi posterior abdominal duvarın mezotelyumu olan mezodermal epiteldir ve ürogenital kabartıları döşer; ikincisi embriyonik mezenşimdir ve posterior karın duvarında ürogenital kabartıları oluşturur; üçüncüsü primordial germ hücreleridir, yolk kesesinden çıkıp gelişmekte olan gonada yerleşirler ve daha sonra spermatogonyumlara farklılaşırlar (Şekil 2-1a) (53,54,56,57).

6. haftadan itibaren mezodermal epitelden gelişen parmak şeklindeki epitelyal kordonlar yani primitif cinsiyet kordonları, alttaki mezenşim içerisine doğru büyürler. Farklılaşmamış gonad artık dışta yer alan bir korteks ve içte yer alan bir medulladan oluşmaktadır. Primordial germ hücreleri de bu primitif cinsiyet kordonları içine girmeye başlamıştır (Şekil 2-1c,d) (53,54,56,57).

Gelişimin 7. haftasına kadar gonadlar morfolojik olarak farklılaşmazlar. 7. haftaya kadar erkek ve dişide genital yapının gelişimi ortaktır. Bu nedenle genital sistem gelişiminin başlangıç periyodu “cinsiyet gelişiminin farklılaşmamış safhası” olarak adlandırılır. Farklılaşmamış basamak boyunca bir embriyonun hem erkek hem dişiye farklılaşma potansiyeli vardır (53,54,56,57).

Cinsiyet kromozom kompleksinin tipi, fertilizasyonla belirlenir, bu kompleks farklılaşmamış gonadın hangi yönde gelişeceğini belirlemektedir. Cinsiyet kromozomu kompleksi XY şeklindeyse, Y kromozomu taşıyan embriyolarda normalde testisler gelişmektedir. Y kromozomu bulunmadığında, cinsiyet

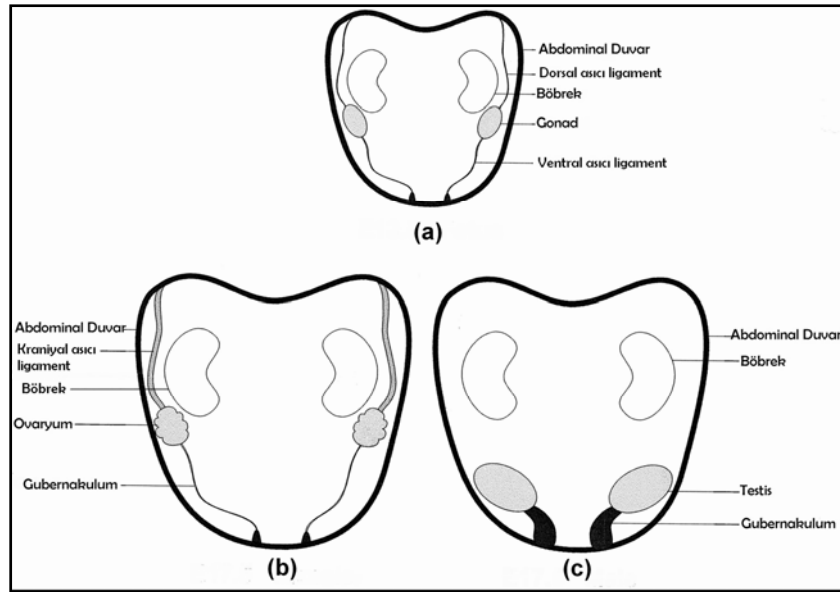
kromozomu kompleksi XX şeklinde olduğunda ovaryum gelişimi beklenir. Eğer embriyo XX cinsiyet kromozom kompleksine sahip ise, farklılaşmamış gonadın korteksi ovaryuma farklılaşır, medullası geriler; XY cinsiyet kromozom kompleksi taşıyorsa, medulla testise farklılaşır, korteks bir takım kalıntıları dışında geriler, dejenere olur. Mevcut gonadın tipi, daha sonra genital duktusların ve dış genitalerin farklılaşmasını belirlemektedir (53,54,56,57).



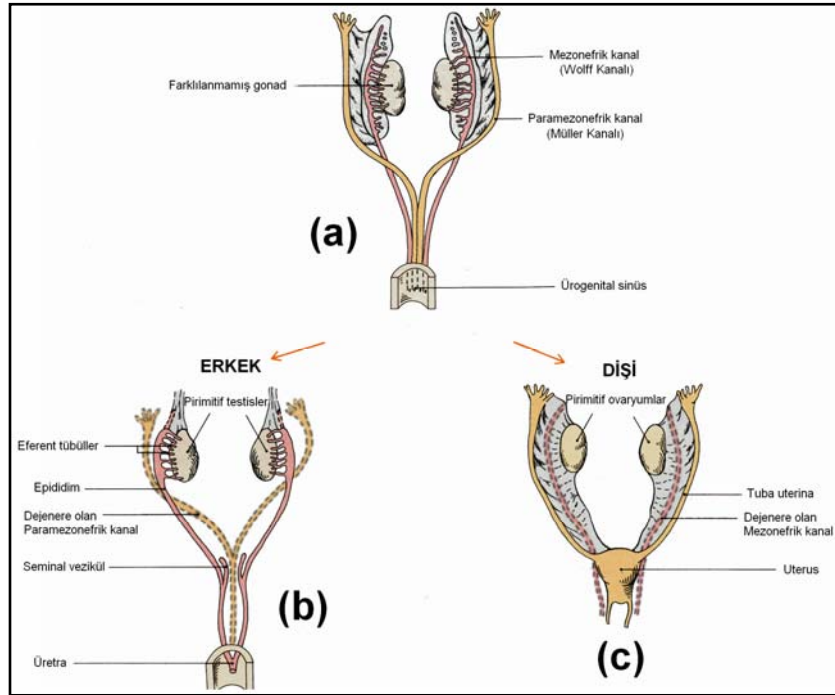
Şekil 2-1: Testislerin gelişimi. – Gray's Anatomy (57)'den değiştirilerek.

2.1.2. Testislerin Gelişimi

Farklılaşmamış gonadlar, gonadal farklılaşmadan önce mezonefrozun iki yanında dorsal ve ventral ligamentlerle asılı bir şekilde bulunurlar (Şekil 2-2a). Dorsal ligament kraniyal asıcı ligamenti meydana getirirken, ventral ligament gubernakuluma dönüşür. Yaklaşık olarak embriyonal 13.5 gün civarında bu farklılaşmamış testisin yakınında mezonefrik Wolff kanalı ile paramezonefrik Müller kanalının türevleri bulunur (Şekil 2-3a). Gelişimin 7.-8. haftalarında farklılaşmamış gonad testis veya ovaryuma dönüşür. Dişilerde normal gelişime göre, androjenlerin yokluğunda kraniyal asıcı ligament gelişmeye devam eder ve ovaryumu böbreğe yakın bir konumda tutar, buna mukabil gubernakular ligament involüsyona uğrar ve kaybolur (Şekil 2-2b). Paramezonefrik kanal varlığını tuba uterina olarak devam ettirirken Wolff kanalı da involüsyona uğrayarak ortadan kalkar (Şekil 2-3a,c) (3,52,53,54,55,56,).



Şekil 2-2: Dorsal asıcı ligamentin kraniyal asıcı ligamente ve ventral asıcı ligamentlerin gubernakuluma farklılaşması – Zimmerman (59)'dan değiştirilerek.



Şekil 2-3: Mezonefrik Wolff kanalı ve Paramezonefrik Müller kanallının erkek ve dişide dönüşümleri – Carola (71)'den değiştirilerek

Erkeklerde ise testislerin gelişimi, koordineli bir seri genin indüksiyonu ile sağlanır. Y kromozomu kısa kolu üzerindeki Testis Belirleyici Faktör'ü (TDF) kodlayan SRY geni, farklılaşmamış gonadın testis olarak gelişiminde bir anahtar rolü oynamaktadır. Testis Belirleyici Faktör, primitif cinsiyet kordonlarını uyararak, onların farklılaşmamış gonadın medullasının derinlerine doğru uzamasına neden olur, kordonlar burada dallanarak birbirleriyle anastomoz yaparlar ve böylece rete testis oluşur (Şekil 2-1d) (3,52,53,54,55,56).

Gelişimin erken döneminde seminifer kordonların arasında yer alan mezenşimal hücrelerin büyük bölümü testosteron salgılayan interstisyel hücrelere yani Leydig hücrelerine dönüşür. 8. haftadan itibaren Leydig hücreleri, androjenik hormonlar olan testosteron ve androstenedione salgılamaya başlarlar. Testosteron üretimini insan koriyonik gonadotropin (hCG) hormonu uyarır, hormonun miktarı 8-12 haftalık periyotta en yüksek değerine ulaşmıştır. Seminifer kordonların içinde farklılaşan ve gelişen Sertoli hücreleri de Müllerian-Inhibitör Madde'yi (MIS) yada diğer adıyla Anti-Müllerian Hormon (AMH)'u salgırlar. MIS/AMH'un moleküler yapısı büyük glikoprotein bir yapıda olup TGF-beta'nın moleküler yapısına çok benzerdir. MIS/AMH ve testosteron Wolff

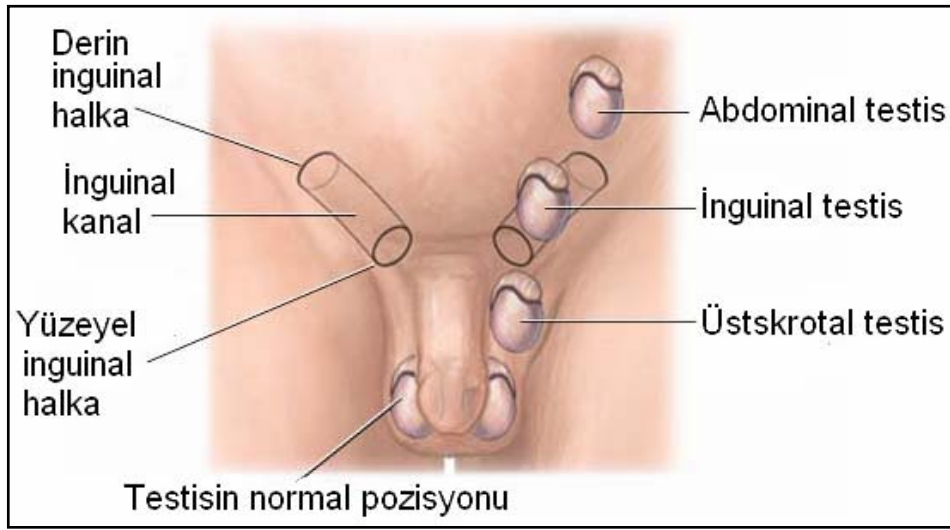
kanalı boyunca yayılmaya başlarlar ve bitişik Müller kanalının hücrelerinin bölünmesini inhibe etmek suretiyle dişi üreme organlarının gerilemesine ve artıklarının ortadan kalkmasına, bitişik seyreden Wolff kanalının ise korunup gelişmesine neden olurlar (Şekil 2-3a,b). MIS/AMH salınması erginliğe kadar devam eder, daha sonra ise seviyesi azalır. Mezonefrik Wolff kanalı, gelişimsel olarak gerileyen mezonefrozun boşaltım kanalı olmaktan çıkıp gelişmekte olan testisin kanalı olur. Testosteron, erkek genital taşıyıcı tübüllere dönüşen mezonefrik kanalın gelişip farklılaşmasını sağlar. Androjenler kraniyal asıcı ligamentin involüsyonuna, gubernakulumun ise gelişip kalınlaşarak iri ligament bir yapı halini almasına neden olurlar. Diğer abdominal organlar dorsal olarak gelişirken testis, gubernakulum sayesinde inguinal bölgeye yakın tutulur ve böylece böbreklerden ayrılarak bağımsız bir organ olarak belirir (Şekil 2-2c) (3,52,53,54,55,56).

Yoğun ve sıkı tunika albugineanın gelişimi, fetüste testiküler gelişim açısından oldukça karakteristiktir. Tunika albuginea geliştikten sonra cinsiyet kordonlarının yüzey epiteli ile olan bağlantıları kaybolur. Bu aşamadan sonra primitif cinsiyet kordonları, seminifer kordonlar olarak adlandırılırlar (Şekil 2-1f). Genişleyen testis aşamalı olarak dejenere olan mezonefrozdaki ayrılar ve kendi mezenterisi olan mezorşium ile asılı hale geçer. Seminifer kordonlar, seminifer tübüllere, rete testis'e ve tubuli rektile farklılaşırlar (53,54,56).

Fötal testiste, Sertoli hücreleri, seminifer kordonlarda çoğunluğu oluşturur. Daha sonraki gelişme sırasında, testisin yüzey epiteli düzleşir ve yetişkin testis'in dış yüzeyindeki mezoteli oluşturur. Rete testis, duktuli efferentesleri oluşturan 15-20 adet mezonefrik tübüller ile devam eder. Bu duktuliler, duktus epididimisi oluşturan mezonefrik duktusa bağlanırlar. Seminifer kordonların erginliğe kadar lümenleri yoktur, erginlikten itibaren lümen gelişir. Seminifer kordonların duvarında iki tip hücre bulunur: Spermatogonyumlar ve Sertoli hücreleri (53,54,56).

2.1.3. İnguinal Kanalların Gelişimi ve Testislerin İnişi

İnguinal kanallar kasıklarda oluşmuş skrotuma açılan harici bir geçittir. Testislerin karın içi yerleşim bölgelerinden, anterior karın duvarı boyunca skrotuma kadar olan inişlerinde, bir yol oluşturmaktadırlar (Şekil 2-4). İnguinal kanallar, cinsel gelişimin, morfolojik olarak farklılaşmamış safhasında, her iki cinstede gelişirler. İnguinal kanallar genellikle testislerin geçişi tamamlandıktan sonra kapanırlar (14,53,55,57,60,61).



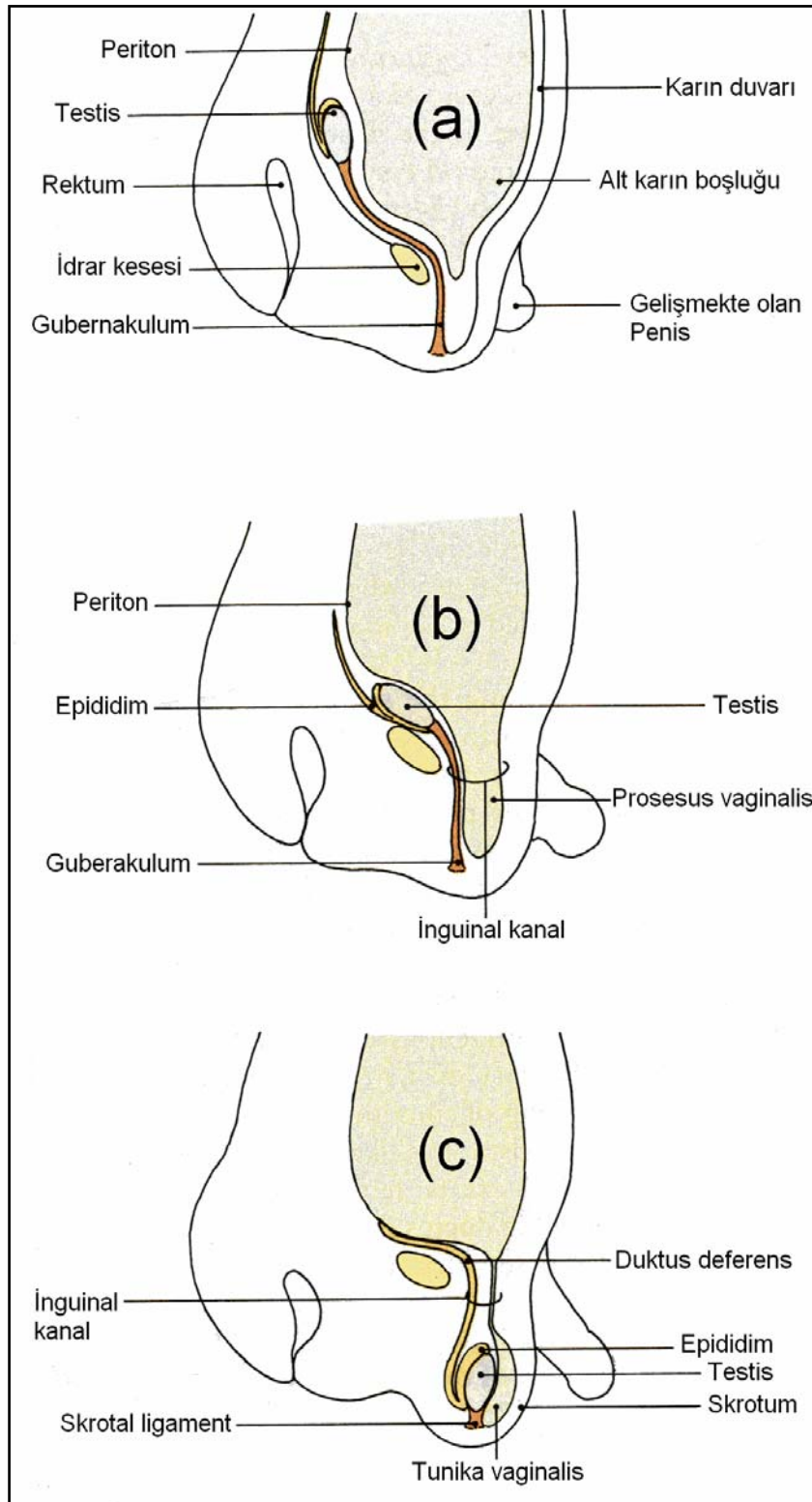
Şekil 2-4 : İnguinal kanallar ve inmemiş testisin skrotum dışındaki yerleşim yerleri – Sexton (62)'den değiştirilerek

Mezonefroz dejenere olup testis ve epididimis belirgin hale geldiği zaman, karın boşluğunun her iki tarafında kalın bir mezodermal doku kolunu bu ikisini dorsal vücut duvarından ayırır ve kendisi gubernakulumu oluşturur. Bu yapı tam olarak farklılaştığında, daha çok ara maddenin bulunduğu, göbek bağındaki Wharton peltesi benzeri gevşek bir dokuya dönüşür. Gubernakulum gonadların alt kutuplarından aşağı doğru uzanır, testisin alt kutbu ve epididimisin kuyruk kısmı gubernakulumun üst ucu içine gömülü bulunurlar. Gubernakulum, anterior abdominal duvarın inguinal kanalın oluşacağı bölgesinden oblik olarak geçer ve alt ucu, gelecekte skrotum ve labia majoraları yapacak olan labio-skrotal şişkinliklerin iç yüzeylerine yapışır (Şekil 2-5a). Böylece bir yol oluşmuş olur (14,53,55,57,60,61).

Skrotuma göçün yönü androjenler tarafından dolaylı olarak genitofemoral sinir ve nörotransmitterlerin salınması yoluyla kontrol edilmektedir. Kalsitonin Geni-İlişkili Peptid, “**Calcitonin Gene-Related Peptide**” (CGRP), genitofemoral sinirin hissi dallarında tesbit edilmiştir ve pek çok deneysel çalışmalar sonucunda bu nörotransmitterin gubernakulumun ucunun gelişimini ve gubernakulumun skrotuma göçünün yönünü kontrol ettiği düşüncesi uyanmıştır. Genitofemoral sinir üzerinde androjen etki yerinin tam olarak neresi olduğu bilinmemektedir fakat dorsal kök gangliyon hücre gövdeleri üzerinde cinse bağlı dimorfizm gösterilmiştir (3,4,5,13,63,64,65,66,67).

Inguinal kanalların oluşumuna katılan ikinci yapı olan processus vaginalis, peritonun bir evaginasyonu olup, gubernakulumun ventralinde, gubernakulum tarafından oluşturulan karın duvarı yolu boyunca bir herniasyon oluşturur (Şekil 2-5b). Processus vaginalis, inguinal kanalın duvarlarını yapacak olan abdominal duvar tabakalarını önüne katıp taşır. Bu yapılar, fascia transversalis, m. transversus abdominalis, m. obliquus internus ve m. obliquus externus’tur. Erkeklerde, bu tabakalar aynı zamanda spermatik kordon ve testisin yüzeysel tabakalarını oluştururlar. Processus vaginalis tarafından fascia transversalis içinde oluşturulan açıklık, derin inguinal halkayı, eksternal oblik aponevroz içerisinde oluşturulan açıklık ise, yüzeysel inguinal halkayı teşkil eder (Şekil 2-4) (14,53,55,60 61).

Testisin karın içi bir pozisyonundan skrotum içine vücut dışı bir pozisyona geçiş mekanizmaları hala anlaşılmazlığını korumaktadır. Hâlihazırdaki bulgular ışığında testisin inişini açıklamak için ileri sürülen teoriler, inişin iki temel basamakta gerçekleştiği üzerinde birleşmektedir (3,4,5,13,63,68):



Şekil 2-5: Testisin inişi basamakları. – Carola (71)'den değiştirilerek

Birinci yani “**trans-abdominal faz**”da testisler, 15. hafta civarında peritonun dışında asılı bulundukları posterior abdominal duvardan derin iç inguinal halkaya doğru inerler. Testislerin bu pozisyon değişikliği, “inişi”, büyük oranda nisbi bir harekettir. Testislerdeki bu ilk pozisyonel değişiklik, embriyonun boyunun uzaması ile birlikte abdomenin üst kısmının büyüyerek gelecekteki pelvik bölgeden uzaklaşması sırasında testisi geride bırakmasından ve abdominal kavite içindeki organların büyümesi sonucu abdomen içi basıncın artmasından kaynaklanır. Abdominal kavitenin ve organların dorsal olarak büyümesine mukabil testisin inguinal bölgeye yakın pozisyonda tutulması, distal gubernakulumun hormon kontrolünde genişlemesi ve büyümesi sonucu testis için daha güçlü bir bağlayıcı ligament haline gelmesi ile gerçekleşir. Eşzamanlı olarak kraniyal asıcı ligament geriler ve bu sayede testis abdominal kavite genişledikçe gelişen inguinal kanal yakınında kalır. Bunun yanında testislerin büyümesi ve mezonefrik böbreklerin atrofisi, testislerin posterior abdominal duvar boyunca kaudal yönde hareketine müsaade etmektedir. MIS/AMH ile uyarılan paramezonefrik duktusların atrofisi, testislerin karın boşluğu içinde derin inguinal halkaya doğru hareketini sağlar (1,3,4,5,13,14,53,54,55,60,61, 63,68).

Kraniyal asıcı ligamentin gerilemesi testosteron kontrolü altındadır. Hem fetal hem yetişkin Leydig hücreleri tarafından salgılandığı yeni bulunan ve insülin veya relaksine benzeyen yapısı nedeniyle “**Insulin-Like Factor 3 (INSL3)/Relaxin-Like Factor (RLF)**” olarak adlandırılan hormon distal gubernakulumun şişme reaksiyonunun stimüle edilmesinden sorumludur ve gubernakulumun genişlemesini kontrol eder. Yapılan deneylerden INSL3 salgısının MIS/AMH ve testosteron tarafından artırılabilceği sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, farelerde INSL3 geninin aşırı ekspresyonu durumunda dişi farelerde ovaryumun gubernakulumun kalınlaşmasına bağlı olarak testis gibi aşağı inmesi, MIS/AMH ve testosteronun nisbeten daha az rollerinin olduğu kanaatini doğurmuştur (3,4,5,13,54,63,65,69,70).

Gerçek iniş, ikinci yani **“trans-inguinal faz”-“inguino-scrotal faz”**da gubernakulumun pubik bölgeyi geçerek iç inguinal halkadan aşağı skrotuma inişiyle gerçekleşir ve 2-3 gün sürer. Bu olay genellikle rahim içi hayatın 25. ve 35. haftaları arasında gerçekleşir. İniş başlamadan önce gubernakulumda hem inguinal kanalın hem de skrotumun dilate olmasına sebep olan bir şişme meydana gelir. Gubernakuluma eşlik eden processus vaginalis, skrotum içinde bir abdominal kavite uzantısı oluşturacak şekilde genişler. Bundan sonra gubernakulum git gide kısalır ve skrotum içine doğru çekilir. Testis ve epididim gubernakulumun üst ucuyla olan yakın ilişkilerini korurlar ve gubernakulumu aşağı doğru takip ederler. Processus vaginalisin büyümesi de testislerin inguinal kanal boyunca skrotuma ilerlemelerinde rehberlik etmektedir. Spermatik kordonun elemanları, musculus cremaster de dahil, gubernakulum etrafında farklılaşırlar (1,3,4,5,13,14,53,54,60,61,63,68).

Testis ve duktus deferens aşağı indiklerinde, karın duvarının fasyal uzantıları ile sarılırlar. Fascia transversalisin uzantısı, internal spermatik fasyayı oluşturur, m. obliquus internus ve fasya uzantıları m. cremasteri ve fasyayı meydana getirir, m. obliquus externusun aponevroz uzantıları, eksternal spermatik fasyayı oluştururlar. Tam iniş gerçekleşip testisler skrotuma girdikten sonra inguinal kanal spermatik kordon etrafında kasılır ve kapanır, böylece processus vaginalisin periton kavitesiyle olan bağlantısı ortadan kalkar. Bu olay doğum sırasında yada doğumdan hemen kısa bir süre sonra gerçekleşir. Bundan sonra processus vaginalisin skrotum içinde kalan artığı, testisin tunika vaginalisi olarak varlığını devam ettirir. Gubernakulumun artığı ise skrotal ligament olarak varlığını devam ettirir (Şekil 2-5c) (14,53,54,55,60,61).

2.2. Testisin Histolojisi

Testisler vücudun dış tarafında skrotum içinde yerleşmiş bir çift oval şekilli organdır. İnsanda her bir erişkin testisi, oval şekilli 10-14 gram ağırlığında, yaklaşık 4-5 cm uzunluğunda, 2,5-3,5 cm genişliğinde ve 2-2,5 cm kalınlığındadır. Testisler spermatik kordonla karın duvarına bağlıdırlar ve gubernakulumun artığı olan skrotal ligamentlerle de skrotumun tabanına yapışmışlardır (52,57,71).

Skrotumun içi fibröz median septum sayesinde iki ayrı kompartımana ayrılmıştır. Her bir testis bir kompartımanda yerleşmiştir. Median septumun hattı dış tarafta deriden bir çizgi halinde belli olur, buna raphe perinea denir. Raphe ileriye doğru penisin alt tarafında ve geriye doğru perinede de devam eder (52,57,71).

Testislerden birisi, genellikle de soldaki diğerinden hafifçe daha aşağıdadır, böylece testisler gündelik aktiviteler esnasında çarpışmazlar. Testisler vücut dışında asılı oldukları için sıcaklıkları vücut ısısının 3-5 derece altındadır. Bu düşük sıcaklık aktif sperm üretimi ve spermlerin hayatiyetlerinin devamı açısından gereklidir. Sıcak havalarda skrotum derisi gevşer ve incelir, bu sayede testisler daha aşağı vücuttan daha uzak bir pozisyona inerler. Ter bezleri de testisin soğumasına yardım ederler. Soğuk havalarda skrotum derisinin altında bulunan musculus cremaster büzülür, derisinde bulunan tunika dartos kasları da kasılır böylece skrotumun derisi kalınlaşır, testisler de daha sıcak olan vücuda doğru çekilir. Bu mekanizmalarla testis sıcaklığı nisbeten sabit tutulur (57,71).

Testisleri (Şekil 2-6a) en dışta 30-40µ kalınlığında fibröz yapıdaki kalın bir bağ dokusu kapsül olan tunika albuginea sarar. Tunika albuginea dışta tunika vaginalis içte ise tunika vasculosa ile sarılmıştır. Tunika vaginalis abdominal boşluğu döşeyen membranın bir uzantısıdır, tunika vasculosa ise zengin bir damar ağı içeren gevşek bağ dokusundan bir kılıftır. Testisin arka kenarında tunika albuginea kalınlaşır ve mediastinum testis'i oluşturacak şeklinde içeri

doğru bir girinti meydana getirir. Testise giren ve çıkan kan damarları, lenfatikler, sinir lifleri ve genital taşıyıcı kanallar mediastinumdan geçerler (Şekil 2-6a). Buradan giren damar ve sinirler septumlar içine girerek bu sayede testisin tamamına yayılırlar. Her bir testisin parankimi tunika albugineadan uzanan ince ve tam olmayan bağ dokusu septumlarla yaklaşık 250 adet birbiriyle bağlantılı piramidal lobüllere ayrılmıştır (Şekil 2-6a,b). Bu piramit şekilli her bir testis lobülünün tabanı testisin dış yüzüne dönüktür tepe kısımları mediastinum testiste bulunur (52,72).

Testis parankiminin histolojik yapısı “seminifer tübüller” ve “interstisyum” olmak üzere iki kısımdan oluşur (Şekil 2-6b,c). Her bir lobül, içinde spermiumların üretildiği 1-4 arası seminifer tübül ve tübüllerin arasını dolduran içinde Leydig hücrelerinin de bulunduğu bir bağ dokusu stroma yani interstisyum ihtiva eder. Her bir testiste, bu son derece kıvrımlanmış seminifer tübüllerden 800 civarında bulunur, her iki testisteki seminifer tübüllerin toplam uzunluğu 225 metre kadardır (52,72).

Seminifer tübüller testisin yaklaşık %90'ını oluştururlar, duvarları sustentakular hücreler de denen Sertoli hücreleri ve çeşitli gelişim basamağındaki spermatogenik hücrelerden oluşan germinal epitel, diğer adıyla seminifer epitel tarafından oluşturulmuştur (Şekil 2-6c,d). Tübüllerin dış kısmını ise miyoid hücreler ve kalın bir bazal membran çevreler. Her bir tübül kendi üzerine yüksek oranda kıvrılarak lobül içinde bir halka oluşturur. Bu halkaların her iki ucu mediastinumda bir ağ şeklinde anastomozlar yapmış kanallardan oluşan rete testise açılır. Rete testise açılmadan önceki son kısımları düz bir hal alır, bu kısma ise düz tübüller “tubuli recti” adı verilir (Şekil 2-6a,b) (52,72,73).

2.2.1. İnterstisyel Doku - Tunika propria

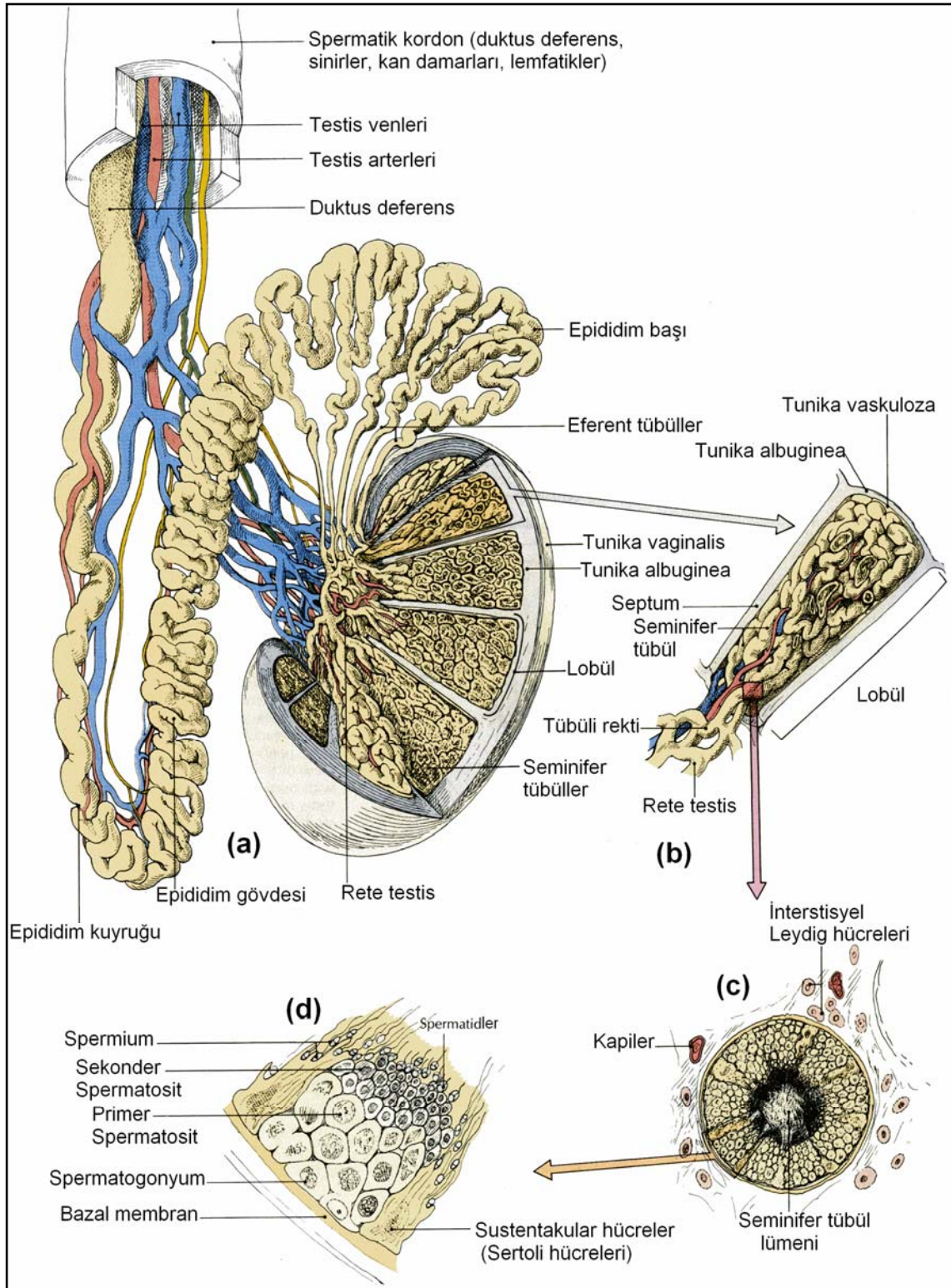
Aynı zamanda “peritübüler doku” olarak da adlandırılan çok tabakalı bir bağ dokusudur. İnsanda, seminifer epitelin bazal membranının dış kısmında peritübüler kontraktıl hücreler olarak adlandırılan üç-beş tabaka miyoid hücreler

mevcuttur. Kemirgenlerde, tunika propria epiteloid düzenleniş gösteren tek tabakalı yassı miyoid hücrelerden oluşur. İnceyapı düzeyinde miyoid hücreler, düz kas hücresi benzeri özellikler gösterirler; bazal laminaları ve çok miktarda aktin filamanları vardır. Aynı zamanda önemli oranda GER ihtiva ederler ki bu da tipik fibroblastların yokluğunda kolajen sentezindeki rollerine işaret eden bir özelliktir. Miyoid hücrelerin ritmik kontraksiyonları spermilerin ve testiküler sıvının iletilici tübül sistemine hareketine yardım eden peristaltik dalgalar meydana getirir. Miyoid hücrelerin dış tarafında, Leydig hücreleri, kapillerler ve yaygın lenfatik damar ağı bulunur (Şekil 2-6c) (52,72).

Yaşlanmanın normal bir sonucu olarak tunika propria kalınlığı artar. Bu kalınlaşma, sperm üretiminin düşmesini ve seminifer tübül hacminde bir azalmayı da beraberinde getirir. Hayatın erken dönemlerinde lamina proprianın kalınlaşması ise infertilite ile ilişkili bulunmuştur (52,72).

2.2.2. Seminifer Tübüller

Memelilerde testisin fonksiyonel birimi “tubuli seminiferi contorti”ler yani seminifer tübüllerdir. Seminifer tübüllerin duvarını seminifer epitel oluşturur (Şekil 2-9), bu epitel bir bazal membrana oturmuştur ve bazal membranın dışında da miyoid düz kas tabakaları ile çevrelenmiştir. Her bir seminifer tübül yaklaşık 50 cm uzunluğunda ve 150-250 µm çapındadırlar. Seminifer epitel son derece kompleks ve çok katlı bir epiteldir. Bu epitel içinde iki temel hücre topluluğu mevcuttur: Spermatogenik hücreler ve bunları sarıp çevreleyen Sertoli hücreleri (Şekil 2-9) (52,72).



Şekil 2-6: Testis, lobüler yapısı, seminifer tübül duvarı ve interstisyum – Carola (71)'den değiştirilerek.

2.2.3. Spermatogenik Hücreler

Spermatogenik hücreler, yolk kesesinden köken alan ve testis gelişiminin erken evrelerinde göç ederek gonadal kabartılarda kolonize olan primordial germ hücrelerinden farklılaşırlar. Primordial germ hücreleri bölünerek spermatogonyumlara, spermatogonyumlar da spermatositlere, spermatidlere ve nihayetinde olgun spermiyumlara dönüşürler. Spermatogenik hücreler gelişim evrelerinin ilerleme durumuna göre Sertoli hücreleri arasında zayıf bir tabakalanma gösterirler. Olgunlaşmamış spermatogenik hücreler olan spermatogonyumlar, bazal membran üzerine otururlar. En olgun hücreler olan uzamış spermatidler, Sertoli hücrelerinin apikal kısımlarına yerleşmiş olarak tübül lümeninin sınırında bulunurlar (52,63,72).

2.2.4. Spermatogenez

Testisin iki fonksiyonu vardır, androjenlerin sentezi ile karakterize olan endokrin fonksiyonu ve spermatogenezle karakterize olan ekzokrin fonksiyonu. Seminifer tübüllerde meydana gelen spermatogenez, hipofiz gonadotropinlerinin seviyesindeki yükselme ile birlikte erginlikten kısa bir süre önce başlar ve bütün hayat boyu devam eder. Spermatogenez süreci hücresel ve moleküler değişikliklerin meydana geldiği üç temel faza ayrılarak incelenmiştir. Bunlar: **A)** Spermatogonyal faz (mitoz), **B)** spermatosit fazı (mayoz) ve **C)** spermatid fazı (spermiyogenez)'dir (52,63,72).

2.2.4.1. Spermatogonyum fazı (mitoz)

Gerçek kök hücre karakterli spermatogonyumlar hem kendi topluluklarının devamını sağlayacak hem de nihayetinde primer spermatositleri verecek olan yönlendirilmiş spermatogonyumları oluşturacak şekilde mitozla bölünerek çoğalırlar. Bu faz bazal kompartımanda Kan-Testis Bariyeri (KTB)'nin dışında meydana gelir (52,63,72).

Spermatogonyum kök hücreler çok sayıda bölünme geçirirler ve rutin HE preparasyonlarda çekirdekleri farklılıklar gösteren farklı spermatogonyum yavru hücreleri meydana getirirler. İnsan spermatogonyumları rutin histolojik preparasyonlarda çekirdeklerinin görünüşüne göre üç farklı tipe ayrılır (52,63,72):

TipA koyu (A_d) spermatogonyumların oval çekirdekleri şiddetli bazofilik boyanır ve kromatini ince granüler yapıdadır. Bu hücrelerin seminifer epitelin gerçek kök hücreleri olduğu düşünülür. Düzenli aralıklarla bölünürler ve gerek kök hücre özelliklerini devam ettiren bir çift A_d spermatogonyuma dönüşürler gerekse bir çift A_p spermatogonyuma dönüşürler (52,63,72).

TipA soluk (A_p) spermatogonyumların oval çekirdekleri ince granüler yapıdaki kromatinleri nedeniyle soluk boyanırlar. A_p spermatogonyumlar spermiyumları meydana getirecek olan farklılaşma sürecine geri dönüşsüz olarak giren hücrelerdir. Ardışık birkaç mitoz bölünme geçirerek sayılarını artırırılar. Bu bölünen hücreler farklılaşarak TipB spermatogonyumları oluştururlar (52,63,72).

TipB spermatogonyumların genelde çekirdekleri yuvarlaktır kromatinleri çekirdek zarı boyunca ve merkezi çekirdekçik etrafında yoğunlaşmış kümeler halinde dizilmiştir (52,63,72).

Tip A_d spermatogonyumların tip A_p spermatogonyumlara bölünmesinde diğer hücrelerde görülen mitozlardan farklı bir özellik olarak, meydana gelen yeni hücreler birbirlerine ince bir sitoplazmik köprü ile bağlı kalırlar. Bu durum başlangıçtaki tip A_p spermatogonyum çiftinden meydana gelen yavru hücrelerin geçirdikleri her mitotik ve mayotik bölünmeden sonra devam eder. Böylece başlangıçtaki tip A_p hücre çiftinden meydana gelen bütün yavrular birbirine inci dizisi gibi bağlanmış kalırlar. Bu sitoplazmik bağlantılar spermatid olgunlaşmasının son basamağına kadar varlıklarını devam ettirirler ve her bir çift tip A_p spermatogonyumdan meydana gelen bütün bir klonun senkronize gelişimi için hayati önemleri vardır (52,63,72).

2.2.4.2. Spermatosit fazı (mayoz)

TipB spermatogonyumların mitotik bölünmesi primer spermatositleri verir. Primer spermatositler oluştuktan hemen sonra ve mayoz başlamadan önce DNA'larının eşleniğini oluştururlar, böylece her bir spermatosit (2N) olan normal kromozom sayısının iki katı (4N) kromozom ve dolayısıyla iki misli DNA içeriği taşır. İlk mayotik bölünmeden meydana gelen hücreler sekonder spermatosit olarak adlandırılır. Sekonder spermatositlerde 2N yani diploit miktarda DNA vardır. Bu hücreler yeni DNA sentezi yapmadan hemen ikinci mayotik bölünmenin profazına girerler. Her bir sekonder spermatosit 22 otozomal ve bir X veya bir Y kromozomu taşır. Bu kromozomların her biri iki kardeş kromatidden oluşmuştur. İkinci mayotik bölünmenin metafazı sürecinde kromozomlar metafaz plağında sıralanırlar ve kardeş kromatidler ayrılarak karşıt kutuplara giderler. İkinci mayoz bölünmesi tamamlandığında ve çekirdek membranları oluştuğunda her bir sekonder spermatositten iki adet her biri 22 tek-iplikli kromozom ve (1N) miktarı DNA taşıyan iki spermatid meydana gelir, bu hücreler başka bölünme geçirmezler. Böylece mayoz bölünme, hem kromozom sayısının hem de DNA miktarının haploid düzeye inmesi ile sonuçlanır. Mayoz fazı tamamlandığında her bir spermatositten 4 adet spermatid meydana gelir. Bu faz büyük oranda KTB'nin iç tarafında, luminal kompartımanda gerçekleşir (52,63,72).

2.2.4.3. Spermatid fazı (spermiyogenez)

Yuvarlak birer hücre olan spermatidlerin olgun uzamış kamçılı spermiyumlara farklılaştıkları fazdır. Bu fazda meydana gelen morfojenetik değişiklikler dört aşamada incelenir. Bu değişiklikler spermatidler Sertoli hücresi membranına özel bağlantı kompleksleri ile bağlı halde iken meydana gelirler (52,63,72):

a) Golgi Fazı, spermatidlerin Golgi komplekslerinde PAS pozitif granüllerin toplaşması ile karakterizedir. Bu glikoproteinlerden zengin proakrozomal granüller birleşirler ve çekirdek zarı yakınında membranla çevrili bir vezikül olan

akrozomal vezikülü meydana getirirler. Vezikül içeriği bu faz boyunca artar ve vezikül de genişler. Akrozomal vezikülün yerleşimi gelişen spermin anterior kutbunu da belirler, akrozomun bulunduğu kutup spermin anteriorudur. Bu faz boyunca yine, sentrioller çekirdek yakınındaki yerlerinden ayrılarak akrozomal vezikülün aksi istikametine, spermatidin posterior kutbuna hareket ederler. Burada distal sentriol, plazma zarına dik bir açı yapacağı ve uzun eksene paralel olacağı bir konumda yerleşir. Distal sentriol sperm kuyruğunun aksonemini oluşturan iki merkezi mikrotübülün ve dokuz periferik mikrotübül çiftinin oluşumunu başlatır. Proksimal sentriol genellikle kaybolur (52,63,72).

b) Kep Fazı'nda akrozomal vezikül çekirdeğin ön yarısı boyunca yayılır. Bu yeni oluşan yapı akrozomal kep olarak adlandırılır. Akrozomal kepin altındaki çekirdek zarının gözenekleri kaybolur ve daha kalın bir hal alır. Çekirdek yoğunlaşması da bu zamanda başlar (52,63,72).

c) Akrozom Fazı'nda spermatidler kendilerini, kafaları Sertoli hücrelerine iyice gömülecek ve yönü bazal laminaya bakacak şekilde yeniden yönlendirirler. Gelişen kuyruk seminifer tübül lümenine uzanır. Spermatidlerin yoğunlaşmış çekirdekleri yassılaşır ve uzar, çekirdek ve üzerini kaplayan akrozom anterior plazma zarının altına ilerlerler, sitoplazma ise posterior kısma kayar. Sitoplazmik mikrotübüller akrozomun posterior ucundan spermatidin posterioruna doğru uzanacak şekilde silindirik şeklinde manşet adı verilen bir tabaka oluştururlar. Daha önce kuyruk oluşumunu başlatan sentrioller yeniden çekirdeğin posterior yüzüne hareket ederler ve çekirdek üzerindeki sık bir oluğa yerleşirler. Bunlar daha sonra gelişen spermiyumun boyun parçasını oluşturacak şekilde değişirler. Plazma membranı gelişen kuyruğu örtmek üzere posterior yöne hareket ettikçe manşet kaybolur, sitoplazmanın geri kalanındaki mitokondriler spermatidin boyun bölgesinde sarmal şeklinde sıralanmış bir gömlek oluşturmak üzere buraya göç ederler. Burası spermiyum kuyruğunun orta parçasını teşkil eder. Bunun altında kuyruğun ana parçası yer alır, kuyruğun sonuna kadar uzanır. Kuyruğun en sonundaki kısa parça son parça olarak adlandırılır (52,63,72).

d) Maturasyon Fazı; morfogenezin bu son basamağında sitoplazmanın fazlası atılır. Sertoli hücreleri artık cisimcik olarak da adlandırılan bu artık sitoplazmayı fagosite ederler. Baştan bu yana mevcut bulunan sitoplazmik köprüler artık cisimciklerde kalırlar. Bu aşamadan sonra spermatidler birbirlerine bağlı değildirler ve daha sonra “spermiasyon” adı verilen mekanizma ile Sertoli hücrelerinden seminifer tübül lümenine salıverilirler (52,63,72).

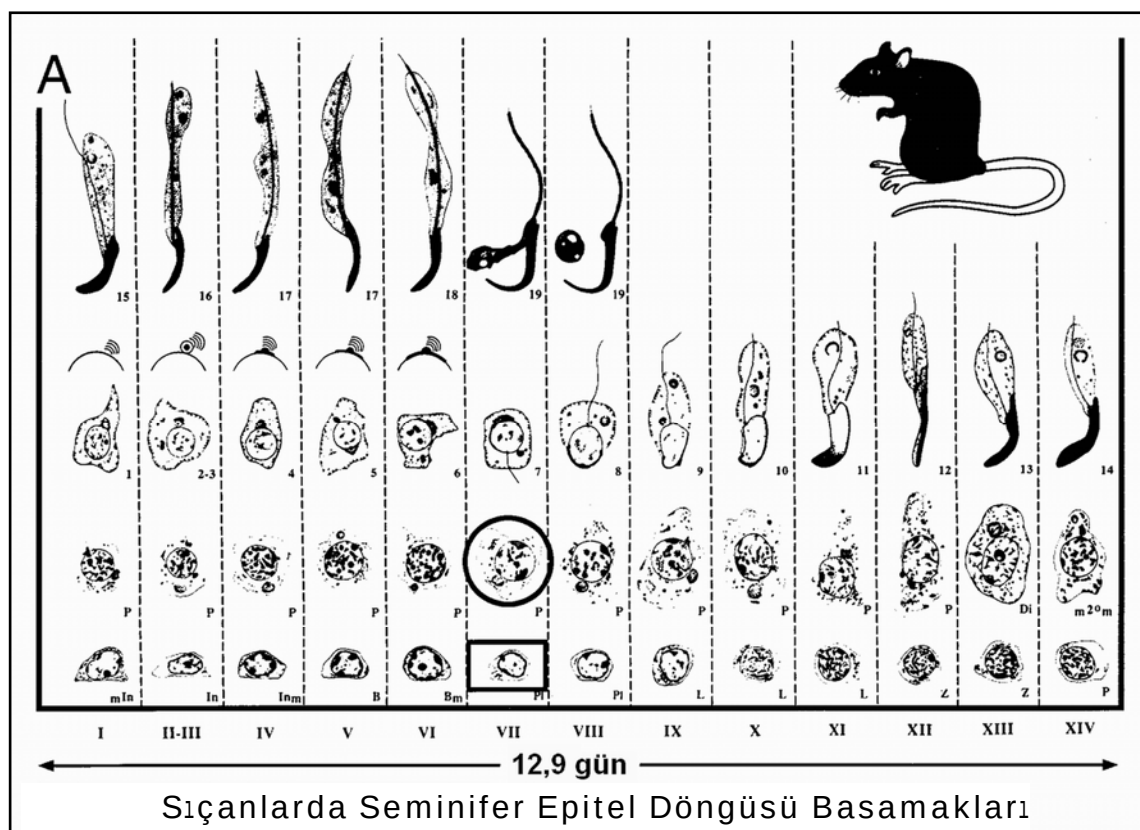
2.2.5. Seminifer Epitel Döngüsü

Tek bir tip A_p spermatogonyumdan çoğalan yavru hücreler bölünme esnasında sitokinezi tam olarak tamamlamazlar böylece aralarında hücrelerarası sitoplazmik köprüler kalır. Bu köprüler sayesinde hücrelerin senkronize olmaları, her bir farklılaşma basamağında aynı süreyi geçirmelerini sağlar. Yavru hücrelerin birbirleriyle sitoplazmik köprülerle ilişkili kalmaları ve mitotik ve mayotik bölünmelere ve olgunlaşmaya senkronize girmeleri sayesinde seminifer tübüllerde epitelin her hangi bir yerinde her bir farklılaşma fazı ardışık tabakalar halinde devam eder (52,63).

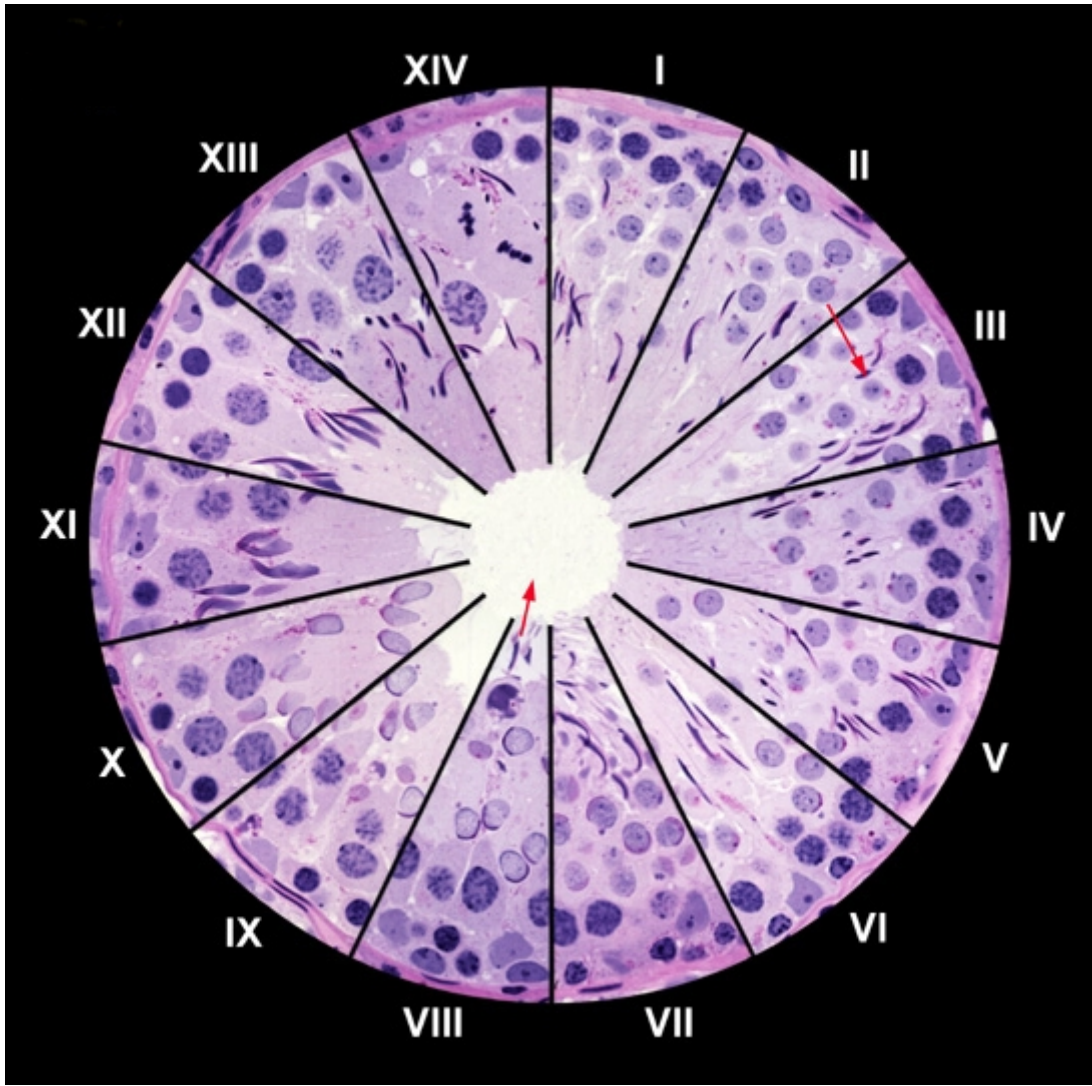
Farklılaşan spermatogenik hücreler seminifer epitelde rasgele düzenlenmemiştir; belli hücre tipleri gruplar ve katmanlar halinde toplanmışlardır. Seminifer epitelin herhangi bir yerinde herhangi bir zamanda epitel duvarın bazalinden apikaline dek farklı jenerasyonlardan gelişen hücrelerin üst üste bulunduğu ve böylece karakteristik hücre ortaklıkları oluşturdukları görülür. Seminifer tübül içinde herhangi bir yerde görülen aynı hücre grubu modelinin ikinci kez görünmesine kadar görülen farklı basamak serileri bir seminifer epitel döngüsü oluşturur (52,63).

Seminifer epitel döngüsü en iyi sıçanlarda çalışılmıştır. Sıçanlarda tübül boyunca 14 farelerde 12 ardışık basamak tesbit edilmiştir (Şekil 2-7, Şekil 2-8). İnsanda seminifer epitel döngüsünde altı basamak tesbit edilmiştir. Ancak bu basamaklar sıçan seminifer tübülündeki kadar belirgin değildir çünkü insanda bu basamaklar seminifer tübül boyunca mozaik tarzında düzensiz bir dağılım

gösterir. Otoradyografik çalışmalar seminifer epitel döngüsünün insanlarda sabit olduğunu ve yaklaşık 16 gün sürdüğünü göstermiştir. Bir kök hücreden meydana gelen bir spermatogonyumun spermatogenez sürecini tamamlaması için yaklaşık 74 gün yani her biri 16 günden oluşan 4,6 döngü gerektiği saptanmıştır. Spermlerin epididimisi geçmesi için de 12 gün gerekmektedir. Böylece, herhangi bir tipA spermatogonyumdan farklılaşan bir tipB spermatogonyumdan oluşan spermiyumların ejakulatta görülmesi için yaklaşık 86 gün gerekmektedir (52,63).



Şekil 2-7: Sıçanlarda seminifer epitel döngüsünün 14 basamağı. (I-XIV): Döngü basamakları; (mIn): Tip A_{dark} spermatogonyum; (In): Tip A_{pale} spermatogonyum; (Inm): Mitotik spermatogonyum; (B):Tip B spermatogonyum; (Bm): mitotik TipB spermatogonyum; (PI): Preleptoten spermatosit; (L): Leptoten spermatosit; (Z): Zigoten spermatosit, (P): Pakiten spermatosit; (Di): Diploten spermatosit; (m2^om): Diploten mayotik spermatosit; (1-7): Yuvarlak Spermatid; (7-11): Uzayan spermatid; (11-19): Uzamış spermatid. – França (75)'den değiştirilerek.



Şekil 2-8: Sıçanlarda seminifer epitel döngüsü basamaklarının hücresel olarak gösterimi. Hess (74).

2.3. Sertoli Hücresi

2.3.1. Sertoli Hücresi Kökeni ve Embriyonal Gelişimi

Testiste bulunan hücrelerden Primordial Germ Hücrelerinin kökeninin allantoisin tabanında oluşan ve dorsal barsak mezenteri yoluyla gelip gonadlarda 10,5-11,5 gün civarında yerleşen hücreler olduğu bilinmektedir. Peritübüler miyoid hücrelerin ve endotel hücrelerinin, gonadlara göç eden mezonefrik hücrelerden geliştiği gösterilmiştir. Bununla birlikte Sertoli hücreleri ve Leydig hücrelerinin kökeni tartışmalı kalmıştır. Sertoli hücrelerinden salgılanan hormonlardan ilk ortaya çıkan MIS/AMH'un testis kültürlerinde 11,5 günde tesbit edilmesi göz önüne alınarak farklılaşmış Sertoli hücrelerinin döllenme sonrası 11,5 gün itibariyle gonadda var oldukları kararlaştırılmıştır (63).

Söloomik epitel hücrelerinin, EM düzeyindeki benzerlikleri nedeniyle Sertoli hücrelerinin kaynağı olabileceği düşünülmüştür. Söloomik epitel bütün söloomik kaviteyi döşeyen tek katlı hücrelerden oluşur. Cıvcıvlerde Hint mürekkebi ile yapılan çalışmalarda söloomik epitel hücrelerinin gelişmekte olan gonada göçtüğü gösterilmiştir. Sıçanlarda gonad oluşumunun başlamasıyla birlikte söloomik epitelin altındaki bazal membranda bulunan tipl ve tiplII kolajen parçalanır. Bu bulgulara dayanılarak, söloomik epitelden kaynaklanan hücrelerin testis içine hareket ettikleri ve testis içindeki mevcut hücre topluluklarının öncülü oldukları fikri ileri sürülmüştür (63).

Lipofilik bir boya olan ve söloomik epitel hücrelerini doğrudan boyayan DiI ile yapılan çalışmalar neticesinde bu hücrelerin akıbetinin farelerde döllenme sonrası 11,2-12,5 günler arasında belirlendiği gözlenmiştir. Söloomik epitel hücrelerinin gonadın içine yürüdükleri ve Sertoli hücresi ve interstisyel hücrelere dönüştükleri gösterilmiştir. 11,5 günden önce söloomik epitel hücreleri seminifer kordonlar içinde öncül Sertoli hücrelerine dönüşür. İşaretlenmiş olan söloomik epitel hücrelerinin 11,5 günden sonra Sertoli hücrelerine dönüşmeye devam

edemedikleri için ancak testis kordonları dışında varlıklarını devam ettirdikleri gözlenmiştir; bundan yola çıkılarak interstisyel hücre topluluğunun bir kısmını oluşturdukları düşünülmüştür. Sölomik epitelden hücrelerin göçü 12,5 gün civarında azalmış ve tunika albuginea oluştuktan sonra ise sona ermiştir. Bu gözlemler ışığında Sertoli hücre topluluğunun erken dönem testis farklılaşması sırasında sölomik epitelden göç eden hücrelerden kaynaklandığı ve geriye kalan sölomik epitel hücrelerinin ise interstisyumdaki hücre topluluklarına dönüştüğü düşünülmüştür (63).

Sıçanlarda Sertoli hücrelerinin çoğalması fetal hayatın 16. gününde başlar ve doğumdan önceki 2. günde maksimum seviyeye ulaşır. Doğum sırasında sıçan testisinde 1 milyon Sertoli hücresi mevcuttur ve artan çoğalma aktiviteleri sayesinde doğumdan sonraki 15. günde sayıları yaklaşık 40 milyon dolaylarına gelir. Doğumdan sonraki 15. günden itibaren çoğalma durur ve farklılaşma ve olgunlaşma başlar; bundan sonra yetişkin hayatı boyunca sayılarının sabit kaldığı kabul edilir (76).

Yenidoğan testislerinde tiroid hormonlarının Sertoli hücresi çoğalma ve farklılaşmasını triiodotironin vasıtasıyla düzenlediklerine dair veriler mevcuttur. Ancak bu etkinin hangi mekanizma yada mekanizmalarla meydana geldiği aydınlatılamamıştır (77).

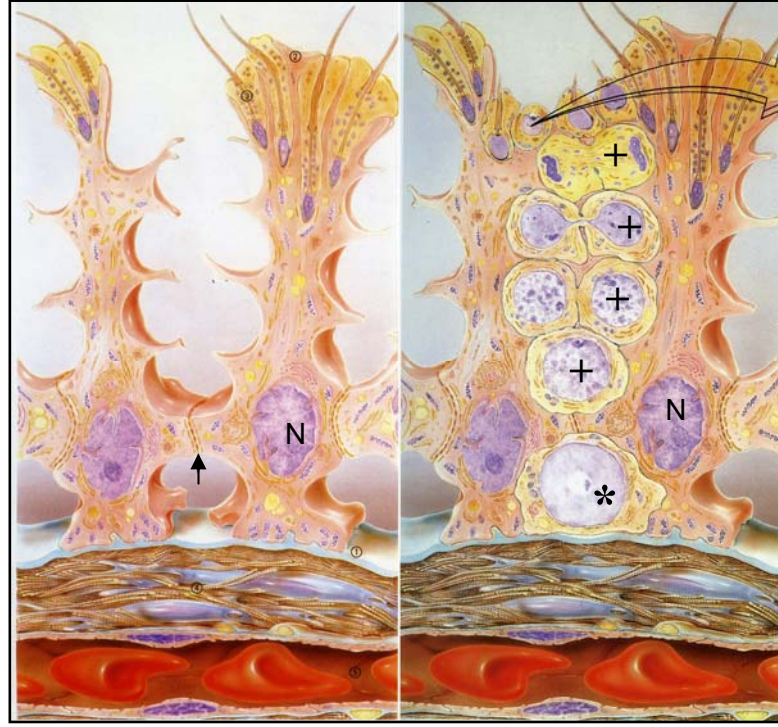
2.3.2. Sertoli Hücresi Morfolojisi

Erginliğe yakın belirli bir zaman diliminde Sertoli hücreleri hızlı bir şekilde çoğalırlar ve hacimlerini 10-20 kat artırırlar. Sayıları germinal unsurlarla karşılaştırıldığında az olmasına rağmen seminifer tübülün hacimsel olarak dörtte birini oluştururlar. Tam olarak özelleştiklerinde bölünme yeteneklerini kaybederler ve erginlikten sonra çoğalmazlar. Erişkin tip Sertoli hücresi topluluğunun yaşam boyunca sabit kaldığı düşünülür. Sıçanlarda Sertoli hücresi doğumdan sonraki 18. günde üremesini tamamlar (52,73).

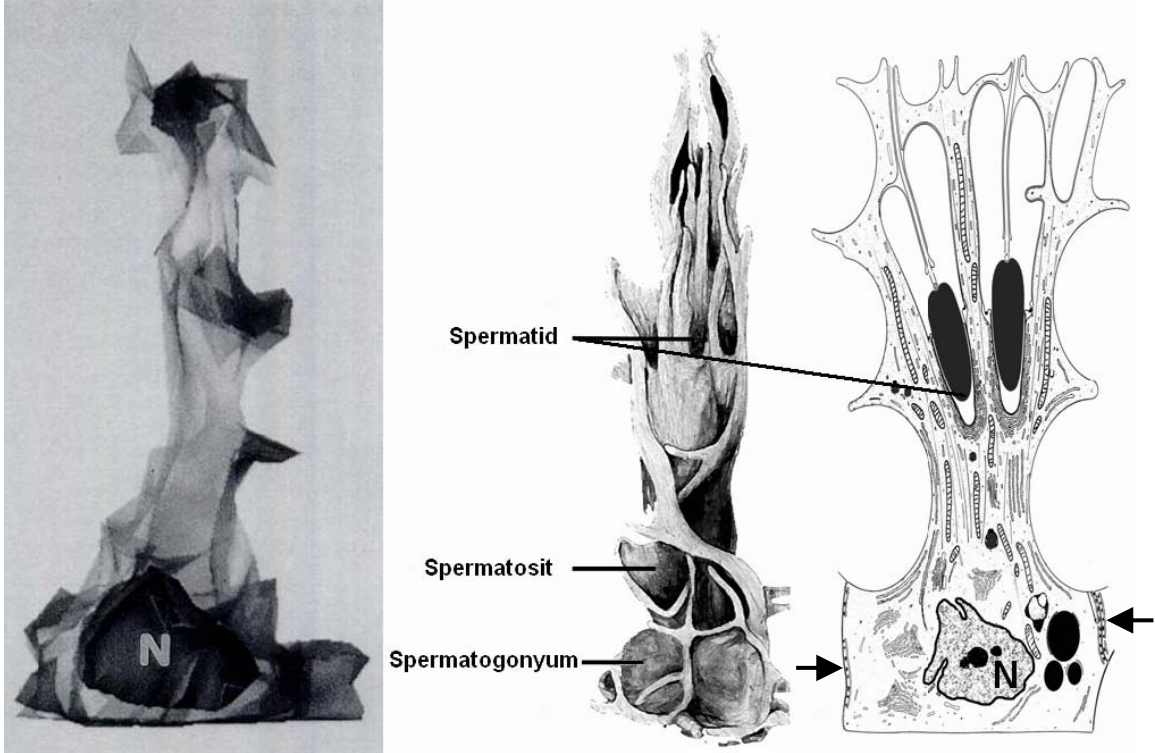
Sertoli hücreleri doğum sonrası dönemde hem morfolojik görünümünde hem de biyokimyasal aktivitede büyük değişikliğe uğrar. Bu değişiklikler büyük ölçüde Folikül Stimulan Hormon (FSH) aracılığıyla ortaya çıkar. Altı günlük olgunlaşmamış farelere FSH uygulanması Sertoli hücresi sayısında ve sitoplazmasında bir artış meydana getirir. Yenidoğan sıçanların seminifer tübüllerindeki FSH'u aktive eden adenilat siklaz Sertoli hücresi plazma membranına özellikle bağlanır. Doğum sonrası sürecinde Sertoli hücresinin büyüklüğünde, çekirdek hacminde ve sitoplazmik değişimlerinde FSH'un etkisi doğrulanmıştır (73).

Sertoli hücreleri spermatogenik seri hücreleri için destekleyici ve besleyici hücreler olarak bilinirler. Konik-prizmatik hücrelerdir ve çok sayıda apikal ve lateral uzantıları vardır, bu uzantılarıyla aralarında bulunan spermatogenik hücreleri sararlar (Şekil 2-9, Şekil 2-10). Sertoli hücreleri seminifer tübülün tabanındaki bazal membrandan lümenine kadar uzanırlar ve tübül içindeki organize yapıyı oluştururlar (52,72,78).

Sertoli hücreleri seminifer tübüllerin gerçek somatik epitelini oluşturur. Yakın temasta olmaları sayesinde gelişmekte olan sperm hücreleri için destekleyici hücrelerdir. Düzensiz şekilli yüksek prizmatik-piramidal biçimli bölünmeyen epitelyal hücrelerdir ve seminifer tübüllerin kalın çok tabakalı bazal membranı üzerine yerleşmiştir. Bazal membrandan lümene kadar uzanır ve yetişkin sıçanlarda seminifer tübüllerin hacimsel olarak yaklaşık %17-19'unu meydana getirirler. Sıçanlarda yaklaşık 90 μm uzunluğundadır. Hacmi yaklaşık 6000 μm^3 ve yüzey alanı yaklaşık 12000 μm^2 dür. Hacimlerine nazaran çok büyük bir yüzey alanları vardır, bu sayede yetişkin sıçanlarda tek bir Sertoli hücresi başına farklı gelişim basamaklarındaki yaklaşık 50 germ hücresi (1:50) barındıracak kapasiteye sahiptirler. Bu özellik gerek spermatogenez açısından gerekse germ hücrelerinin hareketi açısından hayati önem taşır (52,72,73,79).



Şekil 2-9: Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücrelerle ilişkisi. (Ok): Kan-testis bariyeri; (*): Spermatogonyum; (+): spermatogenik hücreler; (N): Sertoli hücresi çekirdeği. – Breckwoldt (80)'den değiştirilerek.



Şekil 2-10: Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücrelerle ilişkisi. (N): Sertoli hücresi çekirdeği. (Ok): KTB. – Skinner (63) ve Nakai (81)'den değiştirilerek.

Sertoli hücresi ince yapısında (Şekil 2-11) yaygın bir DER, iyi gelişmiş bir GER ve annulate lamella yığını bulunur. Çok sayıda küresel ve uzamış mitokondri, iyi gelişmiş bir Golgi ve değişen miktarlarda mikrotübüller, lizozomlar, lipid damlacıkları, veziküller glikojen granülaları ve filamanlar ihtiva eder. Çekirdeği saran 7-9 nm kalınlığındaki filamanlar çekirdeği diğer sitoplazmik organellerden ayırır. Hücrenin çok aktif olduğunun bir göstergesi olarak ökromatik olan Sertoli hücresi çekirdeği genellikle oval veya üçgen şeklindedir ve bir veya daha çok derin kıvrıntıları vardır. Şekli ve konumu değişiklik gösterir. Genelde yassılaştırmış olarak hücrenin bazal bölümünde hücrenin tabanına yakın ve paralel olarak bulunabileceği gibi, hücrenin tabanından belli uzaklıkta oval ve üçgen şeklinde de bulunabilir. İnsanda bazal sitoplazmasında karakteristik birikinti cisimcikleri (Charcot-Böttcher) bulunur. 10-25 µm uzunluğunda 1-3 µm kalınlığında olan bu ince iğsi kristaloitler rutin histolojik preparatlarda görünürler. Kimyasal yapıları ve fonksiyonları bilinmemektedir (52,72,82).

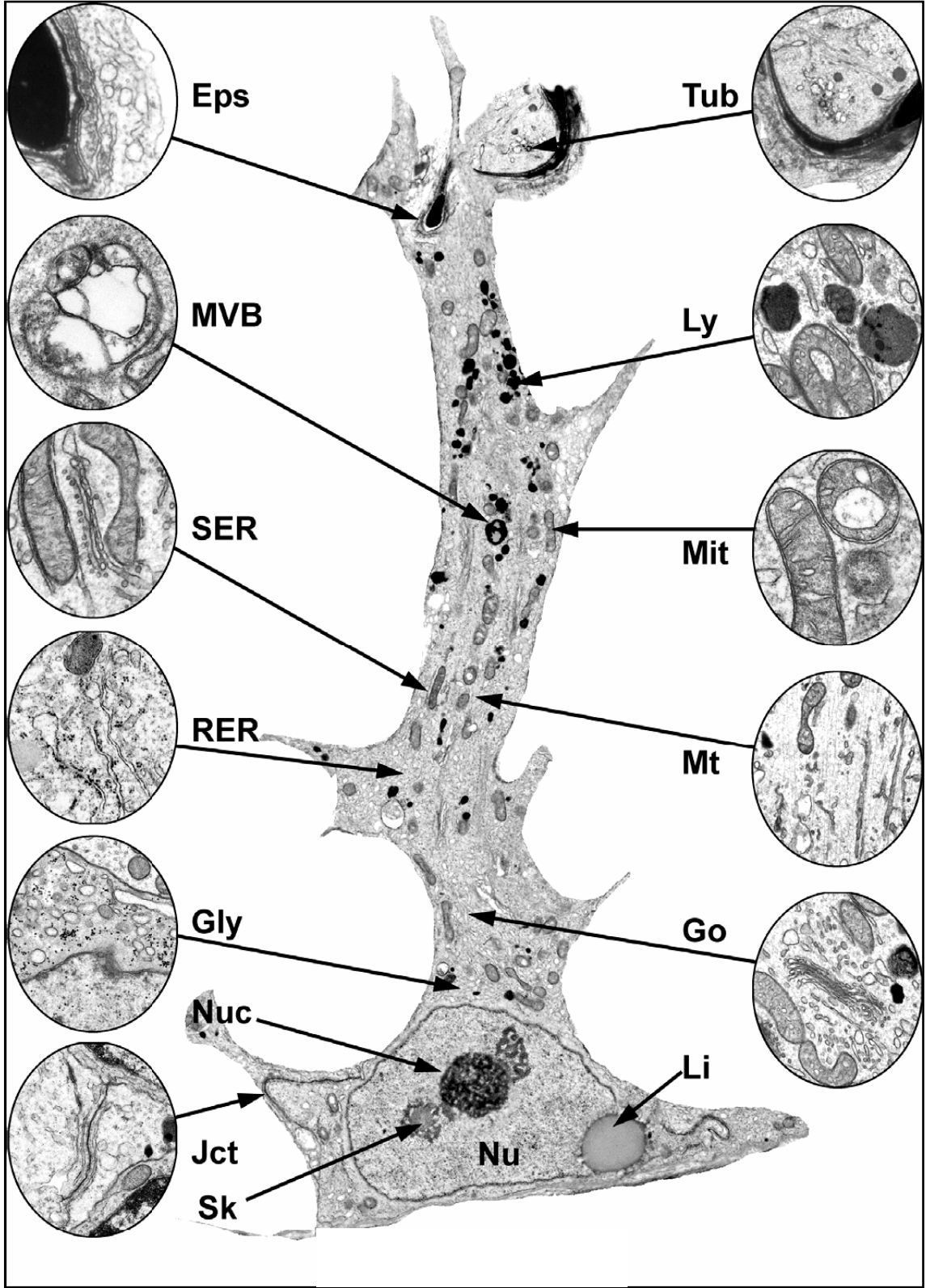
Sertoli hücreleri morfolojik açıdan tipA ve tipB olarak adlandırılan iki farklı morfoloji gösterirler. TipA Sertoli hücrelerinde lümene atılmaya hazır olgun spermatidler Sertoli hücresi kripleri arasında ancak oldukça derinlerde, pakiten spermatositlere ve yuvarlak spermatidlere yakın bulunur. Bunun aksine tipB Sertoli hücrelerinde spermatidler yüksekte ve lümene yakın bulunur ve kripler zor seçilir durumdadır. Seminifer epitel döngüsünün V. basamağı sırasında görülen Sertoli hücreleri daha çok tip A, VI-VIII. basamakları boyunca görülen Sertoli hücreleri ise tip B Sertoli hücreleri olarak değerlendirilir (63).

2.3.2.1. Hücre İskeleti

Sertoli hücresi iskeletinin üç temel elemanı vardır, bunlar, aktin filamanlar, ara filamanlar ve mikrotübüllerdir. Genel hücre biyolojisi çerçevesinde bu elemanların hücre yapısında ve fonksiyonundaki rolleri bilinmektedir ve başlıca, hücre şekli ve polaritesinin devamlılığı, hücre içi organellerin hareketi ve pozisyonlarının belirlenmesi, psödopodlar ve mikrovillüsler gibi sitoplazmik

uzantılar oluşturulması, proteinlerin sınıflanması ve hedeflerine yönlendirilmesi ve hücre organellerin hücre zarına tutturulması şeklinde sıralanabilir (33,34,63,79).

Sertoli hücrelerinde ise bu üç elemanın her birinin kendine has hücre içi dağılımı vardır ve bu dağılım seminifer epitel döngüsünün 14 ayrı basamağında diğerlerinden farklı ayrı bir model oluşturur. Sertoli hücrelerinde genel hücre fonksiyonlarına ek olarak bu elemanlar, özelleşmiş seminifer epitel aktivitelerine de katkıda bulunurlar. Bunlar arasında, 1) hücre şeklinin korunması, 2) hücre içindeki organellerin pozisyonunun belirlenmesi ve taşınmalarının sağlanması, 3) hücre-hücre ve hücre-hücre dışı matriks temasının olduğu bölgelerde hücre membranının sabitlenmesi, 4) gelişimin farklı evreleri boyunca gelişen germ hücrelerinin pozisyonunun belirlenmesi, seminifer epitele tutunmalarının sağlanması ve seminifer epitel boyunca hareketine yardım edilmesi ve 5) ergin spermatidlerin spermiyasyon ile seminifer epitelden salıverilmesine katkıda bulunulması gibi işlevler sayılabilir (63,79).



Şekil 2-11: Sertoli hücresi ince yapısı. (Nu): Çekirdek; (Nuc): Çekirdekçik; (Sk): Uydu karyozom; (Li): Lipid damlacıkları; (Jct): Bağlantı Kompleksleri; (Go): Golgi kompleksi; (RER): Granüllü Endoplazmik Retikulum; (SER): Düz Endoplazmik Retikulum; (Mit): Mitokondri; (Mt): Mikrotübüller; (MVB): Multiveziküler Cisimcikler; (Ly): Lizozomlar; (Eps): Ektoplazmik Özelleşmeler; (Tub): Tubulobulbar Kompleks.
- Skinner (63)'den.

1) Aktin

Aktin filamanları moleküler ağırlığı 42 kDa olan ve memelilerde altı farklı izoformu bulunan aktin monomerlerinden meydana gelmişlerdir. Sertoli hücresinde aktin, hücre yapısının devamlılığında ve hücre kontraktilitesinde son derece önemli bir rol oynar; aynı zamanda hücre bağlantı komplekslerinin bulunduğu periferik kısımlarda da bulunması aktinin hareketle ilgili süreçlere de katıldığı izlenimi vermektedir. Sertoli hücreleri de dahil bütün ökaryotik hücrelerde birbiriyle denge halinde birlikte bulunan G-aktin ve F-aktin olmak üzere iki aktin havuzu vardır. Bu havuzlardan birinin baskın çıkması aktin filamanlarının polimerizasyon yada depolimerizasyonuna sebep olarak hücre iskeletinin genel durumunu belirler. Aktin filamanları ile vinculin ve zyxin adaptör proteinleri ilişkili bulunmuştur. Zyxin immün-çöktürme yoluyla noktasal bağlantılarda ve sitoplazmik uzantılarının ileri uçlarında aktin ile ilişkili olarak gösterilmiştir. Aktin filamanları aynı zamanda, Sertoli hücrelerinin kendi aralarında ve Sertoli hücreleri ile germ hücreleri aralarında mevcut bulunan modifiye bir tür adezyon bağlantı kompleksi olan “ektoplazmik özelleşmeler” ve “tubulobulbar komplekslerin” de temel yapı taşlarından biridir. Bu durum her iki bağlantı kompleksinin aynı zamanda gelişen germ hücrelerinin hareketinde de rol aldıklarını gösterir (63,79,83,84).

Fare haploid germ hücreleri iki özel aktin ekspresse ederler, bunlardan birisi T-aktin1 diğeri T-aktin2’dir, diğer aktinlerle %40 benzerlik gösterirler. T-aktin1 spermatid sitoplazmasında dağılım gösterirken, T-aktin2 spermiyum başı ve kuyruğunda dağılım gösterir. Bu da bu iki germ hücresine özgü aktinlerin spermatogenez süresince germ hücrelerinin morfogenezi açısından önemli olduğunu gösterir (63,79,83,84).

2) İntermediyer Filamanlar

İntermediyer filamanlar hücre-hücre ve hücre-hücre dışı matriks bağlantı yerlerine has bir yerleşim gösterirler, desmozomlar ve hemidesmozomlar olmak üzere iki tür adezyon bağlantı kompleksi ile ilişkilidirler (63,78,79).

Beş tip ara filaman bulunmaktadır ve testiste varlığı gösterilenlerin listesi Tablo-1’de verilmiştir. Bunlar Sertoli hücrelerinin kendi aralarındaki ve Sertoli hücreleri ile germ hücreleri arasındaki desmozom benzeri bağlantılarda gösterilmiştir. İntermediyer filamanların spermatogenezdeki kesin rolleri bilinmemekle beraber seminifer epitelin bütünlüğünün sağlanmasına ve korunmasına, çekirdeğin pozisyonunun belirlenmesine ve sabitlenmesine, hücre membranı ile çekirdek arasındaki iletişime katkıda bulundukları düşünülür (63,78,79).

Tablo 2-1: Testiste Bulunan Ara Filaman Tipleri		
Filament tipi	Örnek	$M_r (10^{-3})$
Tip I	Asidik keratinler	40–57
Tip II	Bazik keratinler	53–67
Tip III	Vimentin	57
	Desmin	53
	Glial fibriler asidik protein	50
	Nestin	200
	Periferin	57
Tip IV	NF-L	70
	NF-M	67
	NF-H	60
	α -İnterneksin	x
Tip V	Lamin A	x
	Lamin B	x
	Lamin C	x

Sertoli hücrelerinde bulunan tipIII ailesi mensubu ara filamanlardan birisi de vimentindir. Tipik bir Sertoli hücresinde vimentin filamanları 57 kDa’luk vimentin monomerlerinin polimerizasyonu sonucu oluşur. Bunlar çekirdeği sararak tipik bir “hale” görüntüsü oluştururlar ve çekirdek çevresinden hücre periferine doğru, hücrelerarası bağlantılarda sonlanan uzantılar gönderir. Bu bağlantılar arasında, Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar ve ektoplazmik özelleşmeler vardır. Diğer hücre tiplerinde olduğu gibi vimentin ara filamanlarının Sertoli hücrelerindeki işlevi tam olarak anlaşılamamıştır. Yapısal yönden destek oluşturmak, hücre membranı ile çekirdek arasında iletişim sağlamak, çekirdek pozisyonunun belirlenmesi ve sabitlenmesine yardım etmek gibi fonksiyonları olabileceği yönünde görüşler vardır (23,63,78,79,85,86,87).

3) Mikrotübüller

Sertoli hücresi mikrotübülleri seminifer epitelin en belirgin ve göze çarpan elemanlarıdır. Mikrotübüller tubulinler tarafından meydana getirilirler. Bugüne kadar en az altı tubulin tanımlanmıştır, bunlar α , β , δ , ϵ , γ ve ζ 'dir, fakat mikrotübül iskeletinin temel yapı taşları α - ve β - tubulinlerdir. Sertoli hücrelerinde mikrotübül organizasyonunun mekanizması in-vivo olarak henüz ortaya çıkarılmış değildir. Seminifer epitel döngüsü basamakları boyunca Sertoli hücresi iskeletinin düzenlenmesinin altında yatan mekanizmalar da hala tam olarak aydınlatılamamıştır (79)

Sertoli hücrelerinde mikrotübüllerin yerleşimi en yoğun şekilde hücre gövdesinin uzun eksenine boyunca gözlenir. Mikrotübüllerin seminifer epitel döngüsünün bazı basamaklarında apikaldeki uzayan ve uzamış spermatidlere ince uzantılar gönderdikleri gözlenir. Seminifer tübül enine kesitlerinde tübülün için yapılan immünohistokimya boyamalarında seminifer epitelin bazalinden lümene doğru uzanan araba tekerleği tarzında bir model ortaya çıkar. Mikrotübül yerleşimi başlıca hücreSEL ve salgısal hareketlerin ana rotası üzerinde yer alır ve seminifer epitel döngüsü basamakları boyunca kararlı kalır. Mikrotübüller aynı zamanda ektoplazmik özelleşmeler adezyon bağlantı bölgelerinde bulunurlar (34,63,79).

Sertoli hücresi fonksiyonlarının pek çoğu mikrotübül-bağımlı elemanlarla gerçekleştirilmektedir (33). Bu fonksiyonlardan başlıcaları şu şekilde özetlenebilir:

1) Sertoli hücrelerinin prizmatik şeklinin meydana getirilmesi ve korunması şeklinde yapısal destek oluştururlar. Mikrotübüller aynı zamanda Sertoli hücresi çekirdeklerinin yarıklarına da uzanırlar ve burada yer alan diğer hücre iskeleti elemanı ara filamanlar ile etkileşerek çekirdek pozisyonunun belirlenmesine ve hücre yapısının korunmasına katkıda bulunurlar (33,34,79).

2) Hücre içi organellerin pozisyonlarının belirlenmesi ve yerlerinin değiştirilmesinde rol alırlar. Bazı sitoplazmik organeller, hücre içindeki çizgisel duruşlarından da anlaşılabilceği gibi, mikrotübül demetleri boyunca dizilirler ve taşınırlar. Sertoli hücrelerinde mikrotübüller ektoplazmik özelleşme adezyon bağlantı komplekslerinin yapısına da katılan düz endoplazmik retikulumların doğrusal görünümünün ve pozisyonlarının devam ettirilmesine ve mitokondrilerin düzgün ve düzenli dağılımlarına yardım ederler (34,63,79).

3) Gelişimin farklı evreleri boyunca gelişen germ hücrelerinin pozisyonunun belirlenmesi, seminifer epitele tutunmalarının sağlanması ve seminifer epitel siklusünün farklı basamaklarında seminifer epitel boyunca hareketine yardım edilmesinde, gelişen spermatidlerin kafalarının şekillendirilmesinde, Sertoli hücresi membranının dış hatlarının spermatogenez sürecinde kriptlere yerleşmiş düzensiz şekilli spermatidlere uyumunu sağlamak ve nihayet olgunlaşmasını tamamlamış ergin spermatidlerin spermiyasyon ile seminifer epitelden salıverilmesinde rolleri vardır (33,34,63,79,84).

4) Metabolitlerin ve bağlayıcı proteinlerin seminifer tübüllerin lümenine doğru kutupsal salınımında ve salgılanan parakrin faktörlerin ve adezyon moleküllerinin germ hücresi tiplerine seçici olarak hedeflenmesinde önemli fonksiyonları vardır. Sertoli hücreleri seminifer tübül lümenine çok sayıda madde salgırlar ve bazal kompartmandan apikal kompartmana pek çok maddenin taşınmasına aracılık ederler. Sertoli hücreleri tarafında salgılanan maddelerin pek çoğu germ hücrelerinin fonksiyonları için hayati önem taşır ve bunların germ hücreleri tarafından alındığı gösterilmiştir. Seminifer epitelde hücrelerin ve salgı ürünlerinin hareketlerinin izlediği rotalar Sertoli hücresi mikrotübüllerinin dağılımıyla izdüşüm göstermektedir. (33,34,63).

Mikrotübüllerin testis fonksiyonlarının gerçekleştirilmesindeki önemi en iyi, mikrotübüller hedef alan kimyasal zehirleyici veya farmakolojik ajanların seminifer epitel üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalarla ortaya konmuştur (34,79).

Bunlardan 2,5-Hexanedione ile yapılan çalışmalar neticesinde testis hasarı olduğu, bu hasar neticesinde Sertoli hücresi morfolojisinde ve testis mikrotübül organizasyonunda değişiklikler meydana geldiği, seminifer tübül sıvısı salgılanmasında azalma olduğu, germ hücrelerinde apoptozun arttığı, organellerin yanlış yerlere yerleştiği ve salgı proteinlerinin yanlış hedeflere yönlendiği gözlenmiştir (34).

Bu tip ajanlardan bir diğeri olan karbendazim, mikrotübüllerin alfa-tubulin alt ünitelerine bağlanarak Sertoli hücrelerinde mikrotübül polimerizasyonunu bozar ve uzamış spermatidlerin seminifer epitelden dökülmesine neden olur. Uzamış spermatidler seminifer epitelden, üzerlerine yapışmış Sertoli hücresi sitoplazması parçacıkları ile birlikte koparlar. Sertoli hücresi gövdesinde mikrotübül immünoreaktivitesi gözlenmezken, tübül lümenine kopan sitoplazma parçacıklarında hala mikrotübül immünoreaktivitesinin pozitif olduğu gözlenmiştir. Bu durum aynı zamanda, Sertoli hücrelerinde mikrotübül organizasyon merkezinin son derece kendine has bir şekilde, diğer hücrelerde olduğu gibi çekirdek çevresinde değil tam aksine hücrenin apikalinde olduğunu göstermektedir. Sertoli hücrelerinde mikrotübüller apikalden bazale doğru büyürler ve çekirdek çevresindeki ara filamanlara bağlanırlar (79).

2.3.2.2. Bağlantı Kompleksleri

Testiste üç tip hücre bağlantı kompleksi bulunur. Bunlar, sıkı bağlantılar “Zonula Occludens”ler, adezyon bağlantıları “Zonula Adherens”ler ve iletişim bağlantıları “Gap Junction”lardır. Bağlantı bölgesinde aktin filamanların bulunduğu adezyon bağlantıları testiste özelleşerek testise özgü “Ektoplazmik Özelleşmeler” ve “Tubulobulbar Kompleksler” halini almıştır. Genelde bu bağlantıların değişik epitellerdeki birbirlerine göre konumları sabittir; sıkı bağlantılar hücrelerin en apikal kısmında yer alırlar, bundan sonra adezyon bağlantıları gelir ve bundan sonra da paralel hatlar halinde desmozomlar yer alır. Hep birlikte bu yapılar “bağlantı kompleksini” oluştururlar. Diğer yandan, iletişim bağlantıları ve desmozomlar, sıkı bağlantılar ve adezyon bağlantıları ile

doğrudan ilişkili değildirler ve epitel boyunca dağılmış olabilirler. Testiste sıkı bağlantıların, adezyon bağlantılara ve iletişim bağlantılarına nazaran konumları diğer epitellerden farklıdır. Diğer epitellerde apikalde bulunmasına karşılık, KTB'ni oluşturan Sertoli hücresi sıkı bağlantıları bazal membrana en yakın bağlantı kompleksi olarak seminifer epitelin bazal kompartımanında bulunurlar (63,79,83,84,88).

Sıkı bağlantılar ve iletişim bağlantılarının tek tipi bulunurken birden çok tipte yapıştırıcı-tutturucu bağlantı vardır; bunlar, adezyon kuşakları veya adezyon bağlantıları, noktasal bağlantılar, desmozomlar ve hemidesmozomlardır. (63,79,83,84,88).

SIKI BAĞLANTILAR

A) Kan-Testis Bariyeri Kavramı

KTB kavramı ilk kez 1970'lerde iki önemli bulgu üzerine gelişmiştir. İlk olarak, seminifer tübüllerden ve rete testisten alınan sıvılarla seminifer tübül dışından alınan lenf ve plazma sıvılarının içerik ve protein kompozisyonları açısından büyük değişiklikler gösterdikleri görüldü. Örneğin, rete testisten alınan sıvılardaki potasyumu ve klor oranının kan plazmasından daha yüksek olduğu görüldü. Ayrıca rete testis sıvısının total protein içeriği plazmanınkinin 1/20'si ile 1/50'si arasındaydı. İkinci olarak, radyoaktif işaretleyici ve boyaların kan plazmasından testis sıvılarına geçişinde varyasyonlar vardı. Bu sonuçlar bir bariyerin varlığı konusunda bir fikir uyanmasına neden oldu (79,83).

Modifiye bir sıkı bağlantı olan ve aynı zamanda seminifer epitel bariyeri olarak da bilinen KTB, sıçanlarda yaklaşık 15-18. gün civarında seminifer epitelin bazal üçte birlik kısmında yerleşmiş olan Sertoli hücresi sıkı bağlantıları tarafından meydana getirilir. KTB seminifer epiteli iki kompartımana ayırır. Biri spermatogonyumların, preleptoten ve leptoten spermatositlerin bulunduğu bazal kompartıman, diğeri spermatogenez ve spermiyogenezin değişik basamaklarındaki mayotik spermatositlerin ve spermatidlerin bulunduğu luminal kompartımandır (63,79,83,88).

KTB olarak ifade edilen “occluding zonula” ile Sertoli hücresi sıkı bağlantıları olan “occluding macula” arasında ince bir fizyolojik ayırım söz konusudur. Çünkü KTB ile Sertoli hücresi sıkı bağlantıları in-vivo olarak senkronize bir şekilde meydana gelmemektedirler. Seminifer epiteli bazal ve luminal olmak üzere iki kompartımana bölen “occluding zonula” KTB’nin temelini oluşturur. “Occluding zonulayı” yani KTB’ni oluşturan fibriller süreklilik gösterir ve Sertoli hücrelerini çepeçevre sarar, böylece sızdırmaz bir bariyer meydana getirir. Sıçanlarda KTB doğumdan sonra yaklaşık 15-18 gün civarında teşekkül eder. Diğer yandan “occluding macula” yerel bir yapışma ile meydana gelir ve dokular arası sıvı veya işaretleyici ajanlar kolaylıkla bunlardan geçebilir. Morfolojik çalışmalar, testiste bulunan “occluding maculaları” meydana getiren fibrillerin süreklilik göstermediklerini ve KTB’ni oluşturan “occluding zonulanın” hemen altında veya üstünde bulunabileceklerini göstermiştir (63,79,83,88).

B) Sıkı Bağlantı Membran Proteinleri

Testiste bulunan sıkı bağlantılarda dört farklı dâhili membran proteini vardır, bunlar, Okudinler, Klaudinler, “Junctional Adhesion Molekülleri” (JAM) ve Trisellülin’dir.

1) Occludin Ailesi:

Occludin 60-65 kDa ağırlığında tek bir polipeptid zincirinden ibaret Ca^{+2} bağımsız bir hücrelerarası adezyon molekülüdür. Her bir occludin molekülü dört membran içi alanı, iki hücre dışı halka, bir hücre içi halka, küçük bir NH_2 -sitoplazmik alan ve bir büyük $COOH$ - sitoplazmik alanı ihtiva eder. Sitoplazmik $COOH$ - alanı ZO-1 ile 1:1 oranında eşleşmiştir. Occludinin $COOH$ - alanının kırılması in-vitro olarak işaretleyici ajanların sıkı bağlantı bariyerinden içeri geçmesine sebep olmuştur (79,89,90,91).

Kültür ortamında köpek böbreği hücrelerinde piliç occludininin aşırı ekspresse edilmesi sonucunda sıkı bağlantı ipliklerinin sayısının arttığı bununla eş zamanlı olarak epitelyal elektriksel dirençte bir yükselme meydana geldiği,

böylece sıkı bağlantı bariyerlerinin “sıkılaşmasına” sebep olduğu gözlenmiştir. Bununla beraber sıkı bağlantılardan occludinin ortadan kaldırılması hücre morfolojisini önemli oranda etkilememiştir; bu da diğer sıkı bağlantı proteinlerinin bunun yapısal rolünü üstlenebileceği anlamına gelir (83,89).

Occludin kendi başına işlevsel ve kalıcı bir sıkı bağlantı bariyeri oluşturamaz. Occludine-yoksunu embriyonal kök hücreler sıkı bağlantıları olan kutuplaşmış epitelyal hücreler haline farklılaşabilirler. Çalışmalar, epitellerde occludinlerin ve claudinlerin birlikte sıkı bağlantı fonksiyonunun devamlılığını sağladıklarını göstermiştir. Occludinin ilk hücre dışı halkasının önemli ölçüde hücre adezyon fonksiyonuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir. İmmüno-dondurma-kırma elektron mikroskopisi ile yapılan çalışmalar da yine occludinin hücre membranında sıkı bağlantı fibrilleri arasında konsantre olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte bazolateral membranda sıkı bağlantı fibrilleri halinde düzenlenmemiş fazladan küçük bir occludin havuzu daha bulunur. Bu lateral occludin havuzunun sıkı bağlantıların hızlı değişimi için molekül rezervi olarak işe yaradığı düşünülmüştür. Aynı fibril üzerinde bulunan iki bitişik occludin molekülünün lateral oligomerizasyon yapabilme yeteneğinin olduğunu gösterilmiştir, böylece iki membran tabakası içinde kenetlenmiş sıkı bağlantı fibrilleri oluşur (83,89,92,93,94).

Erişkin testisinde occludin mRNA seviyeleri oldukça yüksek bulunmuştur. İmmünohistokimya yoluyla erişkin sıçan ve fare testisinde occludinin yerinin tam olarak KTB'ne denk düştüğü gösterilmiştir. Her iki türde de yerleşimi seminifer epitel döngüsü basamaklarına bağlı değildir bu da bu yapıların bütün spermatogenez sürecinde bütün epitel döngüsü boyunca önemli olduğunu gösterir (79,89).

İlk hücre dışı halkası %60'a yakın tirozin ve glisin amino asitlerinden oluşmuştur ve hücre-hücre adezyonunda rol alır. Occludinin ikinci hücre dışı halkasına denk düşen 22 amino asitlik sentetik bir peptidin epitelyal veya Sertoli hücre kültürlerine ilave edilmesi yada testis içine enjekte edilmesi KTB'nin in-vitro ve in-vivo olarak bozulmasına ve geri dönüşlü infertilite oluşmasına sebep

olmuştur; bundan yola çıkılarak, ikinci hücre dışı halkasının da parasellüler bariyerin oluşturulmasına katkıda bulunduğu düşünülmüştür. Bu durumda sentetik peptid, komşu Sertoli hücrelerine ait occludinler arasındaki homotipik etkileşimi bozarak KTB'nin dağılmasına sebep olmuştur. Bu da neticede seminifer epitelden germ hücrelerinin kaybına neden olmuştur. Peptid metabolize olduğunda yada temizlendiğinde KTB tekrar kurulmakta ve spermatogenez geri dönmektedir. Bu sonuçlar sıkı bağlantıların işlevselliği açısından ikinci hücre dışı halkanın önemli bir rolü olduğunu gösterir. Bütün bunlar ise occludinin testis fonksiyonları, spermatogenez ve germ hücresi hareketi için gerekli olduğunu göstermektedir (79,89,92).

İmmünohistokimya yoluyla fare testisinde doğum sonrası gelişim sürecinde occludinin sıkı bağlantı bölgelerinde birikiminin KTB'nin oluşumu ile yakın ilişkili olduğu gösterilmiştir. Doğum sonrası 23. gün ve yetişkinlik arasındaki sürede seminifer epitelde yaygın ve yayılmış olarak bulunmuştur. Genleri değiştirilmiş occludin -/- farelerin erken doğum sonrası dönemde testisleri ve seminifer tübülleri tesbit edilir bir hasar olmaksızın normal görünmekle beraber yetişkinlik döneminde beyinde kalsifikasyon, kemiklerde incelleme ile birlikte testiküler tübüllerde dumura uğrama ve germ hücresi kaybı gibi değişiklikler tesbit edilmiştir (83,89,92).

2) Claudin Ailesi:

Claudinler, aynı zamanda “**O**ligodendrosit-**S**pesifik **P**rotein” (OSP) olarak da bilinirler. Sıkı bağlantılara işlevsellik kazandıran bir başka dahili sıkı bağlantı membran proteinleridir. Geleneksel dondurma-kırma teknikleri ile claudinlerin yerinin sıkı bağlantı alanları olduğu gösterilmiştir. Claudinler sıkı bağlantılarda bağlantı kompleksinin sızdırmazlık fonksiyonunun oluşmasından sorumlu öncelikli sıkı bağlantı proteinleridir. Moleküler ağırlıkları 20-24 kDa arasında değişen claudin sıkı bağlantı membran içi proteinleri ailesinde, farklı epitellerde en azından 24 farklı üye bulunur. Farklı claudinler arasındaki fark COOH-uçlarından kaynaklanır; bu da farklı organlarda sıkı bağlantı dinamiklerine katkılarının farklı sitoplazmik proteinlerle olan ilişkileriyle alakalı olduğunu

gösterir. Her bir claudinin ekspresyonu farklı dokular arasında ciddi farklılıklar gösterir; örneğin claudin-11 büyük oranda testis ve beyinle sınırlıdır (79,89,90,91,92,95,96).

İki farklı claudin tipi aynı hücrede birlikte ekspresse edilebilmektedir. Son çalışmalar bir hücredeki claudinlerin komşu hücredeki claudinlerle heterotipik ve homotipik olarak bağlanabileceğini göstermiştir. Kültür ortamında fibroblastlarda bir claudin üyesinin ekspresyonunun indüklenmesi üzerine sıkı bağlantı ipliklerinin oluşturulabileceği gösterilmiştir. Claudin ekspresse eden fibroblastlara occludin aşılandığında occludin, claudin tarafından fibrillerin içine alınmıştır; bu da claudinlerin fibril formasyonunun başrol oyuncusu olduğu kanaatini doğurmuştur. Claudinlerin hücrelerarası boşluğu kapatmak için hücreler arası temas noktalarında occludinlerden daha kuvvetli bir adezyon sağladıkları düşünülmektedir. Claudinler ve occludinler oligomerler ve hetero-oligomerler şeklinde organize olabilirler (79,83,89,92,95).

Testiste yedi farklı claudin molekülü bulunur bunlar, claudin-1, -3, -4, -5, -7, -8, -11'dir, claudin-11'in yerleşimi KTB'ne hastır. Claudin-11 ekspresyonu germ hücrelerinde bulunmaz, testiste sadece Sertoli hücrelerinde mevcuttur (79,83,89,90,97,98).

Claudinler, ikinci hücre dışı halkalarının ve sitoplazmik parçalarının daha küçük oluşu dışında occludinlerle benzer bir moleküler mimari gösterirler. Her bir Claudin molekülü, kısa bir NH₂- sitoplazmik alanı, iki hücre dışı halka, dört membran içi alan ve uzun bir COOH- sitoplazmik alandan oluşur. Bununla birlikte Claudinlerin birincil amino asit dizileri occludinlerle anlamlı bir benzerlik göstermemektedir, bu bulgu bu iki sınıf bağlantı proteinlerinin birbirinden farklı olduğunu gösterir (79,83,89).

Claudin -/- L hücreleri kullanılarak yapılan claudin ile gen aşılama çalışmalarında, claudin-1 ile claudin-3'ün ve claudin-2 ile claudin-3'ün karşılıklı olarak sıkı bağlantı kompleksi oluşturabildikleri, ancak claudin-1 ile claudin-2'nin oluşturamadıkları görülmüştür. Böylece, bu 24 claudin içinde ancak bazılarının birbirleriyle etkileşime girebilecekleri anlaşılmaktadır (83,89).

Fare testisinde in-vivo ekspresse edilmesi doğum sonrası 6-16. günlerde başlar, bu aynı zamanda KTB'nin doğum sonrası ~10-16. günlerde oluşmaya başlaması ile eş zamanlıdır. Genleri iptal edilmiş hayvan çalışmaları, claudin-11 taşımayan farelerin steril, arka ayaklarının zayıf ve sinir iletiminde gecikme olduğunu göstermiştir. Claudin-11 geni iptal edilmiş farelerde merkez sinir sistemi miyelinlerinde ve testiste Sertoli hücreleri arasında sıkı bağlantıların membran içi fibrilleri mevcut değildi. Bu sonuçlar claudin-11'in KTB'nin bütünlüğü ve spermatogenez sürecinde oynadığı rolün önemini göstermektedir (79,83,89,95).

3) JAM:

Yeni tanımlanmış bir Ig süperailisi olan JAM'ler, epitelyal ve endotelyal hücrelerde sıkı bağlantı alanlarında yerleşmiş oldukları gösterilmiş üçüncü sıkı bağlantı dahili membran proteinidir. Ancak JAM'ların tam bir sıkı bağlantı yapı taşı olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Bugüne kadar JAM-1, JAM-2 ve JAM-3 olarak adlandırılan üç farklı JAM molekülü tanımlanmıştır. Farklı dokulardaki JAM'ların moleküler ağırlıkları karbonhidrat çeşitliliğine bağlı olarak 36 ila 41 kDa arasında değişmektedir (79,89,91).

JAM'lar occludin ve claudinlerden çok farklı bir moleküler yapı gösterir. Her bir JAM molekülü bir hücre içi alan, bir membran içi alan ve bir hücre dışı alandan oluşur. JAM'lerin aynı zamanda homotipik hücre-hücre adezyonunu kolaylaştırdığı da bildirilmiştir. Bununla birlikte, JAM'in gerçekten sıkı bağlantı fibril elemanı olup olmadığı ve tek başlarına fonksiyonel bir sıkı bağlantı bariyeri kurup kuramayacağı bilinmemektedir. JAM'lar occludin, ZO-1 ve cingulin ile aynı yerlerde bulunur (83,89).

Anti-JAM antikor kullanılarak yapılan bir çalışmada lökositlerin endotelyal hücrelerden geçişinin inhibe edildiği tesbit edilmiştir, bir başka çalışmada ise TNF- α ve IFN- γ ilave edilmesinin JAM'in farklı bir şekilde dağılımına neden olduğu, bunun ise lökositlerin umbilikal ven endotelinden göçünü arttırdığı

gösterilmiştir. JAM'ların homotipik hücre adezyonuna katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür ancak detayları tam olarak bilinmemektedir (79,89).

Fare testisinde JAM-1 ve JAM-2 tanımlanabilmiştir, JAM-3'ün varlığı kesin değildir. Testiste bulunan JAM-1 ve JAM-2'nin fonksiyonu tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır (83,89).

4) Trisellulin:

Tricellulin yeni tanımlanmış ve daha çok epitelyal hücre tabakalarında üç adet hücrenin birbiriyle temas ettiği köşe başı noktalarda dikey olarak yerleşmiş sıkı bağlantı iplikçikleri içerisinde konsantre olmuş bir dahili sıkı bağlantı proteindir. Trisellulinin dört adet membran içi alanı bulunur. 130 amino asitlik COOH- ucunun amino asit dizilişi occludine %32 oranında eştir, NH₂-ucu sitoplazmik alanı ise occludinin ucundan uzundur. RNAi metodu kullanılarak yapılan çalışmalarda trisellulinin sadece üç hücreli sıkı bağlantıların değil aynı zamanda klasik iki hücreli sıkı bağlantıların yapısına ve organizasyonuna da katıldı gösterilmiştir. Bütün epitelyal hücre tiplerinde bulunmasına karşın Tricellulin genindeki resesif bir mutasyonunun fenotipik olarak sadece sağırılığa neden olduğu bulunmuştur. Tricellulin geni iptal edilmiş hücrelerde ikili hücre sıkı bağlantılarının yapısının da etkilendiği gösterilmiş ve bundan yola çıkılarak ikili hücre sıkı bağlantılarının organizasyonu veya stabilizasyonu için üçlü hücre sıkı bağlantıların yasının normal olması gerektiği ileri sürülmüştür. Ayrıca alternatif kırılma yoluyla trisellulinin farklı izoformlarının meydana geldiği bildirilmiştir. Occludin geni iptal edilmiş hayvanlarda trisellulinin üçlü hücre bağlantılarına değil, ikili hücre sıkı bağlantılarına yerleştiği gösterilmiştir (99,100,101).

C) Sıkı Bağlantı Membran Proteinlerini Hücre İskeletine Bağlayan Sitoplazmik Sıkı Bağlantı Proteinleri

MAGUK, “**M**embrane-**A**ssociated **G**uanylate **K**inase” homolog protein ailesinin ZO-1, ZO-2 ve ZO-3 olmak üzere üç üyesi vardır. Bunlar, hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenlerler, membran organizasyonunu kontrol ederler, sinyal ileti yollarını yönetirler ve hücre kutuplaşmasını düzenlerler. Bu protein ailesinin her üyesinin moleküler yapısında hepsi protein-protein etkileşimleri için son derece önemli olan üç farklı alan bulunur: 1-bir maya enzim guanilat kinaz alanı 2-bir src-eşleşme bölgesi alanı (SH3); 3-bir veya daha fazla “**P**ostsynaptic **D**ensity-95/**D**iscs-large/**ZO**-1” (PDZ) alanları (79,83).

PDZ alanı bulunan proteinler, multiprotein komplekslerin yapılanmasını koordine ederler, sıkı bağlantı proteinlerini kümelerler, sinyal moleküllerini harekete geçirirler. PDZ alanı ihtiva etmeyen proteinler sıkı bağlantı alanlarında PDZ alanı bulunan proteinler tarafından çalıştırılırlar, yada doğrudan dahili sıkı bağlantı membran proteinleri ile etkileşirler. MAGUK proteinlerinin SH3 alanı aktin ile etkileşime girebilir ve bu, MAGUK homolog ailesine bağlı membran proteinleri ile aktin iskeleti arasında bir ilişki olduğu anlamına gelir (79,83).

1) ZO-1

Epitelyal ve endotelyal hücrelerde sıkı bağlantılarla ilişkili 1-225 kDa’luk bir periferel membran proteini olan ZO-1 yapı iskelet elemanı ve sinyal ileti özellikleri taşır, ilk kez hepatosit membranında tanımlanmıştır. ZO-1 occludinin C ucu ile 1:1 oranında ilişki kurar. Epitelyal ve epitelyal olmayan dokularda aynı zamanda aktin ve α -katenin ile de ilişkiye girer, bu da adezyon bağlantılarıyla da ilişkiye girebileceğini gösterir. Herhangi bir dokuda ZO-1 fazlalığının sıkı bağlantıların sıklığı ile bir ilişkisi olmadığı gösterilmiştir. Epitelyal hücrelerde sıkı bağlantı bütünlüğü tehlikeye düştüğünde ZO-1’in sıkı bağlantı bölgesinden kalkıp çekirdeğe gittiği gösterilmiştir. Bu olay aktin iskeleti aracılığıyla gerçekleştirilir. Bütün bunlar ZO-1’in sinyal iletimi olaylarında, örneğin transkripsiyonel düzenlenmesinde, da rol alabileceğini göstermektedir. Testiste

ZO-1 hemen hemen sadece KTB'ni oluşturan Sertoli hücresi sıkı bağlantılarında yerleşmiştir. ZO-1'in aynı zamanda Sertoli hücrelerinde erken dönem uzayan spermatidlere bitişik olan ektoplazmik özelleşmelerde de bulunduğu gösterilmiştir, bu da germ hücresi hareketine katkılarını gösterir. ZO-1, occludin dışında ZO-2, ZO-3, koneksin43, F-aktin, JAM, claudin-1, cingulin, spectrin, protein kinaz C gibi moleküllere de bağlanmaktadır. Yetişkin testisinde ZO-1, Sertoli hücresinin sıkı bağlantılarının ve diğer bağlantı tiplerinin membran farklılaşmalarıyla ilişkilidir; bu da bu proteinin sıkı bağlantılarla sınırlı olmadığını göstermektedir (79,83,89,97).

2) ZO-2

160 kDa bir protein olan ZO-2 ilk kez MDCK hücrelerinde ZO-1'in bağlanma partneri olarak tanımlandı, testiste yaygın olarak çalışılmamıştır. ZO-2 üzerinde yapılan bir çalışmada, üç MAGUK alanında ZO-1 ile %51 eşleşme gösterdiği fakat C-ucunda sadece %25 eşleşme gösterdiği bulunmuştur, C-ucundaki bu farklılığın bu iki molekülün fonksiyonel olarak özgün olmasında etkili olduğu düşünülmüştür. ZO-2 protein kinazlar tarafından aktive edilebilir. ZO-2 occludin ve claudine bağlanabilir; F-aktin, α -katenine de bağlanabilmesi bu molekülün ZO-1 gibi adezyon bağlantılarının düzenlenmesinde de rol alıyor olabileceğini gösterir (79,83,89,97).

3) ZO-3

130 k-Da bir polipeptid olan ZO-3 ilk kez MDCK hücrelerinde p130 olarak tanımlandı daha sonra hem ZO-1 hem ZO-2 ile olan eşleşmesi nedeniyle ZO-3 olarak adlandırıldı. MDCK hücrelerinde ZO-3'ün ZO-1 ve ZO-2'ye benzer şekilde protein kinazların bir substratı olduğu ve serine ve tyrosine amino asitlerinden fosforile edilebileceği gösterilmiştir. İmmünofloresan ve immünoelektron mikroskopisi yöntemleri ile ZO-3'ün sıkı bağlantı bölgelerinde ZO-1 ile birlikte bulundukları gösterilmiştir. Aynı zamanda occludin, claudin, aktin ile de etkileşime girdiği ancak ZO-2 ile etkileşmediği gösterilmiştir (79,83,89,97).

4) Diğerleri

Cingulin epitelyal ve endotelyal hücrelerin sıkı bağlantılarının sitoplazmik plaklarında bulunan 140 kDa ağırlığında bir fosfoproteindir ve sıkı bağlantı alanlarında ZO-1'den daha uzakta bulunur. Cingulin sızdırmaz bir bariyer oluşturduğu için sıkı bağlantı fonksiyonu açısından hayati önem taşır. Cingulin, miyozin ve paramiyozin gibi diğer hücre iskeleti proteinleri ile yapısal bir eşleşme gösterir. İn-vitro olarak cingulinin occludin, ZO-1, ZO-2 ve ZO-3 gibi diğer sıkı bağlantı proteinleri ile etkileşime girdiği gösterilmiştir. İmmünofloresan mikroskopik çalışmalarda cingulin sıçan ve fare testisinde bazal kompartımanda ZO-1 ile aynı yerde KTB'nin yakınında tesbit edilmiştir (79,83,97).

Simplekin 150 kDa'luk bir proteindir. Kutuplaşma gösteren epitellerin ve Sertoli hücrelerinin sıkı bağlantılarında immünohistokimya ve immünogold elektron mikroskopi teknikleri ile gösterilmiştir. Simplekin ZO-1, ZO-2 ve ZO-3 ile yapısal eşleşme göstermez (79,83,89,97).

Protein kinazlar, heterotrimerik G-alfa proteinleri, küçük GTP-bağlayıcı proteinler (Rab3B, ve Rab13), AF6, Src substratı ve c-yes, sıkı bağlantıların sitoplazmik yüzeylerinde tesbit edilmiştir; bununla birlikte bu moleküllerin pek çoğunun fonksiyonları bilinmemektedir (79,83,89).

D) Sıkı Bağlantıların Fonksiyonları

Memeli dokularında testis de dahil, tek bir tip sıkı bağlantı vardır o da zonula occludens'dir. Dondurma-kırma yöntemiyle yapılan çalışmalar testiste sıkı bağlantıların, her bir hücrenin bazalini çepeçevre çeviren 50-100 adet ~10 nm çapında fibriller bulunan alanlardan müteşekkil olduğunu göstermiştir. Buralarda komşu hücrelerin plazma membranları yakın ve sıkı temasta bulunur. Sıkı bağlantı fibrillerinin biyokimyasal içeriği tam olarak bilinmemekle birlikte her birinin, occludin ve claudin gibi parasellüler alanı sıkıca kapatan membran içi proteinlerin sıkıca gruplanıp sıralanmasından meydana geldiği düşünülmektedir.

Bu bağlantı kompleksleri seminifer tübülleri bazal ve luminal olarak iki kompartımana ayırır (79,83,89,93).

Sıkı bağlantı bariyerinin sıklığı ile sıkı bağlantı iplikçiklerinin sayılarının korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Sertoli hücresi sıkı bağlantılarının memeli vücudunda bulunan en sıkı sıkı bağlantılar olduğu bilinmektedir, bu da Sertoli hücrelerindeki sıkı bağlantılarda nisbeten daha fazla sayıda bağlantı iplikçığı bulunacağı kanaati doğurmaktadır. Oysa, Sertoli hücresi sıkı bağlantı bariyerinin in-vitro olarak $\sim 100 \text{ ohm/cm}^2$ elektrik rezistansa sahip oldukları gösterilmiştir; bu ise köpek böbrek hücreleri ve keratinositlerde in-vitro gözlenen değerin onda biri kadardır. Bu da KTB'nin sıklığının böbrekte ve epitellerde bulunanların ancak onda biri kadar olabileceğini düşündürmüştür. Ancak başka bir çalışmada Sertoli hücresi sıkı bağlantı bariyerinin sıklığının in-vitro olarak testosteron varlığında ciddi oranda artabileceği gösterilmiştir. Bir diğer çalışmada rete testis sıvısında bulunan testosteron seviyesine eşdeğer bir dozda $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ testosteronun in-vitro olarak Sertoli sıkı bağlantı bariyerini CdCl_2 'nin bozucu etkisine karşı koruduğu gösterilmiştir. Testosteronun bu kültürde Sertoli hücreleri tarafından occludin ekspresyonunu da uyarabileceği gösterilmiştir. Bu sonuçların, testisteki sıkı bağlantı niteliklerinin ve davranışlarının androjenler tarafından düzenlendiği ve ayarlandığını gösterdiği düşünülmüştür (79,83,89)

Membran trafiği ve sinyal iletimi için gerekli olan proteinlerin pek çoğu sıkı bağlantılarda bulunduğundan sıkı bağlantıların sinyal iletimi ve trafiği için bir tür platform oluşturduğu düşünülmüştür. Sıkı bağlantıların çeşitli hücresel fonksiyonların, özellikle de preleptoten ve leptoten spermatositlerin KTB'den ve monositlerin epitelden geçişleri gibi hücre geçişlerini düzenlemek için sıkı bağlantı fonksiyonlarının koordinasyonunda sinyal iletimi için bir platform olarak öne çıktığı gösterilmiştir. Ancak bu olayların kesin düzenlenişi bilinmemektedir. Sertoli hücresi sıkı bağlantıları tarafından oluşturulan KTB sıçanlarda 15-18 günlerden sonra oluşur ve böylece germ hücrelerinin gelişim ve hareketi için gerekli olan mikro çevre kurulmuş olur (79,83,89).

Testisteki sıkı bağlantılar diğer dokularda bulunanlardan birkaç yönden farklılıklar gösterir. **Birincisi**, testiküler sıkı bağlantılar erginliğe kadar oluşmazlar, sıçanlarda bu doğumdan sonra ~15 gün civarına denk düşer. **İkincisi**, Sertoli hücresi sıkı bağlantı kompleksinin seminifer epiteli içinde son derece kendine has bir mimarisi ve konumu vardır; bunlar komşu Sertoli hücresi membranlarının bazal kompartımandaki çok yakın teması ile meydana gelir ve KTB'nin oluşumuna katılırlar. Testiste KTB, diğer dokulardakilerin aksine bazal laminaya en yakın olan bağlantı kompleksidir. Testislerdeki KTB aynı zamanda germ hücresi gelişimi için özel bir ortam meydana getirir, çünkü gelişen germ hücreleri sistemik dolaşıma ulaşamamaktadır, bu nedenle beslenmeleri ve biyolojik faktörlerin temini için doğrudan Sertoli hücrelerine bağımlıdırlar. **Üçüncüsü**, KTB diğer kan-doku bariyerlerine nazaran son derece dinamik yapılardır, çünkü preleptoten ve leptoten spermatositlerin sonraki gelişim aşamalarını geçirebilmeleri için luminal kompartımana geçebilmeleri açısından sürekli açılıp kapanmaları gerekmektedir (79,83).

Sıkı bağlantılara üç temel işlev atfedilebilir; **Birincisi**, bitişik hücreler arasında kurulan sıkı bağlantılar çözünmüş moleküllerin parasellüler yollardan difüzyonunu sınırlayarak yarı geçirgen bir bariyer oluştururlar. Bu özellikleri kompartmentizasyonda önemli bir rol oynarlar. Moleküllerin geçişi büyük oranda moleküler ağırlıkları ve kimyasal özelliklerine bağlıdır. Sıkı bağlantıların geçirgenliğinin dokular arasında farklılıklar gösterdiği, böylece farklı dokuların fizyolojik ihtiyaçlarını ve fonksiyonlarını düzenledikleri bilinir. Sıkı bağlantıların geçirgenlikleri değişik faktörler ve fizyolojik şartlar tarafından düzenlenebilir (79,83,102,103).

İkincisi, Sıkı bağlantılar bir hücrenin protein ve lipid bileşimi olarak birbirinden farklı olan apikal ve bazolateral alanları arasında bir sınır oluştururlar. Böylelikle endotelial ve epitelyal hücre kutuplaşmasını meydana getirir ve devamlılığını sağlarlar. Sertoli hücresi-Sertoli hücresi sıkı bağlantı kompleksleri de seminifer tübüllerde içerik olarak birbirinden farklı biri bazal ve diğeri luminal olmak üzere iki ayrı epitelyal kompartıman meydana getiren bir sınır oluşturur. İki kompartıman arasında proteinler ve lipidler gibi moleküllerin

birbirine karışmasını engeller. Bu Sertoli hücreleri için özellikle önemli bir yapısal özelliktir çünkü Sertoli hücreleri androjen bağlayıcı protein, testin ve transferrin gibi bazı ürünlerini kutupsal bir tarzda salgırlar (79,83,102,103).

Üçüncüsü, KTB aynı zamanda immünolojik bir bariyer oluşturur; bu bariyer germ hücresi yüzeylerinde bulunan antijenik yapıları sistemik sirkülasyondan ayırır. Bu bariyer aynı zamanda sistemik immünoglobülinlerin ve lenfositlerin luminal kompartımana girişini de engeller (79,83,102,103).

E) Sertoli Hücresi Sıkı Bağlantılarının Çalışma Prensipleri üzerine Mevcut Teoriler

Germ hücreleri gelişmiş bir hücre iskeleti sistemi taşımadıkları için spermatogenez sürecinde hareketleri Sertoli hücrelerine bağımlı gibi görünmektedir. Bu süreçte hangi mekanizmaların Sertoli hücrelerinin germ hücresi hareketini kolaylaştırması için sinyal oluşturdıkları, hem Sertoli hücreleri hem germ hücrelerinde, hücre hareketini tetikleyen etkileşimleri düzenlemek için hangi tür sinyal moleküllerinin harekete geçtiği konusu hala araştırma ve tartışma konusudur. Sertoli hücresi sıkı bağlantılarının açılıp-kapanma olayını açıklayan üç teori bulunmaktadır. İlki, **“fermuar teorisi”**dir. Buna göre, Sertoli hücresinin bazal kompartımanını tamamen çevreleyen sıkı bağlantı fibrilleri preleptoten veya leptoten spermatositlerin geçişini kolaylaştırmak için yıkılırlar, bir yandan da göç eden preleptoten spermatositlerin alt tarafından yeni “occluding zonula” kuşakları meydana gelir. Bununla birlikte kısa bir zaman dilimi için bile olsa işaretleyici elemanların tübül lümenine geçtiğini gösteren in-vivo bir çalışma mevcut değildir. İkincisi **“intermediyer hücresel kompartıman teorisi”**dir. Buna göre bazal kompartımandan luminal kompartımana geçerken germ hücreleri tarafından kullanılan bir ara kompartımanın varlığı öngörülür. Bununla birlikte yapılan morfolojik çalışmalar göstermiştir ki herhangi bir zaman diliminde her bir Sertoli hücresi başına yalnızca bir tane “occludin zonula” bulunmaktadır; buna göre de böyle bir kompartımanın varlığı söz konusu olamaz. Çünkü öyle olsaydı herhangi bir preleptoten spermatositin iki “occluding zonula” arasında sıkışmış bir vaziyette görüntülenmesi mümkün olurdu. Her iki

teori de preleptoten ve leptoten spermatositlerin KTB'nin ötesine geçmesini sağlamak için sıkı bağlantı fibrillerinin bozulmasını ve yeniden yapışmasını neyin tetiklediğini açıklamamaktadır. Üçüncüsü “**stres teorisi-membran bölümlerinin ardışık uzaklaştırılması teorisi**”dir. Buna göre çok sayıda germ hücrelerinin yukarı yönde sürekli göçü Sertoli hücresi “occluding zonula”sı üzerinde bir stres oluşturur. Bu stres sonuçta bağlantı fibrillerinde yönlenme değişikliğine ve “occluding zonula”yı oluşturan fibrillerin parçalanıp dağılmasına sebep olabilir. Bu teori germ hücrelerinin yukarı hareketini neyin tetikleyip kolaylaştırdığını, meydana gelen stresin sıkı bağlantı fibrillerinde nasıl olup kırılma ve yeniden yönlenme gibi değişikliklere neden olduğunu açıklamamaktadır (79,83,92).

F) Sıkı Bağlantı Dinamiklerini Düzenleyen Moleküler Mekanizmalar

Sıkı bağlantı dinamiklerini düzenleyen faktörler ve yolaklar çok az anlaşılabilmiştir. Bununla birlikte sıkı bağlantı dinamiklerinin düzenlenmesinde rol alan çeşitli sinyal ileti yolakları arasında, protein kinazlar, protein fosfatazlar, hücre içi Ca^{+2} , kalmodülin, G proteinleri, cAMP ve fosfolipaz vardır. Yağ asitleri, amino asitler, glikoz ve IgG gibi küçük moleküllerin besin absorpsiyonu ve enflamatuvar cevap sırasında epitelyal sıkı bağlantıları nasıl geçtiklerini açıklamak için iki biyokimyasal model ortaya atılmıştır (79,83).

1- Ca^{+2} modeli: Bu model, kültüre edilen köpek böbrek hücresi ortamından Ca^{+2} çekilmesinin, sıkı bağlantı bariyerinin ani olarak bozulmasına sebep olduğu gözlemine dayanmaktadır. Kültür ortamına Ca^{+2} eklenmesi üzerine hücre kutuplaşması yeniden sağlanmış ve sıkı bağlantı bariyeri yeniden kapanmıştır. Sertoli hücresi sıkı bağlantı bariyeri kültür ortamındaki Ca^{+2} 'nin seviyelerinin değiştirilmesi ile bozulabilmekte veya yeniden kapanabilmektedir. Bu bulgular Ca^{+2} 'nin testiste sıkı bağlantı dinamiklerinin düzenlenmesinde çok kritik bir rol oynadığını göstermektedir (79,83).

2- ATP modeli: Sıkı bağlantıların yapımı ve yıkımı süresince, aktin hücre iskeleti de, yine ATP-bağımlı bir olay olarak, geniş çaplı polimerizasyon ve

depolimerizasyona uğrar. Mesela, hücrelerin aktin filamanlarını bozan sitoşalazin ile muamele edilmesi parasellüler bariyeri bozar, bu da sıkı bağlantıların işlevselliğinde hücre iskeleti ağının önemini gösterir. ATP'nin sistemden çekilmesi durumunda ZO-1 fodrin gibi hücre iskeleti proteinleri ile ilişkiye girer. Bu ZO-1'in sıkı bağlantı alanından uzağa çekilmesine neden olur ve sonuçta sıkı bağlantı bariyerinin geçirgenliğine sebep olur. ATP'nin yerine konulması üzerine, ZO-1 ve fodrin arasındaki ilişki bozulur ve ZO-1 moleküllerinin tekrar sıkı bağlantı alanına dönmesine imkan doğar, sıkı bağlantı yeniden kapanır. Ancak bu model preleptoten ve leptoten spermatositlerin geçişi için bozulup yeniden yapılması gereken KTB'ni oluşturan Sertoli hücresi sıkı bağlantılarını açıklayamamaktadır. Bu model ayrıca dahili sıkı bağlantı membran proteinleri occludinler, claudinler ve JAM'ın bu süreçte ne gibi rolleri olduğunu açıklamamaktadır (79,83).

ADEZYON BAĞLANTILARI

Yapısal ve biyokimyasal olarak birbirinden farklı dört tip adezyon bağlantısı vardır. Bunlar, 1) Zonula adherensler; 2) Noktasal bağlantılar; 3) Desmozomlar; 4) Hemidesmozomlar'dır. Bu bağlantı kompleksleri arasındaki başlıca fark, zonula adherensler ve noktasal bağlantılara aktin filamanlar bağlanırken, desmozomlara ve hemidesmozomlara ara filamanların bağlanmasıdır. Testiste zonula adherensler, ektoplazmik özelleşmeler ve tubulobulbar kompleksler şeklinde yer almaktadır (79,83,84).

A) Adezyon Bağlantı Tipleri

1) Ektoplazmik Özelleşmeler

Ektoplazmik özelleşmeler yalnızca testiste bulunan modifiye bir tür adezyon bağlantısı tipidir. Bunlara aynı zamanda bağlantı plağı da denir. Diğer epitellerde bulunan adezyon kuşaklarından farklı olarak burada, adezyon kuşağı boyunca paralel uzanan yassılaştırmış incelmış endoplazmik retikulum sisternaları bulunur, ve bağlantı kuşağı ile endoplazmik retikulum sisternaları arasında ise hegzagonal diziliimli aktin filamanlarından oluşmuş bantlar yer alır. Buradaki

aktin filamanları diğer epitel türlerindeki aksine tek yönde uzanan bantlar oluşturmuştur ve bantlar içinde hegzagonal bir yerleşim gösterirler. Ektoplazmik özelleşmeler içinde yer alan aktin filamanları kontraktil sistemin bir parçası değildirler ve hücre kasılmasında etkileri yoktur (79,83,84,88,104).

Ektoplazmik özelleşmeler spermiyasyon, spermatidlerin yer değiştirmesi ve Sertoli hücrelerinin kendi aralarındaki sıkı bağlantılar ve Sertoli hücreleri ile germ hücreleri arasındaki desmozom ve benzeri bağlantılar gibi diğer bağlantı tiplerinin stabilizasyonu için önemlidirler. Sıçan testisinde ektoplazmik özelleşmeler ilk kez spermiyogenezin VIII. basamağında spermatidler uzamaya başladıkları zaman görülür ve spermiyasyondan sonra seminifer epitelde görülmez olur. Bu bağlantı tipi Sertoli hücreleri ile uzayan/uzamış spermatidler arasındaki bağlantıya olduğu gibi Sertoli hücrelerinin kendi aralarındaki bağlantıya da katkıda bulunur. Temelde ektoplazmik özelleşmeler uzayan/uzamış spermatidlerin olgunlaşmamış bir halde tübül lümenine salınmalarını önler. Ektoplazmik özelleşmelerin Sertoli hücreleri ile uzamış spermatidler arasında adezyon tipteki bağlantı komplekslerinden bu dönemde kaybolan desmozomların yerini aldığı düşünülmüştür. Bununla birlikte esasında aynı fonksiyona sahip iki bağlantı kompleksinden birinin ötekinin yerini almasının fizyolojik önemi bilinmemektedir. Ektoplazmik özelleşmeler aynı zamanda son derece kutuplaşmış hücreler olan uzayan/uzamış spermatidlerin oryantasyonunu sağlarlar. Ayrıca kafa yapısındaki ve pozisyonundaki büyük değişikliklerle birlikte uzamış spermatidler Sertoli hücresi kriptlerine gömüldükleri vakit ektoplazmik özelleşmeler bu morfolojik değişikliklere adapte olacak şekilde sürekli yeniden şekillenirler (79,84,104,105).

Ektoplazmik özelleşmelerin biyokimyasal bileşenleri tam olarak aydınlatılamamıştır. Apikal ve bazal olarak adlandırılan iki tip ektoplazmik özelleşme varlığı gösterilmiştir. Apikal ektoplazmik özelleşmelerde $\alpha 6\beta 1$ ve $\alpha 4\beta 1$ integrin varlığı tesbit edilmiştir. $\alpha 4\beta 1$ integrin varlığı aynı zamanda bazal ektoplazmik özelleşmelerde de gösterilmiştir. KTB seviyesinde Sertoli hücrelerinin kendi aralarındaki bazal ektoplazmik özelleşmelerin yapıtaşı proteinleri apikal ektoplazmik özelleşmeler kadar iyi belirlenmemiştir. Nektin-

afadin-ponsin kompleksinin daha çok apikal ektoplazmik özelleşmelerde, kaderin-katenin kompleksinin ise daha çok bazal ektoplazmik özelleşmelerde yer aldığı gösterilmiştir (79,84,106,107).

Ektoplazmik özelleşmelerin yapısında, β -integrin, “Focal Adhesion Kinase” (FAK), aktin, α -aktinin, myosin VIIA, fimbrin, espin vinculin, paxillin, gelsolin, myosin VIIa, integrin-linked kinase (ILK), nektin, testin gibi bağlantı proteinleri bulunduğu tesbit edilmiştir. İn-vitro olarak, izole ektoplazmik özelleşme bağlantılarının Sertoli hücresi mikrotübülleri tarafından her iki yönde hareket ettirilebildiği gösterilmiştir. Bu nedenle yapılarında hem kinezin hem dynein motor proteinlerinin bulunabileceği düşünülmüştür. (63, 79,84,106,107).

Seminifer tübüllerde serbest, yani Sertoli hücresi plazma membranlarında bulunan ama bir başka hücre ile temasta olmayan ektoplazmik özelleşmelere de rastlanmıştır. Fizyolojik rolleri bilinmemekle birlikte bu serbest ektoplazmik özelleşmelerin, ektoplazmik özelleşme protein komplekslerinin geri dönüşümünde rol oynayabilecekleri düşünülmüştür. Alternatif olarak, bir sonraki basamağa ilerleyen yada spermiyasyonla lümene düşen germ hücrelerinin geride bıraktıkları boş ektoplazmik özelleşmeler olabilecekleri düşünülmüştür (79).

2) Tubulobulbar Kompleksler

Testise has özelleşmiş yapıştırıcı bağlantı türü bağlantı komplekslerinden ikincisi tubulobulbar komplekslerdir. Bunlar testiste Sertoli hücresi-Sertoli hücresi arasında sıkı bağlantılar seviyesinde ve Sertoli hücreleri ile tübül lümenine salınmaya hazır spermiyumlar arasında bulunur. Tubulobulbar kompleksler aktin ile sarılı bir çift tübüler yapıdan ibarettir. Spermatid kafasının konkav yüzeyinden Sertoli hücresi sitoplazmasına doğru uzanır. Apikal tubulobulbar kompleksler kendine has bir özellik olarak, epitelyal döngünün VII. basamağındaki spermiyasyondan birkaç gün öncesine kadar gözlenmezler. VIII. basamaktaki spermiyasyondan sonra Sertoli hücreleri tarafından hızla içeri alınırlar ve lizozomlar tarafından sindirilirler. Diğer yandan bazal tubulobulbar

kompleksler epitelyal döngünün II-V. basamaklarında oluşurlar; en çok IV-V. basamaklarda en az VI-VIII. basamaklarda mevcuttur. Apikal tubulobulbar kompleksler bazal tubulobulbar komplekslerden biraz daha uzuncadırlar. Olgun spermatidlerde 4-24 arası tubulobulbar kompleks bulunabilir, bu da bu yapıların germ hücresi hareketindeki önemini gösterir (79,84,107).

Tubulobulbar komplekslerin fonksiyonunun uzamış spermatidlerin tübül lümenine olgunlaşmamış bir şekilde atılmasını önlemek olduğu düşünülmektedir. Bu yapıların spermatidlerin sitoplazmasının ortadan kaldırılmasına yardım ettiği de düşünülmektedir, çünkü sitoplazma hacmi tubulobulbar kompleks varlığında %70'e kadar azaltılmaktadır. Diğer yandan akrozomal bir glikoprotein olan MN7'nin de tubulobulbar kompleksler içine girdikleri gösterilmiştir, bu özellik fazla akrozomal içeriğin spermiyasyon sırasında bu kompleksler sayesinde azaltılıyor olabileceğini gösterir. Tubulobulbar kompleksler germ hücresi hareketi sırasında arasında bulundukları sıkı bağlantılar ve iletişim bağlantıları gibi diğer bağlantıları içlerine alabilirler (63,79,84,107).

3) Noktasal Bağlantılar

Aynı zamanda “fokal adezyonlar” veya “adezyon plakları” olarak da bilinirler. Aktin bazlı olup hücreleri hücrelerarası matrikse bağlarlar. Büyük oranda integrinlerden oluşmuşlardır ve bulundukları hücrenin aktin filamanlarını hücrelerarası matrikse bağlarlar. Hemen hemen bütün epitel türlerinde mevcuttur. Noktasal adezyonlar oldukça dinamik yapılardır ve fibroblast ve makrofajlarda olduğu gibi hücre hareketini düzenlerler ve sinyal iletimi fonksiyonları da vardır. Diğer epitelde noktasal bağlantılarda olduğu bilinen proteinlerin testiste ektoplazmik özelleşmelerde var olduğu gösterilmiştir. Bu durum bu proteinlerin ektoplazmik özelleşmelerin yapıştırıcı fonksiyonlarına katkıda bulunabileceğini düşündürmüştür (63,79,84,107).

4) Desmozomlar ve Hemidesmozomlar

Desmozomlar bağlantı alanlarında ara filamanların bulunduğu hücre bağlantılarıdır. Doku bütünlüğünün korunmasından sorumludurlar. Testiste bulunduğu bilinmekle birlikte testisteki biyokimyasal yapısı tam olarak aydınlatılamamıştır. İki temel alandan oluşmuşlardır, 1) hücre dışı çekirdek yada desmogleinler 2) plazma membranına paralel duran komşu hücrelerde simetrik olarak yer alan sitoplazmik plaklar. İntermediyer filamanlar bu sitoplazmik plaklara tutunur ve bütün hücre içinde sürekli ve düzenli bir ağ oluştururlar (63,79,84).

B) Adezyon Bağlantılarının Proteinleri

1) Kaderinler

Kaderinler 115-130 kDa'luk Ca^{+2} bağımlı CAM ailesi üyesi membran içi proteinleridirler. Bugüne kadar 30'dan fazla kaderin molekülü tanımlanmıştır. Kaderinler, adezyon bağlantılarında aktinleri birbirine bağlarken, desmozomlarda ara filamanları birbirine bağlar. Adezyon bağlantılarında ve desmozomlarda iki farklı sınıf kaderin bulunmaktadır (79,83,84,88,90,104).

Klasik Kaderinler: Buna, epitelyal kaderin (E-kaderin), nöral kaderin (N-kaderin), plasental kaderin (P-kaderin) ve karaciğer hücre adezyon molekülü (L-CAM) dahildir. Kaderinlerin hücre içi COOH- alanları β - ve γ -kateninler ile ilişkilidirler ve adezyon bağlantı alanlarında kaderin/katenin komplekslerini oluştururlar; diğer yandan karşılıklı hücrelerdeki her bir kaderin molekülünün NH₂- alanları komşu hücredeki eşleriyle homotipik olarak ilişki kurarlar. Bu kompleksler fonksiyonel hücre adezyon birimleridirler. α -Katenin daha sonra kaderine bağlanmış olan β - veya γ -katenine ile etkileşir ve bu kompleksi aktin hücre iskeletine bağlar. Kaderin katenin etkileşimi aynı zamanda Ca^{+2} gerektirir ve GTPaz'lar tarafından düzenlenir. Ca^{+2} yokluğunda kaderinler inaktiftir ve proteolize açıktırlar. Hem E-kaderin hem de β -katenin geri dönüştürülebilir proteinlerdir, hücre içine alınabilir sonra tekrar hücre membranına geri döndürülebilirler.

Desmozomal Kaderinler: Başlıca desmozomal kaderinler Desmogleinler (Dsgs) ve Desmocollinler (Dscs)'dir, hücre-hücre ara filaman-bazlı hücre adezyonunda görev alırlar. Üç tane Dsgs ve üç tane Dscs mevcuttur: Dsgs 1, 2 ve 3 ile Dscs 1, 2 ve 3. Diğer desmozomal proteinler desmoplakinler I ve II'dir. Son yapılan immünohistokimyasal çalışmalar spermatidlerin çevresinde desmoglein varlığını göstermiştir.

2) Kateninler

Dört tip katenin mevcuttur: ~100 kDa'luk α -katenin, 85-88 kDa'luk β -katenin, 80-82 kDa'luk γ -katenin ve 90-120 kDa'luk p120^{ctn}; bunlar hücre iskeleti proteinleri ile yüksek oranda benzerlik gösterirler. β - ve γ -kateninler kaderinin sitoplazmik parçasının ~100 aa bir dizisiyle etkileşirler ve aynı zamanda bir aktin-bağlayıcı protein olan α -katenin, kaderini aktin iskeletine bağlar. Bu bağlanmayı α -aktinin, vinculin ve ZO-1 gibi bir dizi aktin-bağlayıcı proteine bağlanarak veya doğrudan aktinin kendisine bağlanarak gerçekleştirir. Yine α -kateninin ZO-1'e bağlanmasının E-kaderin aracılığıyla oluşan adezyonun gücünü nonepitelyal hücrelerde arttırdığı bilinmektedir; bununla birlikte bu etki epitelyal hücrelerde görülmemektedir, bu da kateninlerin farklı hücrelerde farklı rolleri olabileceğini göstermektedir. β -katenin'in adezyon bağlantılarındaki yapısal rolüne ek olarak, bir sinyal ileticisi olarak da fonksiyon yaptığı gösterilmiştir (79,83,84,88,90,104).

3) Nektinler ve Afadinler

Nektinler, kaderin/katenin kompleksine ek olarak pek çok adezyon bağlantısında bulunan ve yeni tanımlanan bir dahili adezyon bağlantı membran proteinleri ailesine aittir. Her bir nektin molekülünün hücre içi parçası, F-aktin bağlayan bir protein olan afadin molekülü ile nektin/afadin kompleksi oluşturmak üzere etkileşir. Afadin daha sonra adezyon bağlantı alanlarında sitoplazmadaki ZO-1, α -katenin ve ponsin ile etkileşir. Son bir çalışma, α -kateninin a.a. dizisindeki kısa bir parçanın, muhtemel afadin bağlanma alanı olduğunu

göstermiştir. Böylece afadin, nektin/afadin kompleksini aktine doğrudan veya α -katenin vasıtasıyla bağlayabilir. Nektinler ve afadinler immünoglobülin benzeri hücre adezyon molekülleridirler. Nektin/afadin kompleksi kaderin/katenin kompleksinin bulunduğu aynı yerde, yani adezyon bağlantılarında yüksek konsantrasyon gösterir. Nektin/afadin kompleksi kaderin/katenin kompleksi ile yapısal olarak doğrudan ilişkide olmamasına rağmen nektin ve kaderin sitoplazmik parçalarıyla ilişkilenen proteinler vasıtasıyla birbirleriyle etkileşirler. Nektinler birbirleriyle homotipik ve heterotipik olarak etkileşirler ve komşu hücreler arasında hücre-hücre adezyonuna katkıda bulunurlar (79,83,84,88,90, 104,108).

Afadin/nektin kompleksinin hücre yapışkanlığını nasıl etkilediği tam olarak bilinmemektedir. Etkilerini hücre iskeleti organizasyonu ve epitelyal hücrelerin kutuplaşması yoluyla gösterdikleri düşünülmektedir. Genleri değiştirilmiş afadin -/- farelerde adezyon bağlantılarının organizasyonunun şiddetli bir şekilde bozulduğunu gösterilmiştir. Afadin -/- fare embriyolarında kutuplaşmış epitellerde kaderin bazlı adezyon bağlantıları yanında sıkı bağlantıların yapısal organizasyonları da bozulmuştu. Nektin/afadin kompleksi adezyon bağlantıları ve sıkı bağlantılar arasındaki iletişimde de rol oynuyor olabilir, çünkü afadin genindeki bir silinme hem adezyon bağlantılarındaki hem de sıkı bağlantılardaki işlevselliği etkilemektedir (79,83,84,88,90,104,108).

Nektin-2 geni iptal edilmiş fareler infertil bulunmuştur, bunlarda spermatidlerde anormal hücre iskeleti yapısı ve çekirdek morfolojisinde bozukluklarla birlikte seminifer epitel döngüsünün X-XVI. basamakları arasındaki spermatidlerde mitokondrilerin orta parça yerine kafada toplandıkları görülmüştür. Bu sonuçlar nektin/afadin kompleksinin erkek üreme fonksiyonundaki hayati rolünü göstermektedir (79,83,84,88,90,104,108).

4) Testin

Testin adezyon bağlantısı ilişkili bir proteindir ve ilk olarak Sertoli hücrelerinin yoğun olarak bulunduğu kültür ortamlarında tesbit edilmiş, daha sonra saflaştırılmıştır. Testin testosterona-duyarlı bir Sertoli hücresi salgı glikoproteini olduğu için, salgılanmayı takiben hızlıca Sertoli-germ hücresi adezyon bağlantılarında, bilhassa Sertoli hücreleri ve geç spermatidler arasında Sertoli hücresi yüzeyine yerleşir. İmmünogold elektron mikroskopisi, immüno Floresan mikroskopisi ve diğer biyokimyasal analizler, testinin Sertoli hücresi yüzeyine, reseptör-benzeri bir proteinle özellikle de ektoplazmik özelleşmeler alanlarında bağlandığını göstermiştir. Bu bağlanma muhtemelen kaderin/katenin veya nektin/afadin kompleksi ile ve bunun yanında bir de adezyon bağlantısı proteini ile etkileşimi vasıtasıyla gerçekleşmektedir (79,83).

Yetişkin sıçanlarda testin hemen yalnızca gonadlarla sınırlıdır. Seminifer epitelde Sertoli hücreleri testinin temel kaynağıdır ve yetişkin sıçan testisinden izole edilen germ hücreleri testin ekspresse etmezler veya salgılamazlar. Yetişkin sıçan testisinde testin Sertoli hücre membranı ile ilişkidir. Sitoplazmadaki miktarı hemen hemen tesbit edilemeyecek düzeydedir ve epididimiste, rete testis ve seminifer tübül sıvılarında bulunmaz (79,83).

İmmüno Floresan mikroskopisi, immünohistokimya ve immünogold EM çalışmaları, testinin ektoplazmik özelleşmeler ve tubulobulbar kompleksler gibi Sertoli-germ hücresi adezyon bağlantılarında bulunduğunu göstermiştir ve bu bulunuşu seminifer epitel döngüsünün basamaklarına bağlı olarak değişir, basamak VII ve erken VIII, spermiyasyondan hemen önce en yüksek düzeyde ekspresse edilir. Testinin in-vivo olarak uzamış spermatidler ve Sertoli hücreleri arasında spermiyasyondan hemen önce ektoplazmik özelleşmeler alanında şiddetli fakat geçici birikiminin olduğu bulgusu bunun adezyon bağlantısı dinamiklerindeki sinyalizasyon rolüne kuvvetli bir delil oluşturmaktadır (79,83).

Sertoli hücreleri tarafından testin, Sertoli-germ hücresi adezyon bağlantılarının bozulmasına bir cevap olarak salgılanır, bu da testinin adezyon bağlantısı-ilişkili bir sinyal molekülü olabileceğini düşündürmektedir (79,83).

C) Adezyon Bağlantısı-İlişkili Sinyal Molekülleri

Adezyon bağlantılarında birkaç sinyal molekülü bulunur, bunlardan bazıları Src, Csk, CK2, GSK ve p120^{ctn}'dir. Bu moleküllerin protein fosforilasyonu bağlantı kompleksinin yapışma kuvvetini değiştiren kaderin/katenin kompleksini düzenler. Bu sinyal molekülleri spermiyasyonla ilişkili bulunmuşlardır. p120^{ctn} ve β -katenin çekirdeğe girmeleri halinde gen ekspresyonunu indükleyebilirler, bu da fizyolojik önemlerini gösterir. Daha önceki morfolojik çalışmalar p120^{ctn}'nin sıçan testisinde bir ara filaman-bazlı desmozom-benzeri adezyon bağlantısı elemanı olduğunu göstermiştir. Daha yeni immün-çöktürme çalışmaları testiste en az dört tip p120^{ctn} izoformu olduğunu göstermiştir (79,83,84,88).

D) Adezyon Bağlantıların Fonksiyonları

Adezyon bağlantılar, bir hücredeki hücre iskeleti elemanlarını gerek bir başka hücredekilere gerek hücre dışı matrikse bağlayan ve böylece doku bütünlüğünü temin ve devam ettiren bir ağ oluştururlar. Adezyon bağlantıları aynı zamanda sinyal iletimi olaylarında da rol alırlar, çünkü adezyon bağlantıları yapı proteinlerinden olan kaderinler, kateninler ve p120^{ctn}, aynı zamanda, çoğalma, farklılaşma ve hareket gibi temel hücresel olayları düzenlemek üzere çift yönlü sinyal ileticileridir ve transkripsiyonel aktivasyona neden olabilirler, böylece hücre dışı bir uyarıyı çekirdekte gen aktivitesine dönüştürerek sinyal iletimi için bir tür platform gibi davranırlar. Testisteki adezyon bağlantılarının dinamik tabiatı spermatogenez sürecinde gelişen germ hücrelerinin seminifer epitel boyunca bazaldan luminal kompartımana zamanına uygun olarak geçmelerini sağlar (79,83,84,88).

İLETİŞİM BAĞLANTILARI

İletişim bağlantıları iki komşu hücrenin sitoplazmik kompartımanları arasında moleküler ağırlıkları 1 kDa'dan küçük moleküllerin hücreler arası direkt değişimine olanak tanıyan membran kanallarıdır. İletişim bağlantıları iki komşu hücredeki konnekson adı verilen dairesel kanalların karşılıklı birleşmesi sonucu oluşurlar. Her bir konnekson yaklaşık 1,6-2 nm çapında olup birbirinden 2-4 nm aralıklı mesafede bulunurlar. İletişim bağlantıları genelde bir "iletişim bağlantısı plağı" oluşturacak şekilde diğer iletişim bağlantılarıyla birlikte bir arada bulunurlar. Konneksonlar ise koneksin (Cn) adı verilen globüler membran proteinlerinden altı tanesinin birleşip ortalarında hidrofilik bir delik oluşturacak şekilde organize olması ile meydana gelir. Moleküler ağırlıklarına göre yaklaşık 20 farklı koneksin molekülü tanımlanmıştır. Bunlar dokulara özgü bir şekilde ekspresse edilirler ve farklı hücre tiplerinde birden çok koneksin tipi mevcuttur. Konneksonlar aynı tip koneksinler tarafından oluşturulduklarında homomerik, en az iki farklı tip koneksinler tarafından oluşturulduklarında ise heteromerik olarak tanımlanırlar. İletişim bağlantıları yoluyla hücreler arası haberleşme, hücre büyümesi ve farklılaşmasının düzenlenmesi, homeostaz ve neoplastik dönüşüm olaylarında önemlidir. Son çalışmalarda konneksonların hücrelerarası kanallar kurmaksızın kendi başlarına sinyal iletiminde kritik fonksiyonları olabileceğini göstermiştir (109,110).

A) Testiste İletişim Bağlantıları

Testiküler iletişim bağlantıları ilk defa sıçan testisinde elektron mikroskobu ile tanımlanmışlardır. Dondurma-kırma elektron mikroskopisi ve immünofloresan boyalarla geçirgenlik analizleri kullanılarak, kemirgen testisinde spermatogenezin başlamasından önce ve spermatogenez sürecinde bu bağlantıların varlığı gösterilmiştir. Sertoli hücreleri ile germ hücreleri arasında sinyal iletiminde görev aldıkları için germ hücreleri gelişiminin farklılaşmasının ve hareketinin koordinasyonunda önemli roller oynadıkları düşünülmüştür (109,110).

Testiste, farklı dağılım göstermekle beraber yaklaşık 11 koneksin tanımlanmıştır. Her bir koneksin molekülü, bir hücre içi NH- sitoplazmik alanı, iki hücre dışı halka, dört membran içi halka ve bir COOH- sitoplazmik alanından oluşur. Altı koneksin molekülü bir konnekson yapmak üzere bir araya gelirler ve sonra hücre dışı halkaları vasıtasıyla komşu hücrelerin konneksonları ile bağlantı kurarlar. Böylece iki konnekson ortalarında sulu bir gözenek kalacak şekilde fonksiyonel bir iletişim bağlantısı meydana getirirler. Son zamanlarda konneksonların karşı hücre membranındaki konneksonlarla ilişkililenmeden yürüttükleri fonksiyonları olduğu da saptanmıştır. Bu durumda daha çok çekirdekle sitoplazmik elemanlar arasında hücre içi iletişimi sağlamak gibi görevlerde rol aldıkları bildirilmiştir (39).

Erişkin sıçan testisinde Cn26, Cn30.2, Cn31, Cn31.1, Cn32, Cn33, Cn37, Cn40, Cn43, Cn46 ve Cn50 olarak adlandırılan onbir farklı koneksin mRNA'sı tesbit edilmiştir. Cn26, Cn30.3, Cn31, Cn31.1, Cn32, Cn37, Cn40, Cn43, Cn45 ve Cn46 fetal fare testisinde de bulunmuştur (109,110).

Seminifer tübüllerde iletişim bağlantıları, Sertoli hücrelerinin kendi aralarındaki sıkı bağlantılar bölgesinde KTB seviyesinde, ayrıca spermatogenezin her basamağındaki germ hücreleri ile Sertoli hücreleri temas yüzeylerinde bulunur. Testisteki en baskın koneksin Cn43'tür ve insanda, sıçanlarda, Gine domuzlarında ve minkte seminifer tübüllerin bazal kompartımanında yer alırlar. Bu kompartıman seviyesinde Cn43'ün, occludin, ZO-1 ve mikrotübüller gibi yapısal proteinlerle direkt bağlantılı oldukları gösterilmiştir (38,109,110,111,112).

Geniş bir yelpazedeki düşük moleküler ağırlıklı işaretleyicilerle yapılan doku içi boya eşleştirme deneyleri, sıçan seminifer tübülünde, geçirgenlik özellikleri ve alternatif açılıp-kapanma fazları bulunan farklı iletişim bağlantısı iletişim rotaları olduğunu göstermiştir. Yapılan boya transfer çalışmalarında Cn43'ün komşu Sertoli hücreleri arasındaki, Sertoli hücreleri ile spermatogonyumlar arasındaki, Sertoli hücreleri ile erken ve geç dönem spermatositler arasındaki iletişimde rol aldığı ama Sertoli hücreleri ile

spermatidler arasındaki iletişime katkısının olmadığı gösterilmiştir. Aynı çalışma “Lucifer yellow” boyasının yalnızca Sertoli hücrelerinden germ hücrelerine geçtiğini ama germ hücrelerinden somatik hücrelere geçmediğini göstermiştir. Bu asimetrik eşleşmenin Sertoli hücrelerinden bağlantılar yoluyla yayılan maddelerin germ hücrelerinde konsantre olmasını kolaylaştırdığı düşünülmüştür. Bu bilgiler ışığında Sertoli hücreleri ile spermatogenik hücreler arasında mevcut olan iletişim bağlantılarının, Sertoli hücreleri tarafından germ hücreleri üzerine uygulanan kontrol mekanizmasında birer aracı olduğu düşünülebilir (109,110).

Spermatogeneze özel olarak, bölünen germ hücreleri hücre bölünmesini tamamlamazlar ve sonuçta bu durum hücreler arasında sitoplazmik köprülerin oluşmasına yol açar. Bu yapılar tek bir tipB spermatogonyumdan köken alan bütün germ hücrelerini birbirlerine bağlar ve bu hücrelerin gen ürünlerini paylaşarak senkronize bir şekilde gelişmelerine olanak tanır. Bununla birlikte memelilerde spermatogenik hücrelerin kendi aralarında iletişim bağlantıları tanımlanmamıştır. Cn43 varlığı aynı zamanda artık cisimciklerde de tesbit edilmiştir (109,110).

Bugüne kadar insan testisinde bulunan koneksinler hakkındaki bilgi kısıtlı kalmıştır. Cn43 mRNA’sı ve proteini seminifer tübüllerde ve Leydig hücrelerinde mevcuttur. Cn26 seminifer tübüllerde ve Cn31.9 testiküler damar düz kaslarında tanımlanmıştır. cDNA mikroyarray yöntemi ile Cn40 transkriptleri insan testisinde tesbit edilmiş ancak kesin yerleşimi tanımlanmamıştır. Sıçanlara özgü inhibitör etkili Cn33’ün insanda bir ortoloğu tesbit edilememiştir. Ama insanda da Cn33 benzeri etkileri meydana getiren başka bir koneksin bulunabileceği düşünülmüştür (109,110).

İnterstisyel kompartımanda iletişim bağlantıları Leydig hücreleri arasında da mevcuttur. İletişim bağlantıları varlığı taze izole edilmiş fare Leydig hücreleri arasında gösterilmiştir. Pek çok koneksin tipinin bulunduğu seminifer tübüllerin aksine, sıçan, fare, Gine domuzu, mink, kurbağa ve insan gibi pek çok türün Leydig hücrelerinde bulunan tek koneksin tipi Cn43’tür. Ayrıca Cn37 interstisyel kan damarlarının endotelial hücrelerinde bulunmuştur (109,110).

B) Testiste İletişim Bağlantılarının Fonksiyonları

Cn43'ün spermatogenezin kontrolünde bir rolü olduğunu destekleyen pek çok gözlem mevcuttur: (1) Cn43 Sertoli hücreleri ile çoğalan germ hücreleri arasında hücrelerarası temas meydana getirir, bu da Cn43'ün belirli spermatogenik basamaklarda rol aldığını gösterir. (2) Spermatogenezi bozuk mutant sıçan ve farelerin seminifer tübüllerinde Cn43 seviyeleri azalmış veya tesbit edilemez seviyeye inmiştir. (3) Cn43 ekspresyonu ve iletişim bağlantıları vasıtasıyla iletişim, basamağa-özgü bir tarzda kontrol edilirler; bu da seminifer tübül içinde belirli germ hücrelerinin ilişkisi ile Cn43 ekspresyonu arasında yakın bir ilişki olduğunu gösterir (109,110,113).

Cn43'ün spermatogenezle ilişkisinin direkt isbatına ilişkin bulgular Cn43 taşımayan mutant farelerden elde edilmiştir. Cn43 taşımayan fareler kalbin kötü gelişimi nedeniyle daha doğumda ölmektedirler fakat bu mutant fetüslerden elde edilen testislerde primordial germ hücrelerinin %50 azalmış olduğu bildirilmiştir, bu ise Cn43'ün fetal gelişim süresince germ hücresi çoğalmasının kontrolüne katıldığına işaret eder. Aynı şekilde, Cn43 taşımayan mutant fetüslerden elde edilen testisler yetişkin erkeklerin böbrek kapsülleri altına yerleştirildiklerinde germ hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması mümkün olmamıştır. Cn43'in spermatogenezdeki hayati rolü, mutant farelerde Cn43 gen dizisi yerine Cn32 veya Cn40 dizilerinin konulmasıyla yapılan çalışmadan elde edilen bulgular sayesinde anlaşılmıştır. Bu iki genleri değiştirilmiş fare soyu, Cn43KI32 ve Cn43KI40, yaşayabilmiştir ancak her ikisinin erkekleri de sterildir, seminifer tübüller germ hücresi yönünden tamamen boşalmıştır, böylece tübüllerinde sadece Sertoli hücrelerinin bulunduğu “**Sertoli-Cell-Only**” (SCO) testislere dönüşmüşlerdir. Bu iki fare soyunda kısırlığa neden olan mekanizmalar hala bilinmemektedir. İletişim bağlantılarının yapısında diğer koneksinler yanında gerekli olan bir koneksinin bulunmaması, kanalların açılıp-kapanma özelliklerinin değişmesi, Sertoli hücreleri ve germ hücreleri arasındaki iletişimin bozulması ve yeniden kurulamaması, bu arada hücreler arasında sinyal moleküllerinin geçişinin de bozulması sebepler arasında sayılabilir (109,110,113,114).

Cn43'nın aksine diğer koneksin genleri iptal edilmiş fareler testiküler anormallik göstermezler, normal fertilité gösterirler. Cn37 ve Cn40 birlikte bozuk olan mutant farelerde testis fonksiyonlarında bozulma yanında, spermatogonyumlarda vakuoler dejenerasyon ve testiküler dokuda nekroz görülmüştür. Ancak bu testiküler bozukluklar doğrudan spermatogenezdeki bir değişiklikten çok testiküler damar anomalilerinden kaynaklanmıştır (109,110,113).

Cn43'ün diğer hücre tiplerinin göçünde rolü olmasından yola çıkılarak, fetal testiküler gelişim süresince Cn43'ün, germ hücrelerinin göçü ve gonadlara odaklanması için gerekli olabileceği düşünülmüştür. Bununla birlikte bu özel etkinin doğabilmesi için doğrudan iletişim bağlantıları yoluyla hücre-hücre eşleşmesinin gerekip gerekmediği bilinmemektedir. İmmünolojik ve fizyolojik çalışmaların ışığında Cn43 iletişim bağlantılarının, seminifer tübüller içerisinde Sertoli hücresi metabolizmasının koordinasyonuna imkan veren sinsisyum benzeri transversal ve longitudinal bir iletişim ağı oluşturabilecekleri gösterilmiştir. Sertoli hücreleri bu hücrelerarası kanallar vasıtasıyla germ hücreleri ile metabolit ve sinyal iletimi temin ederek germ hücresi çoğalma ve farklılaşmasını senkronize edebilirler (109,110,113).

C) İletişim Bağlantıları ve Spermatogenez

Testiste koneksin gen ekspresyonunun, seminifer tübüllerin gerek gelişimiyle ve gerek olgunlaşma basamağı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Cn43 transkriptlerinin fetal testis Sertoli hücrelerinde mevcut olduğu fakat yetişkin hayvanlarda daha yüksek seviyelerde ekspresse edildiği gösterilmiştir (109,110,113).

Sıçan ve farelerde Cn43 yerleşimi yenidoğanlarda ve spermatogenezin başlangıcında seminifer tübüllerde apikal bölgelerde iken, testiküler matürasyon sürecinde seminifer tübüllerin bazal bölgelerine doğru kayar (109,110,113,115).

Spermatogenez başladığında Cn43'ün en önemli özelliklerinden birisi de hücresel yapışma bölgelerindeki sıkı bağlantı molekülleri ile birlikte

bulunmalarıdır. Adezyon moleküllerinin iletişim bağlantısı formasyonu için bir ön şart olduğu düşünülmüştür; çünkü hücre kültüründe N-kaderinlerin elimine edilmesinin iletişim bağlantılarının ortaya çıkmasını engellediği bildirilmiştir. Testiste N-kaderin ve α -katenin gibi adezyon molekülleri iletişim bağlantıları tesbit edilmeden önce belirirler. Adezyon moleküllerinin ilk önce sitoplazmada ve daha sonra plazma membranında benekler halinde dağıldığı tesbit edilmiştir. Cn43 sitoplazmada daha sonra belirir. Daha sonra sıkı bağlantı molekülleri ve Cn43'ün komşu hücrelerin hücre-hücre temas noktalarında birlikte yer aldıkları görülür. Testiküler Cn43'ün bu kademeli organizasyonunun, diğer hücrelerde de olduğu gibi hücre iskeleti elemanlarının kontrolü altında olduğu düşünülmüştür (109,110,113).

Cn43 seviyesi seminifer tübül içinde spermatogenezin ilk dalgası süresince yükselir. Aksine diğer adezyon moleküllerinin ekspresyonu testiküler gelişim süresince kayda değer bir değişim göstermez (109,110,113).

Cn43 mRNA ve protein ekspresyonlarının seminifer epitel döngüsü basamaklarına bağlı olduğu ve sıçan ve fare testislerinde VII. basamakta diğer basamaklara nazaran en yüksek seviyede tesbit edildiği yönünde net bulgular vardır. Cn43'ün bu basamak bağımlı ekspresyonu insan testisinde de tanımlanmıştır (109,110).

Sertoli hücrelerinin kendi arasındaki, Sertoli hücreleri ile germ hücreleri arasındaki, Leydig hücreleri arasındaki iletişim bağlantıları endokrin ve parakrin kontrole tabidirler. Fakat testiste koneksin gen ekspresyonunu kontrol eden faktörlerin ne olduğu hakkında sınırlı bir bilgi mevcuttur. Birincil kültürlerde Sertoli hücreleri arasında iletişim bağlantıları oluşumunun FSH tarafından artırıldığı yönünde bulgular mevcuttur. Bunun ikinci habercisi olan cAMP de yine iletişim bağlantıları vasıtasıyla iletişimi artırma ve Cn43 seviyelerini değiştirme kapasitesi vardır. Yine, bozulmamış seminifer tübüller veya izole hücrelerde cAMP varlığında ölçülen iletişimin, Ca^{+2} içermeyen kültür sıvıları ile inkübe edilmesi sonucu inhibisyonu, cAMP cevabının olabilmesi için Ca^{+2} gerektiğini göstermektedir (109,110).

Tiroid hormonlarının testislerin gelişimi ve fonksiyonunda önemli bir rol oynadıkları, ve yenidoğan periyodunda Sertoli hücresi çoğalma ve farklılaşması üzerinde özel bir etkileri olduğu bilinmektedir. Sıçanlarda yenidoğan hipotiroidizmi yaptığı bilinen Propylthiouracil'in, sıçanlarda Sertoli hücrelerinde Cn43'ün mRNA ve protein seviyelerini etkilemeksizin molekülün yerini plazma membranından sitoplazmaya kaydırıldığı bilinmektedir. Bu bilgiden, tiroid hormonlarının Sertoli hücrelerinde Cn43'ün transkripsiyonundan çok, hücre içi trafiğini kontrol ettiği düşünülmüştür (109,110).

D) Testiküler Hastalıklarda İletişim Bağlantıları

Daha önceki çalışmalarda spermatogenezi bozulmuş patolojik insan testislerinde testiküler iletişim bağlantılarında ileri derecede değişiklikler olduğu bildirilmiştir. Feminize testislerde dondurma-kırma yöntemiyle yapılan preparasyonlarda Sertoli hücreleri arasında iletişim bağlantılarına rastlanmadığı halde Leydig hücreleri arasında bulunmuştur. İnfertil azoospermik ve oligozoospermik hastaların seminifer tübüllerinde atipik iletişim bağlantıları bulunduğu bildirilmiştir. Hipospermik ve aspermik hastalarda iletişim bağlantısı-benzeri hücre membranı özelleşmelerinin azaldığı bildirilmiştir, ve bu yapılar SCO fenotipi gösteren seminifer tübüllerde tamamen bozulmuşlardır. SCO durumu gösteren hastalarda seminifer tübüllerde Cn43 proteini tesbit edilememektedir. Bu hastaların seminifer tübüllerinde Cn43 proteininin kaybolması ile testiküler Cn43 mRNA seviyelerindeki düşmenin eşzamanlı olduğu gösterilmiştir; bununla birlikte Leydig hücrelerindeki Cn43 transkriptleri ve protein seviyeleri varlığını devam ettirmiştir. Lösemiden etkilenmiş 5 ila 12 yaş arasındaki çocuklarda testislerinde yapısal olarak normal iletişim bağlantıları gözlenmiştir ve kemoterapi Sertoli hücresi bağlantılarını etkilememiştir (109,110,112).

Koneksin fonksiyon bozukluğu ve iletişim bağlantıları vasıtasıyla iletişimin bozulması karsinojen ve onkojenlerin etkileriyle de ilişkili bulunmuştur.

Karsinoma in-situ veya seminoma ile hücreleri ekilmiş insan testislerinde Cn43'in, bulunmadığı immünohistokimyasal yöntemlerle gösterilmiştir. Bir başka çalışmada bir grup saf testiküler seminoma hücre soyunda Cn43 mRNA ve protein varlığı gösterilmiştir; fakat Cn43 seminoma hücrelerinin hücre membranlarında yerleşmek yerine anormal şekilde sitoplazmada yer almıştır. Kriptorşid testislerde ise Cn43'ün immünreaktivitesinin azaldığı bulunmuştur. (109,110).

2.3.3. Sertoli Hücresi Fonksiyonları

Bugüne kadar, özellikle de germ hücresi gelişimi ve hareketi ile doğrudan ilişkili olarak, bazı Sertoli hücresi fonksiyonları tanımlanmıştır. Bunlar genel olarak, yapısal desteklik sağlamak; geçirgenliği olmayan aynı zamanda immünolojik bir bariyer oluşturmak; germ hücresi hareketi ve spermiyasyona yardım etmek; germ hücrelerini salgıladığı ürünlerle beslemek şeklinde özetlenebilir. Ancak bu fonksiyonlardan bazıları in-vitro Sertoli hücresi kültürleri kullanılarak tanımlanmıştır, bu yüzden bu fonksiyonların Sertoli hücrelerinin in-vivo fonksiyonları ile fizyolojik olarak ne kadar denk düştüğü hala araştırma konusudur. Mesela sıçanta, bütün germ hücresi gelişim süreci, yalnızca tipB spermatogonyumun preleptoten ve leptoten spermatosite dönüştüğü erken safha hariç, Sertoli hücrelerindeki bazal laminaya yakın olan KTB sayesinde sistemik sirkülasyondan ayrılmıştır. Germ hücreleri ve Sertoli hücreleri parakrin faktörlerle ve sinyal molekülleri ile hücreden-hücreye haberleşebilecekleri çok özel ve sıkı bir hücresel ağ oluşturmuşlardır, böylece Sertoli hücreleri gelişmekte olan germ hücrelerine gerekli olan besin maddelerini ve biyolojik faktörleri sağlayabilirler (63,72,79,83).

2.3.3.1. Yapısal Desteklik

Sertoli hücreleri, hücre dışı matriks elemanlarının salgılanmasına katılarak ve özelleşmiş hücre bağlantı komplekslerinin oluşumuna katkıda bulunarak gelişmekte olan germ hücrelerine destek sağlar. Sertoli hücrelerinin bir diğer

çarpıcı özelliği çok iyi gelişmiş hücre iskeletidir, ve bu hücre iskeleti seminifer epitelin organizasyonundan birincil olarak sorumludur. Morfolojik çalışmalar neticesinde Sertoli hücresi iskeletinin, hücre formunu ve şeklini muhafaza etmek; organellerin hücre içindeki pozisyonlarını belirlemek ve taşınmalarını sağlamak; hücre-hücre ve hücre-hücre dışı matriks bağlantı noktalarında hücre membranlarının oluşturulmasına ve sabitlenmesine katkıda bulunmak; gelişen germ hücrelerini pozisyonlarını belirlemek, bunları sabitlemek ve bir sonraki yerlerine hareketlerine katkıda bulunmak; spermiyasyon sırasında olgun spermatidlerin seminifer epitelden tübül lümenine salıverilmesine katkıda bulunmak; gibi özellikleri ön plana çıkmıştır (63,72,78,79,83,116,117).

2.3.3.2. Bariyer Oluşturması

Sertoli-Sertoli bağlantı kompleksi KTB'ni oluşturur. Bu bariyer seminifer epitel içinde, iyonik, amino asit, karbonhidrat ve protein kompozisyonu açısından fizyolojik bir kompartimentizasyon oluşturulması için hayati önem taşır. Bu nedenle, seminifer tübül ve taşıyıcı kanalların içindeki sıvının içeriği kan plazması ve testiküler lenften büyük oranda farklıdır (52,63,72,79,83).

Plazma proteinleri ve dolaşan antikorlar seminifer tübül lümeninden uzak tutulurlar. Sertoli hücrelerinin ekzokrin salgı ürünleri, özellikle de testosteron ve dihidrotestosterona karşı yüksek bağlanma afinitesi gösteren 90-kDa'luk **Androjen Bağlayıcı Protein (ABP)** seminifer tübül lümeninde yüksek oranda konsantre olurlar ve seminifer tübül lümeninde testosteronun spermatogenik hücrelerin farklılaşması için uygun bir mikro çevrenin oluşmasına imkan sağlayacak düzeyde yüksek konsantrasyonlarda bulunmasını sağlar. Daha da önemlisi KTB, genetik olarak farklı ve bu yüzden antijenik olan haploid germ hücrelerini (sekonder spermatositler, spermatidler ve spermiyumlar) erişkin erkek immünolojik sisteminden izole ederler. Spermiler tarafından üretilen yada onlara ait antijenler sistemik dolaşıma ulaşmaktan alıkonur. Bunun tersi olarak da γ -globülinler ve bazı bireylerde bulunan özelleşmiş sperm antikorlarının da seminifer tübüldeki gelişmekte olan spermatogenik hücrelere ulaşması önlenir.

Böylece KTB spermatogenik hücrelerin immünolojik sistemden izole edilmesinde hayati bir rol oynar (63,79,83).

KTB'ne üç temel fonksiyon atfedilir. 1) özelleşmiş bir ortam meydana getirir; 2) moleküllerin geçişini düzenler; 3) immünolojik bir bariyer olarak işlev görür. İlk olarak, KTB germ hücrelerinin gelişim ve farklılaşmaları için uygun özelleşmiş bir mikro çevre oluşturarak testisin karmaşık yapısal organizasyonuna katkıda bulunur. Sertoli hücreleri gelişen germ hücrelerinin büyüme, farklılaşmaları için gerekli olan ürünleri sentezlemek salgılamak ve uygun bir şekilde sunmak üzere farklılaşmışlardır. KTB'ni oluşturan sıkı bağlantılar besinler ve atıklar gibi ürünlerin, gerek seminifer epitel içine gerekse dışına hareketini düzenlerler. Örneğin FSH seminifer tübül sıvısına geçemez, bu nedenle FSH reseptörleri bazal kompartıman tarafındaki Sertoli hücresi membranında bulunurlar. KTB immünolojik bir bariyer oluşturarak organizmanın immünolojik sisteminin haploid germ hücrelerinin membranlarında sonradan beliren özel antijenleri ile karşılaşmasını önler. Aksi halde otoimmün reaksiyonlar gelişebilir. Ayrıca Sertoli ve germ hücreleri interferonlar, interleokinler ve sitokinler üretmek yolu ile özel bir antiviral savunma sistemi oluşturmuşlardır. KTB aynı zamanda Ig'lerin ve lenfositlerin luminal kompartımana geçişlerini engeller (63,79,83).

2.3.3.3. Germ Hücresi Hareketi Ve Spermiasyon

Sertoli hücreleri gelişen germ hücrelerinin hareketi ile doğrudan ilişkilidirler çünkü germ hücreleri hücre yapı özellikleri açısından örneğin fibroblast gibi hareket edebilen hücrelerin yapısına benzememektedir. Bazı çalışmalarda germ hücresi hareketinde GTPaze süperailisi üyelerinin rolü olabileceğini göstermiştir. Bazı çalışmalarda uzayan/uzamış spermatidlerin seminifer epitel boyunca yer değiştirmesinin geniş çapta ektoplazmik özelleşmelere bağlı olduğunu göstermiştir. Mikrotübüller, dynein, myosin VIIa, ATP-azlar ve GTPaz gibi ektoplazmik özelleşmelerde mevcut bulunan bazı motor proteinlerle birlikte

uzayan/uzamış spermatidlerin seminifer epitel boyunca hareketine yardım ediyor gibi görünmektedirler (33,34,63,78,79,83,84).

Sertoli hücreleri aynı zamanda seminifer epitel döngüsü boyunca erken mayotik spermatositlerin bazal kompartımandan luminal kompartımana geçişine de yardım ederler. Sertoli-Sertoli ve Sertoli-germ hücresi adezyon bağlantı komplekslerinin yıkılmasını gerektiren bu süreç seçici bir süreçtir. Örneğin tipA spermatogonyumlar bazal membrana yapışık kalmak zorundadırlar ve yukarı çıkarılamazlar, bu ise hangi hücrelerin bazal membrandan kaldırılıp bazal kompartımana alınabileceğini belirleyen mekanizmalar olduğunu gösterir (33,34,63,78,79,83,84).

Sertoli hücrelerinin, olgun spermatidlerin seminifer epitelden salınması olayında vazgeçilmez rolleri vardır. Sertoli hücresi sitoplazmik uzantıları sperm başlarını sararlar, daha sonra spermatidler Sertoli hücresi kriptlerinden itilirler ve son olarak da spermatid başları seminifer tübül lümenine saliverilir (33,34,63,78,79,83,84).

2.3.3.4. Fagositoz, Pinositoz, Reseptör-Aracılı Endositoz

Olgun spermatidlerin saliverilmesinden sonra Sertoli hücreleri spermatidlerden arta kalan artık cisimcikleri ve aynı zamanda spermatogenez sürecinde bozulan bütün germ hücrelerini fagosit ederler. Bu haliyle Sertoli hücreleri seminifer epitelin bütünlüğünü koruyan birer makrofaj gibi fonksiyon görürler (63,72,79,83).

Bunun yanı sıra Sertoli hücrelerinin epitelin luminal kompartımanında aktif pinositoz, bazal kompartımanlarında ise reseptör-aracılı endositoz yaptıklarını gösteren çalışmalar mevcuttur (63,72,79,83).

Her iki kompartımanda da spermatogenik hücreler Sertoli hücrelerinin karmaşık uzantıları ile sarılı durumdadırlar. Sertoli hücreleri ve gelişen

spermatogenik hücreler arasındaki sıra dışı yakın ve kompleks ilişki dolayısıyla Sertoli hücrelerinin bir anlamda “dadi” hücreler yada destek hücreleri olduğu düşünülmüştür; çünkü gelişen spermatogenik hücreler ile dolaşım sistemi arasında metabolik moleküllerin ve atıkların değişimi noktasında aracı olmaktadır. Ayrıca Sertoli hücreleri spermiyogenezin son safhasında meydana gelen artık cisimciklerin yıkılması ve fagosite edilmesini de sağlar. Aynı zamanda tam olarak farklılaşamayan başarısız spermatogenik hücreleri de fagosite ederler. Son bulgular, Sertoli hücrelerinin sayısının, genellikle yaşlılığa bağlı olarak azalmasıyla infertilite oranının da buna bağlı olarak arttığını göstermiştir (63,72,79,83).

2.3.3.5. Salgı Fonksiyonları

Sertoli hücrelerinin hem ekzokrin hem endokrin salgı fonksiyonları vardır.

Sertoli hücreleri tipik salgı hücreleridir. Bu hal, Sertoli hücreleri tarafından üretilen bütün proteinlerin %15'inin salgılanmak üzere üretilmiş glikoproteinler olduğu bulgusu ile desteklenmektedir. Sertoli hücrelerinin, özellikle germ hücreleri ile ilgili olan pek çok fonksiyonunun anlaşılması yolunda yapılan pek çok araştırmalar neticesinde Sertoli hücreleri tarafından sentez edilen çeşitli proteinler tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Sertoli hücresi salgı ürünleri temel olarak 1) proteazlar, 2) proteaz inhibitörleri, 3) hormonlar, 4) enerji substratları, 5) büyüme faktörleri, 6) parakrin faktörler ve 7) hücre dışı matriks bileşenleri, şeklinde sınıflanabilir (63,72,79,83,117).

Gelişen spermilerin seminifer tübüller boyunca taşıyıcı kanallara geçişini kolaylaştırıcı bir sıvı salgılayanın yanı sıra Sertoli hücreleri ABP de salgırlar. ABP testosteronu seminifer tübüllerin luminal kompartımanında konsantre eder, çünkü yüksek konsantrasyonlardaki testosteron gelişen spermilerin normal olgunlaşması için hayati önem taşır (63,72,79,83,117).

Sertoli hücreleri aynı zamanda bazı endokrin maddeler salgılar. Bunlar arasında 32-kDa'luk glikoprotein bir hormon olan inhibin ön hipofizden FSH salınmasını inhibe eden bir feed-back halkasında yer alır. Sertoli hücreleri hem FSH hem testosteron ile uyarılırlar. Ek olarak Sertoli hücreleri aynı zamanda plazminojeni, aktif proteolitik hormon olan plazmine dönüştüren plazminojen aktivatör faktörü ve bir demir taşıyıcı protein olan transferrin sentez ederler. FSH reseptörlerinin yalnızca Sertoli hücreleri üzerinde var olduğu ve ABP, inhibin ve plazminojen aktivatörü salgılanması için hayati olduğu düşünülmektedir (63,72,79,83,117).

2.3.3.6. Besin Sağlama

Morfolojik çalışmalar bu hücrelerin çok geniş bir yüzey alanlarının olduğunu ve gelişimin her basamağından germ hücreleri ile yakın temasta olduklarını göstermiştir. Tek bir Sertoli hücresinin yaklaşık 50 kadar gelişmekte olan germ hücresine bakıcılık ettiği düşünülürse bunun testisin biyolojisi açısından ne denli önemli olduğu anlaşılabilir. Örneğin, Sertoli hücreleri glikozu germ hücreleri tarafından enerji kaynağı olarak kullanılan laktat ve piruvata metabolize edebilirler ve bunu iletişim bağlantıları vasıtasıyla germ hücrelerine aktararak hayatiyetlerini devam ettirmelerine yardımcı olurlar (63,72,79,83,118).

Pek çoğu germ hücrelerinin hayatta kalması için önemli olan Sertoli hücresi ürünlerinin, sentezlenmesi ve KTB'nin gerisinde yaşayan spermatositlere ve spermatidlere yeterli şekilde verilmesi gerekmektedir. Bu ürünler arasında amino asitler, karbonhidratlar, lipidler, vitaminler ve metal iyonları vardır. Besin ürünlerinin Sertoli hücrelerinden germ hücrelerine aktarımı bu iki hücre arasında mevcut bulunan karmaşık bir ilişki sayesinde mümkün olabilmektedir. Bu durum en iyi, germ hücreleri izole edilip kültüre edildikleri zaman anlaşılır çünkü germ hücreleri tek başlarına kültür ortamında 24 saatten fazla yaşamazlar. Bir Sertoli hücresi ürünü olan "Stem Cell Factor"ün in-vitro germ hücresi apoptozunu önleyebildiğinin bulunması, germ hücrelerinin hayatının büyük oranda Sertoli hücrelerine bağlı olduğunun anlaşılmasını

sağladı. Önceki çalışmalar germ hücrelerinin Sertoli hücreleri ile birlikte kültüre edildiklerinde yaklaşık 8 gün yaşabildiklerini göstermiştir (63,79,83).

Sertoli hücresi metabolizması hala tam olarak anlaşılabilmiş değildir, yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu da genelde in-vitro çalışmalar olduğundan bunların in-vivo şartları tam olarak yansıttıkları söylenemez. Kültür ortamında bulunan Sertoli hücrelerinin hormonal çevresi in-vivo şartlardan farklıdır; çünkü bu hücreler serumsuz ve kimyasal olarak limitli bir ortamda yaşarlar. Eğer Sertoli hücresi kültürlerine serum ilave edilirse bu yanlış sonuçlara götürür çünkü in-vivo KTB'nin bulunuşu serum proteinlerinin luminal kompartımana geçişini sınırlar. Bunun gibi nedenlerle bu tür çalışmalardan elde edilen sonuçların in-vivo bağlamında yorumlanması genelde zor, kimi zaman da imkansızdır (63,79,83).

2.4. Kriptorşidizm

Kriptorşidizm testislerin skrotuma inmemesiyle oluşan doğumsal bir bozukluktur. İnsanlarda normalde testislerin skrotuma inişi gebeliğin 28. haftasında başlar, bu nedenle kriptorşidizm vakalarının büyük çoğunluğu doğumda veya erken çocukluk çağında tesbit edilebilir. Testislerin inişi de diğer biyolojik süreçler gibi zaman açısından farklılıklar gösterebilir. Bu nedenle doğumda kriptorşid doğmuş bebeklerin yaklaşık %50'si doğumdan sonra yaklaşık 3 ay civarında kendiliğinden düzelir. Erken doğumlar da hesaba katılırsa, kriptorşidizm yenidoğan erkek çocukların yaklaşık %4-5 kadarını etkileyen en yaygın rahatsızlıktır. Testislerin inişi doğumdan önce gerçekleştiği için erken doğan bebeklerde, zamanında doğmuş bebeklere nazaran kriptorşidizm görülme oranı daha yüksektir. 2,5 kilodan küçük doğmuş bebeklerde kriptorşidizm oranı %21-23 iken 2,5 kilo üstünde doğmuş bebeklerde bu oran %3-4 kadardır. Normal doğumdan 12 hafta sonra doğumların yaklaşık %1-2'sinde hala inmemiş testis görülebilmektedir. Bunlar skrotuma göç fazını tamamlayamamış gonadlardır ve konjenital inmemiş testis olarak adlandırılabilirler (3,69,119,120,121).

Kriptorşidizm vakalarının büyük çoğunluğu gelişimsel dengesizliğe bağlanabilir. Bununla birlikte kriptorşidizmin karakteristik bir semptomatığı yoktur. Yapılan bir çalışmada kriptorşid olarak belirlenen 4000 çocuktan %8,9'unda abdominal ya da gelişmemiş olduğundan dolayı palpe edilebilir testis bulunmadığı; %41 kadarında testislerin inguinal kanal boyunca herhangi bir yerde bulunduğu; yaklaşık %50'sinde ise testislerin retraktıl olduğu, yani skrotum ile inguinal kanal arasında gidip geldiği tesbit edilmiştir (4,5,121).

Kriptorşidizm vakalarının %85'i tek taraflıdır; bununla birlikte özellikle testislerin palpe edilemez olduğu durumlarda bilateralidir. Kriptorşidizm sıklıkla erkek genital organlarındaki diğer gelişimsel bozukluklarla birlikte görülür. Bu durum "Testiküler Disgenez Sendromu" olarak tanımlanmaktadır. Testiküler Disgenez Sendromu'nun sebebinin gerek genetik mutasyonlar gerek cinsiyet belirlenmesi sırasındaki endokrin bozukluklar olabileceği düşünülmüştür.

Neticede bu durum Sertoli ve/veya Leydig hücre fonksiyonunda bozukluğa neden olabilmektedir. Sertoli hücreleri zarar görmüşse semen kalitesinde düşme veya “**Carsinoma In-Situ**” (CIS) gibi germ hücresi bozuklukları ortaya çıkar. Leydig hücreleri zarar görmüşse en azından androjen yetersizliği ortaya çıkar ve buna bağlı olarak dış genital organlarda kriptorşidizm, hipospadias, mikro penis gibi androjen yetersizliğine bağlı değişiklikler meydana gelebilir. Bununla birlikte kriptorşidizm genellikle tekil bir sendrom olarak ortaya çıkar ve sayılan bu defektlerle bağlantılı olmayabilir; bu da androjen yetersizliğinin tek başına kriptorşidizm için yeterli bir açıklama olmayacağını gösterir (3,4,16,119,120,121).

Daha çok 5-10 yaş arası çocuklarda görülen yeni bir grup inmemiş testis vakası daha tanımlanmıştır. Çocukluk çağları boyunca vücut büyüklüğü önemli ölçüde artar ve bu aynı zamanda inguinokrotal bölge için de geçerlidir. Yüzeyel inguinal halka ile skrotum arasındaki mesafe çocukluk boyunca büyür ve bebekte 5 cm iken 10 yaşındaki bir çocukta 10 cm olur. Bu durum spermatik kordonun da aynı şekilde doğumdan sonraki 10 yıl içinde iki katı kadar büyümesini gerektirir. Kazanılmış inmemiş testis spermatik kordonun bu uzaması yetersiz olduğu durumlarda ortaya çıkar. Bu olgunun artık, kliniğe başvuran kriptorşid vakaların yaklaşık %50’sinde kriptorşidizm oluşturan temel sebep olduğu düşünülmektedir. Prosessus vaginalisinin tamamıyla ortadan kalkmayıp, vas deferens ve spermatik damarların yaşla birlikte uzamasını engelleyen fibröz bir artık bırakmasının bu olguya sebep olabileceği gösterilmiştir (3).

Erkek üreme organları ile ilgili kriptorşidizm gibi gelişimsel anormalliklerin sıklığında zamanla birlikte bir artma olduğu yönünde raporlar mevcuttur. Kriptorşidizm prevalansının yıllara bağlı değerlendirilmesinden, prevalansın zamanla arttığı görülmektedir. 1962-1981 yılları arasında İngiltere ve Wales bölgelerindeki hasta taburcu kayıtlarının analiz edildiği ve kriptorşidizm prevalansının araştırıldığı bir çalışmada, inmemiş testis prevalansının 1952’de %1,4’ten 1977’de %2,9 gibi bir değere yükseldiği gösterilmiştir (5,121,122).

2.4.1. Kriptorşidizmin Testis Üzerindeki Etkileri

Testislerin doğumdan sonra skrotuma inişinin sekteye uğramış olması testisin fizyolojisinde ve biyokimyasında ilerleyen anormalliklere sebep olur. Erkeklerde normal skrotal sıcaklık, abdominal sıcaklıktan yaklaşık 3-5 derece daha düşüktür ve testis fizyolojisi doğumdan sonra bu düşük sıcaklıkta çalışmak üzere programlanmıştır. Testisin bu düşük sıcaklıkta olmamasının testiste, hormon üretimi ve fizyolojisi ve germ hücrelerinin gelişimi ile ilgili ikincil anormalliklere sebep olduğu kabul edilmektedir. Gerek sıçanlarda ve diğer türlerde yapılan deneysel çalışmalar gerekse insanlarda yapılan klinik gözlemler, abdominal sıcaklığın erkek üreme fonksiyonlarını birkaç noktada olumsuz etkileyebileceğini ve neticede yetişkin hayatta infertiliteye yol açabileceğini göstermiştir (3,123,124,125).

Bunlardan ilk ve en önemlisi, erken gonosit kök hücrelerin tipA spermatogonyumlara farklılaştığı mitoz basamağıdır. Bu kök hücre havuzu erginlik döneminde spermatogenezin efektif bir şekilde gerçekleşmesi için hayati önem taşır. İnmemiş testiste kök hücre karakterindeki germ hücrelerinin tipA_d spermatogonyumlara dönüşümü yetersiz kalır. Bu dönüşümdeki bozukluk tipA spermatogonyum havuzunda bir yetersizliğe yol açar ve bunun da erginlikten sonraki düşük sperm sayısının temel sebebi olduğu düşünülmüştür. Bu erken farklılaşma basamağındaki bozukluk neticesinde konjenital olarak anormal olan gonositler inmemiş testisin yüksek sıcaklıklı ortamında mutasyona uğrayabilir ve CIS hücrelerine dönüşebilir. Kriptorşidizm öyküsü olan erişkinlerde testiküler CIS oranının %2,9 civarında olduğu tahmin edilmektedir. Bu durum ileriki dönemlerde ortaya çıkabilecek testiküler kanser, seminoma, öncüleriyle ilişkili bulunmuştur. Kriptorşidizm ile ilişkili bulunan testis kanseri oranı %5 civarındadır; öyküsünde kriptorşidizm bulunanlarda risk 3,5-17,1 kat fazla bulunmuştur. Tek taraflı kriptorşidizmde tümörlerin çoğu inmemiş kriptorşid testistedir, ancak %8-15 olguda karşı taraftaki inmiş skrotal testiste de olabilmektedir. Karın içi yerleşimli testislerde tümör riski oldukça yüksektir; yetişkinlerde palpe edilemeyen testislerde tümör bulunma ihtimali yaklaşık %40 bulunmuştur (3,4,6,61,69,121,122,126,127,128,129).

Spermatogenezdeki ikinci ısıya-hassas basamak, pakiten spermatositlerin erken yuvarlak spermatidlere dönüştüğü mayoz basamağıdır. Bu insan kriptorşidizmi ile ilişkili görünmese bile pek çok deneysel modelde isbat edilmiştir ve mesleki nedenlerle testislerin aşırı ısınmaya maruz kaldığı durumlar için geçerli olabilir. Rhesus maymunlarda testislerin hafifçe ısıtmasının spermatositlerde p53 transkripsiyon faktörü ekspresyonunun indüksiyonuna neden olduğu gösterilmiştir, bu durum p21'in indüksiyonuna yol açmıştır, dolayısıyla retinoblastoma proteinini aktive etmiştir. Bu da, spermatositlerde post-mayotik genlerin düzenlenmesinde önemli roller oynayan başlıca transkripsiyon faktörü olan TR2'nin tamamen azalmasına neden olur (4).

Üçüncü olarak Sertoli hücrelerinin de mekanizmaları tam olarak bilinmese de ısıya hassas olduğu düşünülmektedir. Isıdaki yükselme aynı zamanda gelişen spermlerdeki DNA üzerinde oksidatif hasar oluşması riskini artırır, dolayısıyla etkilenen şahısların daha sonraki neslinde embriyoların hayatta kalma şansını azaltır (4).

Skrotumun en serin alanı kauda epididimisin yerleştiği alandır. Epididimisin, spermler bir kez germinal epiteli terk ettikten sonra bunların olgunlaşması ve depolanması için hayati önemi vardır. Bu fonksiyon büyük oranda epididimis epitelinden salgılanan özel proteinlere bağlıdır. Kriptorşid hayvanların epididimislerinde ve epididimis hücrelerinin birincil hücre kültürlerinde yapılan bir dizi çalışmada bu epididimal gen ürünlerinin bir kısmının sıcaklıktaki çok küçük değişikliklere dahi son derece hassas olduğunu gösterilmiştir (4).

2.4.2. Kriptorşidizmin Etiyolojisi ve Bilinen Risk Faktörleri

İnmemiş testisin etiyolojisi çoğunlukla idiyopatik ve multifaktöriyeldir (1,2,3,4,5,6).

Kriptorşidizm için bilinen risk faktörleri arasında, ırksal köken, ailevi kriptorşidizm hikayesi, hamilelik sırasında ağrı kesici kullanımı, kardeşler arasındaki doğum sırası, düşük doğum ağırlığı, erken doğum, hamilelik sırasında sigara, alkol ve kolalı içeceklerin tüketimi, annenin obezitesi ve mevsimsel faktörler sayılabilir. Senenin farklı zamanlarında meydana gelen kriptorşidizm artışları ile karakterize bir mevsimsel etkinin de olabileceğine dair bulgular çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. Endokrin bozucu kimyasallara erken dönemde maruz kalmanın üreme organlarında anormalliklere, sperm üretiminde azalmaya sebep olabileceği ve testis kanserini tetikleyebileceği bildirilmiştir. Kriptorşidizm daha sonra testis kanseri gelişimi açısından bilinen bir risk faktörüdür ve doğurganlık düzeyi düşük olan erkeklerin daha yüksek testis kanseri olma riski taşıdıkları gösterilmiştir (3,5,6,128,130).

INSL3, testosteron ve MIS/AMH üretimindeki hormonal bozukluklar testiküler iniş anormalliklerine sebep olabilir ancak bunların hep birlikte meydana gelmesi nadirdir. Çocukların büyük çoğunluğunda inmemiş testisin kesin sebebi hala anlaşılamamıştır. Fakat vakaların çoğunluğundaki anormalliğin, gebeliğin ikinci yarısında yeterli testosteron üretiminin uyarılması için gerekli olan plasental koriyonik gonadotropinin eksikliğine bağlı olarak gubernakulumun gelişmemesi ve buna bağlı olarak testisin inguinal bölgeden skrotum içine göçünün gerçekleşmemesi olduğu düşünülmektedir. İnişin birinci fazı, nisbeten daha basit bir mekanizmayla olmasından dolayı, daha nadir olarak hatalıdır ve karın içi pozisyonundaki testisler, total kriptorşid vakalarının yalnızca %10-20'sini oluşturur. Aksine inguino-skrotal iniş çok daha karmaşık bir süreçtir ve daha sıklıkla anormallik görülür. İnmemiş testis görülen çocukların büyük çoğunluğu bu inguinal/üstskrotal gruba denk düşer (3,5,6,122,130).

Bununla birlikte, insanlarda harici hormonların (ağızdan doğum kontrol hapları, hormon gebelik testleri, daha önceki bir düşük hikayesi veya muhtemel düşük durumunda kullanılan progestajenler gibi) meydana getirdiği etkilerin araştırıldığı 14 yayının ele alındığı bir incelemede, bu maddelerin doğum öncesi dönemde zararlı etkilerinin olduğuna dair yeterli bulgu elde edilememiştir (3,5,6,130). Kriptorşidizm açısından belli başlı risk faktörleri şu şekilde sıralanabilir:

2.4.2.1. Androjenler

Kriptorşidizm, pek çok ağır veya hafif hipogonadotropik hipogonadizm ve Testiküler Disgenez Sendromu vakalarıyla ilişkili genel bir sendromdur. Androjen üretiminde veya metabolizmasında bozukluk olan, abdominal, inguinal ve skrotal testisleri bulunan hastalarda erkeklik seviyesi düşüktür. Androjen reseptöründeki (AR) mutasyondan kaynaklanan kısmi androjen duyarsızlığı sendromu bulunan hastalarda Wolff kanalında değişken gelişim, mikro penis, hipospadias ve kriptorşidizm görülebilir. Fonksiyonel androjen reseptörleri bulunmayan doğal testiküler feminizan mutant fareler yukarıdaki semptomların hepsini gösterirler. Ancak AR'ü kodlayan gendeki mutasyonlarda kriptorşidizm vakalarının pek çoğunun sebebini açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Çünkü mevcut vakalar içerisindeki oranı çok nadirdir. Yapılan çalışmalarda kriptorşidizm ile AR mutasyonları arasında bir ilişki bulunamamıştır. Bununla birlikte kriptorşid erkek çocukların 6-14. gebelik haftalarında dolaşımsal testosteron seviyelerinin düşük olduğu gösterilmiştir. Bu açıdan, testosteron yarılanmasını hızlandıran veya androjen sentezini azaltan veya reseptör seviyesinde androjenlere antagonistik etkisi olan çevresel atıkların kriptorşidizm prevalansını arttırmaya neden olabilecekleri mantıklı görünmektedir (4,5,64,65,67,70,122,131,132,133,).

LH reseptörlerinde kısmi inaktivasyona sebep olan bir mutasyonu olan hastalar, psödohermafrodizmden Testiküler Disgenez Sendromu'nun bir veya bütün semptomlarına kadar gelişimsel semptomlar gösterebilirler. LH

reseptörleri iptal edilmiş “LuRKO” soyu farelerde testiküler ve dolaşımsal testosteron düzeyleri çok düşüktür ve tam psödohermafroditizm mevcuttur. Aynı semptomlar GnRH geninin mutasyona uğratıldığı hipogonadal farelerde de mevcuttur. Bununla birlikte testisin inişinde androjenlerin rolü hala net değildir. Karın içi iniş sürecinde, androjenler en azından kraniyal asıcı ligamentin gerilemesine katkıda bulunurlar. Bunun aksine gubernakulumun gelişimi androjenlerden bağımsız görünmektedir, çünkü androjen direnci olan farelerde ve insanlarda da normal olarak meydana gelir, testis inguinal bölgeye yakın tutulur. Kasıktan skrotuma olan ikinci basamağın androjenlere daha bağımlı olduğu kabul edilmektedir, çünkü hormon tedavilerinin yüksek başarı oranları vardır: Genelde testisin pozisyonu ne kadar yukarıda ise hipotalamo-hipofiziyer-gonadal eksenin uyarılması inişi desteklemekte o derece başarısız olmaktadır. Artan LH androjenleri yükselttiği gibi, INSL3 gibi farklılaşmayla ilişkili Leydig hücresi ürünlerini de artıracaktır. Son zamanlarda sıçanlarda dihidrotestosteronun, gubernakulum gelişimini in-vitro artırmak konusunda INSL3 ile sinerjik etkiye sahip olabilecekleri gösterilmiştir (4,5,64,67,70,132,133,134).

2.4.2.2. Müllerian Inhibiting Substance - Anti-Müllerian Hormon

Anti-Müllerian Hormon reseptör geninin iptal edilmesinin gubernakulum büyüklüğü ve gelişiminde bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür. Yine doku kültürlerinde AMH'un gubernakulumun büyümesine sadece küçük bir etkisi olduğu, bunu da AMH tip2 reseptörler vasıtasıyla gösterdiği gösterilmiştir. Gubernakulum üzerine AMH'un direkt etkisi yoksa bile erişkin tipte Leydig hücrelerinin tip2 AMH reseptörleri ekspresse ettiği bilinmektedir. Eğer fetal Leydig hücreleri de aynı özellikleri taşıyorsa bu, testis inişini destekleyecek ikinci bir takviye mekanizma teşkil edebilir (4,14,64,67,70,122,132).

2.4.2.3. İnsulin-Like Factor-3

INSL3 hem f3tal hem yetişkin tip Leydig h3crelerinde ekspresse edilmektedir. INSL3 geni çıkarılmış erkek farelerde tipik kriptorşid fenotipi g3r3lmekte, fakat erkek 3reme organlarında g3zle g3r3l3r bir bozukluk oluşmamaktadır. Bu fareler, kriptorşidizmin erken olarak d3zeltilmesiyle normal fertil fenotipe d3n3şebilmektedir. İnsan kriptorşidizm vakalarında bug3ne kadar INSL3 geninde etken bir mutasyon tesbit edilememiştir, sadece hafif bir polimorfizm tanımlanmıştır (4,123,135).

LGR8/GREAT adı verilen yeni bir G-proteine bağlı resept3r klonlanmıştır. Bu resept3r3n geni ile aşılanmış h3crelerin INSL3/RLF'e d3ř3k nanomolar d3zeylerde 3zelleşmiş cevap verdiği ve bağlandığı tesbit edilmiştir. Gubernakular doku parçalarının da LGR8 resept3r3 ekspresse ettikleri g3sterilmiştir ve bu genin farelerde mutasyonunun kriptorşidizme neden olabileceği ileri s3r3lm3řt3r. Embriyonal 18. g3ne ait sıçan gubernakular doku parçalarının INSL3/RLF ile muamele edilmesi, ligamentin k3lt3rde hızlı ve hacimli b3y3mesine neden olur, dihidrotestosteron ile muamele neticesinde bu etkinin arttığı g3r3lm3řt3r ama dihidrotestosteronun tek başına hafif bir etkisi vardır (4,6,64,122,128,136).

INSL3 geni iptal edilmiş hayvanlarda, testisler abdominal yerleşimlidir ancak peritoneal kaviteye son derece geveşek bağlanmışlardır. Bunun nedeni, bu farelerin androjenleri ekspresse edebiliyor olmalarıdır, bu yolla normal tiplerde olduğu gibi kraniyal asıcı ligament invol3syonu gerçekleşir, yalnızca gubernakulum gelişimi başarısız olur. Fonksiyonel androjen resept3rlerinin olmadığı testik3ler feminizan mutant farelerde INSL3/RLF normal bi şekilde ekspresse edilir. Bu nedenle normal tiplerde olduğu gibi gubernakulum gelişebilir ve testisi inguinal b3lgede tutabilir. Ancak mutasyon nedeniyle androjenik bir etkinin olmaması kraniyal asıcı ligamentinin invol3syona uğramayacağı gelişmeye devam edeceği anlamına gelir; bu da testisin karın içi kavitede ipe gerilmiş gibi asılı kalacağı anlamına gelir. Eğer testik3ler feminizan mutant fareler INSL3 genleri iptal edilmiş farelerle çaprazlanacak olursa erkek

yavrularda testis ovaryuma benzer bir pozisyon alır, kraniyal asıcı ligament iyi gelişir ve gubernakulum INSL3/RLF yokluğunda involüsyona uğrar. Fötal dişi farelerde INSL3/RLF ekspresyonunu uyarmak için genleri değiştirilmiş hayvanların kullanıldığı çalışmalarda, ovaryumların inguinal bölgeye yerleşmelerinin yanı sıra dişi farelerde inguinal herni sıklığında artma görülmüştür; bu ise INSL3/RLF'ün testislerin vücut duvarlarının arasından geçerek abdominal kaviteden skrotuma inmesinde de rol oynayabileceğini düşündürmüştür (4,59,137,138).

2.4.2.4. Östrojenler

1950'li yıllarda gebeliğe hormonal destek olması için uygulanan diethylstilbestrol tedavisinin yüksek oranda kriptorşidizme neden olduğu tesbit edildi. Gebe sıçanların deneysel olarak östrojenlerle muamele edilmesi konuyla ilgili bulguları güçlendirdi; erkek fetüslerin östrojenlere maruz bırakılması testislerin inişinde başarısızlığa yol açtı. Bu aynı zamanda insanlarda son yıllarda giderek artan kriptorşidizmle ve kriptorşidizmde ksenoestrogenlere maruz kalmanın rolü ile de bağdaştırılmıştır. Hamilelik döneminde kriptorşidizm sebep olacak dozda diethylstilbestrol ile muamele edilmiş farelerde erkek fetüslerde yapılan incelemeler, 16. ve 18. embriyonal günlerde INSL3/RLF mRNA'sının, deney grubunda kontrol hayvanlarına nazaran tamamen baskılandığını göstermiştir. Hayvan çalışmaları gelişim sürecinde östrojenlere maruz kalmanın kriptorşidizm neden olabileceğini göstermiştir. İnsanlarda diethylstilbestrol'e maruz kalan annelerin erkek çocuklarında kriptorşidizm gibi üreme organları anomalilerinin meydana geldiği bildirilmiştir (4,6,65,76,128,132,139,140).

Annelerin östrojenle muamele edilmesiyle oluşturulan durumun bir benzeri erkek farelerde aromataz enzimini sentezleyen aşılınmış bir genin (AROM+) aşırı ekspresse edilmesi ile de oluşturulmuştur. Bütün AROM+ erkekler kriptorşid bulundular ve testisleri abdominal kavitenin tabanında yerleşmişlerdi, ayrıca testis, epididimis, seminal bez ve prostat loblarının ağırlıkları anlamlı ve

önemli oranda azalmıştı. Bu farelerde öncelikle erkek fetüslerdeki aşırı östrojen, INSL3/RLF ekspresyonunun baskılanmasına yol açmıştır. Aşırı östrojenler muhtemelen hipotalamo-hipofiziyer-gonadal ekseninde bir feed-back inhibisyona sebep oldular, bu da hipoandrojenemiye neden oldu. Östrojenlerin insanlarda da aynı şekilde etkili olup olmadıkları bilinmemektedir, fakat gerek testis seviyesinde gerekse hipotalamo-hipofiziyer-gonadal eksenin herhangi bir şekilde bozulması yoluyla bir östojenik etkinin oluşması muhtemeldir (4,76,132,139,140).

2.4.2.5. Transkripsiyon Faktörü Hox

Transkripsiyon Faktörü Hoxa-10, üreme sisteminin erken embriyonal gelişimi ile ilişkilidir. Özellikle dişilerde Hoxa-10 geninin ortadan kaldırılması uterus ve Fallop tüplerinin gelişmemesi ile sonuçlanır. Hasta edilmiş erkekler hayatiyetlerini devam ettirebilirler ancak infertildirler. Normal bir erkek görüntüsüne sahip olmakla birlikte bilateral olarak kriptorşid bulunmuşlardır ve gubernakulumları gelişmemiştir. Normal tip farelerde Hoxa-10 için yapılan in-situ hibridizasyon çalışmaları bunların böbrek ve gubernakulumda ekspresse edildiğini ve erkek üreme sisteminde başka bir yerde ekspresse edilmediğini göstermiştir. Bu nedenle, bu transkripsiyon faktörünün kriptorşidizmle ilişkisi olabileceği düşünülmüştür (4,6,61,64,122,141).

2.4.2.6. Genitofemoral Sinir ve “Calcitonin Gene Related Peptid” (CGRP)

Genitofemoral sinir ve onun başlıca nörotransmitteri olan CGRP'in de testislerin inişinde önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. Bu sinirin spina bifida gibi patolojik bir nedenle veya hayvanlarda deneysel olarak haraplanması kriptorşidizme sebep olur; bu durum CGRP takviyesi ile kısmen hafifletilebilir. Bu etki, gubernakulumun yapısında CGRP'in hedefi olabilecek düz kas hücreleri bulunması sayesinde elde edilir (4,64,67,70,122).

2.4.2.7. Çevresel Faktörler

1992 yılında, o zamana kadarki son 25-30 yıl içerisinde gerek kriptorşidizm gerekse hipospadias vakalarında belirgin bir artış olduğunun gösterilmesinden sonra kriptorşidizmin etiyolojisinde çevresel bir bileşenin de olabileceğine dair ilk varsayımlar ortaya atılmıştır. Bu görüşler daha sonra annelerin östrojene maruz kalmalarının erkek fetüslerin dış genital organlarının üzerinde negatif bir etkisinin olduğunu gösteren araştırmalar ile desteklenmiştir. Hep beraber bu bulgular çevresel endokrinolojik bozucu ajanların testisin inişi üzerinde bir etkisi olabileceğini göstermiştir (4,122,128,142,143,144).

Doğu ve Batı Berlin'deki kadın doğum hastanelerinde 1965-1997 yılları arasında kaydedilen kriptorşidizm vakası kayıtları istatistiksel olarak analiz edilmiştir. 1972 yılı öncesinde östrojenik veya anti androjenik etkilerinin olduğu deneysel olarak bilinen böcek öldürücü DDT kullanımı her iki tarafta da yaygındı. Batı Berlin'de 1972 yılında DDT kullanımının yasaklanmasından sonra kriptorşidizm vakaları düşerken Doğu Berlin'de yüksek kaldığının tesbit edilmesi, çevresel faktörlerin kriptorşidizme neden olabileceği tezine ağırlık kazandırmıştır. Bu tezi destekleyecek şekilde bazı çalışmalarda kriptorşidizmi olan hastaların dokularında bazı organoklorin bileşiklerinin yüksek dozlarda bulunduğu bildirilmiştir (4).

Hayvan çalışmalarında çeşitli fithalatesterleri ve flutamid gibi muhtemel östrojenik ve anti androjenik maddelere gebelik sırasında maruz bırakmakla kriptorşidizm meydana getirilebilmiştir. Domuzlarda Tetrachloro dibenzyl-*p*-dioxin'e gebeliğin orta dönemlerinde maruz bırakmakla kriptorşidizm, düşük germ hücresi sayısı ve epididimal bozukluk gibi anormalliler meydana getirilebilmiştir; olaya gubernakulum ve epididimiste östrojen reseptörü α mRNA ekspresyonunda bir azalma ve testiste östrojen reseptörü α protein düzeylerinde bir yükselme eşlik etmiştir. Bu ve benzeri çalışmalardan östrojenik ve anti androjenik etkili kimyasalların kriptorşidizme neden olabilecekleri düşünülmüştür (5,6,128,145,146).

Pek çok epidemiyolojik çalışmada pestisidlere maruz kalmanın erkek genital organlarında anormalliklere neden olabileceği ileri sürülmüştür. İspanya'da Granada'da aşırı pestisid kullanılan yoğun tarım yapılan bölgelerinde orşiopeksi vakalarının oranında artış rapor edilmiştir. Norveç'te pestisidlerin kullanıldığı çiftliklerde doğan erkek çocuklarda kriptorşidizm riskinin arttığı bildirilmiştir. Colombia ve A.B.D Minnesota'da mesleki olarak pestisidlere maruz kalan kimselerin çocuklarında ürogenital bozukluklarda artışlar olduğu bildirilmiştir. 1983-1992 yılları arasında Danimarka hastanelerinden kriptorşidizm teşhisi ile taburcu olmuş bütün erkek yenidoğanların incelendiği bir çalışmada, çiftçilik-bahçecilik işinde çalışan kadınların çocuklarında kriptorşidizm riskinin anlamlı oranda arttığı bulunmuştur. Bununla birlikte bahçecilik ya da çiftçilik işinde çalışan erkeklerin çocuklarında hastalanma riskinde bir artış tesbit edilmemiştir (5)

Endokrinolojik bozucu etkisi olduğu bilinen kimyasal ajanlar arasında, fungusid olarak kullanılan Vinclozolin, Procymidone ve Prochloraz, böcek ve parazit öldürücü olarak kullanılan p,p'DDE, bitki kırıcı olarak kullanılan Linuron, plastik sanayisinde plastikleştirici olarak kullanılan Diethylhexyl phthalate, Benzyl butyl fithalat, Dibutyl fithalat ve son olarak et sığırlarında büyümeyi hızlandırmak için kullanılan 17 β -trenbolone sayılabilir (147).

2.5. Deneysel Model

İnsanın üreme karakterini tam olarak yansıtan bir hayvan modeli mevcut değildir. Bununla birlikte bu gerçek hayvan modellerinin insan üreme fonksiyonları üzerine yapılacak çalışmalarda geçersiz olduğu anlamına da gelmez. Hayvan modeli olarak kullanılacak diğer bütün hayvanların erkeklerinde günlük sperm üretimi, insandaki 4 milyona karşılık 20-28 milyon gibi bir rakamla insanlardan daha yüksektir. Germinal epitelin homojenliği, ejekülattaki spermilerin morfolojisi gibi faktörler hayvan modellerinde ölçülmesi düşünülen pek çok parametre için düşük bir varyasyon katsayısı meydana getirir. Normal hayvanlar arasında üreme fonksiyonları açısından ölçülmesi düşünülen karakter özellikleri insanda olduğundan çok daha az varyasyon gösterdiğinden, aynı özelliklerin insanda çalışılması için gerektiğinden çok daha az sayıda hayvan gerekir (148).

Mevcut hayvan modelleri içinde sıçanlar farelere ve hamsterlere nazaran boyutlarının elverişli olması, üreme karakteristiklerinin ve süreçlerinin iyi belirlenmiş olması ve toksikolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılıyor olmaları nedeniyle daha çok tercih edilirler. Sıçanların üreme organları %50-70 arası bir doku kaybından sonra bile biyokimyasal ve morfolojik çalışmalar için yeterli miktarda doku örneği temin edilebilecek kadar büyüktür. Bununla birlikte kemoterapik ajanların testis fonksiyonları üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda fareler de kullanılabilir (148).

Sıçanların ve benzer kemirgenlerin bir dezavantajı uzun çalışmalar için belirli bir bireyden semen veya spermiyum örneklerinin düzenli olarak elde edilip değerlendirilmesinin mümkün olmamasıdır. Tavşanlar kemirgenlerden sonra en çok kullanılan ikinci tür olarak, uzun çalışmalarda uygun miktarda ve ölçüde semen toplanabilmesi açısından daha kullanışlıdır. Ayrıca tavşanlar için de, elde edilen parametrelerin değerlendirilmesi için gerekli üreme fonksiyonları ve süreçlerine ait temel bilgiler mevcuttur. Hem sıçan ve fare hem de tavşanlar fertilité testleri yapmaya veya gerektiğinde suni dölleme yapılmasına elverişlidirler (148).

Köpekler hayvan modeli olarak daha az tercih edilen hayvanlardır. Köpeklerin vücut büyüklükleri hormonal ve biyokimyasal analizler için yeterli kan elde edilmesine ve uzun çalışmalar için semen toplanmasına elverişlidir; bununla birlikte fertilité testi hemen hemen imkânsızdır. Dişilerin doğumdan sonra 3 ile 9 ay kadar anöstrusta kalması ve bunlarda dışardan östrus veya ovülasyon indüksiyonunun imkânsız oluşu köpeklerde fertilité testlerini çok pahalı hale getirmektedir (148).

Primatların rutin çalışmalar için yaygın olarak kullanılması pek mümkün değildir. Ancak test edilecek bir ajanın yapısı fare, sıçan, tavşan veya köpek gibi bir tür üzerinde etkilerinin değerlendirilmesine uygun değilse ve bir primatın kullanılmasını zorunlu kılıyorsa bu durumda primatlar kullanılabilir (148).

Hayvan modeli olarak genellikle memelilerin kullanılması yaygın ise de piliç gibi bir kanatlı modelinin kullanılması da bazı yaygın çevresel zehirleyici ajanların etkilerinin değerlendirilmesi çalışmalarında düşünülebilir (148).

2.5.1. Kriptorşid Hayvan Elde Etmek için Kullanılan Deneysel Modeller

Kriptorşid bir model oluşturmak için kullanılan metodlar şu şekilde özetlenebilir:

2.5.1.1. Cerrahi Yöntemler

Cerrahi olarak en çok kullanılan model oluşturma metodu abdominal yaklaşımdır (7). Deney hayvanlarının karın boşlukları açıldıktan sonra testisler skrotumdan karın boşluğuna çekilir ve cerrahi dikişle karın duvarına dikilir, inguinal kanallar da içten dikilerek kapatılır (15,18,23,51). Bu metodda başarı oranı yüksektir ancak abdominal kavite açıldığından enfeksiyonla ölüm oranı fazladır. Ayrıca abdominal organlar da maniple edilmiş olur bu da testisin karın içinde yapışmasına ve testis üzerinde istenmeyen sonuçlara yol açar (149). Buna benzer bir metod da skrotumun bir bölümünün kesilip çıkarılması

yöntemidir (165). Bu yöntemde ise inguinal kanal kapatılmadığı için inguinal kanal önündeki deri kısmı zamanla genişleyebilmekte ve testisler tekrar vücut dışına ineabilmektedir (165).

İkincil cerrahi kriptorşidizm

Kullanılan en yaygın yöntem, yetişkin veya ergin hayvanların inmiş olan testislerinin cerrahi olarak tekrar karın boşluğuna konulmasıdır, buna ikincil deneysel kriptorşidizm denir (32,151,152,153). Bu metod, devam etmekte olan spermatogenezin ısı artışından nasıl etkilendiğinin aydınlatılması amacıyla tercih edilmektedir; fakat spermatogenezin henüz başlamamış olduğu yenidoğan insan testisindeki kriptorşidizm nedeniyle oluşmuş değişikliklerin açıklanması açısından yeterli değildir. Bu metod ayrıca tek taraflı kriptorşidizmin skrotumda kalan testis üzerindeki etkilerinin araştırılması açısından da elverişlidir (7).

Birincil cerrahi kriptorşidizm

Kemirgenler gibi bazı türlerde testislerin skrotuma inişi doğumdan sonra gerçekleşir ve bu sayede gubernakulumu veya gelişmekte olan skrotuma müdahale edilmek suretiyle bu iniş önlenabilir, buna da birincil deneysel kriptorşidizm denir (32,23,154,155). Bu modelde inen testiste meydana gelen değişikliklerin karın boşluğu içinde kalmış olan testiste olanlarla kıyaslanması mümkündür. Bu metodun dezavantajı ise, kemirgenlerde spermatogenez doğumdan sonraki ilk haftada başlamaktadır; inen ve karın boşluğunda kalan testisler arasında doğumdan sonraki 14-16. günler arasında bir sıcaklık farkı oluşturulduğunda pakiten spermatosit kadar olan germ hücreleri çoktan oluşmuş bulunmaktadır, oysa yenidoğan insanlarda sadece gonositler ve spermatogonyumlar mevcuttur. Domuz gibi spermatogenezin erginliğe kadar başlamadığı hayvanlar kullanılarak bu metodun dezavantajı giderilebilir (7).

2.5.1.2. Östrojenle oluşturulmuş kriptorşidizm

Fötal dönemde anti androjen etkili östrojen ve östrojen benzeri etkiye sahip flutamid, östradiol ve 5-alfa-redüktaz enzim inhibitörü finasterid uygulaması inmemiş testis modeli oluşturmak için kullanılmıştır (7,35,132,142, 154,156,157,158,159,160,161,162). Bazı çalışmalarda östrojene fazla maruz

kalma nedeniyle insanlarda kriptorşidizmin meydana gelmiş olabileceği öne sürülmüştür ve endokrin bozucu östrojen benzeri çevresel zehirleyici maddelerin son zamanlarda artan kriptorşidizm sıklığının sebebi olabileceği iddia edilmiştir (4,65,76,132,139,140). Bu nedenle deney hayvanlarının östrojenle muamele edilmesi yaygın bir metod olmuştur. Ancak östrojenin testislerin ve erkek genital organlarının gelişimi üzerinde başka olumsuz tesirleri de bulunmaktadır; bu durum artan sıcaklık ve kriptorşidizm nedeniyle meydana gelen değişikliklerin östrojenin meydana getirdiği değişikliklerden izole edilip değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır (7,132). Ayrıca yöntem her defasında başarılı olmamaktadır (149)

2.5.1.3. Genetik modeller

Kriptorşidizmin tek belirti olarak veya diğer genital sistem anormallikleriyle kombine olarak ortaya çıktığı genleri değiştirilmiş veya genleri iptal edilmiş fare modelleri bildirilmiştir. Bu modellerin bazıları kriptorşidizmin etiyolojisi ve kriptorşidizm nedeniyle oluşmuş testis bozukluklarının tedavisi konularında önemli ipuçları sağlamıştır (7,123,134,163).

2.5.1.4. Spontan kriptorşidizmi olan hayvan soyları

Bazı hayvan türlerinde kriptorşidizm spontan olarak meydana gelebilmektedir ve bu hayvanlar deneysel çalışmalar için kullanılabilir. Bu durumun başlıca avantajı maymun domuz ve köpek gibi, kriptorşidizmin tıpkı yenidoğan çocuklarda olduğu gibi spermatogenezin hiç başlamadığı immatür bir testisi etkilediği türlerde çalışmaya imkan vermesidir (7,164,165,166,167,168). Bunun yanında doğumsal kriptorşid hastalardan alınan materyallerle yapılan çalışmalar da mevcuttur (45).

Sunulan çalışmada ise kriptorşid hayvan modeli, gereçler ve yöntem bölümünde ayrıntılı olarak anlatıldığı şekliyle, 17-19 günlük henüz testisleri skrotuma inmemiş (164) yavru sıçanlarda Shono ve ark (169) ve Dündar ve ark. (3,149,170) tarafından uygulanan, bir tür cerrahi metod olan “**inguinoskrotal yöntem**”le oluşturulmuştur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

Operasyon

Sprague-Dawley sıçan

6.0 rezorbe olmayan iplik (Doğsan, Türkiye)

5.0 rezorbe olabilen iplik (Doğsan, Türkiye)

Diseksiyon makası

Cerrahi makas

Düz penset

Dişli penset

Mikro cerrahi forsepsi

Hemostatik forseps

Histolojik Yöntemler

Formaldehit (Atabay Kimya, Türkiye)

Sodyum fosfat dibazik (anhidro) (Merck, Almanya)

Sodyum fosfat monobazik (Merck, Almanya)

Filtre kağıdı (Isotherm)

Ringer çözeltisi (Eczacıbaşı, Türkiye)

Alkol %96 (Merck, Almanya)

Saf alkol (Merck, Almanya)

Toluen (Merck, Almanya)

Parafin, yumuşak (Merck, Almanya)

Parafin, sert (Merck, Almanya)

Gliserin (Atabay Kimya, Türkiye)

Sodyum salisilat (Merck, Almanya)

Hematoksilen (Merck, Almanya)

Eosin (Merck, Almanya)

Mikrotom bıçağı (Feather, Japonya)

Lam (Lamtek, Türkiye)

Poli-L-lizin kaplı Lam (Menzel, Almanya)

Lamel (Lamtek, Türkiye)
Entellan (Merck, Almanya)
Pipet ucu mavi (MediSys)
Pipet ucu sarı (MediSys)
Pipet ucu beyaz (MediSys)

İmmünohistokimya Polivalent Kit (LabVision)
DAB kromojen substrat sistem (LabVision)
Alfa-tubulin (LabVision)
Vimentin (LabVision)
Konneksin 43 (LabVision)
PBS (LabVision)
Sitrat tamponu (EMS)
PAP pen (LabVision)
Vision Mount (LabVision)
APOPTAG PLUS PEROXIDASE KIT (Chemicon)

Paraformaldehit (Merck, Almanya)
Potasyum hidroksit (Merck, Almanya)
Lanthanum nitrat (Merck)
Polivinyllpyrrolidone (Merck)
Glutaraldehit (Merck)
Glukoz (Merck, Almanya)
Osmiyum tetroksit (Merck)
Propilen oksit (Merck, Almanya)
Araldit seti (10951) (Fluka, Japonya)
Araldit seti (10952) (Fluka, Japonya)
Araldit seti (10953) (Fluka, Japonya)
Toluidin mavisi (Merck, Almanya)
Boraks (Horasan Kimya, Türkiye)
Pyronin B (Searle, İngiltere)
Cam bıçak (EMS)
Grid (EMS)

Uranil asetat (Merck, Almanya)
Metil alkol (Merck, Almanya)
Kurşun sitrat (Merck, Almanya)
Sodyum hidroksit (Merck, Almanya)

Mikropipet 1 - 10 (MediSys)
Mikropipet 10 - 100 (MediSys)
Mikropipet 500 – 1000 (MediSys)
Manyetik karıştırıcı (IKA, USA)
pH metre
Peristaltik pompa (LKB Bromma, İsveç)
Perfüzyon teknesi
Etüv (Heraeus, Almanya)
Mikrotom (Leica, Almanya)
Ultramikrotom (Reichert, Avusturya)
Dijital kamera (Leica, Almanya)
Işık mikroskobu (Leica, Almanya)
Geçirimli elektron mikroskobu (Jeol, Japonya)
Dizüstü bilgisayar (Asus, Taiwan)
Dijital fotoğraf makinesi (Samsung, Güney Kore)

3.2. Yöntem

Çalışma, İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dalı ile Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yürütülmüştür. Çalışmada İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen 64 adet, ağırlıkları 23 - 27 g. arasında değişen 17-19 günlük testisleri henüz skrotuma inmemiş Sprague-Dawley soyu albino yavru erkek sıçanlar kullanılmıştır (Şekil 3-1). Sıçanlar çalışmanın başından sonuna kadar İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dalı'nda bakılmış ve operasyonlar burada gerçekleştirilmiştir. Çalışma için İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 29.08.2006 tarih ve 21676 numara ile onay alınmıştır ve bütün çalışmalar Etik Kurul Yönetmeliği esaslarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3-1: Çalışmada kullanılan sıçanlardan bir örnek.

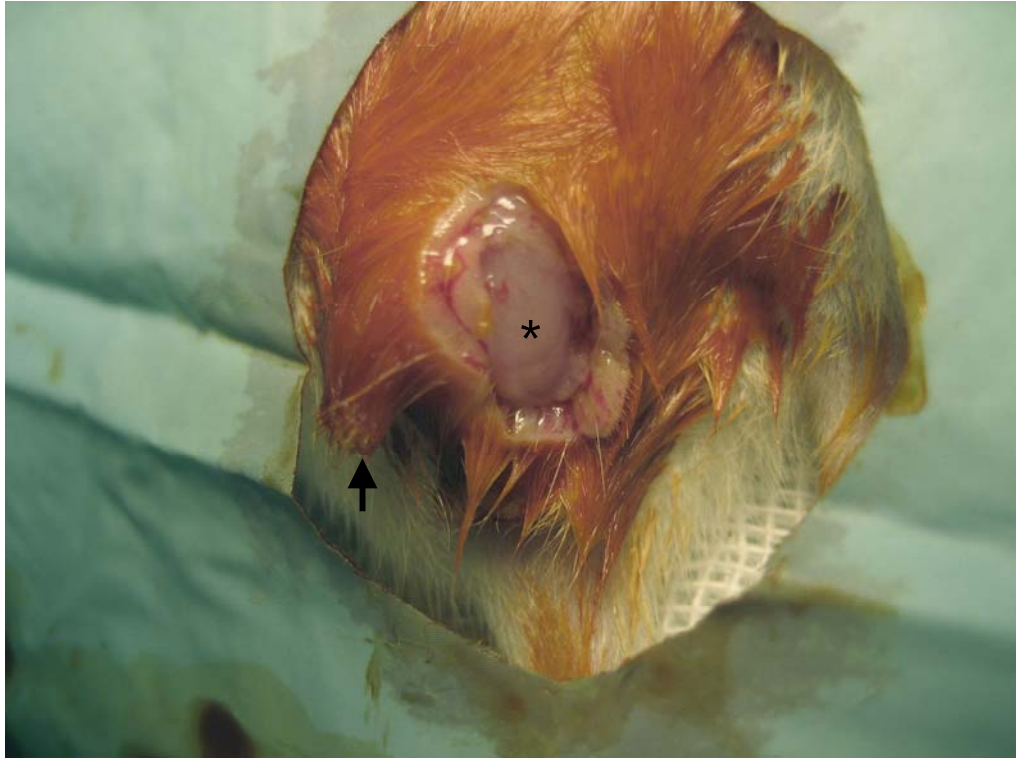
3.2.1. Operasyon

Deney hayvanlarında kriptorşidizm, Shono ve ark (169) ve Dündar ve ark. (3,149,170) tarafından uygulanan, bir tür cerrahi metod olan “**inguinoskrotal yöntem**”le oluşturuldu.

Opere edilecek yavru sıçanlar, intraperitoneal olarak uygulanan ketamin hidroklorür (Ketalar, 50 mg/ml) ve xylazine hidroklorür (Rompun, 100 mg/ml) karışımı ile uyutuldu. Uygulamanın kolaylığı ve aşırı doz nedeniyle hayvan zayıflatının önlemesi açısından öncelikle 10 ml steril tüp içinde 5.75 ml steril su, 3.75 ml Ketalar (50 mg/ml) ve 0.5 ml Rompun (100 mg/ml) iyice karıştırıldı ve bu karışımdan her bir hayvan için 0.2 ml/100 g IP olarak kullanıldı. Hayvanlar bu dozla, tekrara gerek kalmaksızın ortalama 45-60 dakika uykuda kaldılar.

Hayvanların uykuya girip girmedikleri arka ayaklarının pensetle sıkıştırılmasına verdikleri tepki ile test edildi. Uyku sağlandıktan sonra sol inguino-skrotal bölge povidon iyotla temizlendi. Sol inguinal bölgede yapılan yüzeysel kesi ile deri açıldı. Künt diseksiyonla gubernakulumla ulaşıldı (Şekil 3-2) ve gubernakulum bitişik dokulardan izole edildi (Şekil 3-3). İzole duruma getirilen gubernakulum kendi içine ters-yüz edilerek eksternal inguinal halkadan abdominal boşluk içine geri itildi (Şekil 3-4). Ardından gubernakulum eksternal inguinal halka ile birlikte, absorbe olmayan 6/0 ipek iplikle (Doğsan, Türkiye) dikiş atılmak suretiyle sabitlendi (Şekil 3-5). Bundan sonra deri 5/0 absorbe olabilir iplikle (Doğsan, Türkiye) dikilerek kapatıldı (Şekil 3-6). Her bir operasyon ortalama 15 dakika sürdü.

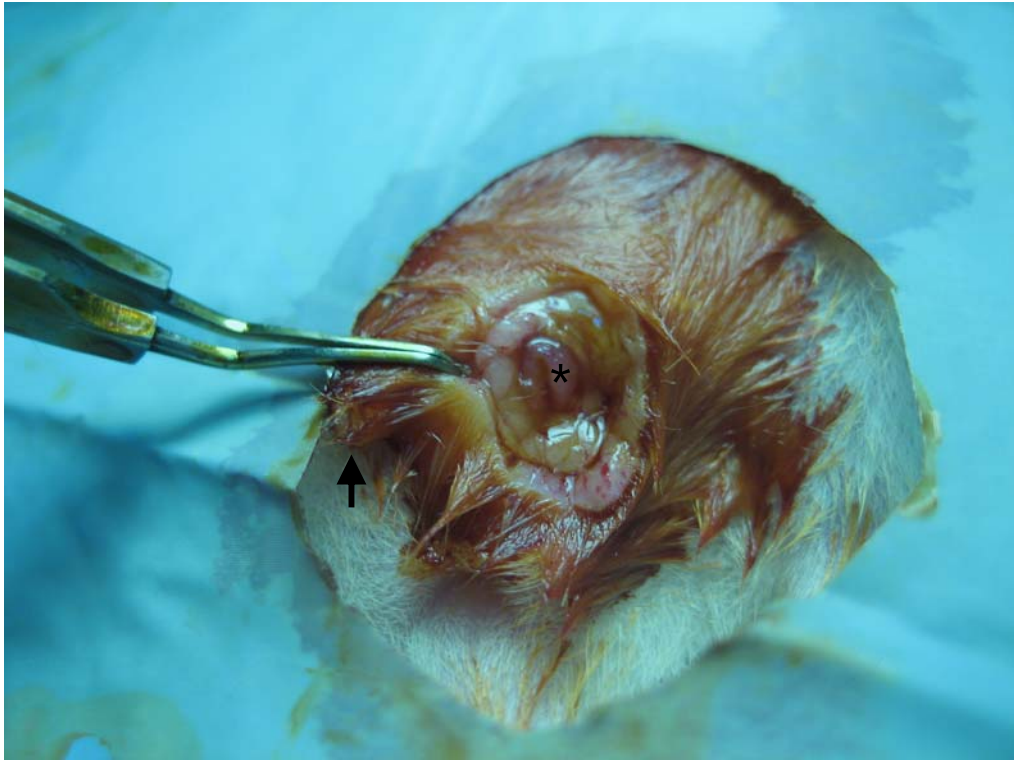
Operasyon sonrasında yavru sıçanlar henüz süt emme döneminde olduklarından annelerinin yanına bırakıldı. Deney süresi sonuna dek hayvanlar anneleri ile birlikte bulundukları kafeste rutin pelet yemle beslendiler ve suya serbestçe ulaşabildiler.



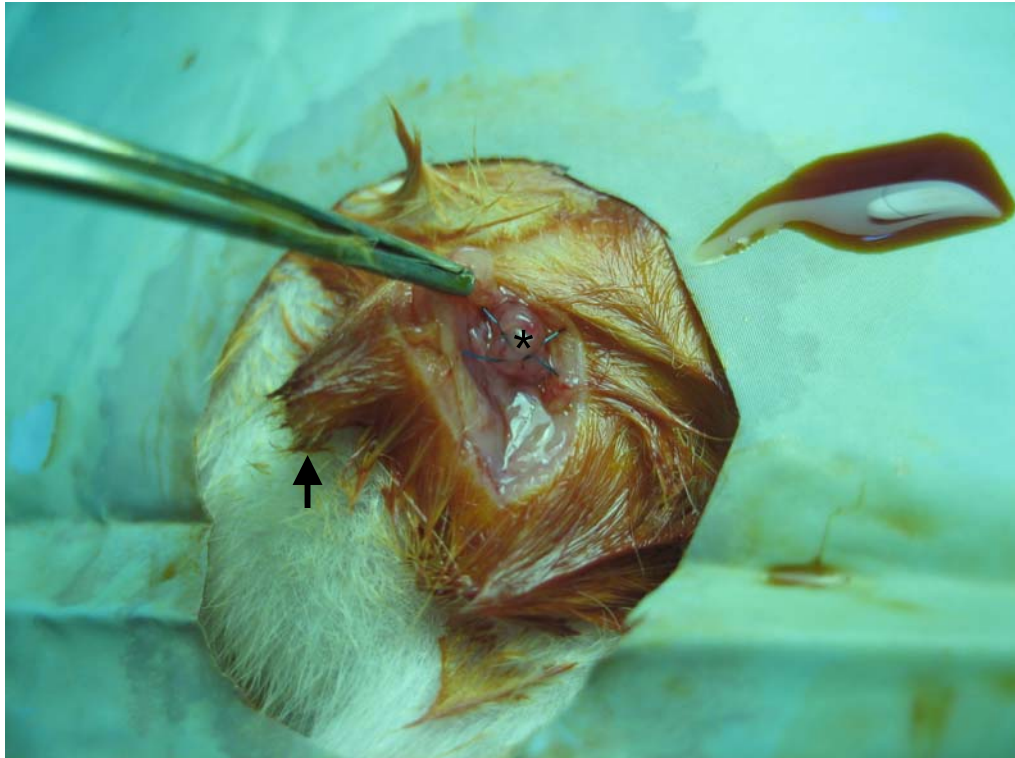
Şekil 3-2: Deride yapılan kesi sonucu ortaya çıkan gubernakulum.
(*): Gubernakulum, Ok: Penis



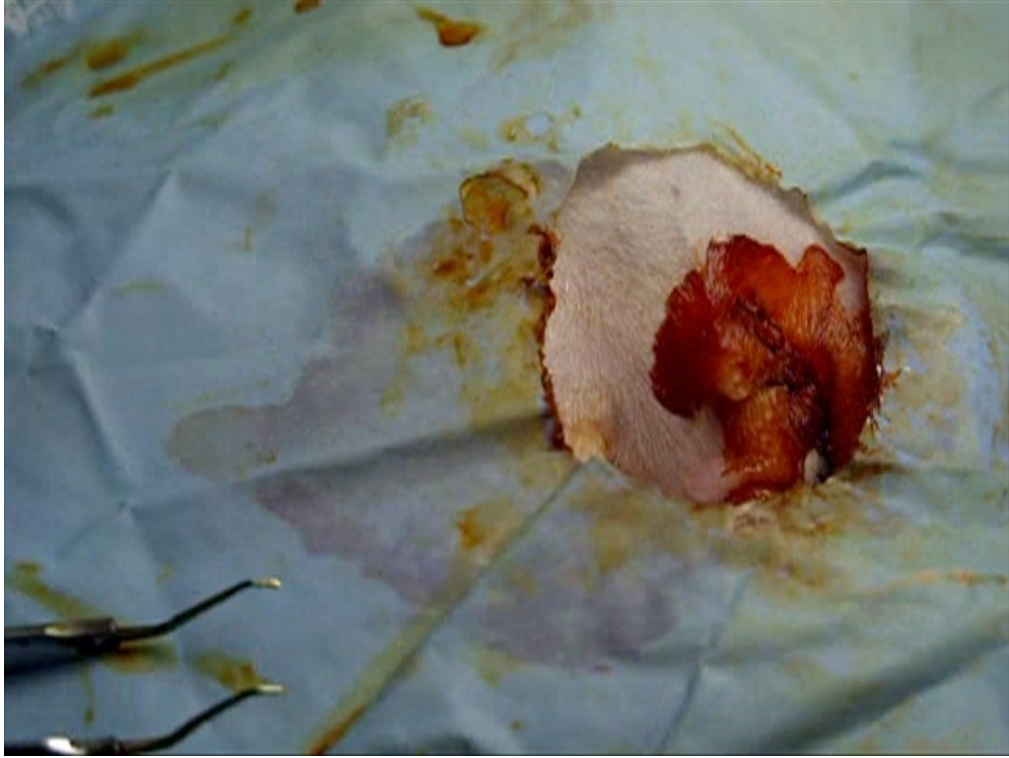
Şekil 3-3: Gubernakulum izole edildikten sonra. (*): Gubernakulum, Ok: Penis



Şekil 3-4: Gubernakulum ters-yüz edilip abdominal kavite içine itildikten sonra. (*): Gubernakulum, **Ok**: Penis



Şekil 3-5: Gubernakulum dikildikten sonra. (*): Gubernakulum, **Ok**: Penis

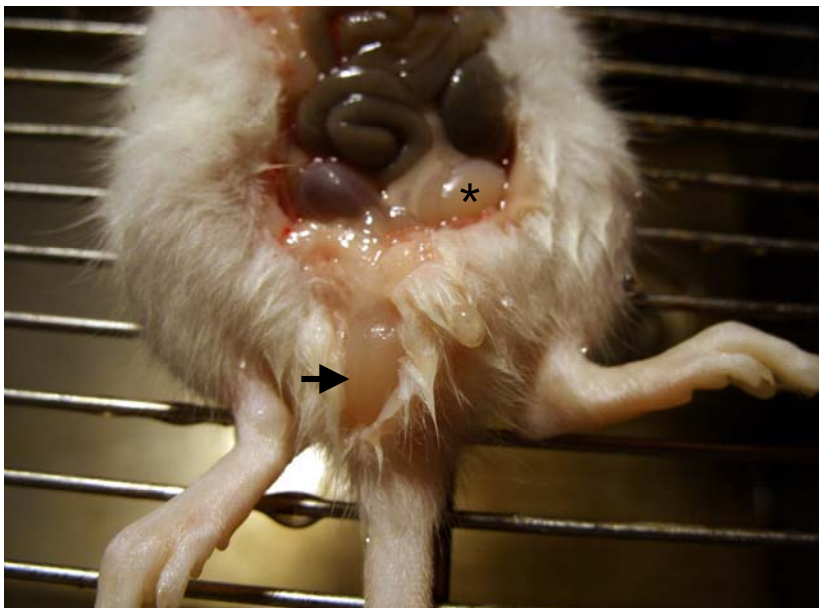
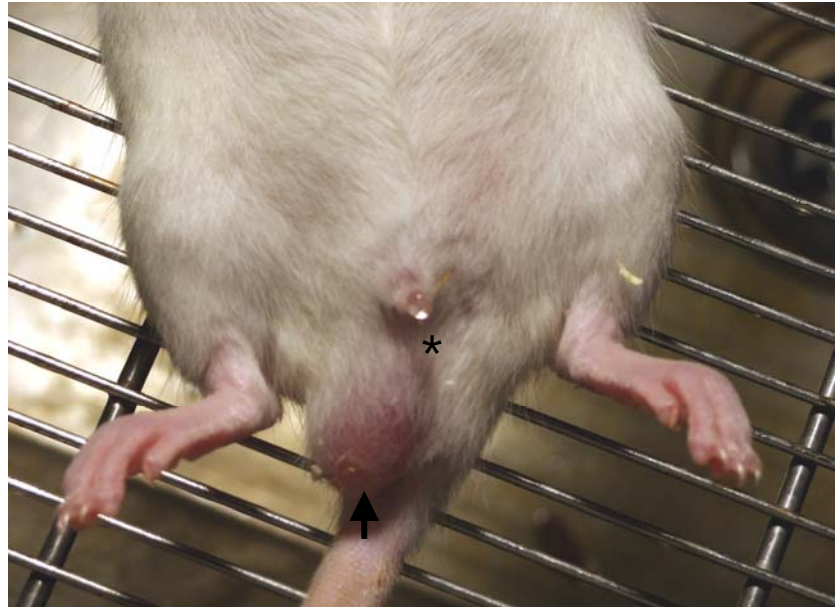


Şekil 3-6: İnguinal bölgedeki kesi kapatıldıktan sonra



Şekil 3-7:
“İnguinoskrotal
yöntemle”
oluşturulmuş
kriptorşidizm
modelinde testislerin
nihai görünümü.
(*): Boş olan sol
skrotum
(Ok): Sağ inmiş
testis

Şekil 3-8:
“İnguinoskrotal
yöntemle”
oluşturulmuş
kriptorşidizm
modelinde testislerin
nihai görünümü
(*): Boş olan sol
skrotum
(Ok): Sağ inmiş
testis



Şekil 3-9:
“İnguinoskrotal
yöntemle”
oluşturulmuş
kriptorşidizm
modelinde testislerin
karın içindeki
görünümü
(*): Sol kriptorşid
testis
(Ok): Sağ inmiş
testis

3.2.2. Işık Mikroskopisi

Her bir deney grubunda ışık mikroskopisi için 7 operasyonlu 2 kontrol olmak üzere toplam 9 adet hayvan kullanıldı.

3.2.2.1. Perfüzyon Fiksasyonu

İmmünohistokimya kitlerinin protokollerinde formalin fiksasyonu önerildiği için, çalışmada kullanılan kitlerle doğru sonuç elde edilebilmesi açısından bütün ışık mikroskopi parçalarının fiksasyonunda, fiksatif olarak formaldehit kullanıldı. Formaldehitin dokulara zarar vermesini önlemek için ise tamponlanarak kullanılması tercih edildi. Tamponlanmış nötral formalin fiksatifi için önce, 100 ml %40 formaldehit ihtiva eden formalin çözeltisi, 900 ml distile suyla karıştırılarak, 1 litre %4 formaldehit ihtiva eden formalin çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan 1 litre çözeltinin içine 4 g sodyum fosfat monobazik ve 6,5 g sodyum fosfat dibazik ilave edildi ve manyetik karıştırıcıda homojenize edildi. Solüsyon kullanılmadan önce 7 µm filtre kağıdından süzüldü.

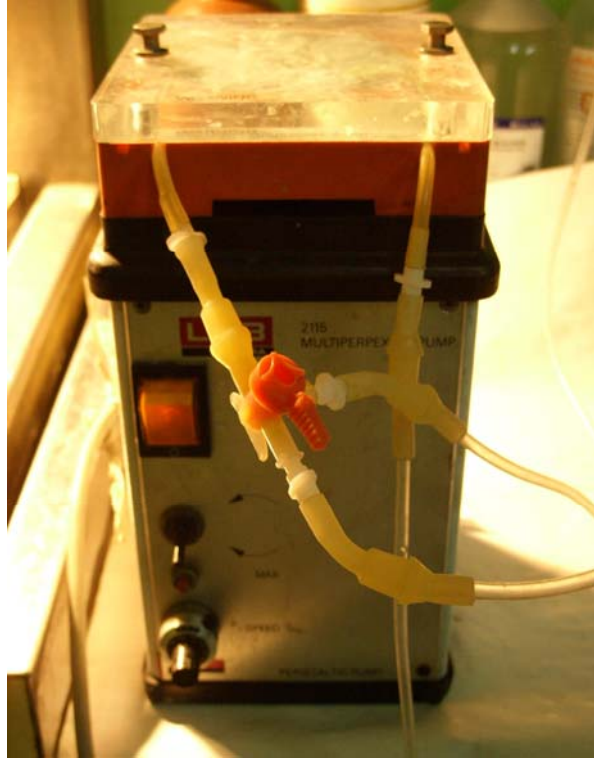
Fiksasyon için, yalnızca daldırma yoluyla fiksasyona nazaran her türlü üstünlüğü bulunan ve tercih edilen perfüzyonla fiksasyon yöntemi kullanıldı (171,172). Hayvanlarda perfüzyon fiksasyonu LKB Bromma Multiperpex 2115 peristaltik pompa kullanılarak uygulandı (Şekil 3-10). Peristaltik pompa tam hızla çalıştırıldığında 110 cm H₂O basıncı elde edilebiliyordu. Bu basınç altında iğne ucundan, sıçanlardaki kan akış debisine uygun olarak 20 ml/dk perfüzyat akışı elde edilmiş ve perfüzyon bu debi ile gerçekleştirilmiştir (173,174).

Deney süresi dolan hayvanlarda perfüzyon fiksasyonu uygulamasına başlamadan önce, hayvanlara operasyon için kullanılan aynı dozlarda intraperitoneal ketamin hidroklorür ve xylazine hidroklorür verilerek uykuya girmeleri sağlandı. Hayvanların uykuya girip girmedikleri ayaklarının pensetle sıkıştırmaya karşılık verdikleri tepki ile test edildi. Bütün işlemler hayvanlar tamamen uykuya girdikten sonra gerçekleştirildi.

Uykuya giren hayvan perfüzyon teknesine (Şekil 3-11) sırtüstü yatırıldı. Göğüs kafesinin alt ucu hizasında diyaframa paralel olarak karın duvarı üzerinde yapılan kesiden sonra (Şekil 3-12) ortaya çıkan göğüs kafesinin sol tarafından bir kesi yapıldı (Şekil 3-13) böylece serbest kalan diyafram kesildi (Şekil 3-14), ardından göğüs kafesinin sağ tarafından da bir kesi yapılarak göğüs kafesi açıldı (Şekil 3-15). Göğüs kafesi kaldırılarak sabitlendi (Şekil 3-16). Perfüzyon setinin iğnesi sol ventriküle yerleştirildi ve ucu sabitlendi (Şekil 3-17). Bundan sonra sağ atrium pensetle parçalandı (Şekil 3-18). Atriumun parçalanmasından sonra perfüzyon pompası çalıştırıldı (Şekil 3-19).

Formaldehitte fiksasyondan önce damarlardaki kanın temizlenmesi için ringer çözeltisi ile perfüzyon yapıldı. Bu işleme dokulardaki kanın uzaklaştığı ve sağ atriumdan kansız ringer çözeltisi gelmeye başladığı görülünceye dek devam edildi (172). Kanın uzaklaştırılmasından sonra tamponlanmış nötral formalin çözeltisi ile perfüzyona geçildi. Hayvanlar aynı debide 200 ml nötral formalin çözeltisi ile perfüze edildi (173,174). Perfüzyonun tamamlanması sonrasında sol kriptorşid ve sağ skrotal testisler alınarak çevre dokulardan ve epididimisten temizlendikten sonra nötral formalin fiksatifi bulunan kaplara konuldular. Testislerin ağırlıkları fiksasyondan hemen sonra ölçülerek kaydedildi.

Şekil 3-10: LKB
Bromma Multiperpex
2115 peristaltik pompa



Şekil 3-11: Perfüzyonu işlemleri için kullanılan, İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'ne ait operasyon odasında yer alan tekne.



Şekil 3-12



Şekil 3-13



Şekil 3-14



Şekil 3-15



Şekil 3-16

Şekil 3-16



Şekil 3-18

Şekil 3-19



3.2.2.2. Parafin Takibi ve Kesit

Tamamıyla fikse olan testislerin her birisi 2 parçaya bölündü ve doku takibine alındı.

Parçalar akar musluk suyunda bir gece yıkandı. Yıkanan parçalar %50 alkolde 12 saat, %70 alkolde 12 saat, %80 alkolde 10 saat, %90 alkolde 10 saat ve 2 değişim %96 alkolde 10'ar saat, 3 değişim mutlak alkolde 4'er saat bekletilerek suları giderildi. Parçalar bundan sonra ilk ikisinde 10'ar dakika 3.de 5 dakika olmak üzere 3 değişim toluen içinde bekletilerek doku içindeki alkol toluen ile değiştirildi. Daha sonra parçalar 60 derece etüv içinde yumuşak parafinde 40 dakika, ardından sert parafinde 40 dakika bekletilerek dokular içine parafin nüfuzu sağlandı. Parçalar bundan sonra her bir testisin iki yarımı aynı blok içinde olacak şekilde sert parafine gömülerek bloklandı.

Parafin bloklardan Leica SM2000 model kızaklı mikrotomunda 4 mikrometre kalınlığında seri kesitler alındı. Işık mikroskobu ve stereolojik değerlendirmeler için kullanılacak kesitler, 50 cc döllenmiş yumurta akı 50 cc gliserin ve 1 g sodyum salisilat karıştırılarak hazırlanmış gliserin-albümin karışımı sürülüp kurutulmuş lamlar üzerine alındı. İmmünohistokimya için kullanılacak kesitler poli-L-lizinli lamlara alındı.

3.2.2.3. Genel Işık Mikroskobu

Genel doku değerlendirmeleri için seçilen kesitler Hematoksilen ve Eosin (H-E) boya ile boyandı.

Hematoksilen - Eosin boyası için kesitler önce bir gece 56°C etüvde bekletildi. Ertesi gün üç değişim toluende 5'er dakika bekletilerek deparafinize edildi; parafini giderilen kesitler her birisinde 5'er dakika bekletilmek suretiyle üç değişim %100 sonrasında %90, %80 ve %70 inen alkol serisinden geçirilerek musluk suyuna alındı. Bundan sonra distile suda 2 dakika bekletilip Hematoksilen boyasına geçirildi ve 15 dakika boyandı. Hematoksilen boyası,

100 ml distile su, 100 ml %96 alkol karışımında 2 gr toz Hematoksilen boyası çözündürülmesi ve bu çözeltiye, 100 ml gliserin, 10 ml glaci el asetik asit ve 50 gr potasyum alum karıştırılması ve bu karışımın 6 ay olgunlaşmaya bırakılması ile elde edildi. Hematoksilenle boyanan boyalar akar musluk suyunda 10 dakika yıkanarak boyanın morarması sağlandı. Sonra %70 alkol içine %0.5 oranında HCl karıştırılması ile elde edilen asit-alkol çözeltisine kısa bir kez daldırılıp çıkarılarak stoplazmadaki boyanın giderilmesi sağlandı. Bunun ardından tekrar 10 dakika akar musluk suyunda morartmaya devam edildi. Yeterince moraran kesitler Eosin-Pholoksin boyasında 10 saniye boyandı. Eosin-Pholoksin boyası, 60 ml distile su içinde 1 g Eosin Y ve 0,1 gr Pholoksin boyalarının karıştırılması ile elde edilen çözeltiye 450 ml %100 alkol ve 1 ml glaci el asetik asit karıştırılması ile elde edildi. Eosin-Pholoksin boyası ile boyamanın hemen ardından kesitler distile suda ve %70 alkolde hızla çalkalandı, %96 ve %100 alkollerde 2'şer dakika bekletilerek kesitlerin suyu giderildi. Mutlak alkolden çıkarılan kesitler toluene alındı. 2 değişim toluen içinde 10'ar dakikadan toplam 20 dakika şeffaflaştırılan kesitler entellan ile kapatıldı.

3.2.2.4. İmmünohistokimya

İmmünohistokimya boyanacak kesitler, boyamadan bir gece önce 56°C etüvde bekletilerek fazla parafininden arındırıldı. Etüvden çıkarılan kesitler her birisinde 5'er dakika olmak üzere sırasıyla 3 değişim toluende, 3 değişim %100 alkolde, ardından 1'er değişim %90, %80 %70 alkollerde bekletildi, bundan sonra distile suya alındı ve 5 dakika distile suda bekletildi. Kesitler, fiksasyon sırasında bozulan antijenik yapının yeniden eski halini alması için "antijen geri kazanımı" işlemine tabi tutuldu. Bunun için ticari olarak 10x olarak bulunan sitrat tamponu çözeltisinin 10 ml'sine 90 ml distile su ilavesi ile sitrat tamponu hazırlandı. Plastik şalede tampon içerisine alınan kesitler mikrodalga fırında hafif kaynama belirtileri görülünceye kadar kaynatıldı. Kaynadıktan sonra fırın kapatılıp 5 dakika bekletildi. Kaynatma işlemi 3 kez tekrarlandı, kaynatma aralarda 5'er dakika bekletildi. Sonuncu kaynatmadan sonra kesitler oda sıcaklığına getirildi. Oda sıcaklığına gelen kesitler, ticari olarak hazırlanmış tabletlerin bir tanesinin 100 ml distile suda eritilmesi ile elde edilen fosfat tamponlu fizyolojik tuzlu su (PBS) solusyonunda 3 defa 5'er dakika yıkandı.

Ardından spesifik olmayan zemin boyanmasının önlenmesi amacıyla endojen peroksidazın giderilmesi için dokular, 12 ml %30 H_2O_2 , 54 ml metanol ve 54 ml distile suyun karıştırılması ile elde edilen ve içinde %3 H_2O_2 bulunan çözelti ile oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Ardından PBS tampon çözeltisi ile 3 kez 5 dakika yıkandı. Son yıkamada lamlardaki kesitlerin çevresi hidrofobik kalemle çizildi. Ardından doku antikorlarının bloklanması için, kesitler üzerine immünohistokimya kiti tarafından sağlanan “Ultra V Blok” uygulandı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Ultra V Blok pipetlenerek uzaklaştırıldı ve ayrıca yıkama yapılmadan kesitler üzerine primer antikorlar uygulandı. Primer antikorlar oda sıcaklığında 2 saat kesitlerin üzerinde kaldı. Bu süre sonunda dokular 5'er dakika 3 değişim PBS ile yıkanarak primer antikorların fazlası giderildi. İmmünohistokimya kiti tarafından sağlanan “Biyotinlenmiş Anti-Polivalent” çözeltisi uygulandı ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Süre sonunda 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı. Bunun üstüne kesitlere immünohistokimya kiti tarafından sağlanan “Streptavidin Peroksidaz” çözeltisi uygulandı ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi, ardından 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı. Dokular üzerine AEC boya kiti tarafından sağlanan kromojen damlatılarak boyama reaksiyonu başlatıldı. Kromojen çözeltisi, 1 ml distile suya kit içindeki A çözeltisinden 2 damla konulup iyice karıştırılmasından sonra bu karışıma B çözeltisinden 2 damla ve C çözeltisinden 1 damla eklenip iyice karıştırılması ile elde edildi; kromojen çözeltisi hazırlandıktan sonra 30 dk içinde kullanıldı. Deneme çalışmalarında mikroskop altında optimum boyanma süresi 7 dakika olarak tesbit edilmişti. Dokular üzerinde 7 dakika tutulan kromojen çözeltisi PBS ile yıkanarak reaksiyon sonlandırıldı. İmmünohistokimya boyamasının bitirilmesinin ardından alkol içermeyen Mayer hematoksilen boyasıyla 30 sn çekirdek boyaması yapıldı. Mayer hematoksilen boyası, 500 ml distile su içinde sırasıyla 25 g potasyum alum, 0,5 g hematoksilen, 0,1 g sodium iodate, 0,5 g sitrik asit karıştırılması ile elde edildi. Hematoksilen distile su ile 5 dakika morartıldı. Ardından immünohistokimya kiti tarafından sağlanan su bazlı “UltraMount” kapatma solüsyonu ile dokular kapatıldı.

Tubulin antikoru 1/1000, vimentin antikoru 1/500, konneksin43 antikoru ise 1/100 dilüsyonunda kullanıldı.

3.2.2.5. Apoptoz Tayini

Apoptotik hücrelerin tesbiti için deney ve kontrol gruplarından alınan kesitler, “Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling” (TUNEL) Kiti (Takara, Japonya) kullanılarak boyandı.

Boyama için ilk önce kesitler kit protokolüne uygun olarak deparafinize edildi. Bunun için önce 5'er dakikalık 3 değişim tolüen uygulandı, ardından 5'er dakikalık 2 değişim mutlak alkol, 5 dakika %90 alkol, 5 dakika %80 alkol uygulandı, bundan sonra 2 dakika akar suda yıkandı ve distile suya getirildi. Bu aşamadan sonra her bir kesitin üzerine kit tarafından sağlanan Proteinaz K, 20 µg/µl olarak uygulandı ve kesitler oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi için 12 ml %30 H₂O₂, 54 ml metanol ve 54 ml distile su karıştırılarak elde edilen ve içinde %3 H₂O₂ bulunan çözelti ile dokular 5 dakika inkübe edildi ve sonrasında 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı. Ardından kit tarafından sağlanan “TdT Enzim”den 5 µl ve “İşaretleme Tamponu”ndan 45 µl karıştırılarak elde edilen “işaretleme reaksiyon karışımı”ndan her bir lamın üzerine 50 µl konuldu ve önceden 37 dereceye kadar ısıtılmış etüv içinde nemlendirilmiş kutuda 90 dakika inkübe edildi. Enzim çözeltisinin dokular üzerinden uzaklaşmasının önlemesi için dokuların çevresi son PBS uygulamasında hidrofobik kalemle çevrildi ve enzim uygulamasından sonra üzerlerine birer lamel kapatıldı. İnkübasyon süresi sonunda dokular PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkanmak suretiyle reaksiyon sona erdirildi. Takiben her bir doku kesiti üzerine kit tarafından sağlanan “Anti-FITC HRP-bağlı antikor”dan 70 µl kondu. Antikoru üzeri, alt taraflarının iki ucundan ince bir şerit halinde kalın bant yapıştırılarak lama yapışması önlenmiş 25x32 mm'lik bir lamelle kapatıldı ve yine 37 derecede 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkandı. Yıkandıktan sonra üzerlerine kit tarafından sağlanan “DAB kromojeni” konuldu ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi; inkübasyon süresi sonunda distile su ile yıkanarak boyama reaksiyonu sonlandırıldı. Çekirdeklerin boyanması için %3'lük metilen yeşili ile 5 dakika boyandı. Distile su ile boyanın fazlası giderildikten sonra %96 alkol, mutlak alkolle dehidrate edilen dokular tolüenle şeffaflaştırıldı ve ardından entellan ile kapatıldı. Boyama

özgüllüğünün kontrolü için pozitif kontrol olarak kit içinden çıkan sıçan meme bezleri doku kesiti kullanıldı. Negatif kontrol olarak ise, kit protokolünde önerildiği şekilde, dokular üzerine Tdt Enziminin uygulandığı aşamada Tdt Enzimi katılmadan yalnızca İşaretleme Tamponunun uygulandığı kesitler kullanıldı.

Boyama işlemi sonucunda apoptotik hücreler kahverengi renkte boyandılar. Şekil 3-20'de 14. gün deney grubundan bir hayvana ait sağ skrotal testiste ve Şekil 3-21'de aynı hayvana ait sol kriptorşid testiste apoptotik hücreler için boyama yapılmış preparatlar görülmektedir. Şekil 3-22'de solda, boyama işleminde negatif kontrol olarak boyanmış bir sol kriptorşid testis kesiti, sağında aynı kesitin apoptotik hücreler için boyanmış hali ile birlikte görülmektedir.

Şekil 3-20: 14. gün sağ skrotal testise ait kesitin TUNEL boyaması x40



Şekil 3-21: 14. gün sol kriptorşid testise ait kesitin TUNEL boyaması x40



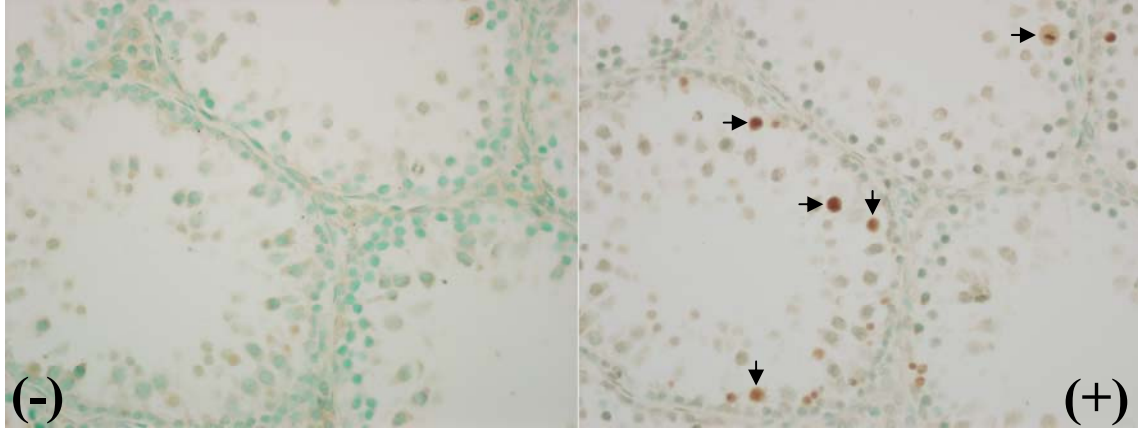
3.2.2.6. Değerlendirme

TUNEL Boyanmış kesitler üzerinde, okülere monte edilebilen 100 noktalı stereolojik sayım gratikülü ("The Microscope Depot" - Counting Reticle 100 PT. Cross Array 10mm; parça no: S-14071) (Şekil-23,24) ve Leica DMLS model araştırma mikroskobu kullanılarak sayımlar yapıldı.

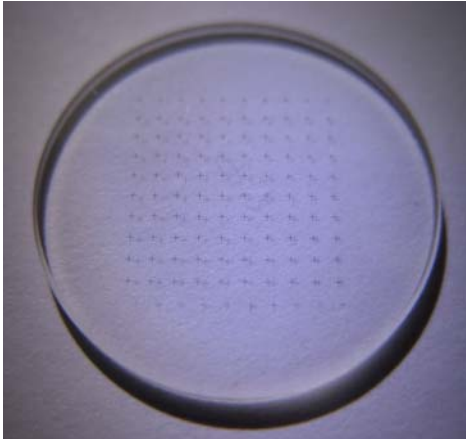
Sayım yapılacak olan kesit x100 yağlı objektif altına yerleştirildi ve testis kesitinin ortasından geçen uzun ekseninin en ucuna gelindi ve buradaki alan ilk sayım alanı olarak kabul edildi. Alan içinde noktaların tam altına denk gelen bütün hücreler sayıldı, "apopitotik – apopitotik değil" veya "germ hücresi – Sertoli hücresi" şeklinde ayırdedilerek, o alandaki toplam sayıları excel dosyasında ilgili sütuna, birinci alanın sayımı olarak kaydedildi. Bundan sonraki alanlar sistematik rastgele prensibine uygun olarak mikroskoba bakılmaksızın, mikroskop tablası üzerindeki milimetrik cetvel kullanılarak belirlendi. İlk sayılan alandan sonra 0,5 milimetrelik adımlarla ilerlenerek bir sonraki sayım alanı elde edildi. Bu tarzda, apopitotik hücrelerin sayımı için her testis başına 20 alan, germ hücrelerinin sayımı için testis başına 12 alan sayıldı. Elde edilen sayımlar daha sonra istatistiki değerlendirme için SPSS programına aktarıldı. İstatistiki anlamlılık değerlendirmeleri, her bir testis için, sayım yapılan bütün alanlar içinde gridin noktalarına denk gelen apopitotik hücrelerin ve germ hücrelerinin sayılarının kıyaslanması şeklinde gerçekleştirildi.

Tübül duvar kalınlıklarının tayini, Olympus BX61 model motorize araştırma mikroskobunun DP72 model dijital mikroskop kamerasına ait ölçüm programı kullanılarak yapıldı. Bunun için her bir hayvana ait testis kesitinde ortadan geçen uzun eksenin en ucundan başlanmak üzere her defasında birer alan atlanarak enine geçmiş seminifer tübül kesitleri bulundu. Bulunan enine geçmiş seminifer tübüllerin duvarında en ince ve en kalın olmayan yerinden enine bir ölçüm yapıldı. Bu şekilde toplam 12 enine geçmiş seminifer tübül üzerinde ölçüm yapıldı ve excel dosyası halinde kaydedildi.

Genel ışık mikroskopisi ve immünohistokimyasal değerlendirmeler için kesitler Olympus BX61 model motorize araştırma mikroskobu ile incelendi ve Olympus DP72 model dijital mikroskop kamerası ile görüntülendi.

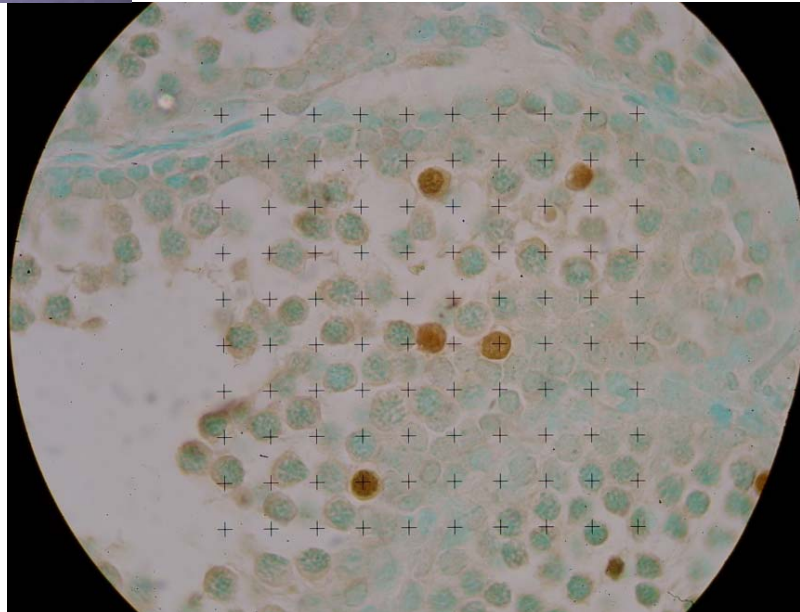


Şekil 3-22: TUNEL testi uygulanan 14. gün sol kriptorşid testise ait kesitler. Soldaki negatif kontrol boyaması, sağdaki aynı kesitin TUNEL+ boyanması. (Oklar): TUNEL+ hücreler. x400



Şekil 3-23: Stereolojik sayımda kullanılan 100 noktalı sayım gratikülü

Şekil 3-24: Stereolojik sayım gratikülüne ait noktaların mikroskopta hücrelerin üzerindeki görünüşü X1000



3.2.3. Geçirimli Elektron Mikroskopisi

Her bir grupta elektron mikroskopisi için 5 operasyonlu 2 kontrol olmak üzere 7 adet hayvan kullanıldı.

3.2.3.1. Perfüzyon Fiksasyonu ve Lanthan'la İşaretleme

Geçirimli elektron mikroskopik çalışmalarda, Kan-Testis Bariyeri bütünlüğünün elektron mikroskobu düzeyinde test edilebilmesi için testislerin lanthanum nitrat içeren fiksasyon çözeltisi ile perfüzyonu öngörülmüştür (102,175,176,177,178, 179,180,181,182,183,184). Fiksatif olarak glutaraldehit kullanıldığında lanthanum nitrat, fiksatif içindeki tampon çözeltisinin sodyumu ile presipitasyona uğradığından, sunulan çalışmada elektron mikroskopik olarak incelenecek dokuların distile suda hazırlanmış %4'lük paraformaldehit ile perfüze edilmesi uygun bulundu. Fiksatifin hazırlanması için öncelikle çeker ocak altında ağzı açık madeni bir kap içinde yarısına kadar doldurulmuş su kaynatıldı. Bir erlen içersine ihtiyaç duyulan fiksatif miktarınca distile su konuldu ve her 100 ml distile su için 4 gr toz paraformaldehit erlen içine katılarak erlen madeni kap içinde kaynamakta olan suya yerleştirildi. Uzun bir laboratuvar derecesi erlenin içine uzatılarak bu derece ile bir yandan çözelti karıştırıldı bir yandan sıcaklık ölçüldü. Çözeltinin sıcaklığı 70-75 dereceye geldiğinde içersine bir damla 10 M KOH damlatıldı ve çözeltinin şeffaflaşması sağlandı. Bundan sonra çözeltinin oda sıcaklığına gelmesi beklendi, oda sıcaklığına geldikten sonra içersine, çözeltinin her 100 ml'si için 2 gr lanthanum nitrat ve 2.5 g polivinylpyrrolidone ilave edildi. Hepsi beraber eriyik halini alıncaya dek manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Fiksatifin pH'sı, 10 M KOH kullanılmak suretiyle 7.4'e ayarlandı. Çözelti perfüzyon için kullanılmadan önce 7 µm filtre kağıdından süzüldü.

Elektron mikroskopisi için kullanılacak hayvanlarda da perfüzyon fiksasyonu ışık mikroskopisi için kullanılan aynı düzenele ve aynı su basıncı ve debi ayarında gerçekleştirildi.

Deney süresi dolan hayvanlarda perfüzyon fiksasyonu uygulamasına başlamadan önce, hayvanlara operasyon için kullanılan aynı dozlarda intraperitoneal ketamin hidroklorür ve xylazine hidroklorür verilerek uykuya girmeleri sağlandı. Hayvanların uykuya girip girmedikleri ayaklarının pensetle sıkıştırmaya karşılık verdikleri tepki ile test edildi. Bütün işlemler hayvanlar tamamen uykuya girdikten sonra gerçekleştirildi.

Uykuya giren hayvan perfüzyon teknesine sırtüstü yatırıldı. Diyaframın alt hizasında diyaframa paralel olarak karın duvarı üzerinde yapılan kesiden sonra açığa çıkan diyafram kesilerek göğüs kafesi serbest hale getirildi, bundan sonra göğüs kafesinin iki yanında yapılan kesilerle göğüs kafesi açıldı. Göğüs kafesi kaldırılarak sabitlendi. Perfüzyon setinin iğnesi sol ventriküle yerleştirildi ve ucu sabitlendi. Bundan sonra sağ atrium makasla kesilerek parçalandı. Atriumun parçalanmasından sonra perfüzyon pompası çalıştırıldı.

Fiksasyondan önce damarlardaki kanın temizlenmesi için ringer çözeltisi ile perfüzyon yapıldı. Bu işleme dokulardaki kanın uzaklaştığı ve sağ atriumdan kansız ringer çözeltisi gelmeye başladığı görülünceye dek devam edildi. Kanın uzaklaştırılmasından sonra paraformaldehit-lanthanum nitrat çözeltisi ile perfüzyona geçildi. Hayvanlar aynı debide 200 ml paraformaldehit-lanthanum nitrat çözeltisi ile perfüze edildi. Perfüzyonun tamamlanması sonrasında sol kriptorşid ve sağ skrotal testisler alınarak çevre dokulardan ve epididimisten temizlendikten sonra Milloning tamponu ile hazırlanmış lanthanum nitrat içermeyen %5 glutaraldehit fiksatifi bulunan kaplara konuldular. Milloning tamponu hazırlamak için önce A, B, C, D çözeltileri hazırlandı. A çözeltisi, 100 cc distile su içinde 2.26 g sulu sodyum fosfat çözündürülmesi ile elde edildi. B çözeltisi, 100 cc distile su içinde 2.52 g sodyum hidroksit çözündürülmesi ile elde edildi. C çözeltisi, 100 cc distile su içinde 5.40 g glukoz çözündürülmesi ile elde edildi. D çözeltisi, A çözeltisinden 41.5 cc, B çözeltisinden 8.5 cc karıştırılması ile elde edildi. Tampon çözeltisi ise, C çözeltisinden 5 cc D çözeltisinden 45 cc karıştırılması ile elde edildi, pH'sı 7.3 -7.4 olarak ayarlandı. pH'ın yüksek olması durumunda A çözeltisi ile, düşük olması durumunda B

çözeltisi ile dengelendi. %5'lik glutaraldehit fiksatif, 21 ml Milloning tampon çözeltisi içerisine 4 ml %25'lik olarak ticari satılan glutaraldehit çözeltisinin karıştırılması ile hazırlandı. Testislerin ağırlıkları fiksasyondan hemen sonra ölçülerek kaydedildi. Tartımdan sonra sağ ve sol testisler yaklaşık 1mm³ büyüklüğünde parçalara ayrıldı. Parçalar 1 gece daha %5 glutaraldehit içinde fikse edildi. Tamamen fikse olan dokular pH 7.4'deki Milloning tamponu içinde 1 gece yıkandı. Yıkanan parçalar bir gün önce 10 cc Milloning tamponu içine 100 mg osmiyum tetroksit karıştırılması ile oluşturulan osmiyum tetroksit fiksatif ile 1.5 saat postfiksasyona tabi tutuldu. Postfiksasyonun ardından doku bloklarının araldit takibine geçildi.

3.2.3.2. Araldit Takibi ve Kesit

Parçalar tampon çözeltisinde 15 dakika yıkandı. Sırasıyla %30, %50, %70, %80, %96 alkollerde 10'ar dakika bekletildi. Ardından 2 değişim mutlak alkol içinde 20'şer dakika bekletilerek dokular içerisindeki su tamamen giderildi. Bundan sonra 2 değişim propilen oksit içinde 15'er dakika bekletildi; ardından 1:1 propilen oksit/araldit karışımı içinde 1 saat, 1:3 propilen oksit/ araldit karışımı içinde 1 saat bekletildi. Parçalar bundan sonra saf araldit içine alınarak 1 gece bekletildi. Saf araldit içinde 1 gece bekletilen parçalar ertesi gün kapsüller içindeki saf araldite gömülerek bloklandı. Bloklar aralditin polimerizasyonu için 24 saat süreyle 45 derecelik etüvde, 48 saat süreyle 60 derecelik etüvde tutuldu. Bu şekilde bloklar kesime hazır hale geldi.

Bloklanan dokular içinde uygun bulunan parçadan yarı ince kesitler alındı. 0,5-1 mikronluk yarı ince kesitler toluidin mavisi ile boyanıp incelenerek ince kesitler için gerekli alanlar tesbit edildi. Toluidin mavisi boyasının hazırlanması için önce 100 ml distile suda 1 g boraks eritildi. Diğer yanda 20 ml distile suda 200 mg pyronin B eritilmesi ile %1'lik pyronin çözeltisi hazırlandı. Boraks çözeltisinin 80 ml'si içine 800 mg toluidin mavisi eklenip iyice karıştırıldı. Bunun üzerine 20 ml %1'lik pyronin ilave edildi. İyice karıştırılıp filtre kağıdından süzülerek kullanıma hazır hale getirildi. Boyama işlemi için yarı ince doku

kesitlerinin üzerine toluidin mavisi damlatıldı ve 60°C'deki sıcak tabla üzerine konulup 1 dakika boyandıktan sonra yıkandı. Yarı ince kesitlerde tesbit edilen alanlardan, Reichert OM U3 model ultramikrotom ile cam bıçaklar kullanılarak ince kesitler alındı ve alınan kesitler 200 gözlü bakır gridlere toplandı.

3.2.3.3. Kontrastlama

Gridlere alınan parçalar uranil asetat ve kursun sitrat ile kontrastlandırıldı. Uranil asetat çözeltisi hazırlamak için, 80 cc metil alkol içerisinde 2 g uranil asetat eritildi. Üzerine 20 cc tridistile su ilave edildi. Bu çözeltide gridler 45 dakika boyandı. Bundan sonra gridler %50 alkol ve iki değişim distile suda kısaca çalkalandı kursun sitratla boyamaya geçildi.

Kursun sitrat çözeltisi hazırlamak için önce 5 cc distile su içine 2 g sodyum hidroksit karıştırılarak 10 N sodyum hidroksit hazırlandı. 50 cc distile su içine 200 mg 3 sulu kursun sitrat karıştırıldı ve bunun üzerine 10 N sodyum hidroksitten 0.5 cc karıştırıldı ve karışım kuvvetle çalkalanarak kursun sitratın erimesi sağlandı; böylece boya kullanılabilir hale geldi. Bu çözeltide gridler 5 dakika boyandı ve iki değişim distile suda kısaca çalkalandı ve kurutuldu. Bu şekilde gridlerin kontrastlama işlemi tamamlanmış oldu.

3.2.3.4. Değerlendirme

Kesitler JEOL JEM-1011 model geçirimli elektron mikroskopunda değerlendirildi ve yüksek çözünürlüklü "SIS Systems" dijital kamera ile görüntülendi.

3.2.4. İstatistiki Yöntemler

Çalışmada ele edilen sayısal bulguların istatistiksel analizleri, Windows için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) sürüm:17.0 programı kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmada, frekans sayımı standart sapma gibi tanımlayıcı istatistiksel yöntemlerle verilerin dağılımları test edildikten sonra gruplar arası varyans analizleri yapıldı. Kontrol grubu testislere ait değerlerin, sol kriptorşid testislere ait değerlerin ve sağ skrotal testislere ait değerlerin 1., 3., 7. ve 14. gün grupları arasındaki değişikliklerin anlamlılık düzeyleri “General Linear Model Analysis of Variance” (ANOVA) testi ile değerlendirildi; sonuçlar %95’lik güven aralığında, anlamlılık $p<0,05$ düzeyinde değerlendirildi. Aynı grup içinde yer alan kontrol, kriptorşid ve sağ skrotal testislere ait değerlerin birbirlerine göre kıyaslanması ise “Oneway ANOVA” testi ile gerçekleştirildi. Oneway ANOVA testinin sonuçları üzerine PostHoc testi olarak “Least Significant Difference” (LSD) ve Dunnett testleri uygulandı; sonuçlar %95’lik güven aralığında, anlamlılık $p<0,05$ düzeyinde değerlendirildi. Ağırlık farklarının değerlendirilmesinde ise, deneyli hayvanların testisleri arasındaki ağırlık farklarının ve kontrol grubu hayvanların testisleri arasındaki ağırlık farklarının 1., 3., 7. ve 14. gün grupları arasında değişiklik gösterip göstermediklerinin değerlendirilmesi için eşleştirilmiş diziler için çift yönlü t testi uygulandı. Her bir grubun kendi içindeki deney grubu-kontrol grubu ağırlık farklarının değerlendirilmesi için ise bağımsız örnekler için çift yönlü t testi uygulandı. Her iki testte de sonuçlar %95’lik güven aralığında, anlamlılık $p<0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

Nihai olarak, kontrol testis değerlerinin 1.-3., 3.-7. ve 7.-14. günler arasındaki değişiklikleri kendi içinde kıyaslandı; kriptorşid testislere ve skrotal testislere ait değerler de aynı şekilde günler arasında bir değerlendirmeye tabi tutuldu. Bunun yanında aynı grup içindeki kontrol grubu testis değerleri ile kriptorşid testis değerleri, kontrol grubu testis değerleri ile skrotal testis değerleri ve sol kriptorşid testis değerleri ile sağ skrotal testis değerleri karşılıklı olarak değerlendirmeye tabi tutuldu.

3.2.5. Çalışma Düzeni ve Deney Gruplarının Oluşturulması

Operasyon sonrası kriptorşid testisteki dejeneratif değişikliklerin ne gün başladığı konusunda literatürde çeşitli bilgiler bulunmaktadır. Ohta ve ark. 1. günde (11), Lee ve ark. 3. günde (39), Barqawi ve ark. 4. günde (185) apoptotik dejenerasyonların başladığını bildirmişlerdir.

Daha önceki çalışmalardan (11,38,39,185,186,187,188,189) ve sıçanlarda seminifer epitel döngüsünün 12.9 gün olmasından (75) yola çıkılarak deney grupları, operasyon sonrası 1., 3., 7., ve 14. günler şeklinde oluşturuldu. Böylece daha ilk döngü içinde meydana gelecek olan apoptotik dejenerasyonlarla eş zamanlı olarak Sertoli hücrelerinde meydana gelen değişikliklerin gözlenmesi amaçlanmıştır.

Grupların oluşturulması işleminde şöyle bir yol takip edildi: İnguinoskrotal yöntemle 17-19 günlük yavru sıçanlarda deneysel model oluşturulduktan sonra, her bir yavruda sağ testislerin skrotuma inişi günlük olarak takip edilmiştir. Bu iniş sıçanlar için teorik olarak yaklaşık 21. gün olarak belirtilmesine rağmen 24. güne kadar sarktığı gözlemlendi. Elle yapılan muayenede sağ testislerin sağ skrotuma kesin olarak indiklerine, yapılan yoklamada geri kaçmamaları sonucu karar verildi. Sağ testislerin indiği gün çalışmanın başlangıç günü, “sıfır” olarak kabul edildi. Bu inişten sonraki 1. gün çalışmanın 1. günü, 3. gün çalışmanın 3. günü, 7. gün çalışmanın 7. günü, 14. gün çalışmanın 14. günü olarak kabul edildi. İnişten sonraki 1., 3., 7. ve 14. günlerde hayvanların testisleri alındı.

4. BULGULAR

4.1. Morfometrik Bulgular

4.1.1. Testis Ağırlıkları ve Ağırlık Farkları

1., 3., 7. ve 14. günlere ait kontrol grubu hayvanların testisleri ile deney grubu hayvanların sol kriptorşid ve sağ skrotal testislerine ait ağırlık ortalamaları ve bu değerlere ait istatistiki değerlendirme sonuçları topluca Tablo-1'de ve ilgili grafik Grafik-1'de verilmiştir.

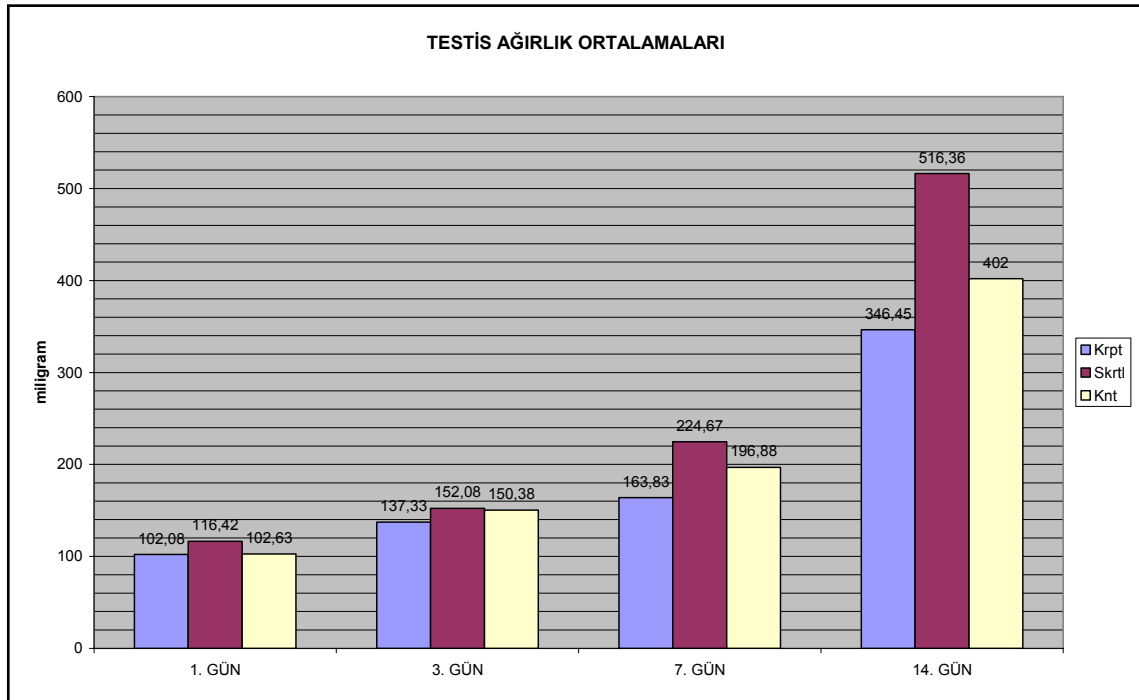
Ağırlık ortalamaları yanında her güne ait kontrol grubu hayvanların sağ ve sol testisleri arasındaki ağırlık farkı ortalamaları ile deney grubu hayvanların sağ ve sol testisleri arasındaki ağırlık farkı ortalamaları da çıkarılarak Tablo-2'de ve ilgili grafik Grafik-2'de gösterilmiştir. Bu değerlere ait istatistiki değerlendirme sonuçları da yine Tablo-2'de verilmiştir.

4.1.2. Apopitotik Hücreler

Apopitotik hücre değerlerinin tayini için 100 noktalı stereolojik sayım çerçevesi kullanılarak yapılan sayım neticesinde elde edilen apopitotik hücrelerin testis başına düşen ortalama sayım değerleriyle bu değerlere ait istatistikî değerlendirme sonuçları topluca Tablo-3'de ve ilgili grafik Grafik-3'de gösterilmiştir.

Tablo 4-1: Kontrol grubu ve deney grubu hayvanların sağ ve sol testislerine ait ağırlık ortalamalarını ve bunlara ait istatistikî anlamlılık değerlerini gösteren tablo. (*): $p < 0,05$ olmak üzere anlamlı.

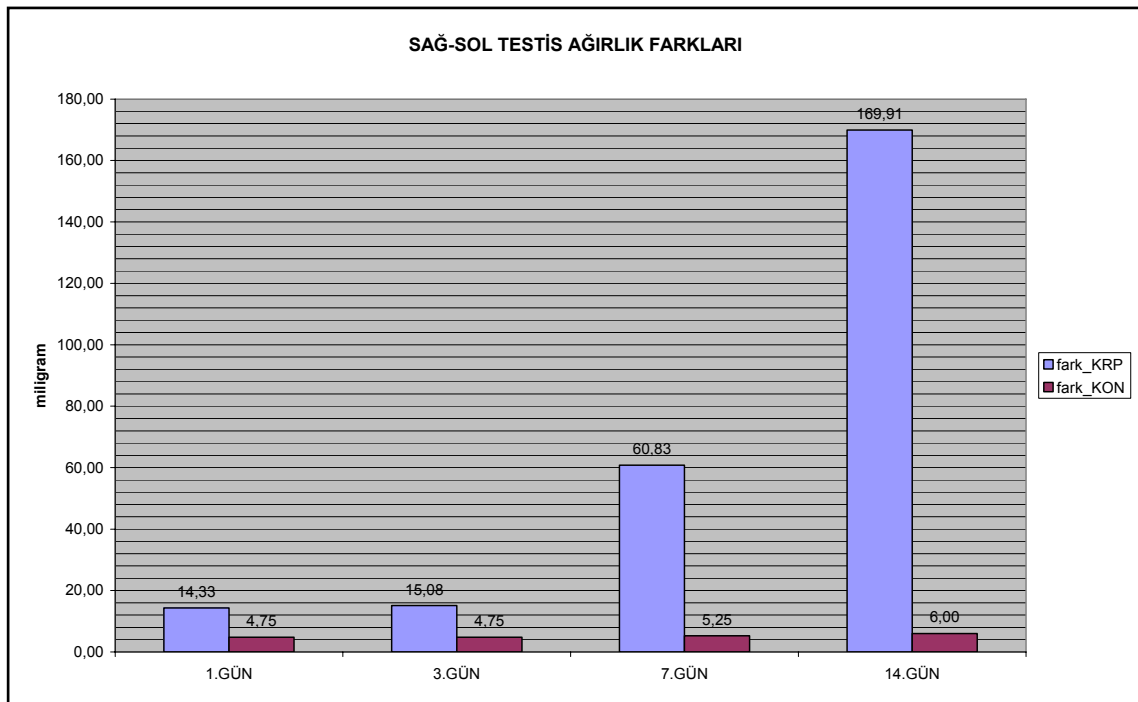
TESTİS AĞIRLIK ORTALAMALARI (mg)				
	1. GÜN	3. GÜN	7. GÜN	14. GÜN
Krpt	102,08±23,3	137,33±42,4	163,83±50,4	346,45±74,8
Skrtl	116,42±31,3	152,08±45,0	224,67±44,2	516,36±116,1
Knt	102,63±16,5	150,38±11,4	196,88±58,7	402,00±171,6
GRUPLAR ARASI ANLAMLILIK				
Günler	Kontrol testisler	Krpt testisler	Skrtl testisler	
1--3	0,0001*	0,024*	0,023*	
3--7	0,730	0,149	0,002*	
7--14	0,007*	0,0001*	0,0001*	
GRUP İÇİ ANLAMLILIK				
Grup	Kontr-Skrtl	Kontr-Krpt	Skrtl-Krpt	
1 gün	0,243	0,963	0,177	
3 gün	0,963	0,464	0,356	
7 gün	0,236	0,161	0,006*	
14 gün	0,520	0,333	0,003*	



Grafik 4-1: Kontrol grubu ve deney grubu hayvanların sağ ve sol testislerine ait ağırlık ortalamaların gösteren grafik

Tablo 4-2: Kontrol grubu hayvanların sağ-sol ve deney grubu hayvanların sağ-sol testisleri arasındaki ağırlık farklarını ve bunlara ait istatistikî anlamlılık değerlerini gösteren tablo. (*): $p < 0,05$ olmak üzere anlamlı.

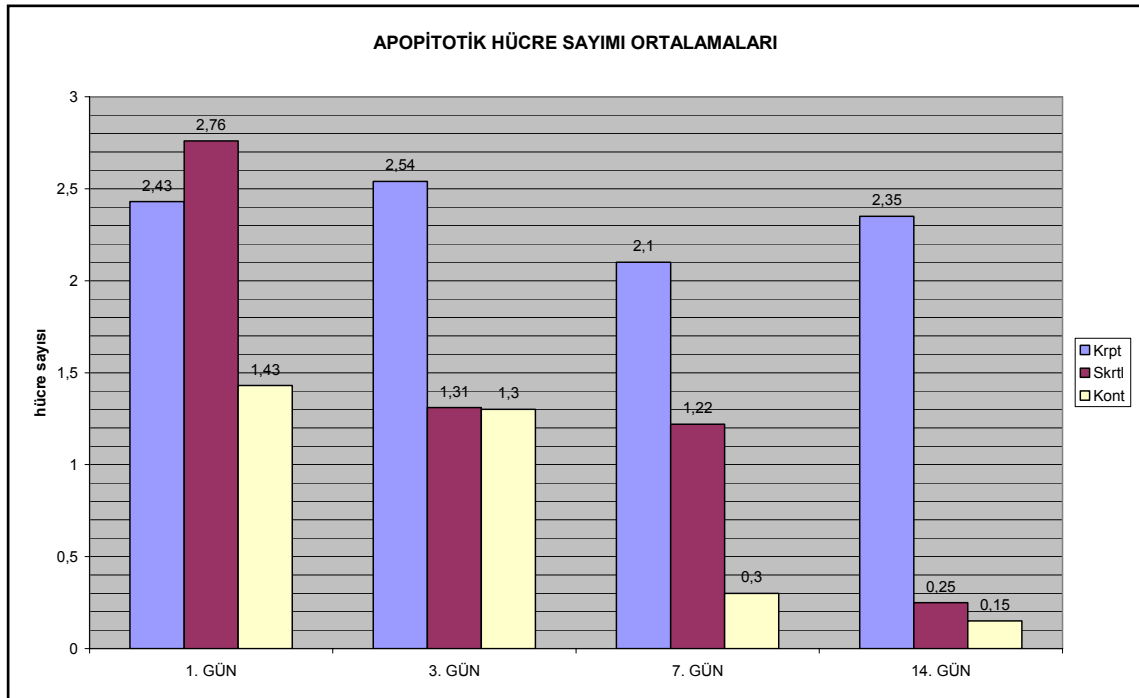
SAĞ-SOL TESTİS AĞIRLIK FARKLARI (mg)				
	1.GÜN	3.GÜN	7.GÜN	14.GÜN
fark_KRP	14,33±10,4	15,08±5,7	60,83±23	169,91±67,5
fark_KON	4,75±0,5	4,75±3,3	5,25±2,9	6,0±4,2
GRUPLAR ARASI ANLAMLILIK				
Günler	Kontrol Grubu		Deney Grubu	
1--3	1,000		0,804	
3--7	0,874		0,0001*	
7--14	0,580		0,002*	
GRUP İÇİ ANLAMLILIK				
Grup	Kontrol Grubu-Deney Grubu			
1 gün	0,009*			
3 gün	0,001*			
7 gün	0,0001*			
14 gün	0,0001*			



Grafik 4-2: Kontrol grubu hayvanların sağ-sol ve deney grubu hayvanların sağ-sol testisleri arasındaki ağırlık farklarını gösteren grafik

Tablo 4-3: Kontrol grubu testisleri ve deney grubu hayvanların sağ ve sol testislerine ait apoptotik hücre sayımlarının ortalamalarını ve bunlara ait istatistikî anlamlılık değerlerini gösteren tablo. (*): $p < 0,05$ olmak üzere anlamlı.

APOİTOTİK HÜCRE SAYIMI ORTALAMALARI				
	1. GÜN	3. GÜN	7. GÜN	14. GÜN
Krpt	2,43±2,5	2,54±1,9	2,1±2,3	2,35±4,0
Skrtl	2,76±2,4	1,31±1,3	1,22±1,7	0,25±0,6
Kont	1,43±1,4	1,3±1,1	0,3±0,6	0,15±0,5
GRUPLAR ARASI ANLAMLILIK				
Günler	Kontrol testisler	Krpt testisler	Skrtl testisler	
1--3	0,590	0,754	0,001*	
3--7	0,0001*	0,143	0,708	
7--14	0,262	0,624	0,0001*	
GRUP İÇİ ANLAMLILIK				
Grup	Kontr-Skrtl	Kontr-Krpt	Skrtl-Krpt	
1 gün	0,003*	0,025*	0,351	
3 gün	0,966	0,0001*	0,0001*	
7 gün	0,015*	0,0001*	0,005*	
14 gün	0,843	0,0001*	0,0001*	



Grafik 4-3: Kontrol grubu ve deney grubu hayvanların sağ ve sol testislerine ait apoptotik hücre ortalama sayımlarını gösteren grafik. Sayılar, her bir grup için sayım yapılan tüm alanlarda gridin noktaları altına toplam ortalama kaç apoptotik hücrenin denk geldiğini ifade ediyor.

4.1.3. Seminifer Tübül Duvar Kalınlığı

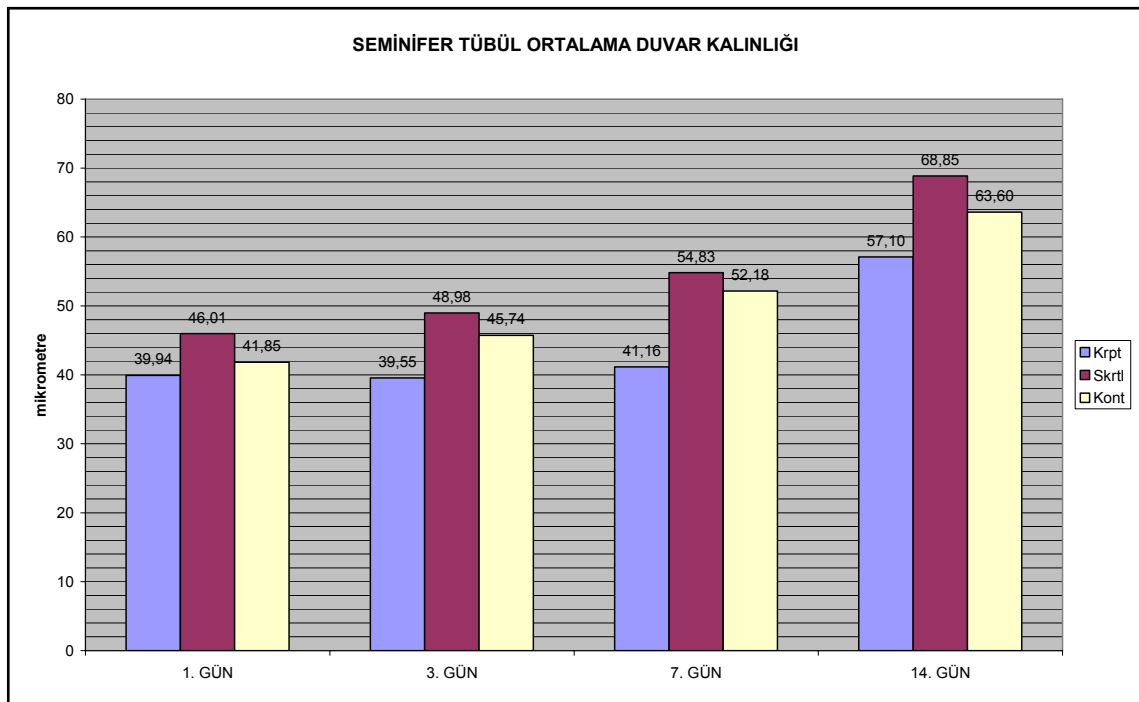
Seminifer túbül duvarlarının ortalama kalınlığının tayini için Olympus BX61 model mikroskop setinin DP72 model dijital kamerasına ait ölçüm programı kullanılarak yapılan ölçümler neticesinde elde edilen seminifer túbül duvar kalınlıklarına ait ortalama değerlerle bu değerlere ait istatistikî değerlendirme sonuçları Tablo-4'de ve ilgili grafik Grafik-4'de gösterilmiştir.

4.1.4. Germ Hücreleri

Germ hücreleri değerlerinin tayini için 100 noktalı stereolojik sayım çerçevesi kullanılarak yapılan sayım neticesinde elde edilen germ hücrelerinin testis başına düşen ortalama sayım değerleriyle, bu değerlere ait istatistikî değerlendirme sonuçları Tablo-5'de ve ilgili grafik Grafik-5'de gösterilmiştir.

Tablo 4-4: Kontrol grubu testislerine ve deney grubu hayvanların sağ ve sol testislerine ait seminifer tübül duvarı ortalama kalınlıklarını ve bunlara ait istatistikî anlamlılık değerlerini gösteren tablo. (*): $p < 0,05$ olmak üzere anlamlı.

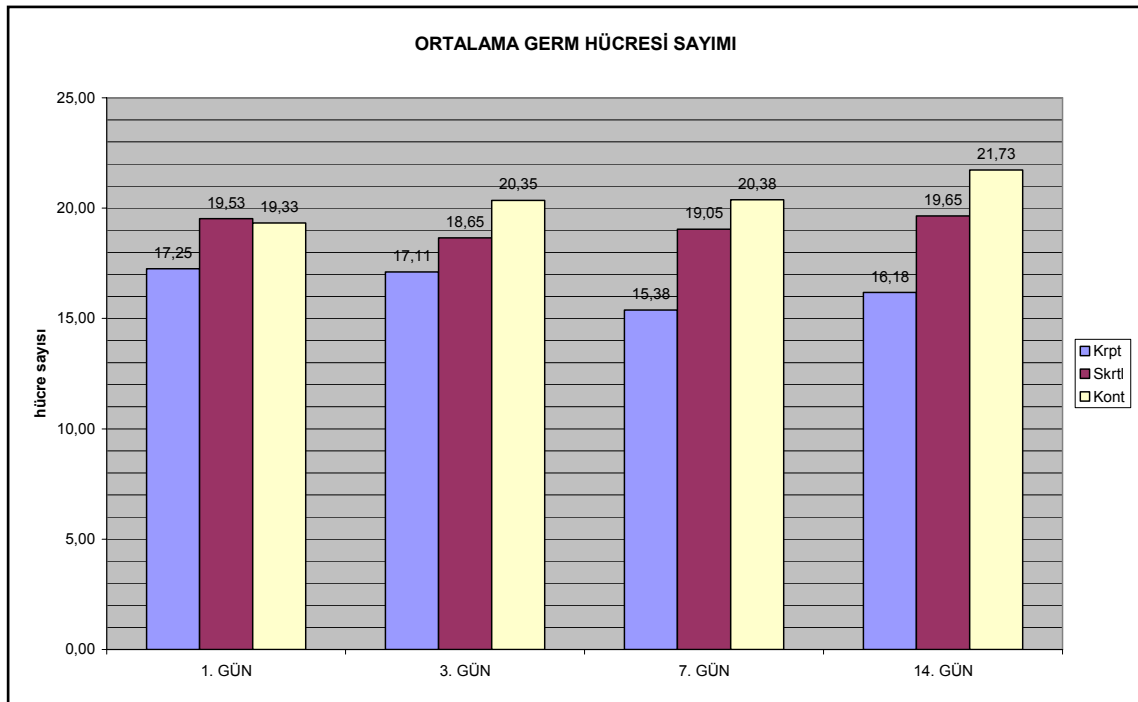
SEMINİFER TÜBÜL ORTALAMA DUVAR KALINLIĞI (µm)				
	1. GÜN	3. GÜN	7. GÜN	14. GÜN
Krpt	39,94±8,6	39,55±7,9	41,16±7,1	57,10±15,0
Skrtrl	46,01±7,3	48,98±9,0	54,83±10,7	68,85±8,2
Kont	41,85±5,6	45,74±8,1	52,18±7,8	63,60±9,0
GRUPLAR ARASI ANLAMLILIK				
Günler	Kontrol testisler	Krpt testisler	Skrtrl testisler	
1--3	0,001*	0,618	0,049*	
3--7	0,001*	0,094	0,002*	
7--14	0,0001*	0,0001*	0,0001*	
GRUP İÇİ ANLAMLILIK				
Grup	Kontr-Skrtrl	Kontr-Krpt	Skrtrl-Krpt	
1 gün	0,003*	0,162	0,0001*	
3 gün	0,034*	0,0001*	0,0001*	
7 gün	0,100	0,0001*	0,0001*	
14 gün	0,015*	0,003*	0,0001*	



Grafik 4-4: Kontrol grubu ve deney grubu hayvanların sağ ve sol testislerine ait seminifer tübül duvarı ortalama kalınlıklarını gösteren grafik

Tablo 4-5: Kontrol grubu testislere ve deney grubu hayvanların sağ ve sol testislerine ait germ hücresi sayımlarının ortalamalarını ve bunlara ait istatistikî anlamlılık değerlerini gösteren tablo. (*): $p < 0,05$ olmak üzere anlamlı

GERM HÜCRESİ SAYIMI ORTALAMALARI				
	1. GÜN	3. GÜN	7. GÜN	14. GÜN
Crpt	17,25±5,4	17,11±4,2	15,38±4,3	16,18±4,9
Skrtrl	19,53±4,6	18,65±4,2	19,05±5,3	19,65±4,9
Kont	19,33±5,1	20,35±4,6	20,38±4,0	21,73±5,2
GRUPLAR ARASI ANLAMLILIK				
Günler	Kontrol testisler	Krpt testisler	Skrtrl testisler	
1--3	0,337	0,567	0,767	
3--7	0,982	0,124	0,350	
7--14	0,193	0,455	0,897	
GRUP İÇİ ANLAMLILIK				
Grup	Kontr-Skrtrl	Kontr-Krpt	Skrtrl-Krpt	
1 gün	0,837	0,024*	0,006*	
3 gün	0,029*	0,0001*	0,020*	
7 gün	0,117	0,0001*	0,0001*	
14 gün	0,027*	0,0001*	0,0001*	



Grafik 4-5: Kontrol grubu ve deney grubu hayvanların sağ ve sol testislerine ait germ hücresi sayım ortalamalarını gösteren grafik. Sayılar, her bir grup için sayım yapılan tüm alanlarda gridin noktaları altına toplam ortalama kaç germ hücresinin denk geldiğini ifade ediyor.

4.2. Genel Işıık Mikroskobu Bulguları

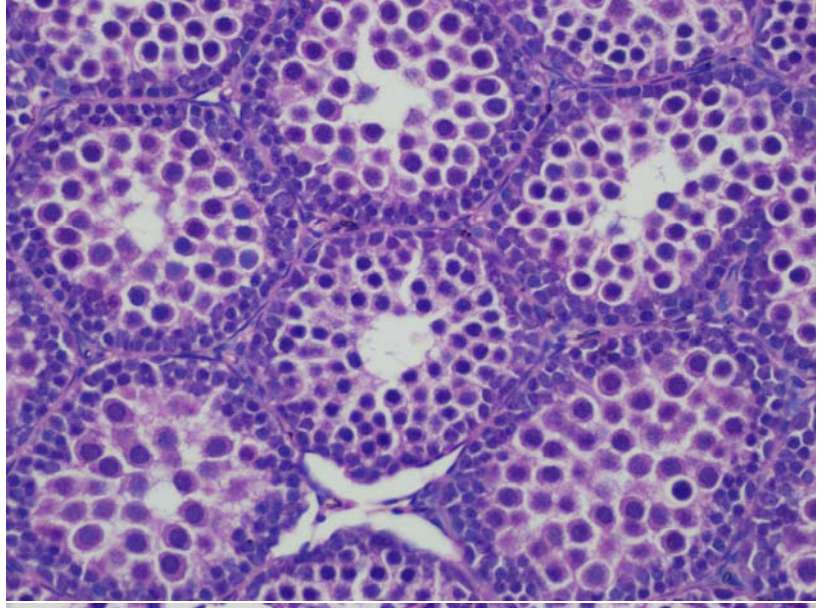
4.2.1. Birinci Gün Bulguları

1. gün kontrol grubu hayvanların testislerinin normal ve düzenli görünümde olduğu, germ hücrelerinin seminifer tübüllerin bazalinden apikaline kadar düzenli diziler oluşturduğu görüldü. Tübül duvarında yer yer normal mitotik aktivitenin, spermatogenezin ve spermiyogenezin devam ettiği görüldü. Spermatogonyumların seminifer tübül bazal membranına yakın yerleşimli oldukları, bunlardan itibaren ise, spermatogenezin çeşitli evrelerindeki spermatositlerin ve spermatidlerin tübül lümenine doğru sıralandıkları görüldü. Erken spermatidler vardı, uzamış spermatidlere ise rastlanmadı (şekil 4-1).

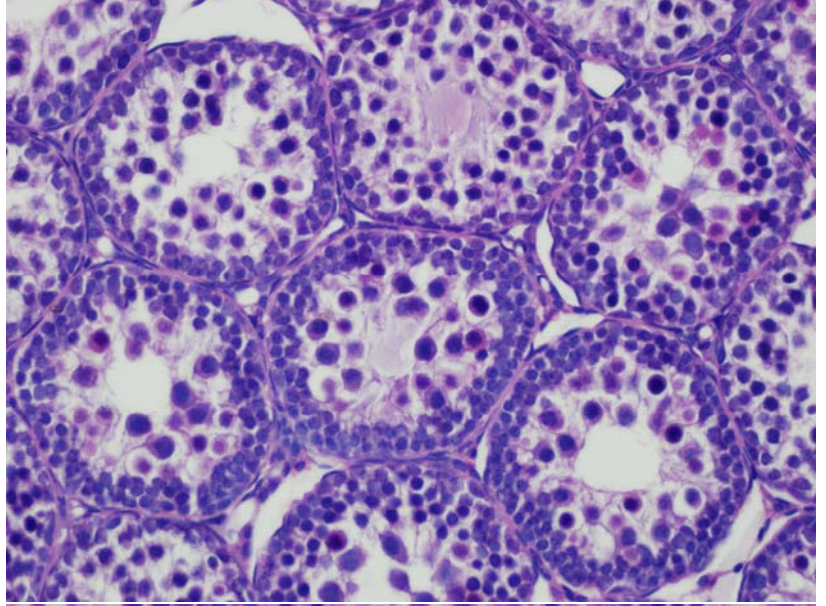
Deney grubu hayvanların sol kriptorşid testislerinde normal testis morfolojisinin bozulmuş olduğu görüldü. Mitotik aktivite yer yer devam etmekle birlikte, spermatogenezin ancak spermatositlere kadar devam ettiği ve o aşamada durduğu görüldü. Erken veya uzamış spermatidlere ise rastlanmadı. Spermatogonyumların seminifer tübül bazal membranı üzerinde varlıklarını devam ettirdikleri, mevcut spermatositlerin seminifer tübül içindeki düzeninin büyük oranda bozulduğu, Sertoli hücrelerinden yer yer ayrılmalar gösterdikleri ve büyük bir kısmının dejenere olduğu, bazı alanlarda germ hücrelerinin tübül lümenine döküldükleri gözlendi (şekil 4-2).

Deney grubu hayvanların sağ skrotal testislerinde kontrol grubuna benzer bir morfolojik görünüm mevcuttu. Tübül duvarında normal spermatogenezin devam ettiği, spermatogonyumların, spermatositlerin ve spermatidlerin bazal membrandan tübül lümenine doğru normal bir diziliş gösterdikleri görüldü. Uzamış spermatidlere rastlanmadı (şekil 4-3).

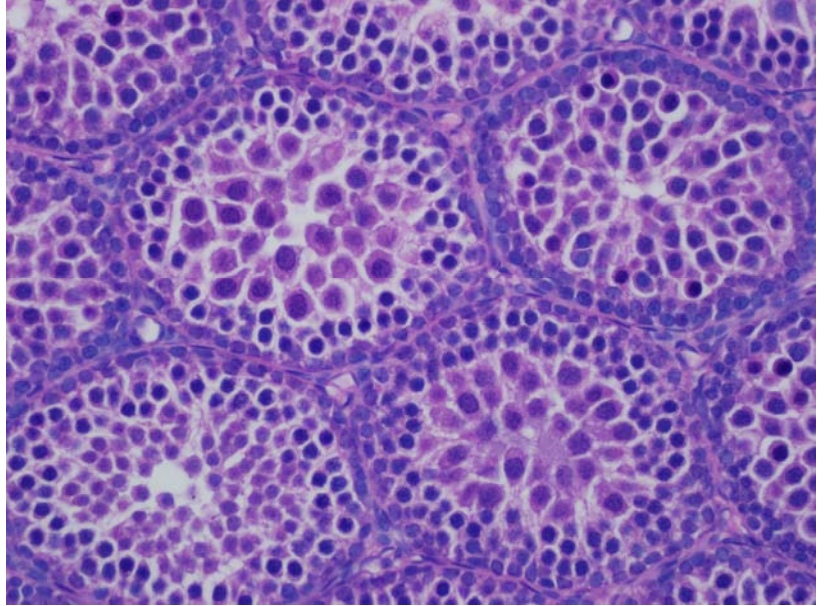
Şekil 4-1: 1. gün
kontrol grubu
testis kesiti.
H-E, x400



Şekil 4-2: 1. gün
sol kriptorşid
testis kesiti.
H-E, x400



Şekil 4-3: 1. gün
sağ skrotal testis
kesiti.
H-E, x400



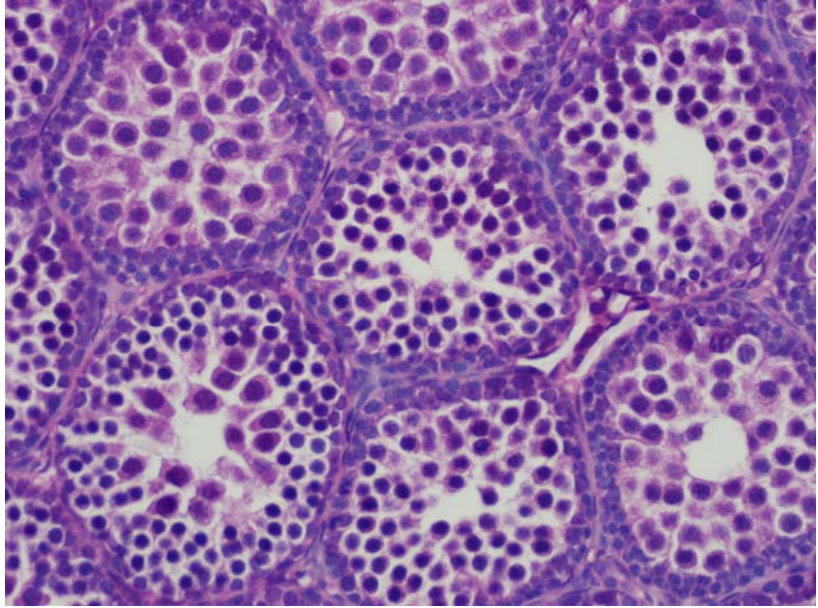
4.2.2. Üçüncü Gün Bulguları

3. gün kontrol grubu hayvanların testislerinin normal ve düzenli görünümde olduğu, germ hücrelerinin seminifer tübüllerin bazalinden apikaline kadar düzenli diziler oluşturduğu görüldü. Tübül duvarında yer yer normal mitotik aktivitenin ve spermatogenezin devam ettiği görüldü. Az sayıdaki tübülde spermiyogenezin başladığı erken spermatidlerin bulunduğu gözlemlendi, uzamış spermatidlere ise rastlanmadı (Şekil 4-4).

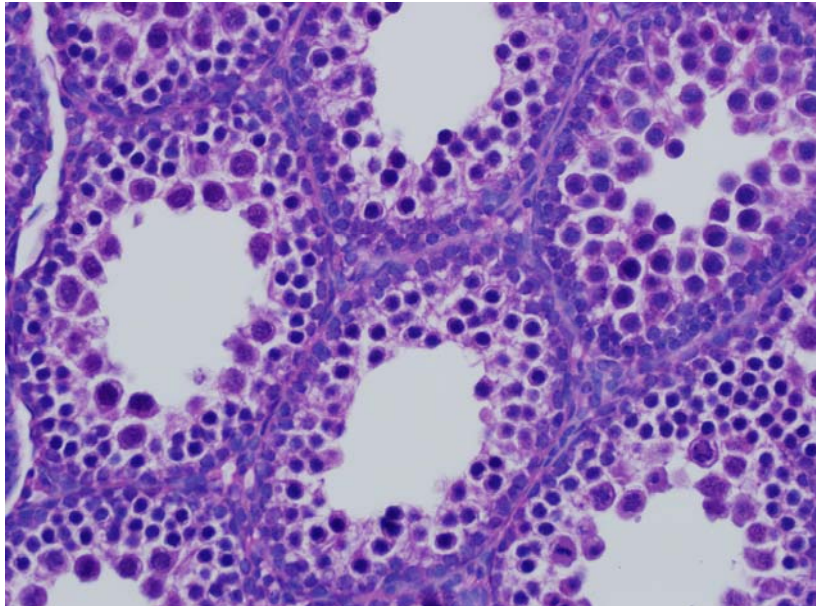
Deney grubu hayvanların sol kriptorşid testislerinde normal testis morfolojisinin bozulmuş olduğu görüldü. Mitotik aktivite yer yer devam etmekle birlikte, spermatogenezin ancak spermatositlere kadar devam ettiği ve o aşamada durduğu görüldü. Erken veya uzamış spermatidlere ise rastlanmadı. Spermatogonyumların seminifer tübül bazal membranı üzerinde varlıklarını devam ettirdikleri, mevcut spermatositlerin seminifer tübül içindeki düzeninin büyük oranda bozulduğu, Sertoli hücrelerinden yer yer ayrılmalar gösterdikleri ve büyük bir kısmının dejenere olduğu, bazı alanlarda hücrelerin tübül lümenine döküldükleri gözlemlendi (Şekil 4-5).

Deney grubu hayvanların sağ skrotal testislerinde kontrol grubuna benzer bir morfolojik görünüm mevcuttu. Tübül duvarında normal spermatogenezin devam ettiği, spermatogonyumların, spermatositlerin ve spermatidlerin bazal membrandan tübül lümenine doğru normal bir diziliş gösterdikleri görüldü. Uzamış spermatidlere rastlanmadı (Şekil 4-6).

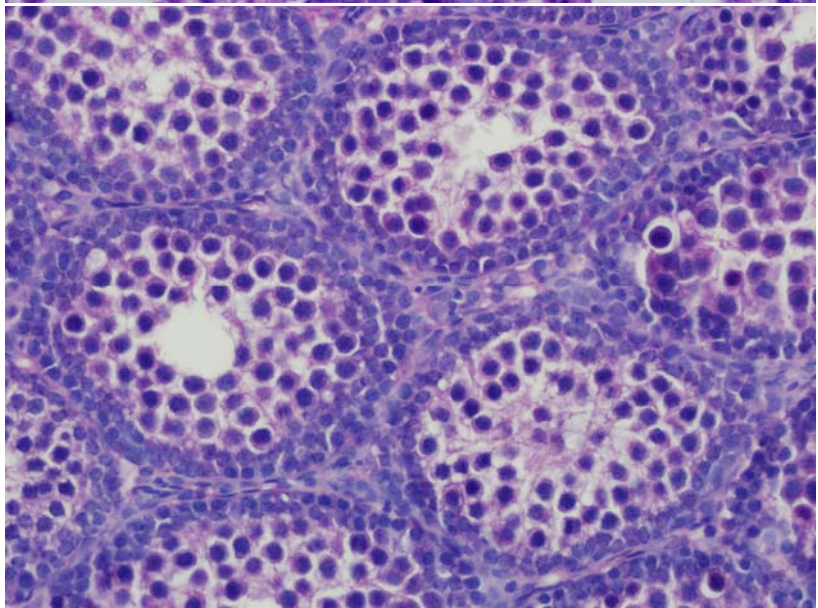
Şekil 4-4: 3. gün
kontrol grubu
testis kesiti.
H-E, x400



Şekil 4-5: 3. gün
sol kriptorşid
testis kesiti.
H-E, x400



Şekil 4-6: 3. gün
sağ skrotal testis
kesiti.
H-E, x400



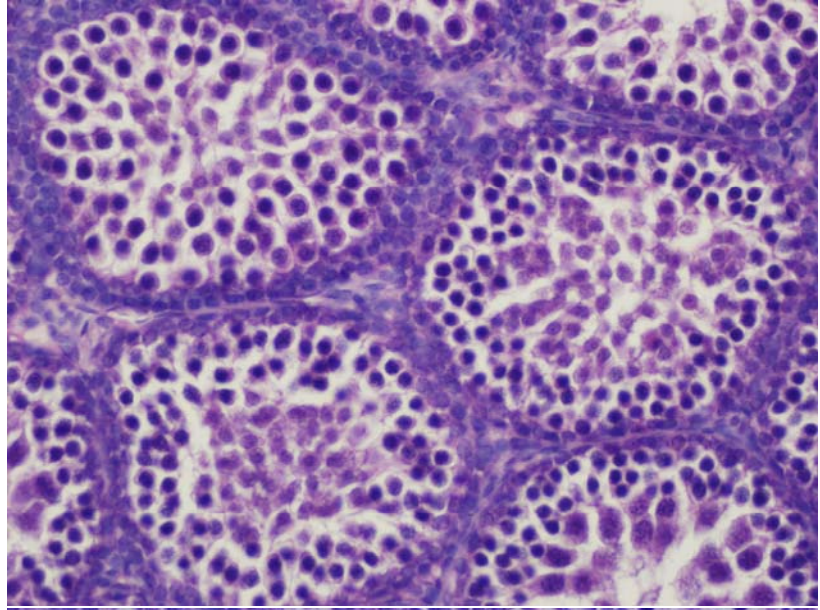
4.2.3. Yedinci Gün Bulguları

7. gün kontrol grubu hayvanların testislerinin normal ve düzenli görünümde olduğu, germ hücrelerinin seminifer tübüllerin bazalinden apikaline kadar düzenli diziler oluşturduğu görüldü. Tübül duvarında yer yer normal mitotik aktivitenin, spermatogenezin ve spermiyogenezin devam ettiği görüldü. Spermatogonyumların seminifer tübül bazal membranına yakın yerleşimli oldukları, bunlardan itibaren ise, spermatogenezin çeşitli evrelerindeki spermatositlerin ve spermatidlerin tübül lümenine doğru sıralandıkları görüldü. Erken spermatidler vardı, uzamış spermatidlere ise rastlanmadı (Şekil 4-7).

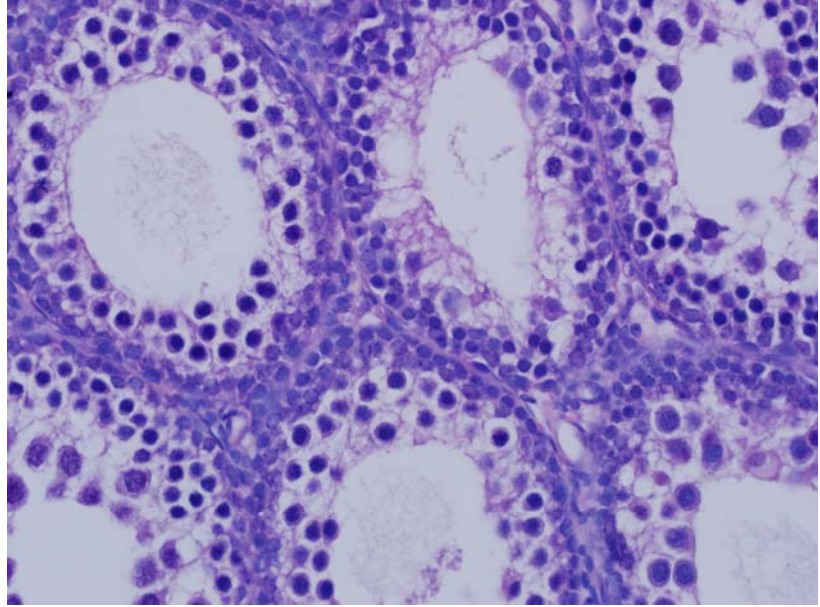
Deney grubu hayvanların sol kriptorşid testislerinde normal testis morfolojisinin bozulmuş olduğu görüldü. Mitotik aktivite yer yer devam etmekle birlikte, spermatogenezin ancak spermatositlere kadar devam ettiği ve o aşamada durduğu görüldü. Erken veya uzamış spermatidlere ise rastlanmadı. Spermatogonyumların seminifer tübül bazal membranı üzerinde varlıklarını devam ettirdikleri, mevcut spermatositlerin seminifer tübül içindeki düzeninin büyük oranda bozulduğu, Sertoli hücrelerinden yer yer ayrılmalar gösterdikleri ve büyük bir kısmının dejenere olduğu, bazı alanlarda germ hücrelerinin tübül lümenine döküldükleri gözlemlendi. (Şekil 4-8).

Deney grubu hayvanların sağ skrotal testislerinde kontrol grubuna benzer bir morfolojik görünüm mevcuttu. Tübül duvarında normal spermatogenezin devam ettiği, spermatogonyumların, spermatositlerin ve spermatidlerin bazal membrandan tübül lümenine doğru normal bir diziliş gösterdikleri görüldü. Uzamış spermatidlere rastlanmadı (Şekil 4-9).

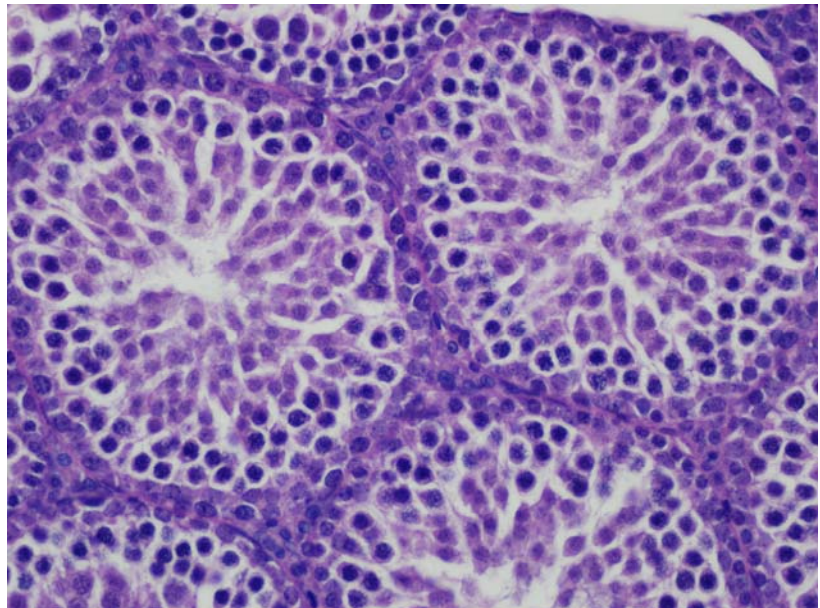
Şekil 4-7: 7. gün
kontrol grubu
testis kesiti.
H-E, x400



Şekil 4-8: 7. gün
sol kriptorşid
testis kesiti.
H-E, x400



Şekil 4-9: 7. gün
sağ skrotal testis
kesiti.
H-E, x400



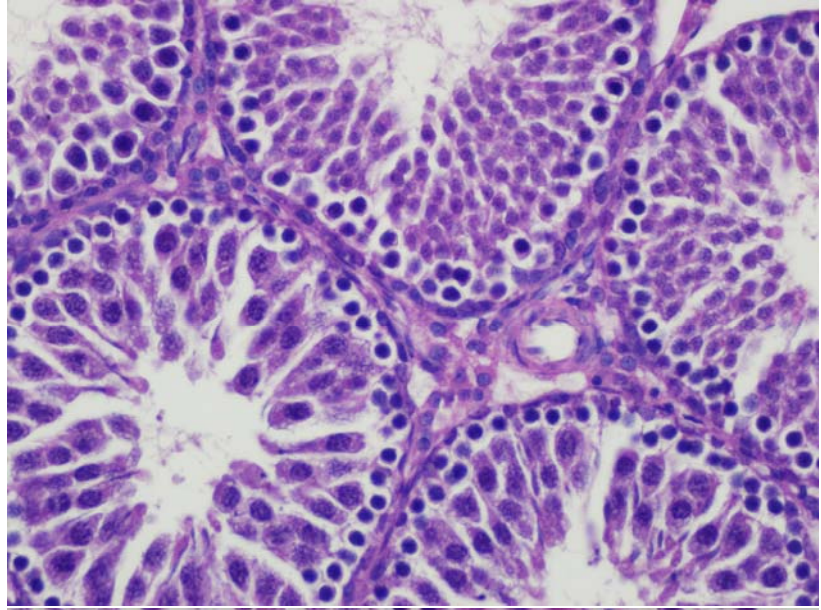
4.2.4. Ondördüncü Gün Bulguları

14. gün kontrol grubu hayvanların testislerinin normal ve düzenli görünümde olduğu, germ hücrelerinin seminifer tübüllerin bazalinden apikaline kadar düzenli diziler oluşturduğu görüldü. Tübül duvarında yer yer normal mitotik aktivitenin, spermatogenezin ve spermiyogenezin devam ettiği görüldü. Spermatogonyumların seminifer tübül bazal membranına yakın yerleşimli oldukları, bunlardan itibaren ise, spermatogenezin çeşitli evrelerindeki spermatositlerin ve spermatidlerin tübül lümenine doğru sıralandıkları görüldü. 14 günlük kesitlerde spermiyogenezin son aşamasına gelmiş uzamış spermatidler mevcuttu (Şekil 4-10).

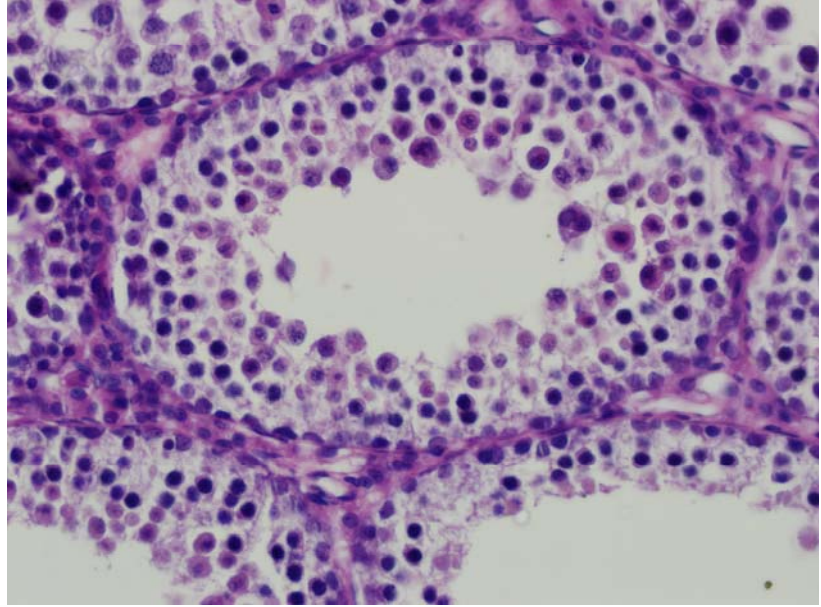
Deney grubu hayvanların sol kriptorşid testislerinde normal testis morfolojisinin bozulmuş olduğu görüldü. Mitotik aktivite büyük oranda ortadan kalkmıştı, spermatogenezin ancak spermatositlere kadar devam ettiği ve o aşamada durduğu görüldü. Erken veya uzamış spermatidlere ise rastlanmadı. Spermatogonyumların seminifer tübül bazal membranı üzerinde varlıklarını devam ettirdikleri, mevcut spermatositlerin seminifer tübül içindeki düzeninin büyük oranda bozulduğu, Sertoli hücrelerinden yer yer ayrılmalar gösterdikleri ve büyük kısmının dejenere olduğu, bazı alanlarda germ hücrelerinin tübül lümenine döküldükleri gözlemlendi (Şekil 4-11).

Deney grubu hayvanların sağ skrotal testislerinde kontrol grubuna benzer bir morfolojik görünüm mevcuttu. Tübül duvarında normal spermatogenezin devam ettiği, spermatogonyumların, spermatositlerin ve spermatidlerin bazal membrandan tübül lümenine doğru normal bir diziliş gösterdikleri görüldü. Uzamış spermatidler de mevcuttu (Şekil 4-12).

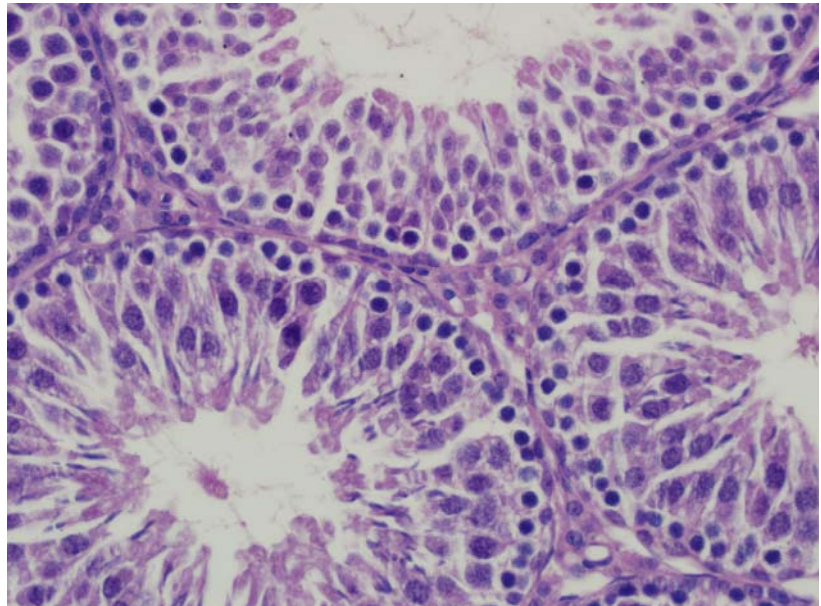
Şekil 4-10: 14. gün kontrol grubu testis kesiti. H-E, x400



Şekil 4-11: 14. gün sol kriptorşid testis kesiti. H-E, x400



Şekil 4-12: 14. gün sağ skrotal testis kesiti. H-E, x400



4.3. İmmünohistokimya Bulguları

4.3.1. Tübülin

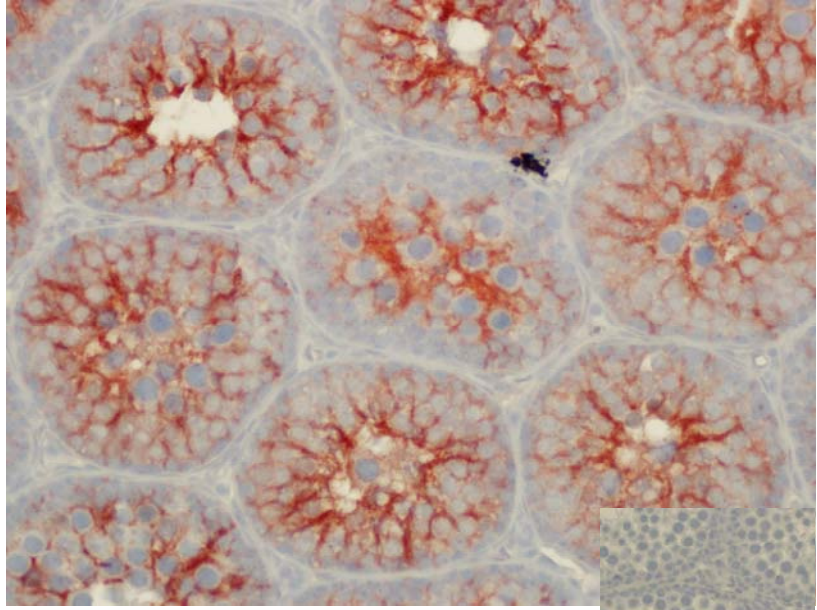
Alfa-tübülin antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal boyama neticesinde elde edilen kesitlerin değerlendirilmesi sonucunda;

1., 3., 7. ve 14. gün kontrol grubu hayvanlarında tübülün immün-reaktivitesinin seminifer tübüllerin bazaline yakın Sertoli hücresinin çekirdeği etrafından başlayarak hücrenin apikale tübül lümenine kadar uzandığı görülmektedir (Şekil 4-13, 4-16, 4-19, 4-22).

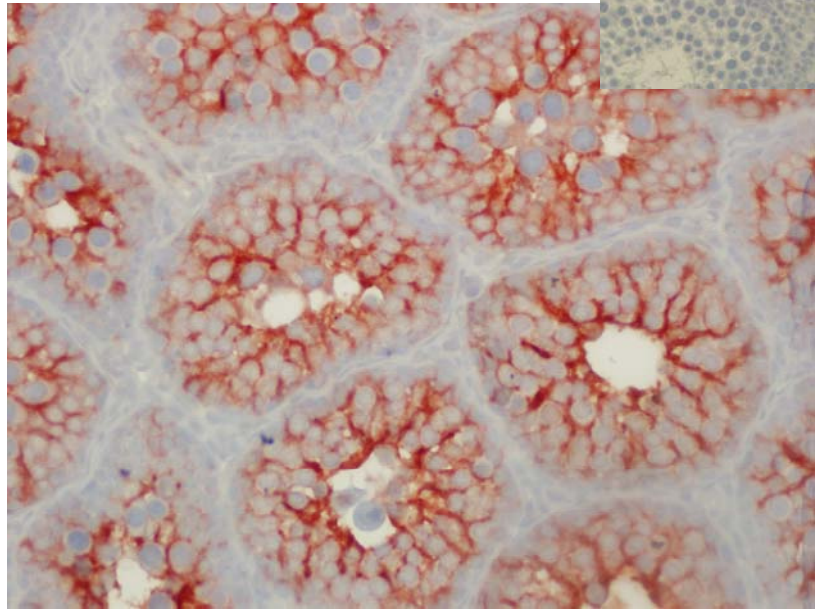
1., 3., 7. ve 14. gün deney grubu hayvanların sol kriptorşid testis kesitlerinde tübülün immün-reaktivitesinin seminifer tübüllerin büyük çoğunluğunda çekirdek çevresindeki immün-reaktivitenin zayıfladığı, tübül duvarının orta kesimlerdeki immün-reaktivitenin varlığını devam ettirdiği, bu boyanmanın ise düzensiz ve dağınık kümelenmeler tarzında olduğu gözlemlendi. Tübüllerin apikalinde ise tübül lümenine dökülen öbekler halinde boyanmış hücre materyalinin varlığı gözlemlendi (Şekil 4-14, 4-17, 4-20, 4-23).

1., 3., 7. ve 14. gün deney grubu hayvanların sağ skrotal testis kesitlerinde tübülün immün-reaktivitesinin, kontrol grubunda olduğu gibi seminifer tübüllerin bazaline yakın Sertoli hücresinin çekirdeği etrafından başlayarak hücrenin apikale tübül lümenine kadar uzandığı görülmektedir (Şekil 4-15, 4-18, 4-21, 4-24).

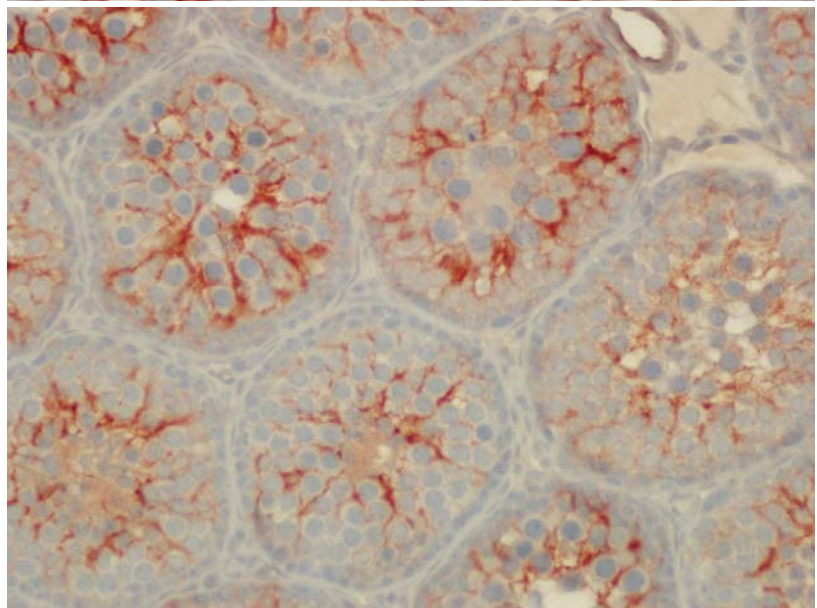
Şekil 4-13: 1. gün kontrol grubu testis kesitinde tübülün boyaması ve sağ altta negatif kontrolü. x400



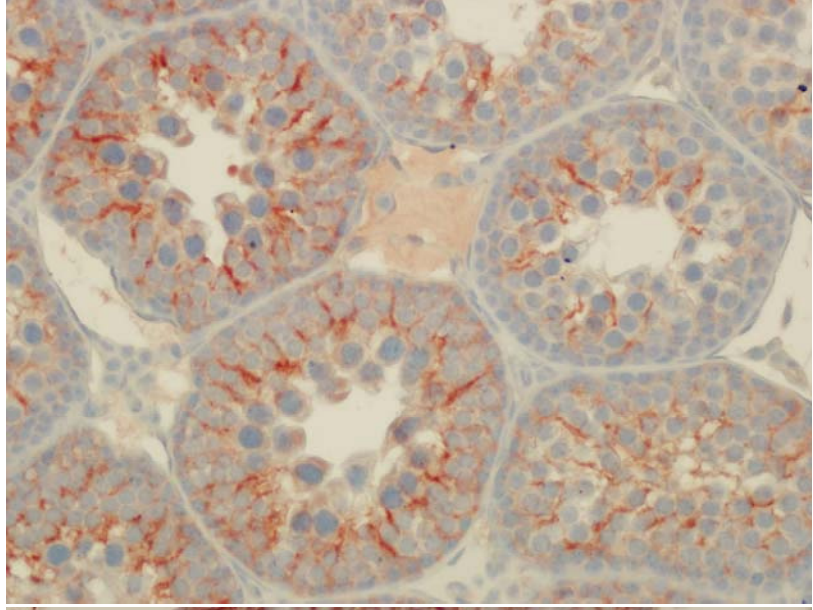
Şekil 4-14: 1. gün sol kriptorşid testis kesitinde tübülün boyaması. x400



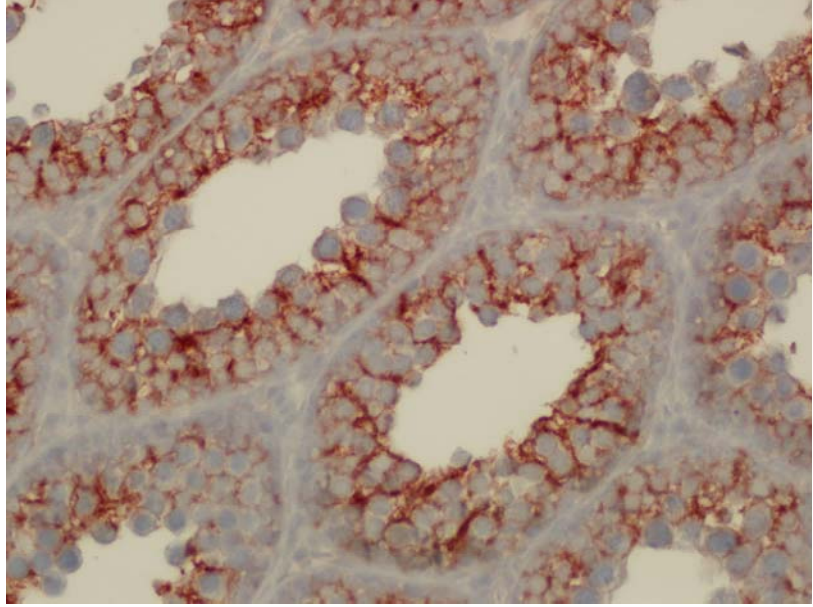
Şekil 4-15: 1. gün sağ skrotal testis kesitinde tübülün boyaması. x400



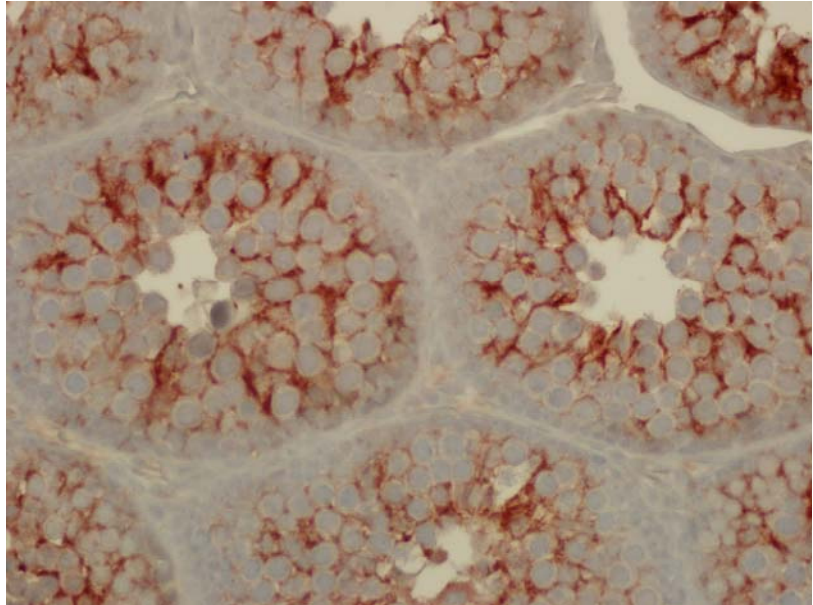
Şekil 4-16: 3. gün kontrol grubu testis kesitinde tübülün boyaması. x400



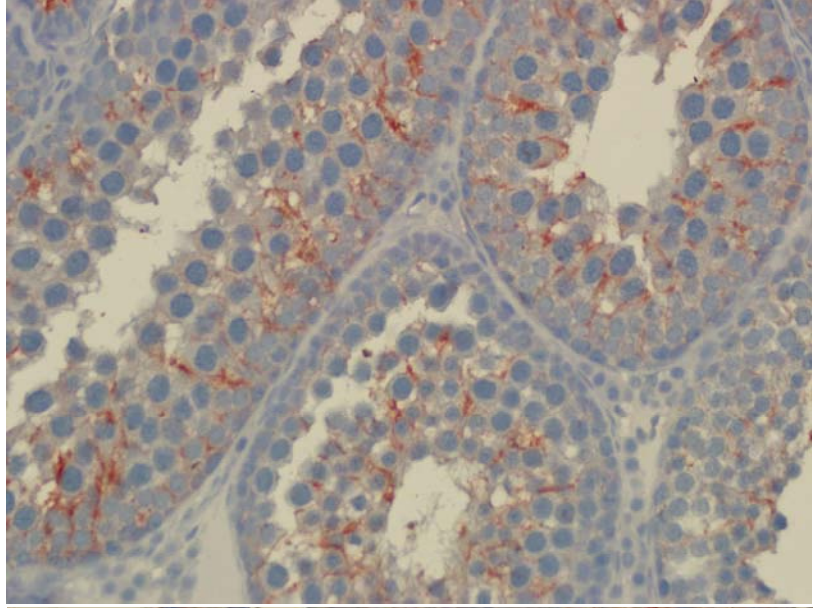
Şekil 4-17: 3. gün sol kriptorşid testis kesitinde tübülün boyaması. x400



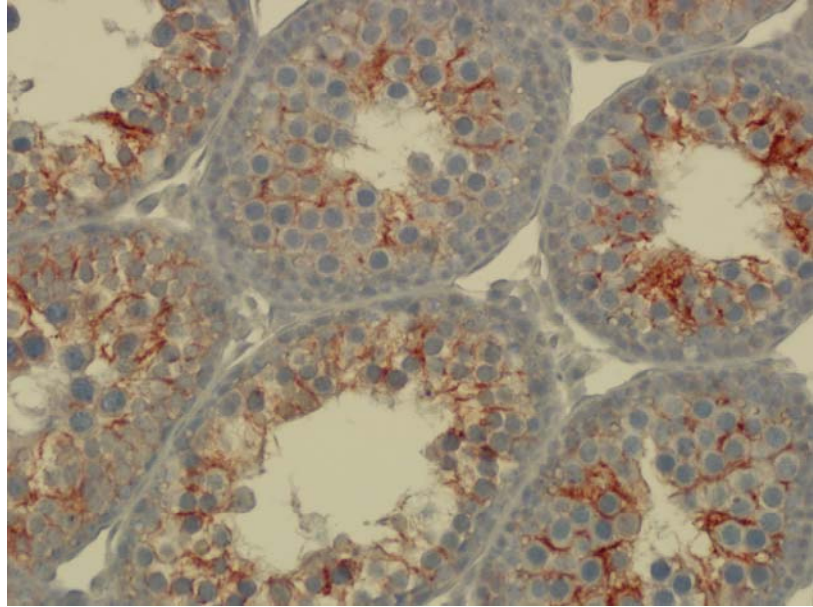
Şekil 4-18: 3. gün sağ skrotal testis kesitinde tübülün boyaması. x400



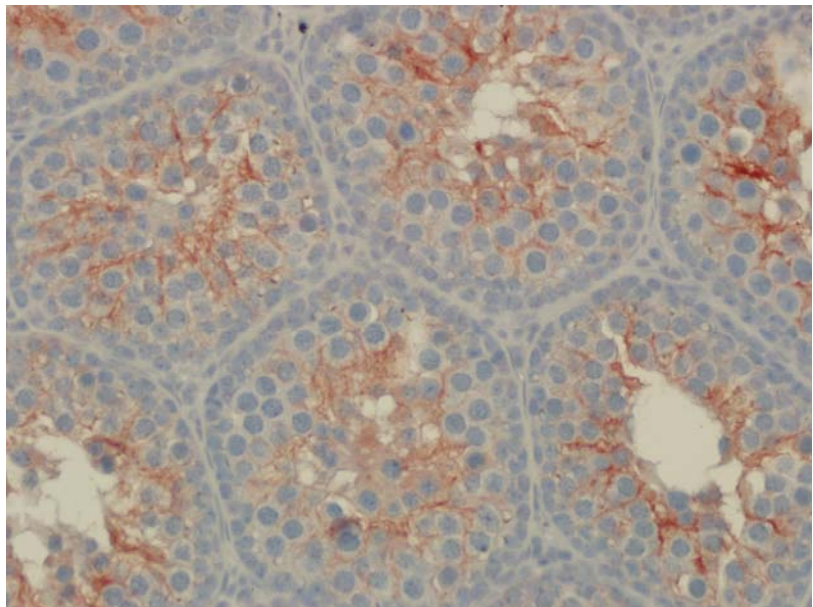
Şekil 4-19: 7. gün kontrol grubu testis kesitinde tübülün boyaması. x400



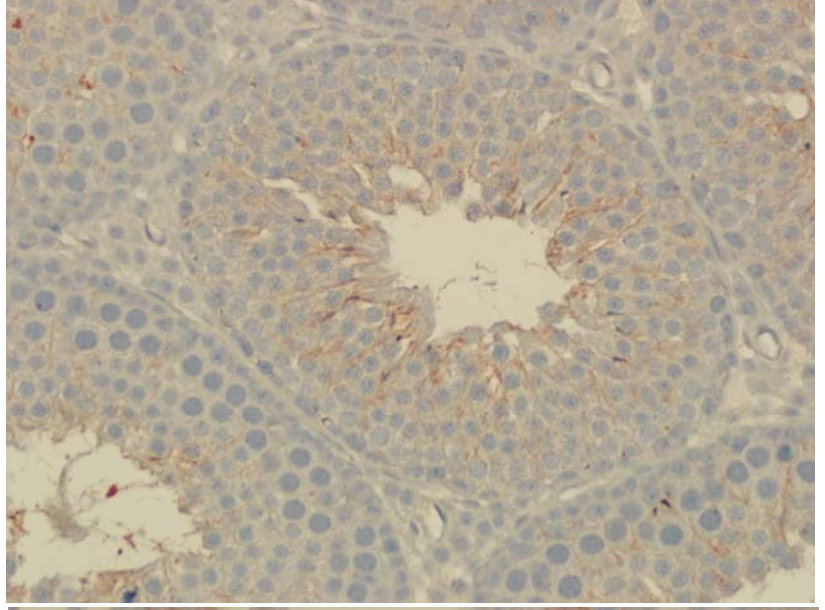
Şekil 4-20: 7. gün sol kriptorşid testis kesitinde tübülün boyaması. x400



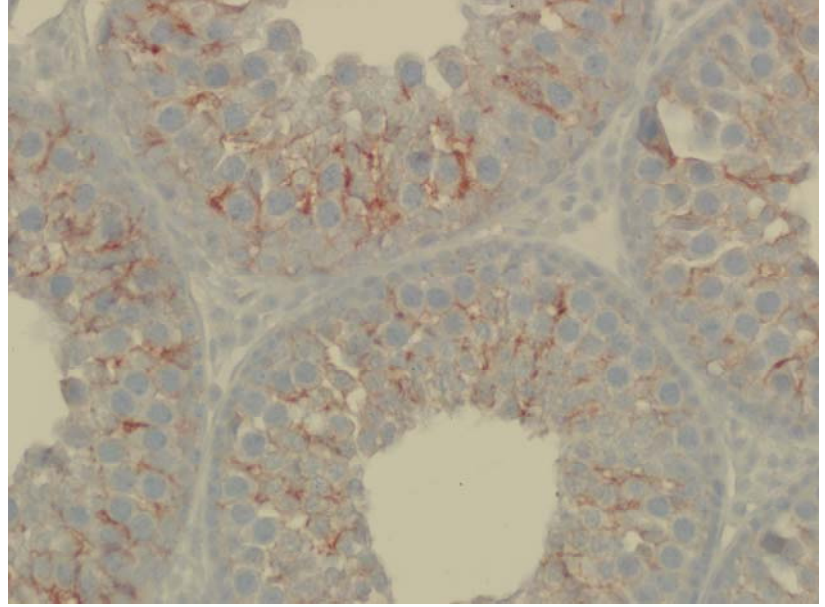
Şekil 4-21: 7. gün sağ skrotal testis kesitinde tübülün boyaması. x400



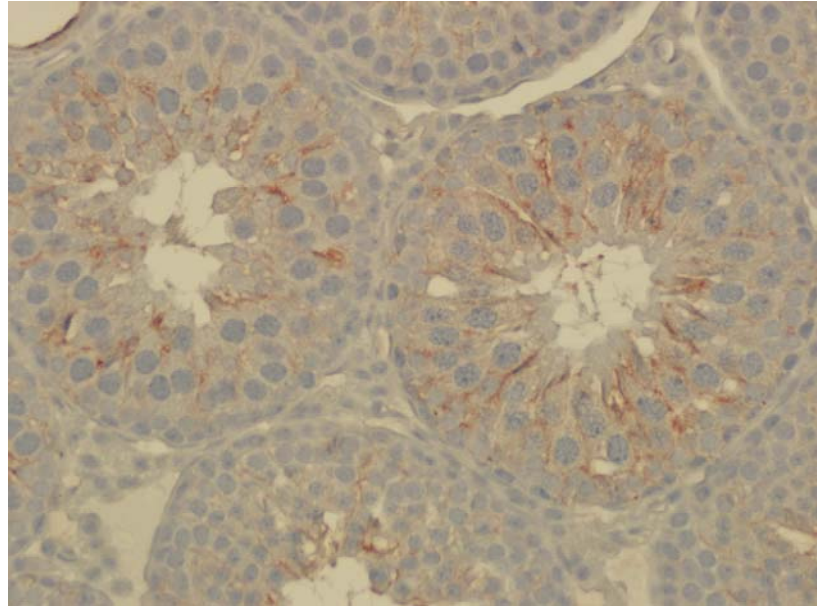
Şekil 4-22: 14. gün kontrol grubu testis kesitinde tübülün boyaması. x400



Şekil 4-23: 14. gün sol kriptorşid testis kesitinde tübülün boyaması. x400



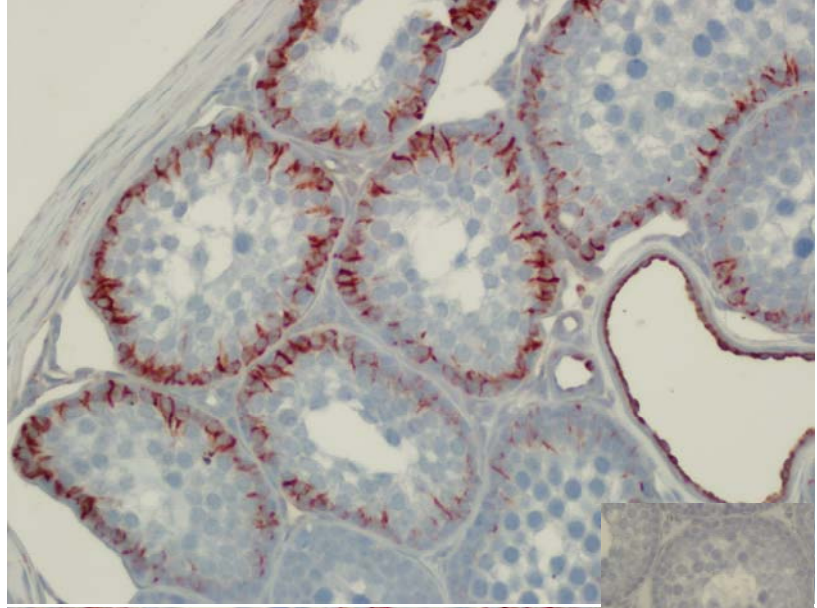
Şekil 4-24: 14. gün sağ skrotal testis kesitinde tübülün boyaması. x400



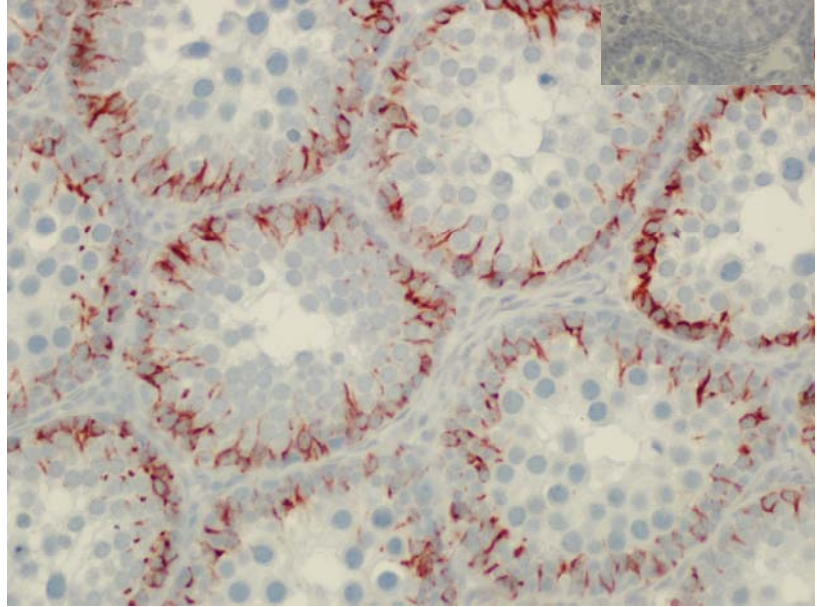
4.3.2. Vimentin

Vimentin antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyama neticesinde elde edilen kesitlerin değerlendirilmesi sonucunda; çalışmada yer alan 1., 3., 7. ve 14. gün kontrol grubu ile deney grubu hayvanların sol kriptorşid ve sağ skrotal testislerinin tamamında vimentin immün-reaktivitesinin birbirine benzer şekilde olduğu, boyanma açısından fark bulunmadığı görülmüştür. Vimentin immün-reaktivitesinin seminifer tübüllerin bazalinde Sertoli hücrelerinin çekirdeği çevresinde yoğunlaştığı, buradan da hücrenin apikaline doğru dallanmalar tarzında uzantılar verdiği görülmüştür (Şekil 4-25 - 4-36).

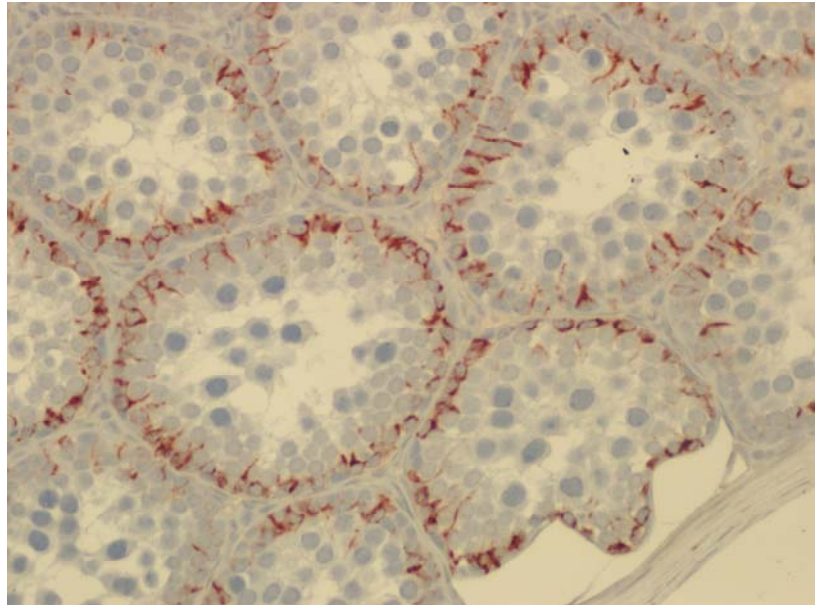
Şekil 4-25: 1. gün kontrol grubu testis kesitinde vimentin boyaması ve sağ altta negatif kontrolü. x400



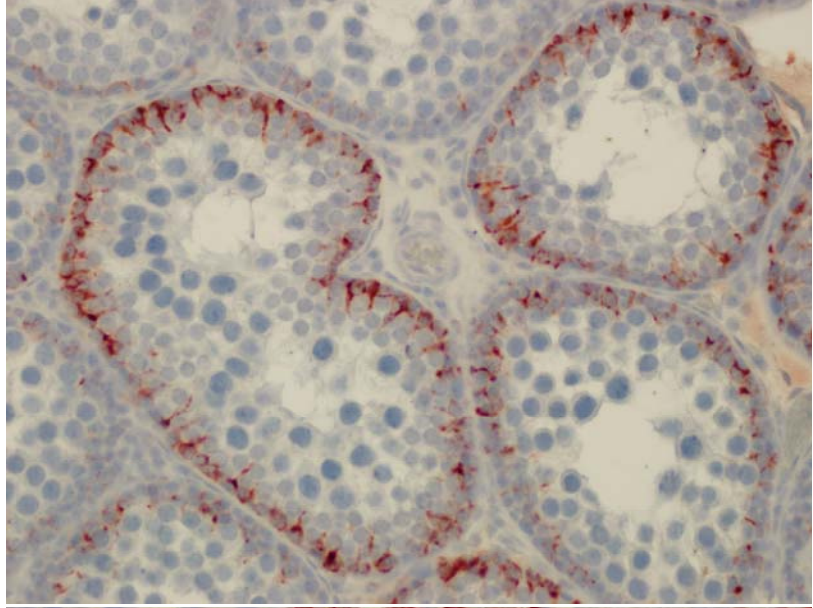
Şekil 4-26: 1. gün sol kriptorşid testis kesitinde vimentin boyaması. x400



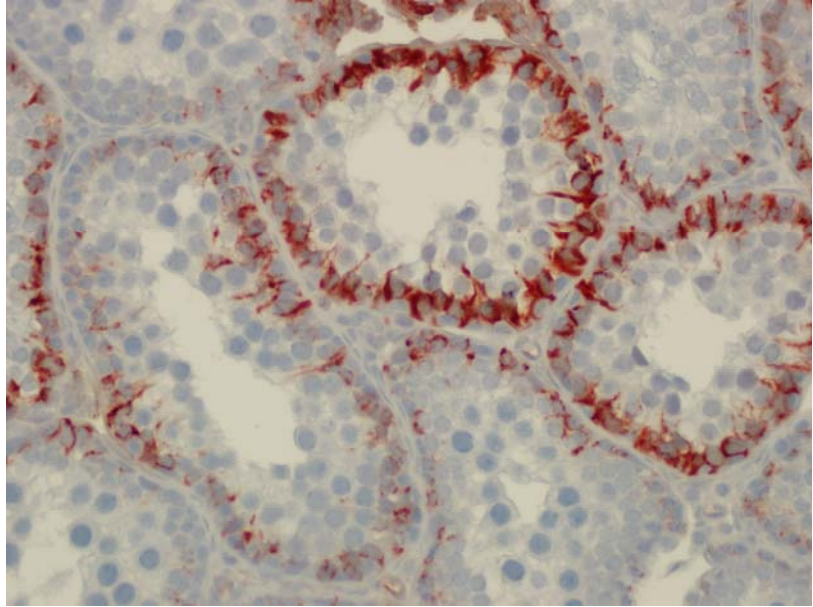
Şekil 4-27: 1. gün sağ skrotal testis kesitinde vimentin boyaması. x400



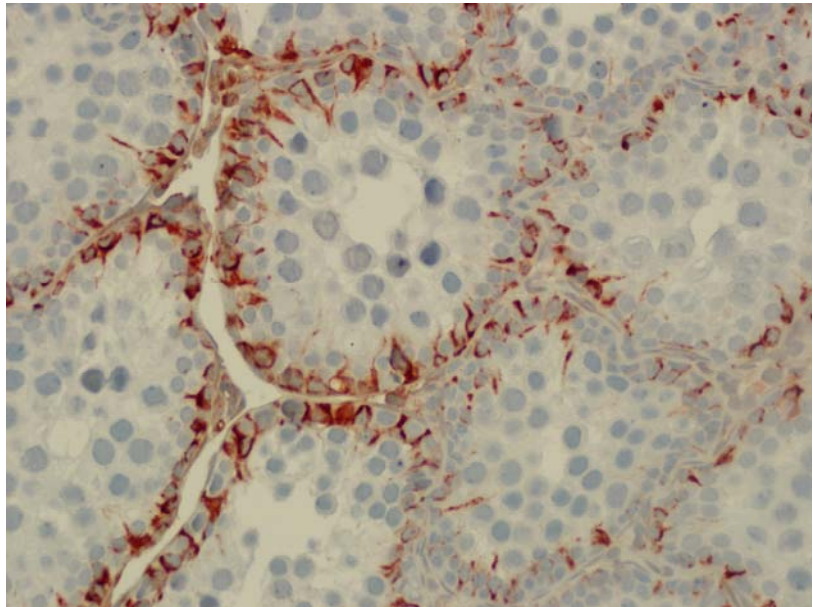
Şekil 4-28: 3. gün kontrol grubu testis kesitinde vimentin boyaması. x400



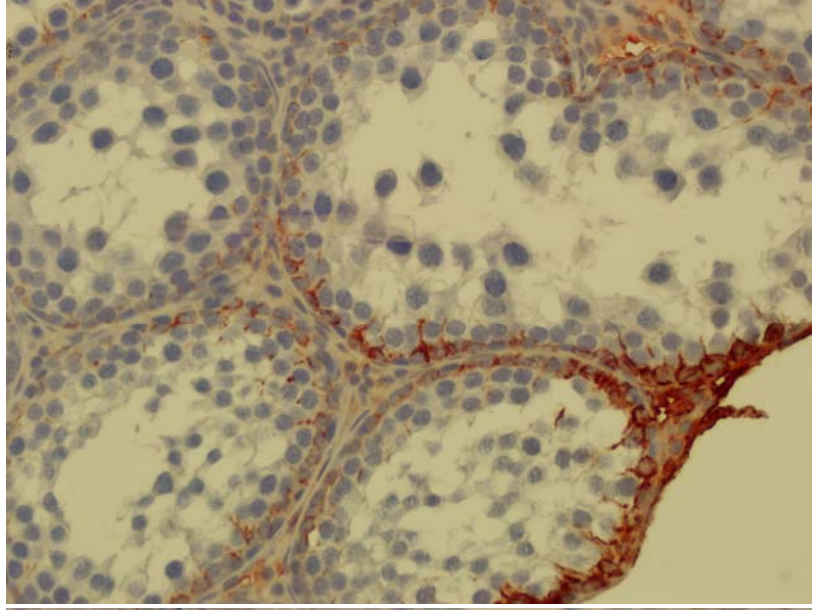
Şekil 4-29: 3. gün sol kriptorşid testis kesitinde vimentin boyaması. x400



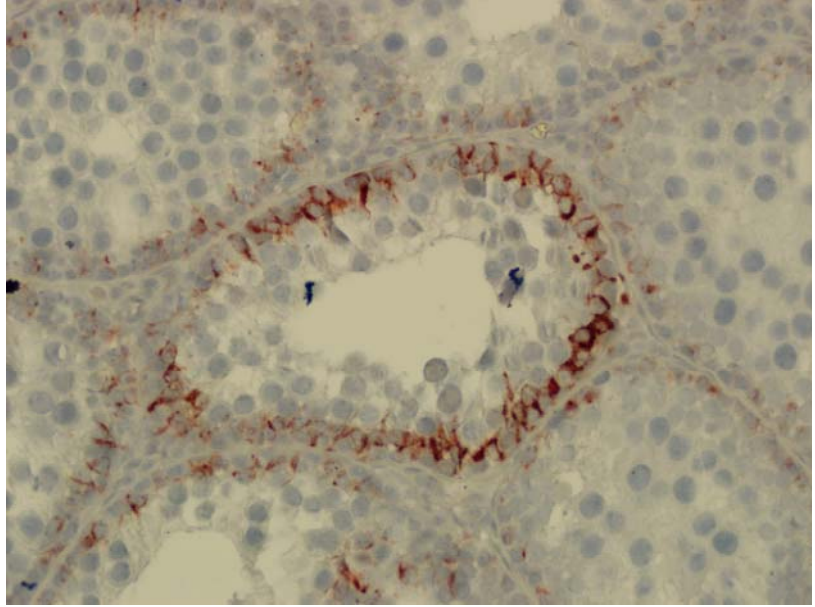
Şekil 4-30: 3. gün sağ skrotal testis kesitinde vimentin boyaması. x400



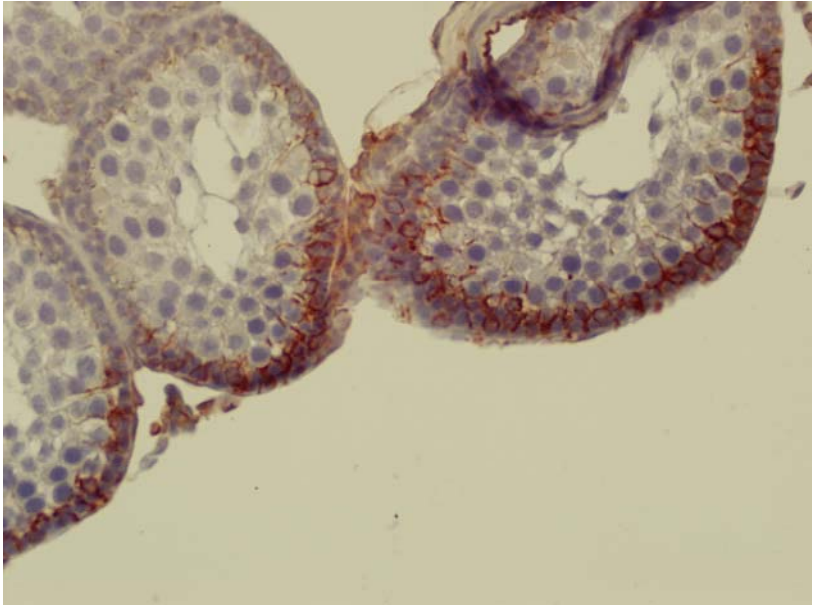
Şekil 4-31: 7. gün kontrol grubu testis kesitinde vimentin boyaması. x400



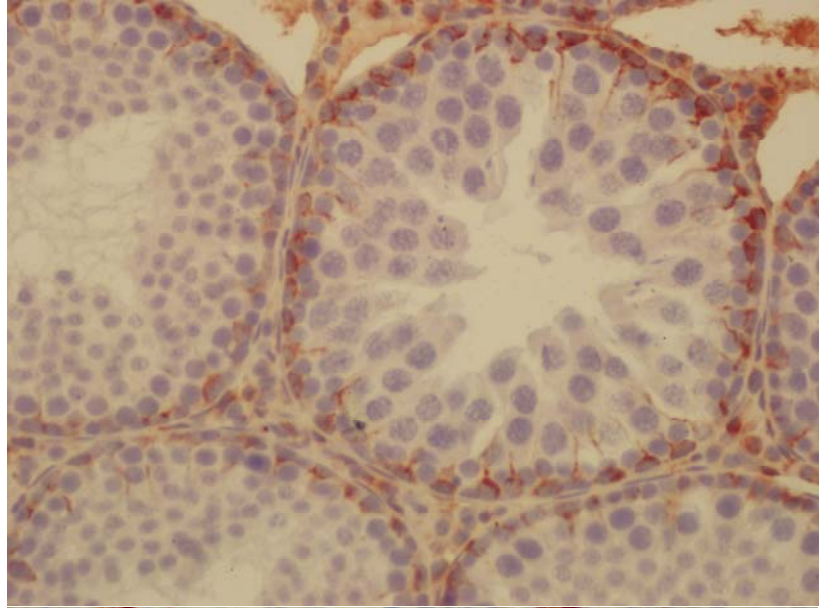
Şekil 4-32: 7. gün sol kriptorşid testis kesitinde vimentin boyaması. x400



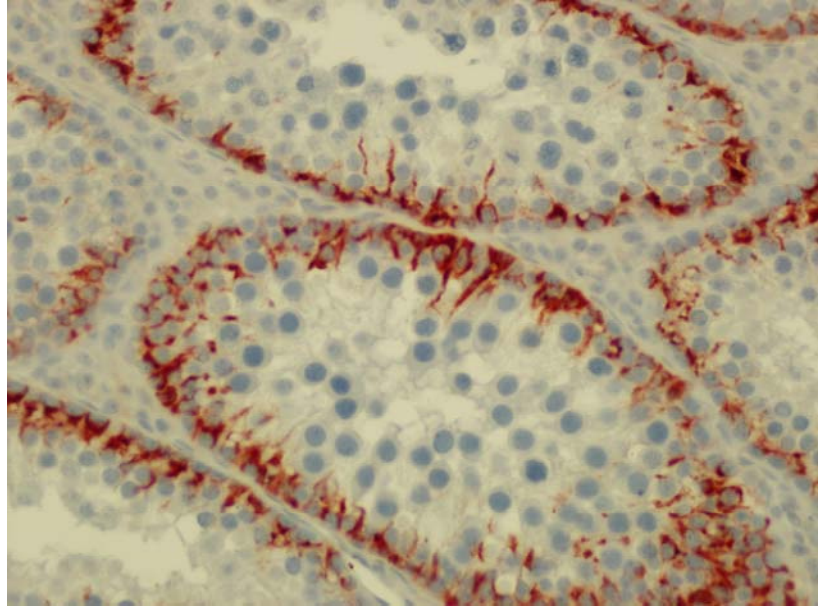
Şekil 4-33: 7. gün sağ skrotal testis kesitinde vimentin boyaması. x400



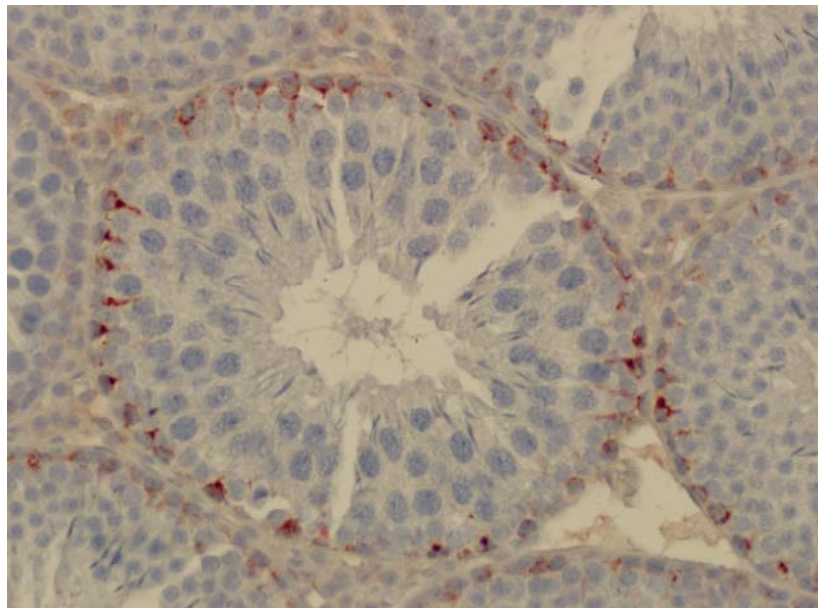
Şekil 4-34: 14. gün kontrol grubu testis kesitinde vimentin boyaması. x400



Şekil 4-35: 14. gün sol kriptorşid testis kesitinde vimentin boyaması. x400



Şekil 4-36: 14. gün sağ skrotal testis kesitinde vimentin boyaması. x400



4.3.3. Koneksin 43

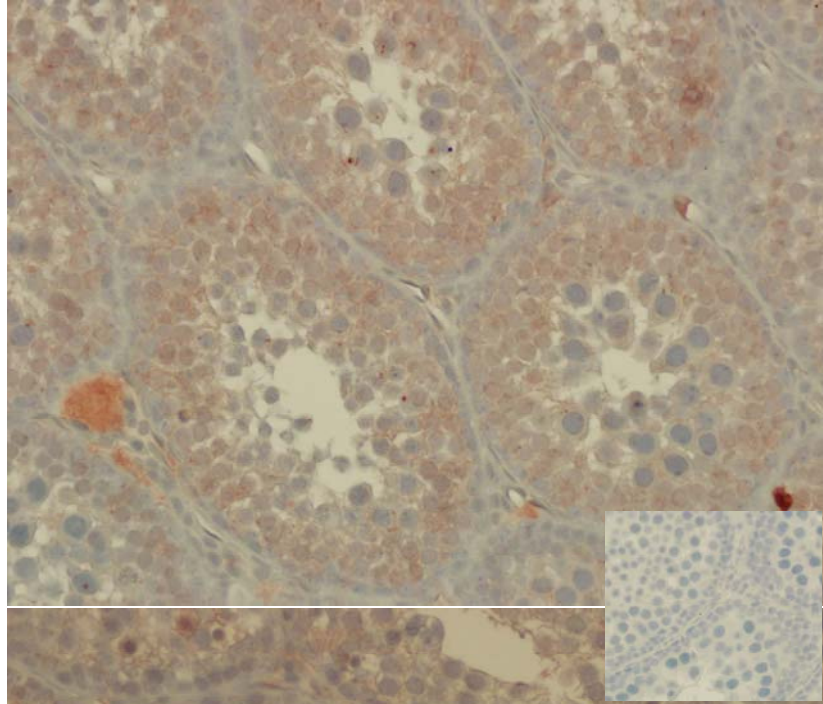
Koneksin 43 antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyama neticesinde elde edilen kesitlerin değerlendirilmesi sonucunda;

1., 3., 7. ve 14. gün kontrol grubu hayvanlarında koneksin 43 immün-reaktivitesinin, seminifer tübüllerin bazal bölümünde, Sertoli hücrelerinin KTB hizasında yoğunlaşmakla birlikte tübüller boyunca zayıf şiddette yaygın olduğu görülmektedir (Şekil 4-37, 4-40, 4-43, 4-46).

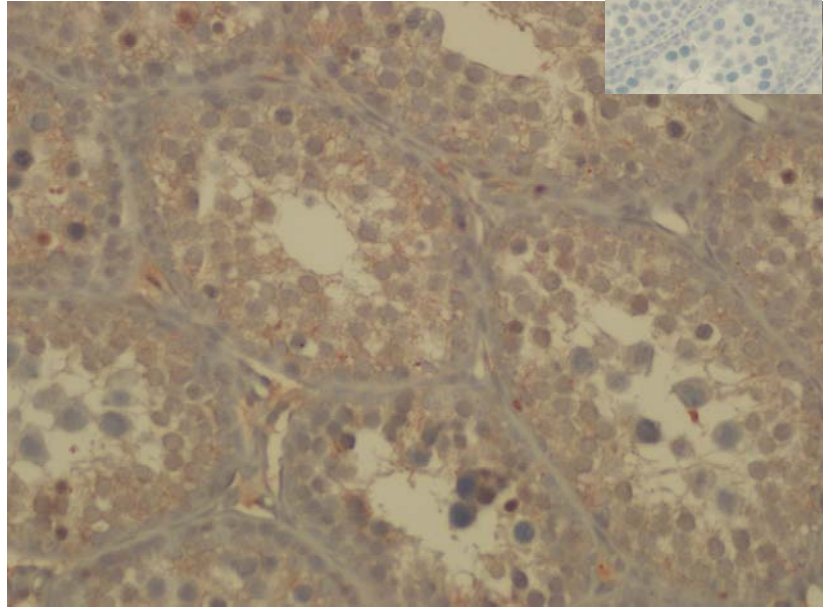
1., 3., 7. ve 14. gün deney grubu hayvanların sol kriptorşid testis kesitlerinde immün-reaktivitenin yoğunluğunun seminifer tübüllerin bazal bölümünde, Sertoli hücrelerinin KTB hizasında azaldığı, daha çok zayıf olarak boyandığı apikal bölgelerde varlığını devam ettirdiği görülmüştür (Şekil 4-38, 4-41, 4-44, 4-47).

1., 3., 7. ve 14. gün deney grubu hayvanların sağ skrotal testis kesitlerinde immün-reaktivitenin kontrol grubuna benzer şekilde seminifer tübüllerin bazal bölümünde yoğunlaşmakla birlikte seminifer tübüller boyunca zayıf şiddette yaygın olduğu görülmektedir (Şekil 4-39, 4-42, 4-45, 4-48).

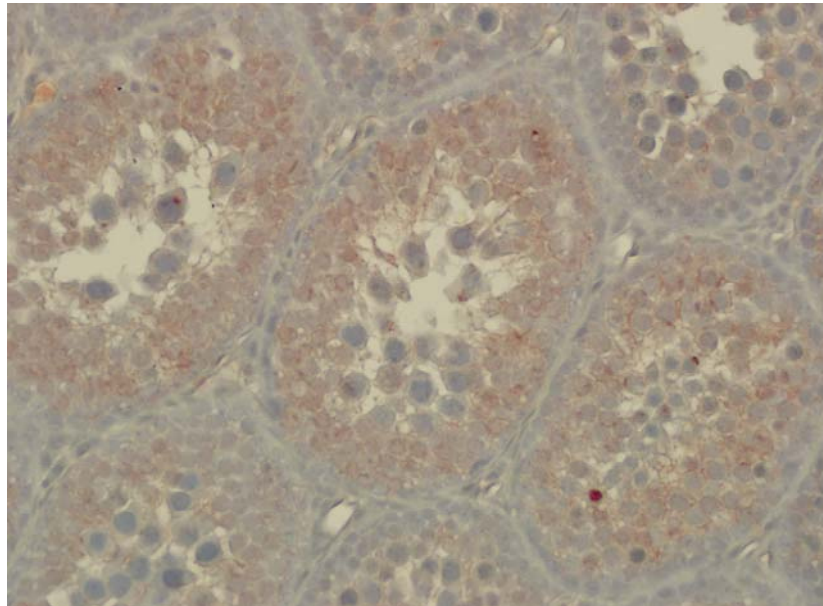
Şekil 4-37: 1. gün kontrol grubu testis kesitinde koneksin boyaması ve sağ altta negatif kontrolü. x400



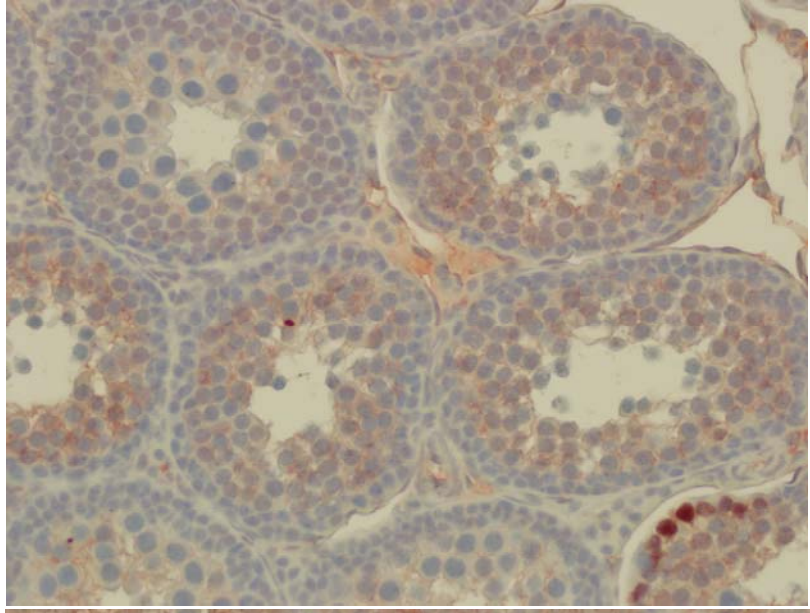
Şekil 4-38: 1. gün sol kriptorşid testis kesitinde koneksin boyaması. x400



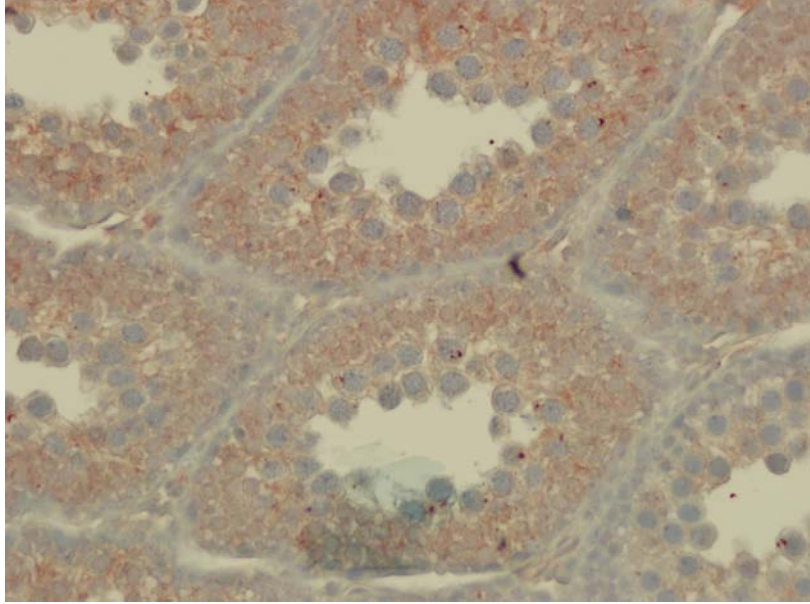
Şekil 4-39: 1. gün sağ skrotal testis kesitinde koneksin boyaması. x400



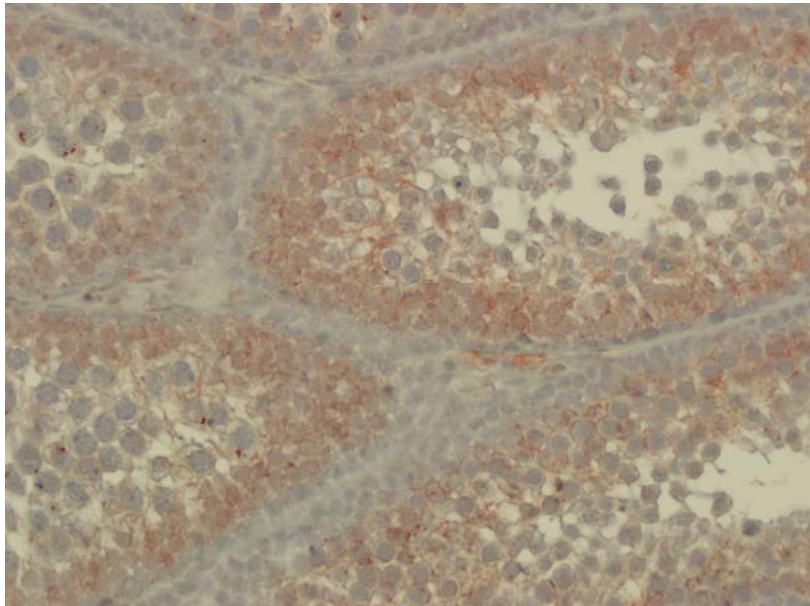
Şekil 4-40: 3. gün kontrol grubu testis kesitinde koneksin boyaması. x400



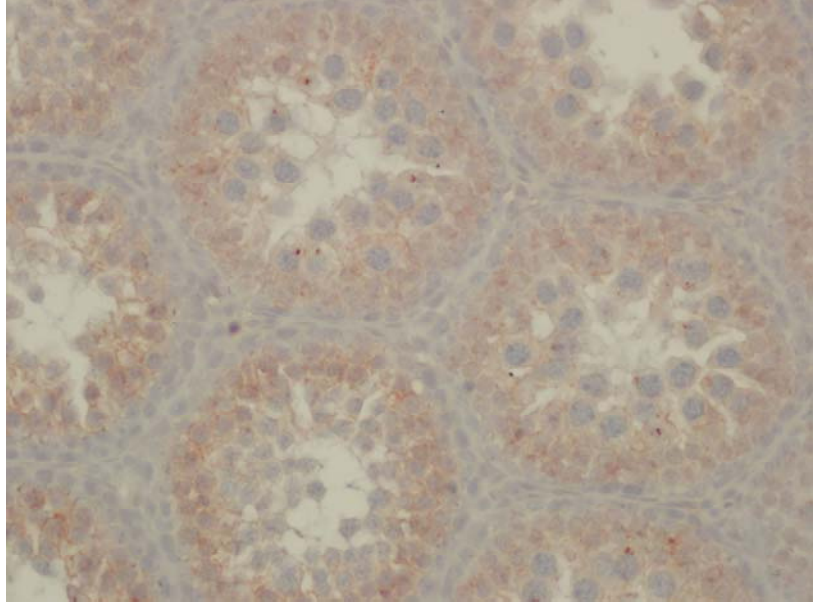
Şekil 4-41: 3. gün sol kriptorşid testis kesitinde koneksin boyaması. x400



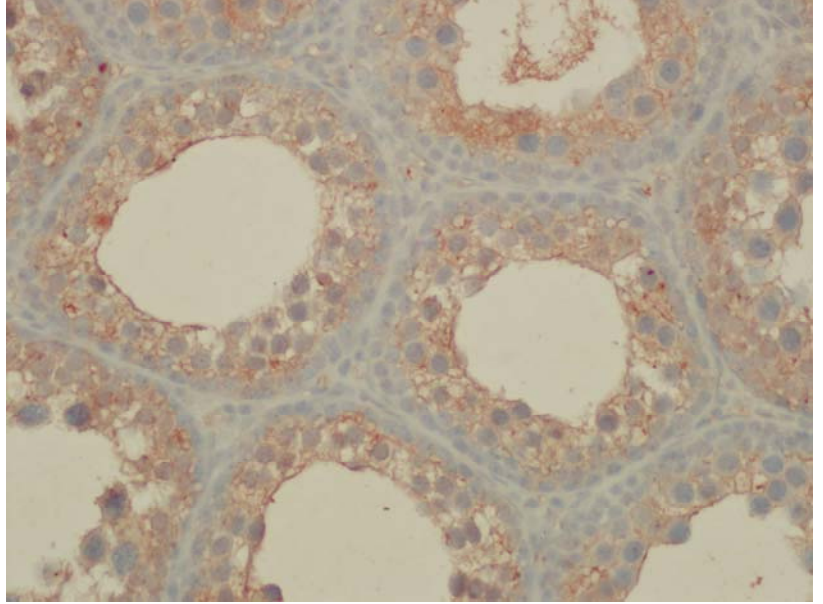
Şekil 4-42: 3. gün sağ skrotal testis kesitinde koneksin boyaması. x400



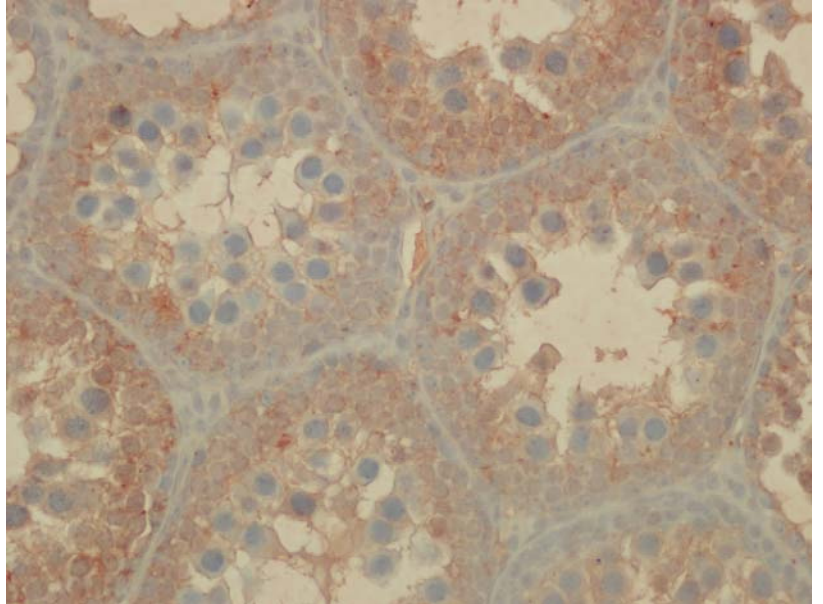
Şekil 4-43: 7. gün kontrol grubu testis kesitinde koneksin boyaması. x400



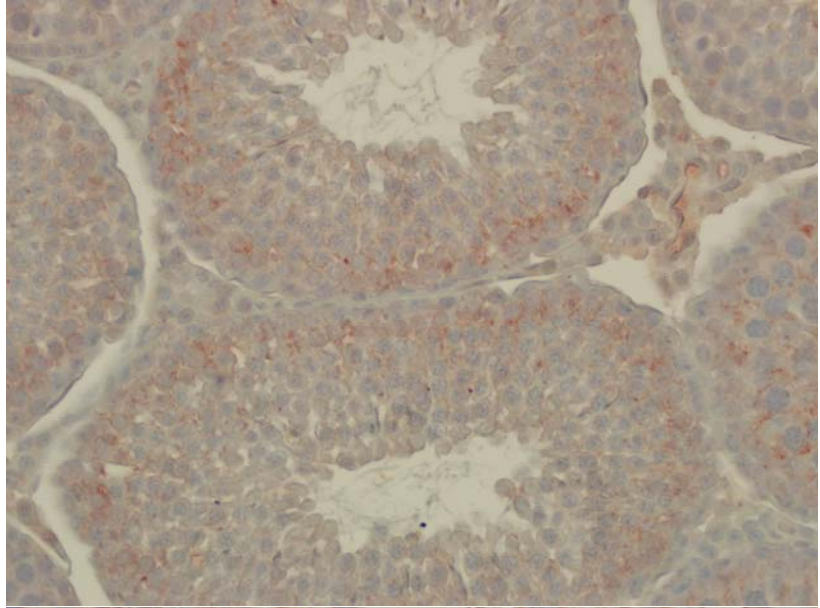
Şekil 4-44: 7. gün sol kriptorşid testis kesitinde koneksin boyaması. x400



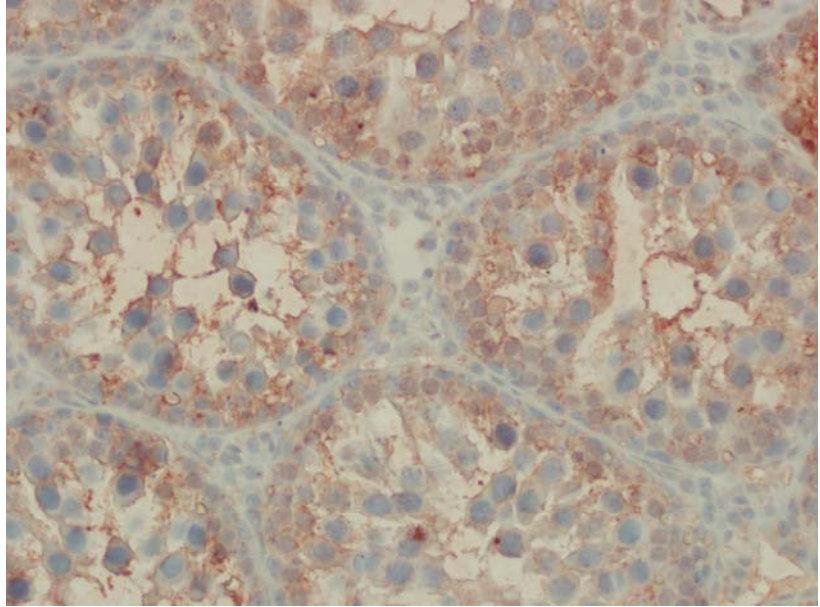
Şekil 4-45: 7. gün sağ skrotal testis kesitinde koneksin boyaması. x400



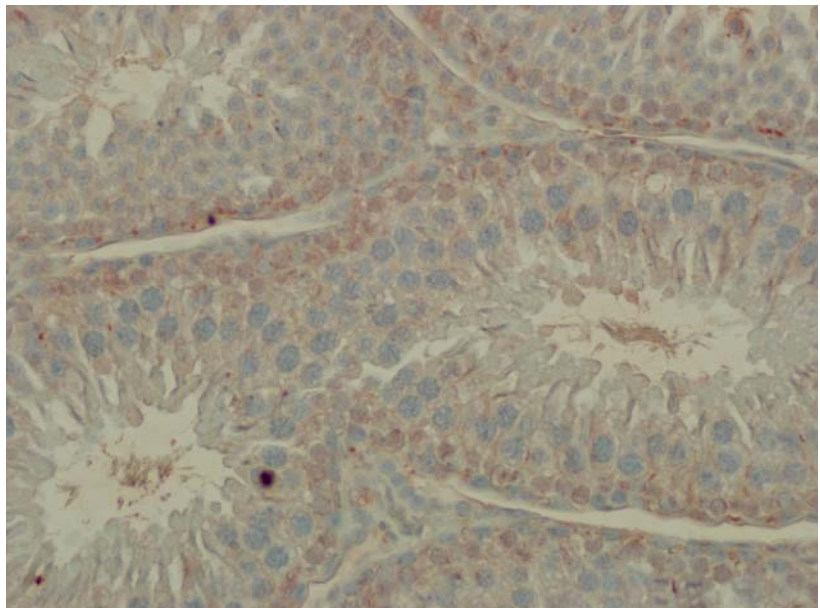
Şekil 4-46: 14. gün kontrol grubu testis kesitinde koneksin boyaması. x400



Şekil 4-47: 14. gün sol kriptorşid testis kesitinde koneksin boyaması. x400



Şekil 4-48: 14. gün sağ skrotal testis kesitinde koneksin boyaması. x400



4.4. Geçirimli Elektron Mikroskobu Bulguları

4.4.1. Birinci Gün Bulguları

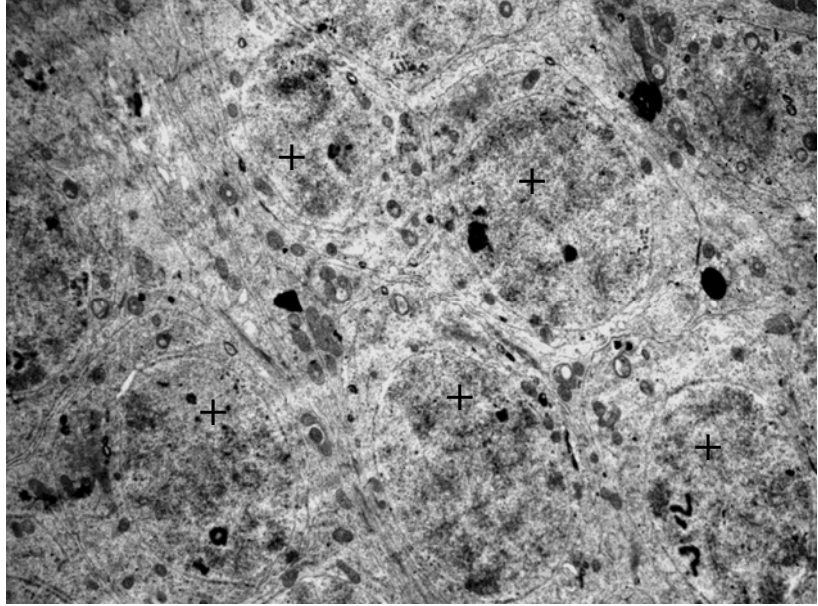
Deney grubu hayvanların sol kriptorşid testis kesitlerinde Sertoli hücrelerinde bazı alanlarda dejenerasyon mevcuttu. Dejeneratif alanlar, lipid damlacıkları (Şekil 4-51, 4-52), membranla çevrelenmiş sitoplazmik yapılar (Şekil 4-53), sitoplazmik temel maddede azalma (Şekil 4-53) ve vakuollenmelerle (Şekil 4-52, 4-53) kendini gösteriyordu.

Deney grubu hayvanların sol kriptorşid testis kesitlerinde elektron-opak lanthan moleküllerinin Sertoli hücreleri arasına sızdıkları görüldü (Şekil 4-54).

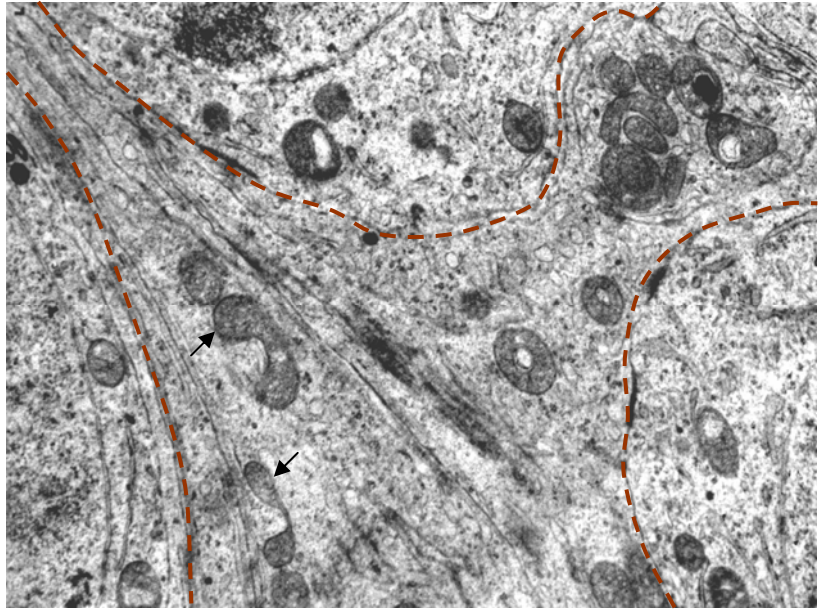
Bazı alanlarda Sertoli hücreleri ile germ hücrelerinin birbirinden ayrılmalar gösterdikleri (Şekil 4-52), bazı alanlarda ise Sertoli hücreleri arası alanın dilate olduğu (Şekil 4-52, 4-54) gözlemlendi.

Endoplazmik retikulum sisternalarının hücre içi dağılımlarının bozulduğu ve bazı alanlarda düzensiz ER öbeklerinin olduğu, bazı alanlarda ise sisternalarda dilatasyon olduğu (Şekil 4-53) gözlemlendi.

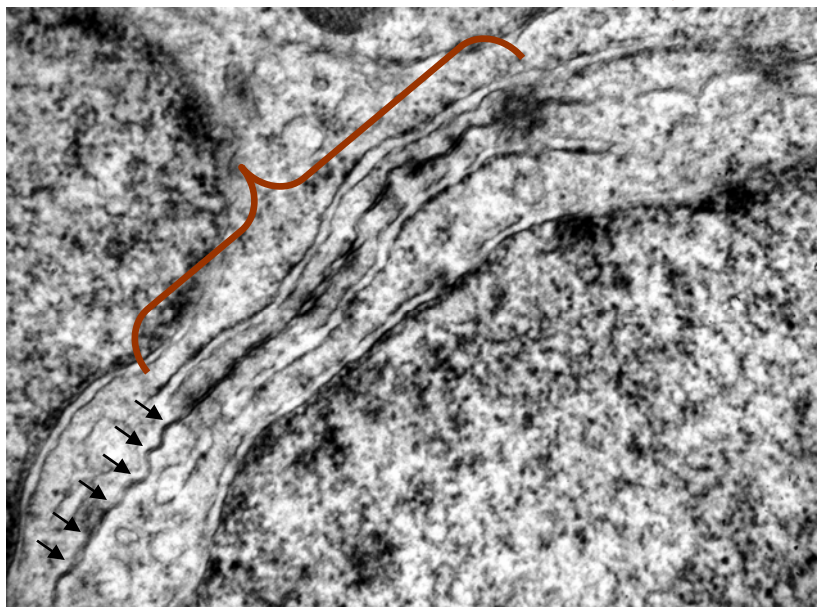
Şekil 4-49: 1. gün kontrol grubu testiste seminifer tübül duvarından genel görünüm. (+): spermatositler X5000



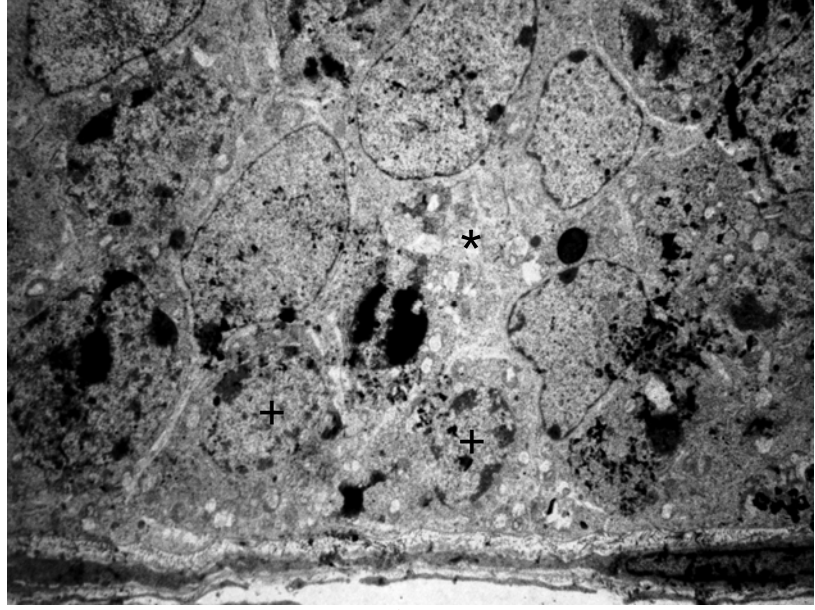
Şekil 4-50: 1 gün kontrol grubu seminifer tübül duvarında germ hücreleri arasında yer alan Sertoli hücresi sitoplazması (kesikli çizgi içinde kalan alan). (oklar): mikrotübüllerle ilişki halindeki mitokondriler. x15K



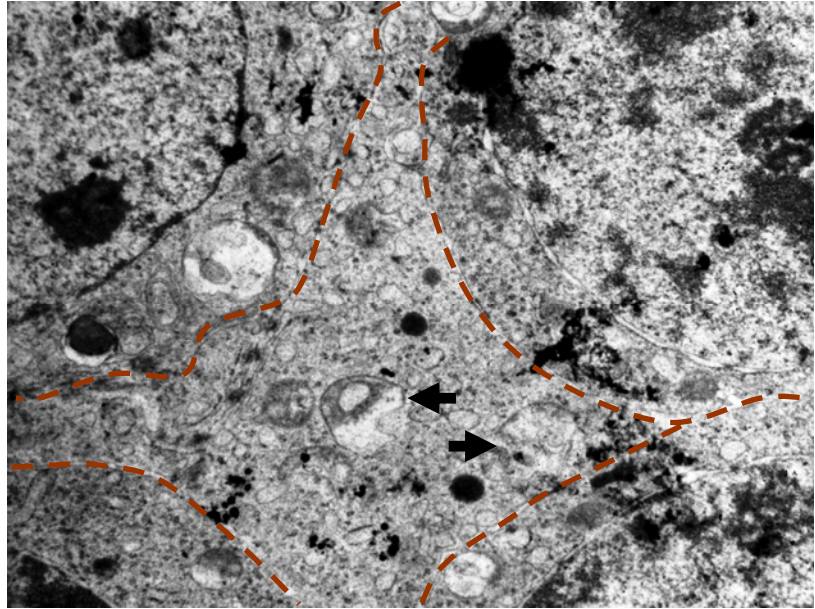
Şekil 4-51: 1 gün kontrol grubunda Sertoli hücresi bazal ektoplazmik özelleşme ({} ve sıkı bağlantı (oklar) kompleksleri x50K



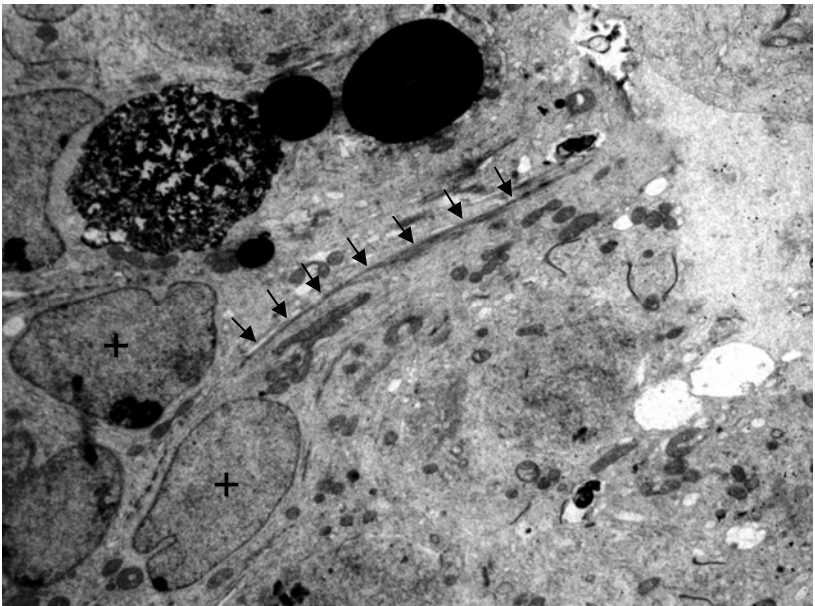
Şekil 4-52: 1 gün sol kriptorşid testiste seminifer tübül duvarından genel görünüm; dejeneratif Sertoli hücresi sitoplazması (*), Sertoli hücrelerinden ayrılan germ hücreleri (+).
x5000



Şekil 4-53: 1 gün sol kriptorşid testiste germ hücreleri arasında yer alan Sertoli hücresi sitoplazması (kesikli çizgi içinde kalan alan). (oklar): dejenere mitokondriler.
x15K



Şekil 4-54: 1 gün sol kriptorşid testiste lanthan sızmış hücrelerarası alan (oklar). Sertoli hücresi çekirdekleri (+).
x2500



4.4.2. Üçüncü Gün Bulguları

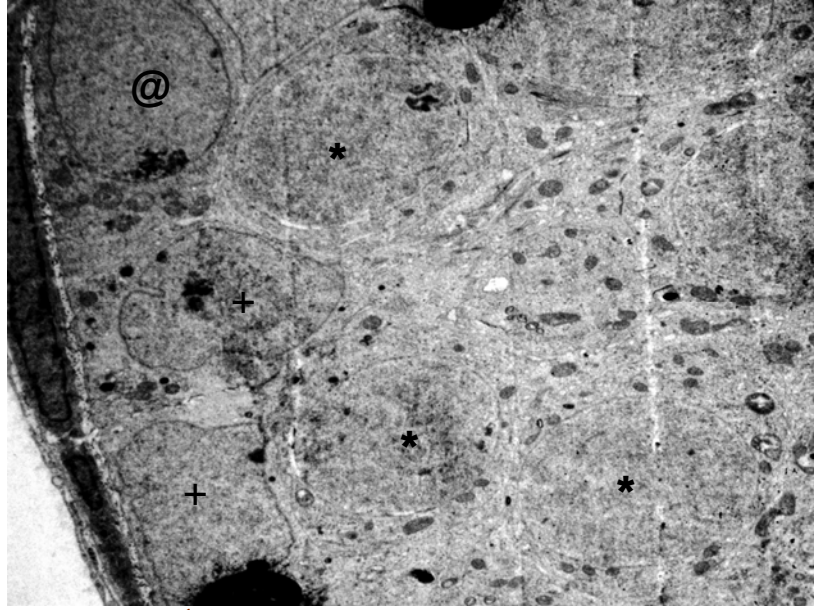
Sertoli hücrelerinde bazı alanlarda dejenerasyon mevcuttu. Dejeneratif alanlar, lipid damlacıkları (Şekil 4-58, 4-60), vakuoller (Şekil 4-58, 4-60), membranla çevrelenmiş sitoplazmik yapılar, sitoplazmik temel maddede azalma şeklinde (Şekil 4-58, 4-59, 4-60) kendini gösteriyordu.

Deney grubu hayvanların sol kriptorşid testis kesitlerinde elektron-opak lanthan moleküllerinin Sertoli hücreleri arasına sızdıkları görüldü (Şekil 4-58).

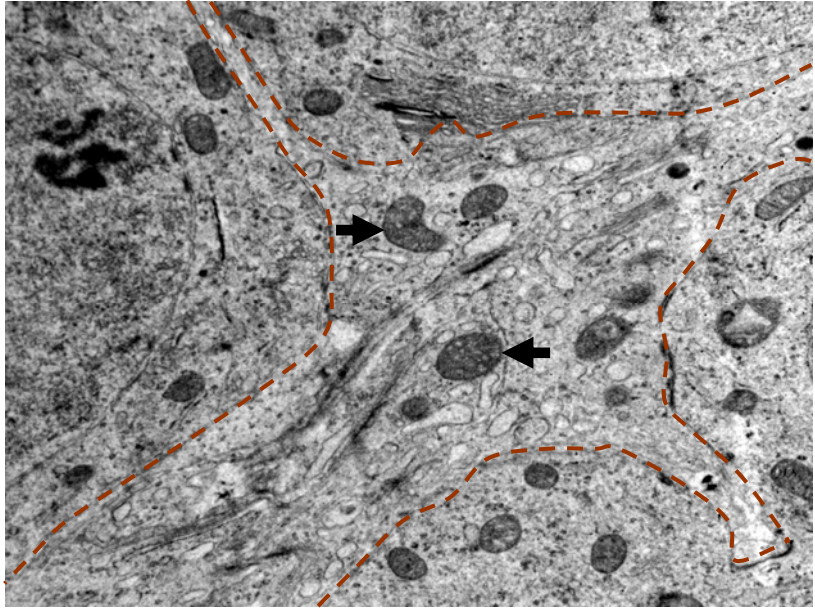
Bazı alanlarda Sertoli hücreleri ile germ hücrelerinin birbirinden ayrılmalar gösterdikleri, bazı alanlarda ise Sertoli hücreleri arası alanın dilate olduğu, membranların birbirlerinden ayrıldıkları (Şekil 4-59, 4-60) gözlemlendi.

Mikrotübül yapılarının Sertoli hücrelerinin özellikle apikal kısımlarında dezorganize olduğu görüldü. Endoplazmik retikulum sisternalarında dejenerasyon gözlenmezken, ER sisternalarının hücre içi dağılımlarının bozulduğu ve bazı alanlarda düzensiz ER öbeklerinin oluştuğu (Şekil 4-58) gözlemlendi.

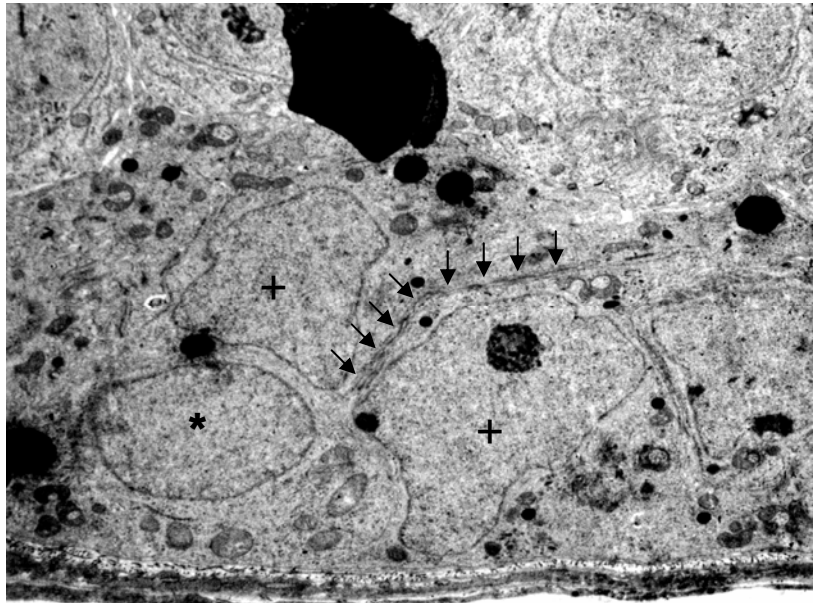
Şekil 4-55: 3. gün kontrol grubu testiste seminifer tübül duvarından genel görünüm. (+): Sertoli hücresi çekirdekleri. (@): spermatogonyum. (*): spermatositler. X5000



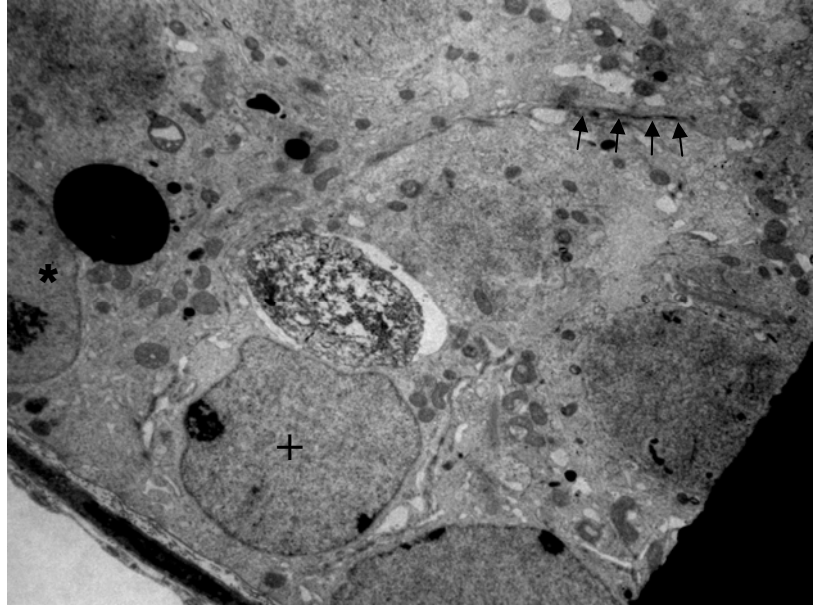
Şekil 4-56: 3. gün kontrol grubu seminifer tübül duvarında germ hücreleri arasında yer alan Sertoli hücresi sitoplazması (kesikli çizgi içinde kalan alan). (oklar): mitokondriler x15K



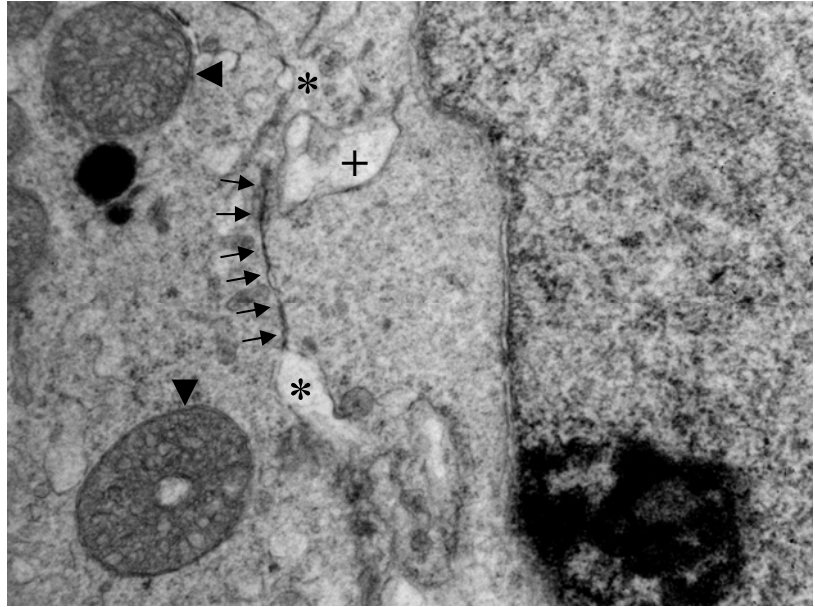
Şekil 4-57: 3. gün kontrol grubu seminifer tübül duvarında bazal bölümde Sertoli hücreleri arasındaki normal görümlü bağlantı kompleksi (oklar). (+): Sertoli hücresi çekirdekleri. (*): spermatogonyum x5000



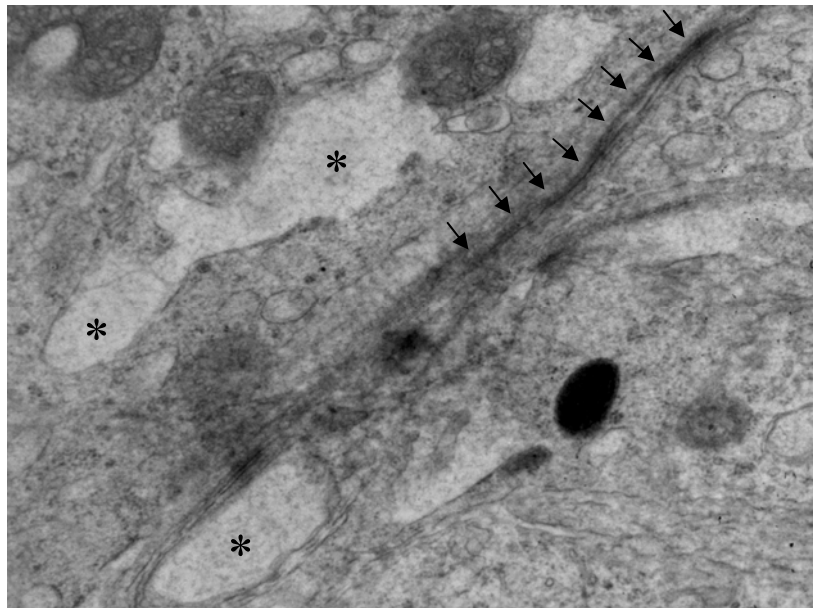
Şekil 4-58: 3. gün sol kriptorşid testiste seminifer tübül duvarından genel görünüm ve lanthan sızmış hücrelerarası alan (oklar). (+): Sertoli hücresi çekirdeği. (*): spermatogonyum x5000



Şekil 4-59: 3 gün sol kriptorşid testiste seminifer tübülün bazal kısmında sıkı bağlantı kompleksinde (oklar) dejenerasyon ve açılmalarla (*), Sertoli hücresinde vakuoller (+). (ok başları): mitokondriler x30K



Şekil 4-60: 3 gün sol kriptorşid testiste lanthan sızmış hücreler arası alan (oklar) ve Sertoli hücresinde vakuollenmeler (*). x30K



4.4.3. Yedinci Gün Bulguları

Kriptorşid testislerde Sertoli hücrelerinde bazı alanlarda dejenerasyon mevcuttu. Dejeneratif alanlar, lipid damlacıkları, sitoplazmada geniş alanlarda nekrotik belirtiler ve vakuoller şeklinde kendini gösteriyordu (Şekil 4-68, 4-69). Bazı alanlarda membranla çevrelenmiş sitoplazmik yapıların varlığı gözlemlendi (Şekil 4-69)

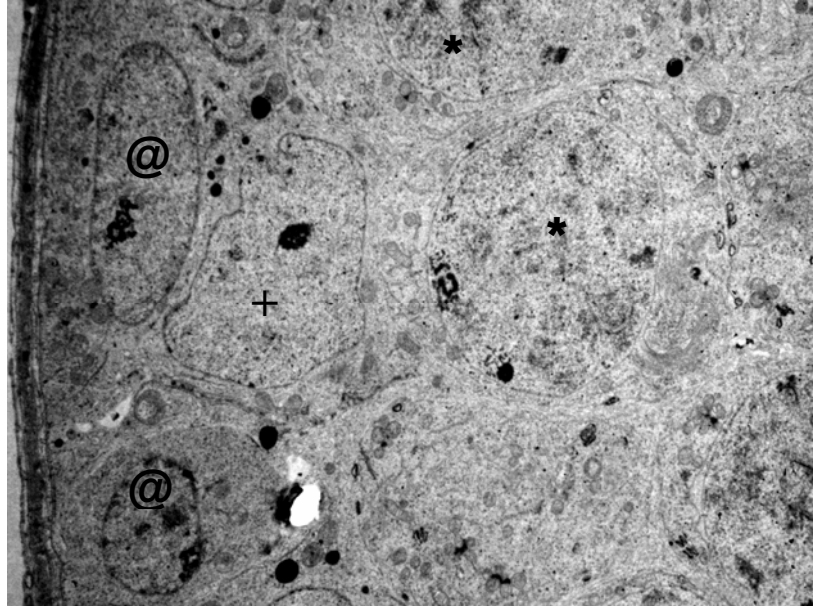
Deney grubu hayvanların sol kriptorşid testis kesitlerinde elektron-opak lanthan moleküllerinin Sertoli hücreleri arasına sızdıkları görüldü (Şekil 4-64).

Ektoplazmik özelleşme bağlantılarının bütünlüğünü ve bunlara bağlanan aktin filamanlarının varlığını koruduğu görüldü (Şekil 4-66). Ancak kontrol grubu testislerinin ektoplazmik özelleşme bağlantı kompleksleri (Şekil 4-63) ile kıyaslandığında, sol kriptorşid testis ektoplazmik özelleşme bağlantı komplekslerinde (Şekil 4-66) bunlara bağlanan aktin filaman yoğunluğunun azaldığı, bağlantı kompleksine eşlik eden ER sisternalarının devamlılığının bozulduğu ve bazı yerlerinde dilate olduğu gözlemlendi. Bazı alanlarda ektoplazmik özelleşme bağlantı komplekslerinde ayrışma ve vakuollenme görüldü (Şekil 4-67). Bazı sitoplazma alanlarında ise bağlantı komplekslerinin oluşturduğu anormal yapılar gözlemlendi (Şekil 4-68)

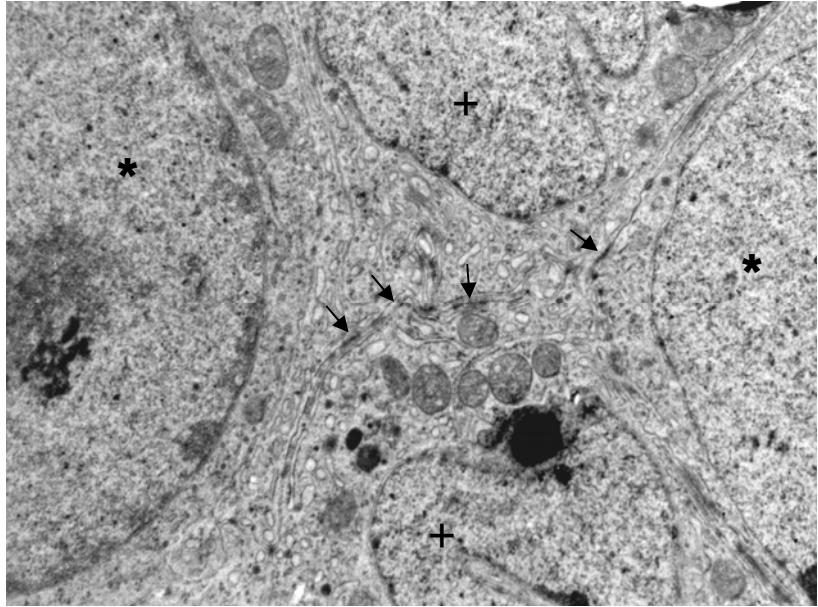
Bazı alanlarda Sertoli hücreleri ile germ hücrelerinin arasında açılmalarla birlikte, Sertoli hücreleri arası alanın da dilate olduğu gözlemlendi (Şekil 4-65).

Mikrotübül yapılarının Sertoli hücrelerinin özellikle apikal kısımlarında dezorganize olduğu görüldü (Şekil 4-64).

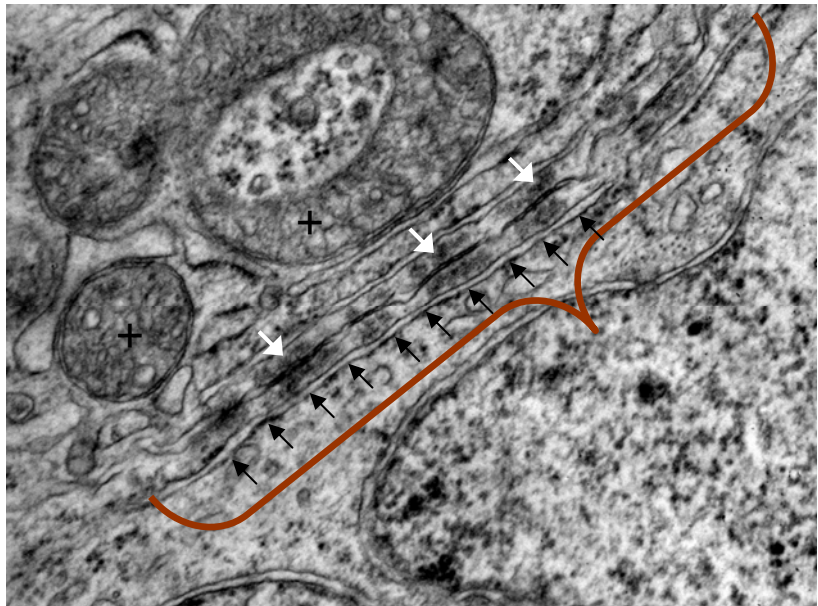
Şekil 4-61: 7. gün kontrol grubu testiste seminifer tübül duvarından genel görünüm. (+): Sertoli hücresi çekirdeği. (@): spermatogonyumlar (*): spermatositler. x5000



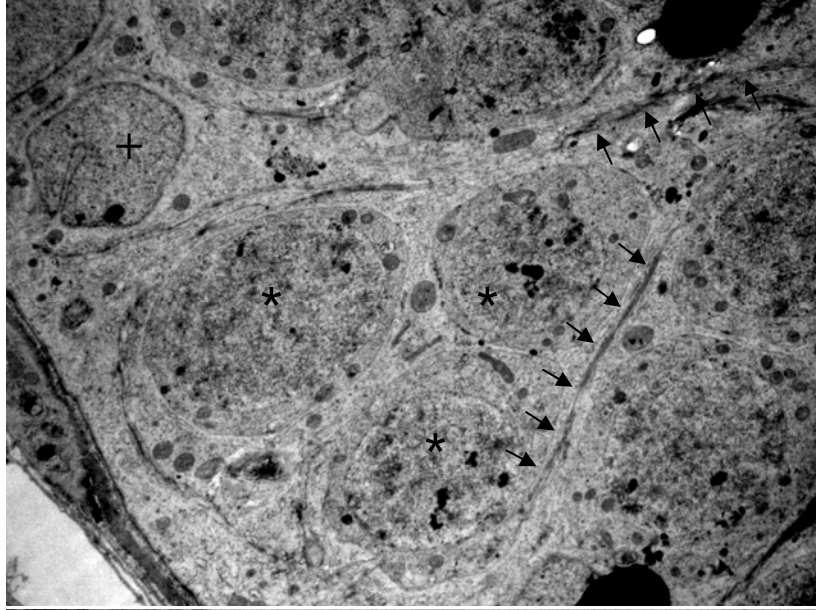
Şekil 4-62: 7 gün kontrol grubu germ hücreleri arasındaki normal görünümlü Sertoli hücresi sitoplazması ve bağlantı kompleksi (oklar). (+): Sertoli hücresi çekirdeği. (*): spermatositler x12K



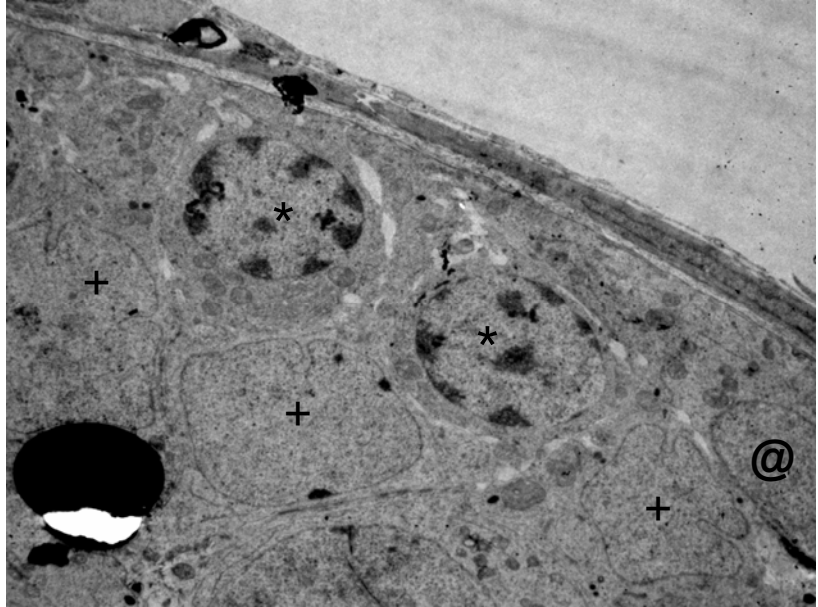
Şekil 4-63: 7. gün kontrol grubu bazal ektoplazmik özelleşme bağlantısında (f) aktin filamanlar (beyaz oklar) ve DER sisternaları (siyah oklar). (+): mitokondriler x50K



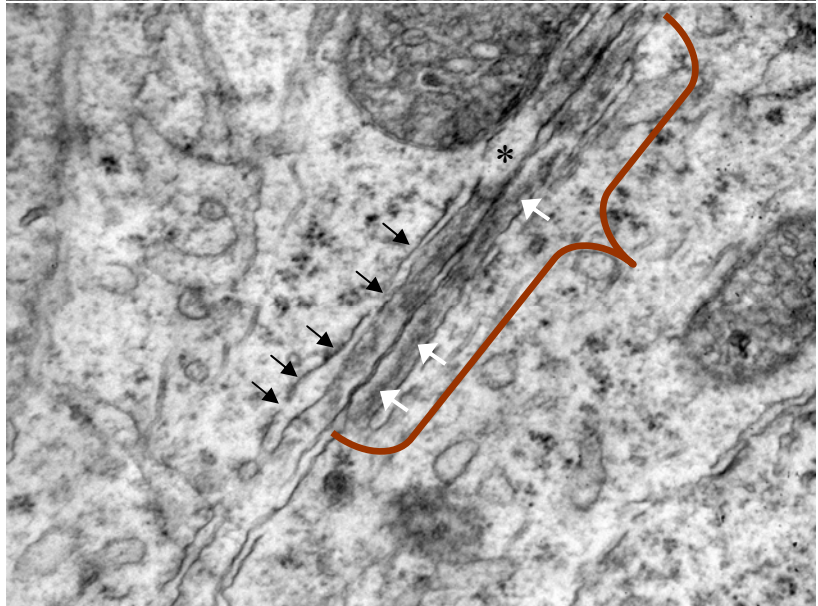
Şekil 4-64: 7 gün sol kriptorşid testiste seminifer tübülün bazal kısmında lanthan sızmış hücreler arası alanlar (oklar). (+): Sertoli hücresi çekirdeği. (*): spermatositler x5000



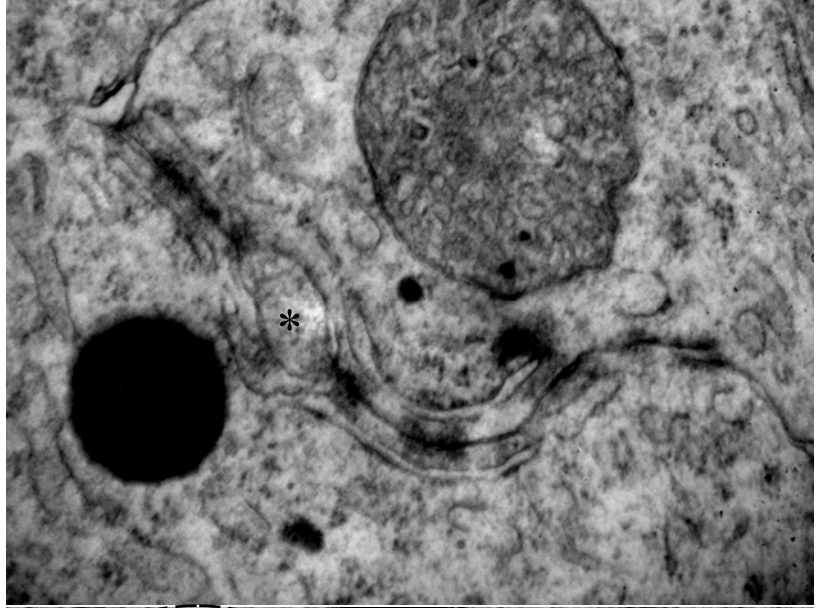
Şekil 4-65: 7. gün sol kriptorşid testiste seminifer tübül bazalinde Sertoli hücrelerinden ayrılmış tipB (*) spermatogonyumlar. (+): Sertoli hücresi çekirdekleri. (@): tipA spermatogonyum x5000



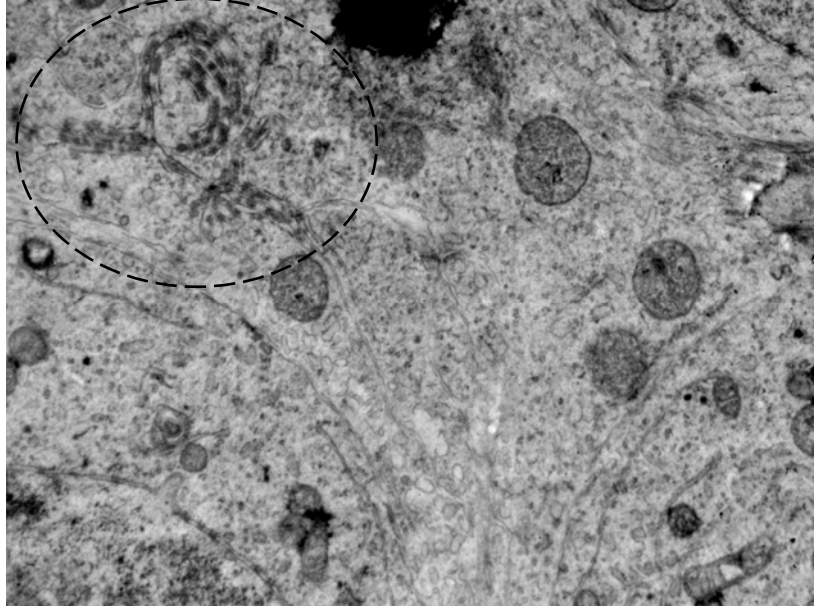
Şekil 4-66: 7. gün sol kriptorşid testiste bazal ektoplazmik özelleşme bağlantısında (f) dejenere alan (*), ER sisternaları (siyah oklar) ve aktin filamanları(beyaz oklar). x50K



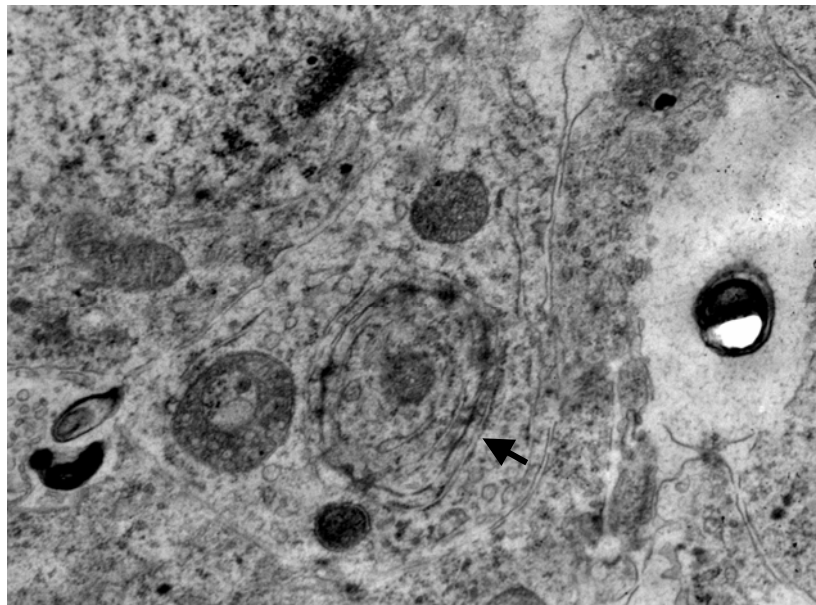
Şekil 4-67: 7. gün sol kriptorşid testiste Sertoli hücreleri arasındaki bazal ektoplazmik özelleşmelerde meydana gelen ayrılma (*). x50K



Şekil 4-68: 7. gün sol kriptorşid testiste Sertoli hücreleri bağlantı kompleksinde meydana gelen dejenerasyon (kesikli çizgi içinde). x15K



Şekil 4-69: 7. gün sol kriptorşid testiste Sertoli hücreleri bağlantı kompleksinde meydana gelen dejenerasyon (ok). x25K



4.4.4. Ondördüncü Gün Bulguları

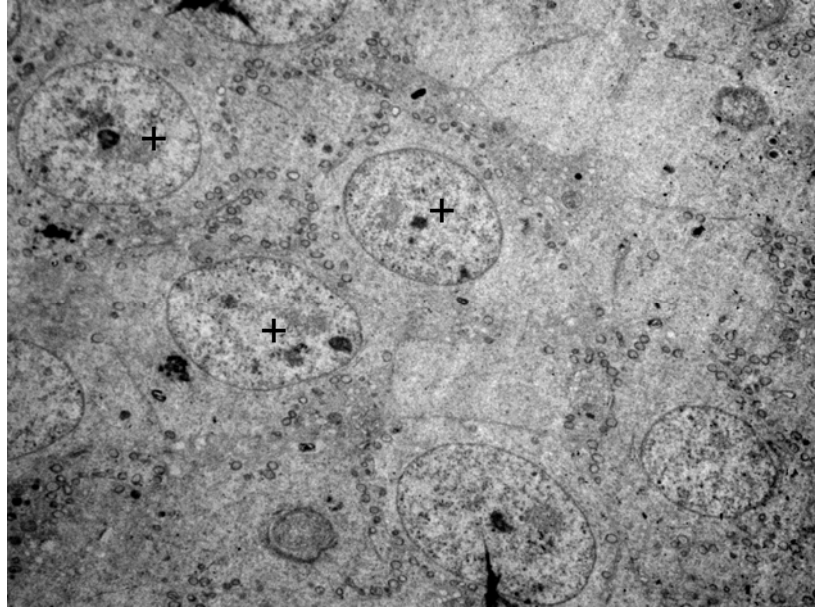
Seminifer tübüllerde yaygın dejenerasyon mevcuttu (Şekil 4-73, 4-74, 4-76, 4-85). Tübül duvarındaki dejeneratif alanlarda büyük vakuoller (Şekil 4-73, 4-74, 4-75) geniş lipid damlacıkları (Şekil 4-75), membranla çevrelenmiş sitoplazmik yapılar (Şekil 4-78, 4-), miyelin benzeri görünümde membransı yapılan (Şekil 4-79), multivesiküler cisimcikler (Şekil 4-80) sitoplazmik temel maddede azalma (Şekil 4-79), apikal kısımlarda parçalanmış sitoplazmik uzantılar (Şekil 4-81) şeklinde kendini gösteriyordu. Bazı alanlarda Sertoli hücresi çekirdeğinde uzama görüldü (Şekil 4-75).

KTB'ni oluşturan sıkı bağlantılarda ayrılmalar ve dilatasyonlar mevcuttu (Şekil 4-82, 4-83). Bunun sonucu olarak sol kriptorşid testis kesitlerinde elektron-opak lanthan moleküllerinin Sertoli hücreleri arasına sızdıkları görüldü (Şekil 4-85, 4-86). Ektoplazmik özelleşmeler bağlantı komplekslerinde etraflarındaki ER sisternalarının bazı bölgelerinde kaybolduğu, aktin filamanlarının dağıldığı, bunların bulundukları membranlarda dejenerasyonlar bulunduğu görüldü (Şekil 4-84).

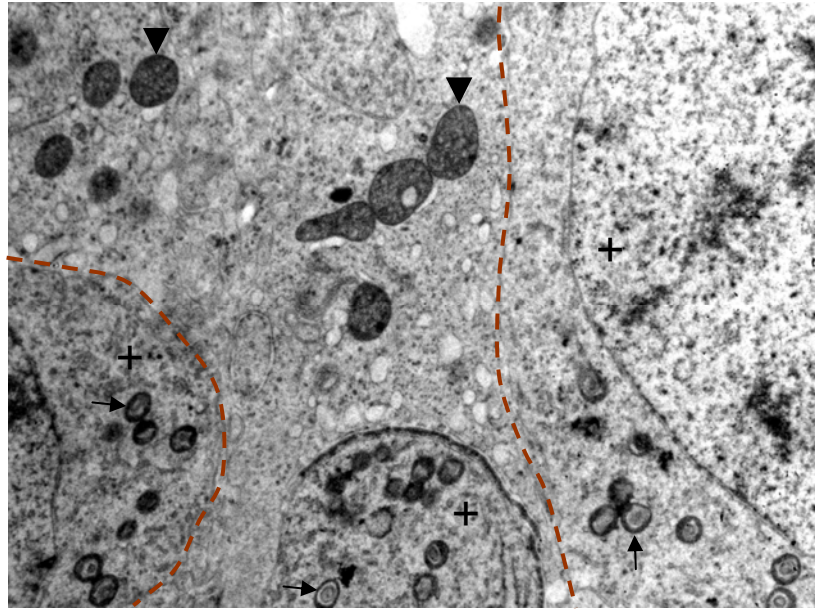
Bazı alanlarda Sertoli hücreleri ile germ hücrelerinin birbirinden ayrılmalar gösterdikleri görüldü (Şekil 4-76, 4-77, 4-78). Gerek Sertoli hücreleri ile germ hücreleri gerekse germ hücrelerinin kendi aralarındaki hücre sınırlarında dilatasyon mevcuttu. Aynı alanlarda Sertoli hücrelerinin de bazal membrandan ayrılmaya başladıkları gözlemlendi (Şekil 4-77). bazı alanlarda ise Sertoli hücreleri arası alanın dilate olduğu (Şekil 4-82, 4-83) gözlemlendi.

Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazmalarında mitokondrilerin yer almadığı, mitokondrilerin daha çok orta kesimlerde yığılmalar gösterdiği görüldü (Şekil 4-85). Mikrotübül yapılarının Sertoli hücrelerinin özellikle apikal kısımlarında dezorganize olduğu görüldü (Şekil 4-85). ER sisternalarının yer yer dilate oldukları (Şekil 4-81, 4-86) ve bazı alanlarda düzensiz ER öbeklerinin olduğu (Şekil 4-79) gözlemlendi.

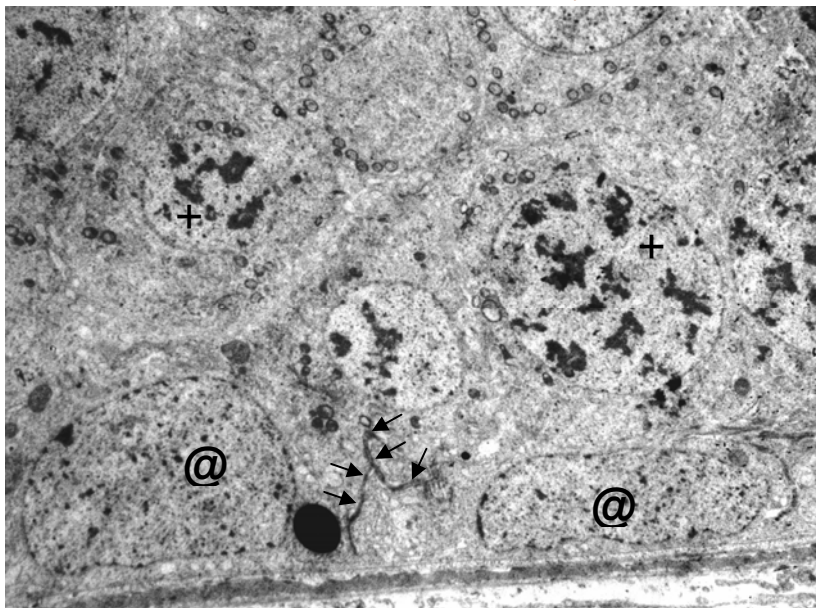
Şekil 4-70: 14. gün kontrol grubu testiste seminifer tübül duvarından genel görünüm. (+): spermatidler x5000



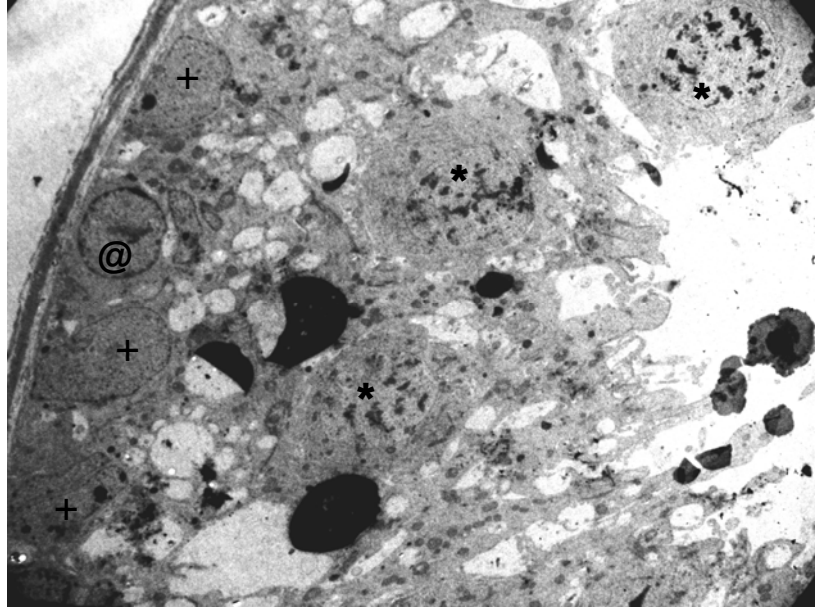
Şekil 4-71: 14. gün kontrol grubu germ hücreleri arasındaki normal görünümlü Sertoli hücresi sitoplazması (kesikli çizgi içinde kalan alan). (+):spermatidler. (Oklar): spermatid mitokondrileri. (ok başları): Sertoli mitokondrileri x15K



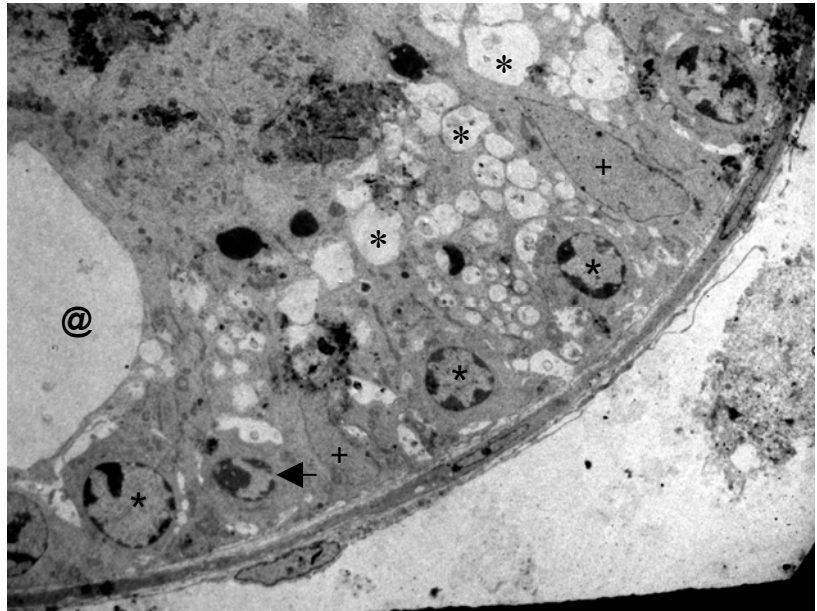
Şekil 4-72: 14. gün kontrol grubu normal görünümlü seminifer tübül bazalinde lanthan parçacıklarını tutmuş bir bağlantı kompleksi (oklar). (+): spermatositler. (@): spermatogonyum. x5000



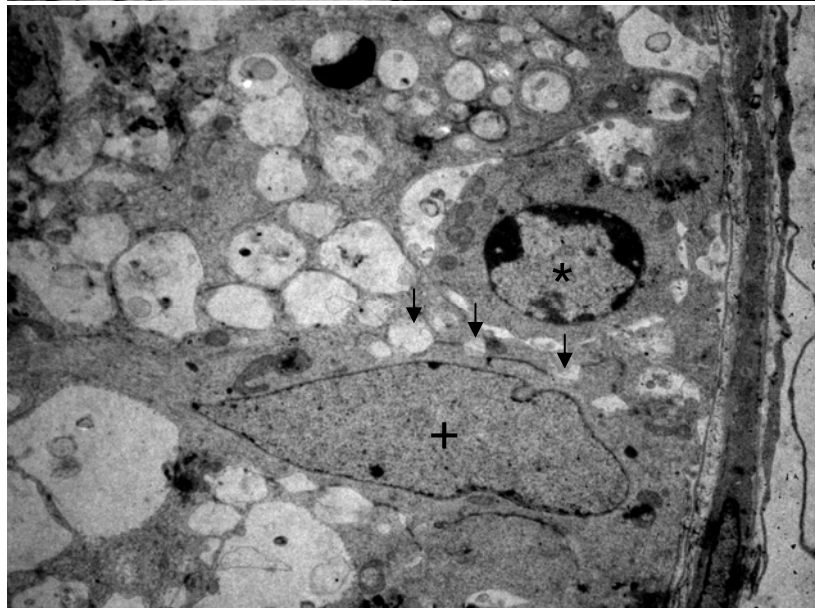
Şekil 4-73: 14. gün sol kriptorşid testiste seminifer tübül duvarından genel görünüm. (+): Sertoli hücreleri çekirdekleri. (@): spermatogonyum. (*): spermatositler x2500



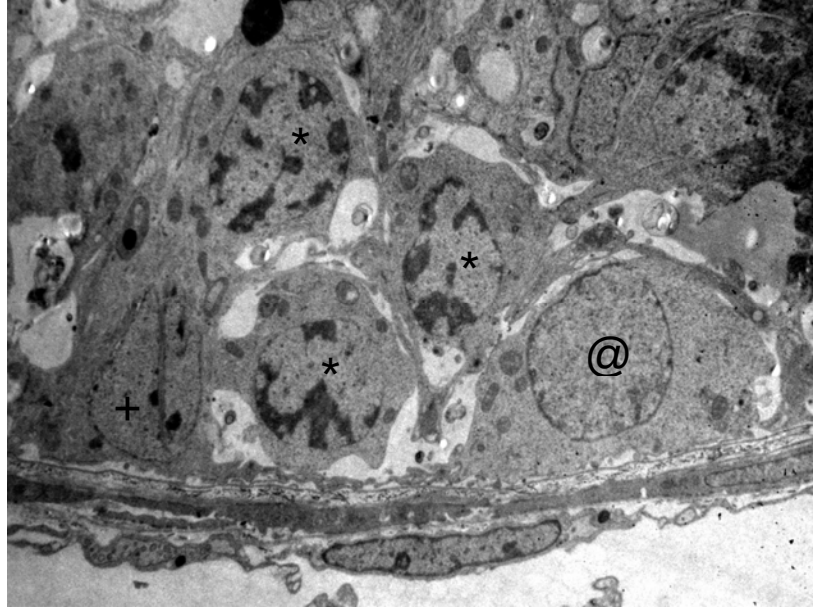
Şekil 4-74: 14. gün sol kriptorşid testiste seminifer tübül duvarında vakuoller (*), seminifer epitelden ayrılan tipB spermatogonyumlar (*), muhtemelen spermatositlerin dökülmesi sonucu oluşan boşluk (@). (+): Sertoli hücreleri çekirdekleri. (ok): apoptotik germ hücresi x2500



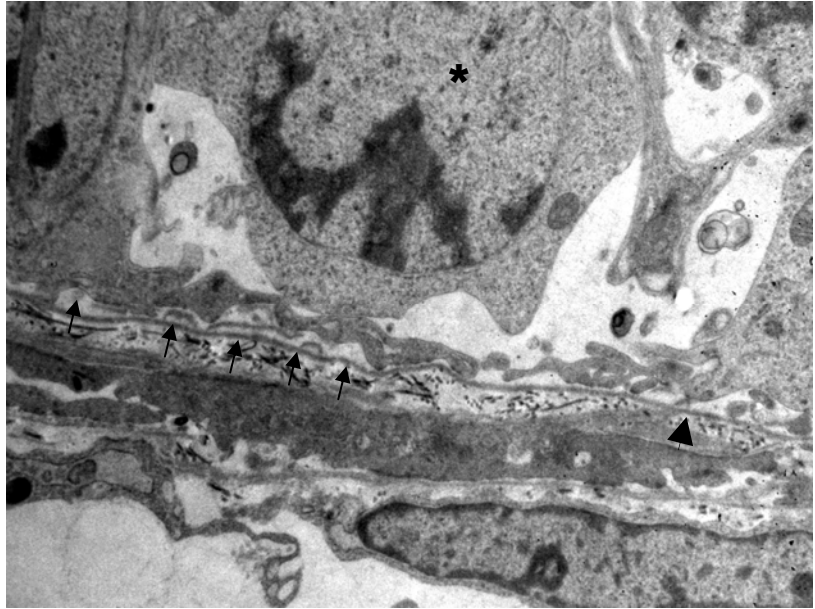
Şekil 4-75: 14. gün sol kriptorşid testiste seminifer tübül duvarından uzamış Sertoli hücresi çekirdeği (+), seminifer epitelden ayrılmış bir tipB spermatogonyum (*) ve bağlantı kompleksindeki açılmalar (oklar). x5000



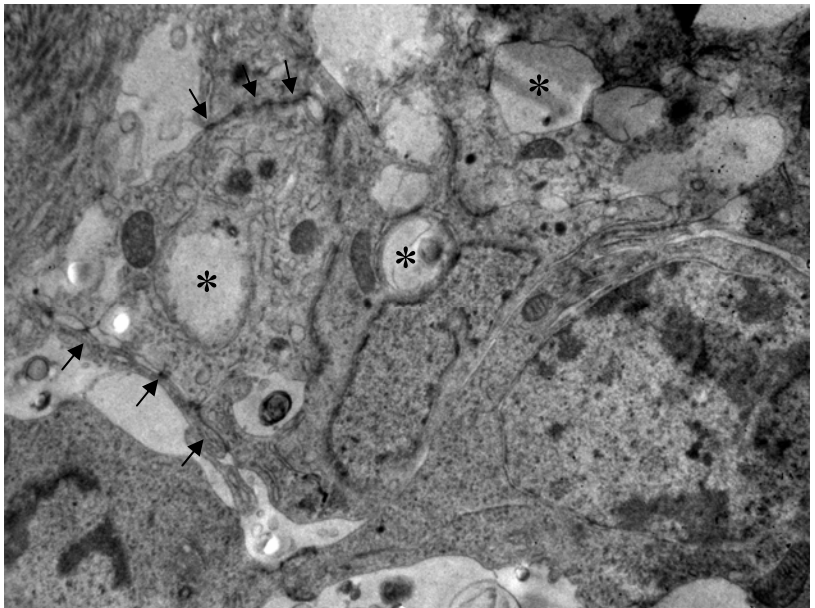
Şekil 4-76: 14. gün sol kriptorşid testiste Sertoli hücrelerinden ayrılmış spermatositler (*) ve bazal membrandan ayrılmış bir tipA spermatogonyum (@) x5000



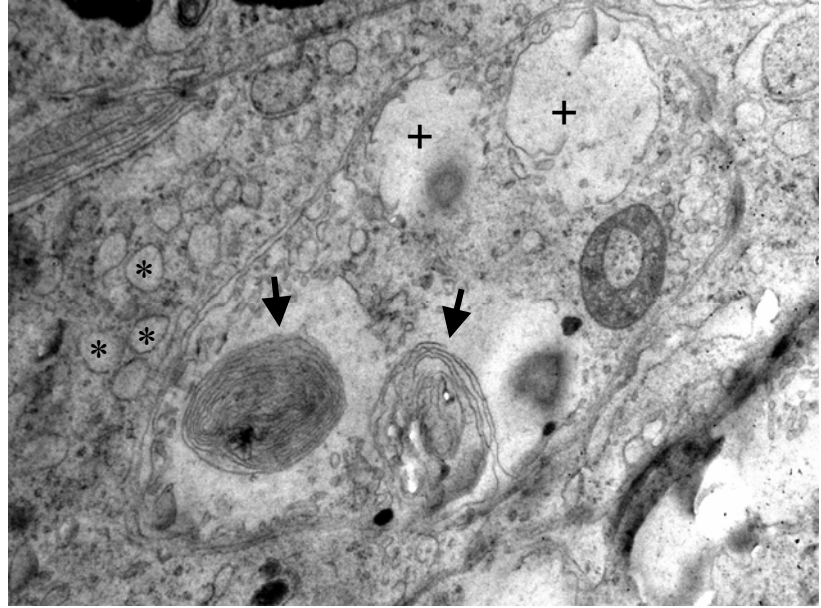
Şekil 4-77: 14. gün sol kriptorşid testiste bazal membrandan ayrılmış Sertoli hücresi sitoplazmik uzantıları (oklar). (ok başı): bazal membrandan ayrılmalar gösteren spermatogonyum uzantısı. (*): spermatosit x12K



Şekil 4-78: 14. gün sol kriptorşid testiste seminifer tübül duvarından dejeneratif alan; vakuoller (*), parçalar halinde bağlantı kompleksleri (oklar). x10K



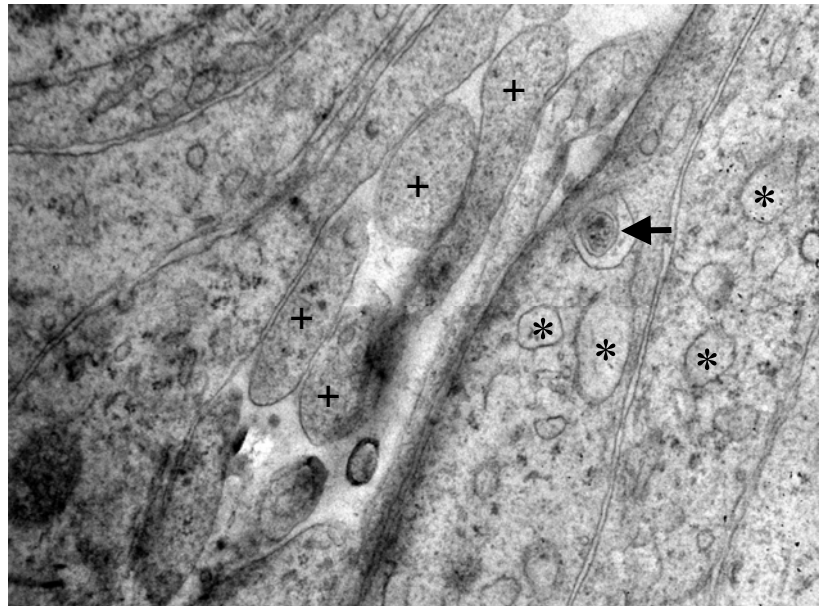
Şekil 4-79: 14. gün sol kriptorşid testiste seminifer tübül duvarından dejeneratif alan; dilate olmuş ER sisternaları (*) vakuoller (+), membransı yapılar (oklar). x20K



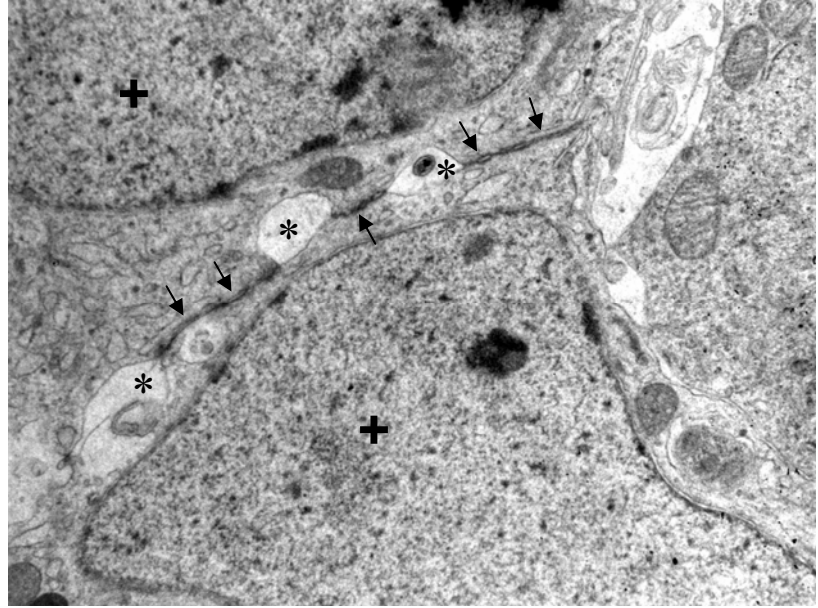
Şekil 4-80: 14. gün sol kriptorşid testiste seminifer tübül duvarından dejeneratif alan; multiveziküler cisimcik (ok). x10K



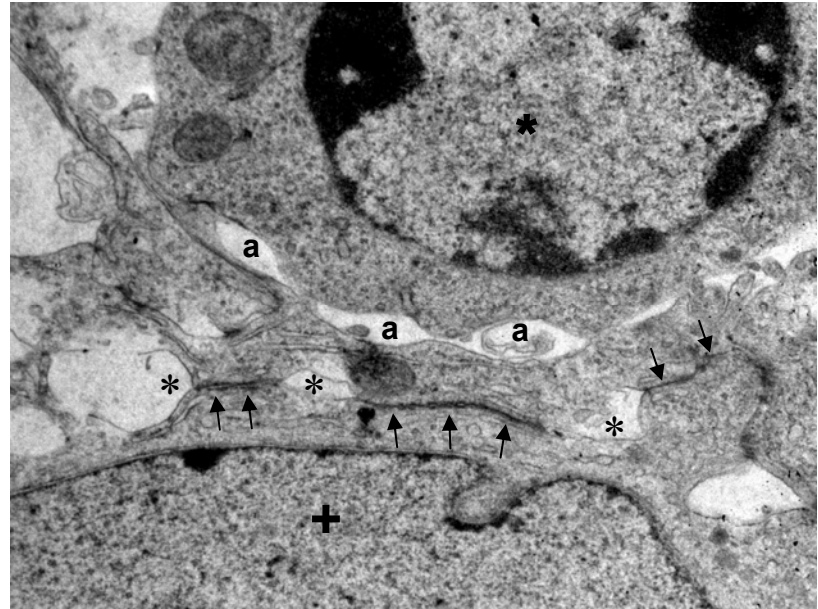
Şekil 4-81: 14. gün sol kriptorşid testiste seminifer tübül duvarının apikal kısımlarında birbirinden ayrılmış ve dağılmış hücre bölümleri (+), dilate olmuş ER sisternaları (*) ve membransı yapı (ok). x30K



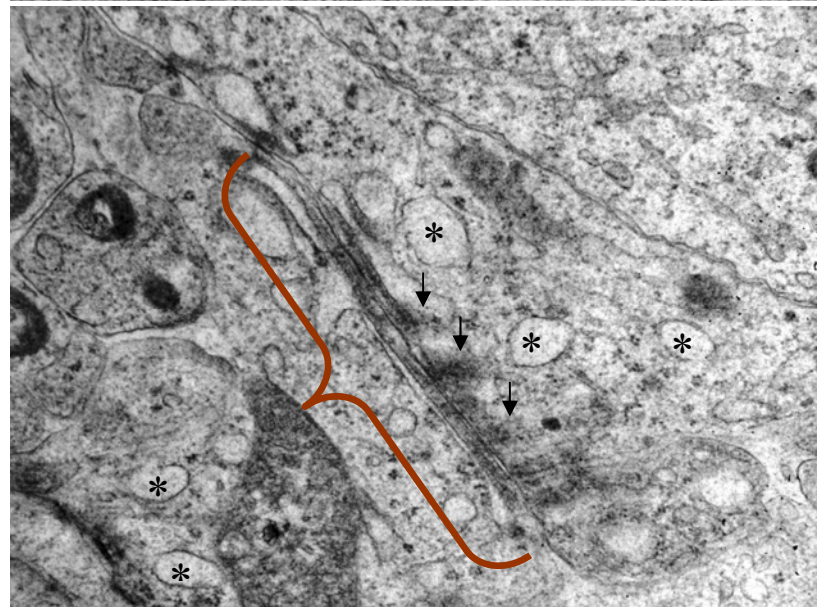
Şekil 4-82: 14. gün sol kriptorşid testiste seminifer tübül duvarından iki Sertoli hücresi (+) arasındaki bağlantı kompleksinde (oklar) açılmalar (*). x15K



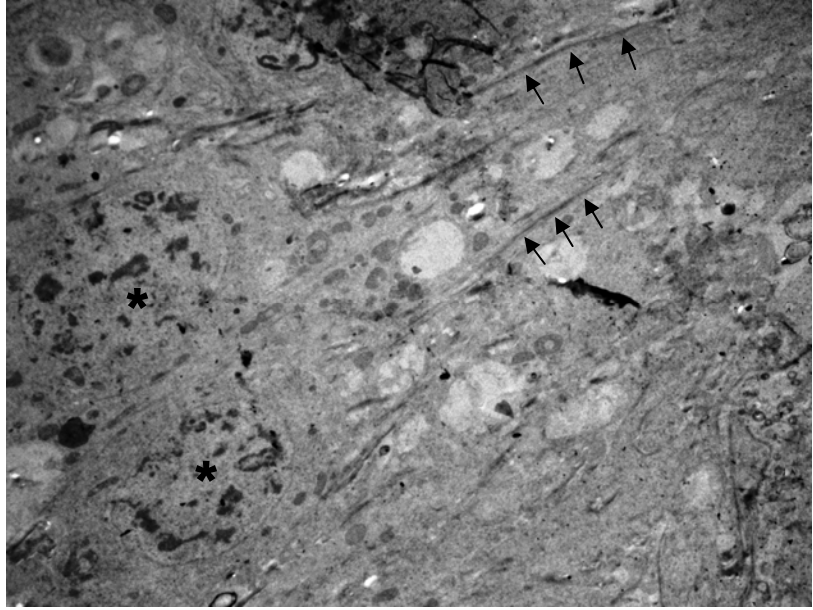
Şekil 4-83: 14. gün sol kriptorşid testiste seminifer tübül duvarında iki Sertoli hücresi arasındaki bağlantı kompleksinde (oklar) açılmalar (*) ve Sertoli hücresinden (+) ayrılmış (a) bir tipB spermatogonyum (*). x15K



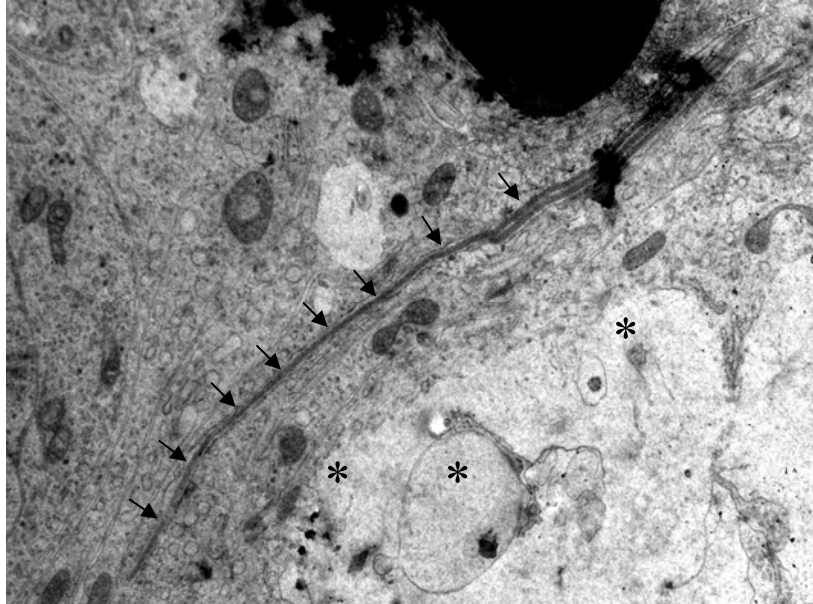
Şekil 4-84: 14. gün sol kriptorşid testiste ektoplazmik özelleşme bağlantı kompleksinin (}) sağ tarafında endoplazmik retikulumun yok olması sonucu dağılan aktin filamanları (oklar) ve dilate olmuş DER sisternaları (*) x30K



Şekil 4-85: 14. gün sol kriptorşid testiste seminifer tübül duvarından Sertoli hücreleri arasında lanthan parçacıkları sızmış hücreler arası alanlar (oklar). (*): spermatositler x4000



Şekil 4-86: 14. gün sol kriptorşid testis seminifer tübül duvarından Sertoli hücreleri arasında lanthan parçacıkları sızmış alan (oklar) ve Sertoli hücresinde dejenerasyon (*) x10K



5. TARTIŞMA

5.1. Yöntem

Kriptorşid bir hayvan modeli oluşturmak için kullanılan değişik yöntemler arasında sonucun kesin olması açısından cerrahi yöntem tercih edilmiştir. Cerrahi yöntem olarak tercih edilen inguinokrotal yöntem Shono ve ark. (22,169) ve Dünder ve ark. tarafından uygulanmış bir yöntemdir (149,170). Diğer cerrahi yöntemlerde olduğu gibi karın boşluğunun açılmaması bu yöntemin en önde gelen avantajıdır. Uyku sağlandıktan sonra operasyon her bir hayvan için yaklaşık 15 dakika sürmekte ve hayvanlarda operasyona bağlı zayıflık olmamaktadır. Sunulan çalışmada model oluşturmak açısından elde edilen sonuçlar net ve başarılı bulunmuştur.

5.2. Genel Morfoloji

Sunulan çalışmada gerek kontrol grubu hayvanların testislerinin, gerek deney grubu hayvanların sağ skrotal ve sol kriptorşid testislerinin ağırlıklarının çalışma süresince artmaya devam ettiği görülmüştür. Bütün gruplarda deney grubu hayvanların sağ skrotal testis ağırlıkları kontrol grubu testislerden daha fazla bulunmuştur, ancak bu fark istatistiki anlamlılık taşımamaktadır. Sol kriptorşid testislerle sağ skrotal testislerin ağırlıkları arasında ise 7. ve 14. günlerde istatistiki anlamlı fark belirmektedir.

Watts ve ark. (15) yaptıkları çalışmada bütün gruplarda kriptorşid hayvanların kontralateral skrotal testisleri ile kontrol grubu testisleri arasında ağırlık farkı olduğunu ve skrotal testislerin kontrol grubu testislerden daha ağır olduğunu bulmuşlardır. Wang ve ark. (23) kriptorşid hayvanlarda kriptorşid testislerin ağırlığının skrotal testislere nazaran zaman geçtikçe azaldığını bildirmişlerdir.

Mirando ve ark. (190) yaptıkları çalışmada hadım edilmiş hayvanlarda testosteron ve FSH düzeylerinin yüksek olduğunu ve skrotal testis ağırlıklarının artmış olduğunu gözlemişlerdir.

Pinart ve ark. (168) spontan kriptorşid domuzlar üzerinde yaptıkları çalışmada skrotal testisin ağırlığında ve hacminde bir artış tespit etmişlerdir. Bunun hadım edilmiş hayvanlarda da (190) görülene benzer bir kompensatuar mekanizma olduğunu belirtmişlerdir. Bunu da kriptorşid hayvanlarda erginlik öncesi dönemde FSH seviyelerinin önemli oranda artmasına bağlamışlardır.

Barenton ve ark. (191) yaptıkları çalışmada kriptorşid koçlarda kriptorşid testislerde Sertoli hücrelerinde ciddi bir fonksiyon bozukluğu meydana geldiğini gözlemişlerdir. Sertoli hücresi başına düşen FSH reseptörlerinin sayısının %95 oranında azaldığını bulmuşlardır. Leydig hücrelerinin sayılarının ve bunların LH reseptörlerinin azalmış olmasına rağmen, her bir hücre başına düşen testosteron salgısı miktarının kriptorşid hayvanlarda kontrol grubu hayvanlara nazaran artmış olduğunu bulmuşlardır; Leydig hücrelerinin kriptorşid testislerde daha yüksek steroid sentezleme kapasitesine sahip olduklarını belirtmişlerdir.

Mendis-Handagama ve ark. (192) kriptorşid testislerde LH seviyelerinin arttığını, bunun da Leydig hücrelerinin testosteron salgılama kapasitesini arttırdığını bildirmişlerdir. Jegou ve ark. ise (193) kriptorşid hayvanlarda Leydig hücrelerinde hipertrofi ve hiperplazi bulmuşlardır.

Pointis ve ark. (110) temelde LH, FSH ve steroidler tarafından oluşturulan klasik endokrin ve parakrin kontrol mekanizmaların doğru ve amacına uygun işlev görebilmesi için, gerek aynı tip hücreler arasında gerekse farklı hücre tipleri arasında, iletişim bağlantısı kompleksleri ve bunların yapı taşları olan koneksinler de dahil hücre bağlantı komplekslerinin mevcudiyetinin gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Kriptorşid testiste testosteron seviyesinin artmış olması kriptorşid testislerde bulunan seminifer tübülleri dejenerasyondan koruyamamıştır. Bu durum adı geçen yayında sözü edilen hormon-bağlantı kompleksi ilişkisi ile birlikte ele alınırsa artmış hormon seviyelerinin kriptorşid testis açısından herhangi bir avantajının olmadığı söylenebilir.

Sağ skrotal testisler ile kontrol grubu testisleri karşılaştırıldığında skrotal testislerin tübül duvarları 14. gün itibarıyla kontrol testislerinden anlamlı şekilde

daha kalın olduğu görölüyor. Bununla beraber, germ hücreleri sayıları yönünden ele alındığında ise 14. gün itibariyle sağ skrotal testislerin germ hücresi sayılarının kontrol testislerdeki germ hücresi sayısından anlamlı şekilde daha az olduğu görölüyor. Bu iki durum birlikte değerlendirildiğinde, kriptorşid testis nedeni ile artan testosteron ve FSH miktarının kontralateral skrotal testislerde Sertoli hücrelerinde bir tür hipertrofiye neden olmuş olabileceği düşünöldü.

5.3. Apoptoz

Sunulan çalışmada deney grubu hayvanların sol kriptorşid testislerinde apoptozun, gerek aynı hayvanların sağ skrotal testislerine gerekse kontrol grubu testislerine nazaran anlamlı oranda arttığı tesbit edilmiştir. Apoptoza giren hücrelerin ağırlıklı olarak spermatositler oldukları gözlemlendi; Sertoli hücrelerinde ve spermatogonyumlarda apoptoz nadir olarak göröldü. Bu bulgu daha önceki çalışmalarla da uyumluluk göstermektedir (22,24,49,153,155,194).

Germ hücrelerinde spontan apoptoz fizyolojik bir fenomendir. Hücresel “niche” teorisine göre (116,195,196,197) germ hücresi mitozu ile üretilen fazla sayıdaki germ hücrelerinin Sertoli hücreleri tarafından desteklenebilecek sayıya getirilmesi ve doku homeostazı bu sayede sağlanır. Ayrıca mitoz ve mayoz süreçlerinde anormal gelişen hücreler de bu şekilde ortadan kaldırılır (195).

Germ hücresi apoptozuna neden olan etkenler arasında hipoksi, yüksek ısı (153,195,198,199,200), radyasyon (198,200), zehirleyici çevresel kimyasal ajanlar (201,202), A vitamini yetersizliği (184,200), oksidatif stres (6,188, 200,203,204), hormonal eksiklikler (78,195,200,201,202,205), günlerin mevsimsel olarak kısalması (206), testiküler enfeksiyon (203) gibi iç ve dış çeşitli travmatizan faktörler sayılabilir.

Bu etkenler yanında gerek spontan gerekse deneysel kriptorşidizm olgusunun da germ hücresi kaybı meydana getirdiğı (15,22,23,24,49,168) ve germ hücrelerindeki bu kaybın apoptoz yoluyla gerçekleştiğı (15,22,23,24,78, 153,155,185,195,201) yapılan çalışmalarda bildirilmiştir.

Bununla birlikte kriptorşidizm olgularında germ hücresi apoptozunun nedenleri henüz tam aydınlatılamamıştır ve devam eden araştırma konusudur. Kriptorşid testislerde gerek Sertoli hücrelerinde ve gerekse germ hücrelerinde çeşitli düzeyde dejenerasyonlar meydana gelmektedir. Ancak görülen bu dejenerasyonlardan hangisinin hangisinin sebebi ya da sonucu olduğu konusunda bir fikir birliği yoktur (7,195,198).

Kriptorşid testislerde germ hücresi kaybı meydana gelirken, Sertoli hücrelerinde meydana gelen değişiklikler ve bu değişikliklerin germ hücreleri üzerindeki muhtemel etkileri hakkında yapılan morfolojik çalışmalar, Sertoli hücresi bağlantı kompleksleri ve iskelet yapısı üzerinde yoğunlaşmaktadır.

5.4. Hücre İskeleti

5.4.1. Mikrotübüller

Mikrotübüllerin Sertoli hücrelerinin germ hücrelerinin desteklenmesine yönelik özel mimarisinin meydana getirilmesinde ve korunmasında rolü vardır (73). Ayrıca hücre içi organellerin ve salgı veziküllerinin hücre içi taşınmasında yönlendirici görev görürler. Yapılan çalışmalarda, spermatogenez sürecinde gelişen germ hücrelerinin bazal kompartımandan luminal kompartımana taşınmasında (33), uzayan spermatidlerin kafasının şekillendirilmesinde (33,84), spermiyasyonda (33) ve artık cisimciklerin ortadan kaldırılmasında (33) rolleri olduğu bildirilmiştir.

Kriptorşid testislerde Sertoli hücresi iskeletinin durumu konusunda net bir görüş yoktur. Kimi yazarlar (32) Sertoli hücresi iskelet yapısını oluşturan aktin, vimentin filamanları ile mikrotübül yapısının dejenerasyona uğradığını bildirirken bazı yazarlar (23,207) iskelet yapısının korunduğunu ileri sürmektedirler

Wang ve ark. (23) mikrotübüllerin Sertoli hücresi sitoplazmasında çekirdekten yukarıdaki apikal kısmında yoğun olarak yerleştiğini ve kriptorşid olgularda bu yerleşimin değişmediğini bildirmişlerdir.

Fleming ve ark. (34) in-vivo olarak Sertoli hücrelerine gama-tübülün adenovirüs vektörü aşılıyarak yaptıkları çalışmalarında, Sertoli hücrelerinde gama-tübülünün aşırı ekspresse edilmesini sağlamışlardır. Aşırı ekspresyonun Sertoli hücresi mikrotübül ağını bozduğunu, mikrotübül ağındaki bozulma sonucu seminifer epitelin organizasyonunun ağır bir dejenerasyona uğradığını ve bu durumun, spermatidlerin ve artık cisimciklerin atılamamasına, bunun yanında germ hücresi apoptozuna yol açtığını gözlemişlerdir. Bu bulgunun Sertoli hücresi mikrotübül ağının seminifer epitelin organizasyonunun devamlılığında önemli rolleri olduğunu ve Sertoli hücresi mikrotübül ağı sağlam olmazsa germ hücresi hayatiyetinin mümkün olmadığını gösterdiğini bildirmişlerdir.

Sunulan çalışmada mikrotübül yapısının sol kriptorşid testislerde 1. gün deney grubundan itibaren bozulduğu Sertoli hücrelerinin bazal kısımlarındaki varlıklarının azaldığı, tübüllerin daha çok apikal kısımlarında bulundukları gözlemlendi. Apikal kısımlarda da mikrotübül yapısının dezorganize olduğu görüldü.

Mikrotübül iskeleti Sertoli hücresi bağlantı, komplekslerine eşlik eden endoplazmik retikulum tübüllerinin pozisyonlarının korunmasını temin etmektedir (208). Mikrotübül iskeletinin bozulması neticesinde bağlantı komplekslerinde bulunan ER sisternalarının yerinden ayrılmasına dolayısı ile bunlara bağlı olan aktin yapılarının ve bağlantı kompleksi proteinlerinin de pozisyonunun bozulmasına yol açacaktır. Nitekim 14. gün kesitlerinde ektoplazmik özelleşmelerde ER kaybı ve buna bağlı olarak aktin filamanlarının dağılımında bozulma gözlenmektedir.

Neely ve Boekelheide (209) elektron mikrograflar üzerinde yaptıkları morfolometrik çalışmada Sertoli hücresi mikrotübüllerinin sinir hücresi aksonlarında olduğu gibi düzenli bir aralıkla birbirlerine paralel seyrettiklerini

göstermişler, bunun ise, normalde sinir sistemine özgü Yüksek Molekül Ağırlıklı-Mikrotübül İlişkili Proteinler “**High Molecular Weight – Microtubule Associated Proteinler (HMV-MAP)**” sayesinde mümkün olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada Sertoli hücrelerinden bu proteini izole etmişler ve beyindeki HMW-MAP’lerin aksine bunların ısıya dayanıklı olmadıklarını göstermişlerdir.

Son derece karmaşık ve kompleks olan Sertoli hücresi şeklinin ve yapısının korunmasında mikrotübüllerin rolü göz önüne alındığında, kriptorşid testislerde mikrotübül yapılarında gözlenen dejeneratif değişikliklerin meydana gelmesinde, normalde olması gerekenden daha yüksek olan vücut sıcaklığına maruz kalan testislerde ısıya karşı hassas olan bu mikrotübül ilişkili moleküllerin bozulmasının rol oynamış olması muhtemel görünmektedir.

5.4.2. Vimentin

Vimentin ara filamanlarının Sertoli hücrelerindeki işlevi, diğer hücre tiplerinde de olduğu gibi tam olarak anlaşılamamıştır. Yapısal yönden destek oluşturmak, hücre membranı ile çekirdek arasında iletişim sağlamak, çekirdek pozisyonunun belirlenmesi ve sabitlenmesine yardım etmek gibi fonksiyonları olabileceği yönünde görüşler vardır (78).

Kopecky ve ark. (210) yaptıkları çalışmada, yetişkin sıçanlarda kriptorşidizm oluşturmuşlar ve sonucunda vimentin filamanlarının dağılımının bozulduğunu, apikal filamanların hücre çekirdeğine doğru çöktüğünü, bazal bölümde de organizasyonlarının bozulduğunu gözlemişlerdir. Bu durumun seminifer epitelin yapısal bütünlüğünün bozulmasına neden olduğu görüşünü ifade etmişlerdir.

Wang ve ark. (23) yaptıkları çalışmada deneysel kriptorşid sıçanlarda Sertoli hücresi yapısının etkilendiğini ve Sertoli hücresi vimentin dağılımının bozulduğunu, bu bozulma ile artmış germ hücresi apoptozu arasında korelasyon bulunduğunu ifade etmişlerdir. Seminifer epitel yapısının

bütünlüğünün korunması için Sertoli hücresi vimentin filamanlarının bozulmamış olmasının gerekli olduğunu bildirmişlerdir.

Zhang ve ark. (32) Rhesus maymunları üzerinde oluşturdukları kriptorşid modelde vimentin filamanlarının dağılımının bozulduğunu gözlemişlerdir. Bu durumun Sertoli hücresi fonksiyonlarında bozulmaya yol açtığını ve bunun da neticede germ hücresi apoptozuna yol açabileceğini bildirmişlerdir.

Show ve ark. (78) yaptıkları çalışmada, deney hayvanlarında testis içi testosteron seviyelerini düşürmüşler ve sonuçta Sertoli hücrelerinin vimentin iskeletinin çekirdek civarına çökmüş yığılmış olduğunu görmüşlerdir. Bu değişiklikler sonucu uzamış spermatidlerin döküldüğünü ve spermatositlerde apoptoz görüldüğünü bildirmişlerdir. Vimentin filamanlarındaki bu dejenerasyonun, germ hücresi apoptozunun bir sebebi mi olduğu, yoksa germ hücreleri bir başka mekanizma ile seminifer epiteli terk ederken Sertoli hücreleriyle bağlantılarını kaybetmelerinin bir sonucu mu olduğu konusunun henüz tam net olmadığını bildirmişlerdir.

Romeo ve ark. ise (207) seminifer tübüllerinde germinal hücrelerin sayıca azalmış, kaybolmuş veya immatür bulunduğu çeşitli seminifer tübül defektleri gösteren hastaların biyopsi materyallerinde yaptıkları incelemeler neticesinde çalışılan vakaların hepsinde vimentin immün-reaktivitesinin mevcut olduğunu göstermişlerdir. Bu durumun da germinal epiteldeki dejeneratif değişiklikler ne olursa olsun, vimentin filamanlarının bundan etkilenmediği şeklinde yorumlamışlardır.

Sunulan çalışmada kriptorşid testislerde vimentin filaman dağılımının gerek kontrol grubu, gerekse deney grubu sol kriptorşid ve sağ skrotal testislerinde bütünlüğünü koruduğu görüldü. Neticede kriptorşidizm olgusunun vimentin iskeletine zarar vermediği düşünüldü.

Zhu ve ark. (85) vimentin filamanlarının pozisyonu ve dağılımının seminifer epitel döngüsü basamakları ile değiştiğini bildirmişlerdir. Kriptorşid testislerdeki vimentin filamanlarının pozisyonel değişiklikleri hakkındaki görüş

ayrılıklarının, adı geçen çalışmalardaki ve sunulan çalışmadaki değerlendirmeler için seçilen seminifer tübüllerin farklı epitel döngüsü basamaklarında oluşları ile açıklanabileceği düşünüldü.

5.5. Hücre Bağlantıları

5.5.1. Kan-Testis Bariyeri ve Adezyon Bağlantıları

Sunulan çalışmada KTB bütünlüğünün test edilmesi açısından etkili bir yöntem olarak kabul edilen lanthan nitrat ihtiva eden fiksatif solüsyonu ile perfüzyon fiksasyonu metodu kullanılmıştır (102,175,176,177,178,179,180,181, 182,183,184).

Sunulan çalışmada elektron mikroskobu düzeyindeki incelemelerde, deney grubu hayvanların kriptorşid testislerinde 1. günden itibaren 3., 7. ve 14. günlerde KTB'nin lanthan sızdırmaya başladığı görüldü. 3. günden itibaren 7. ve 14. günlerde de sızdırma yanında KTB alanında hücreler arasında açılmalar ve karşılıklı membranlarda dilatasyonlar gözlemlendi. 1. günden itibaren germ hücrelerinin Sertoli hücrelerinden ayrılmalar gösterdikleri gözlemlendi.

Kriptorşid testislerde bağlantı kompleksleri ve KTB hasarını meydana getiren moleküler mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır (92).

Kantak ve Kramer (211) ağız içi yassı hücre kanseri hücreleri ile kültür ortamında yaptıkları çalışmada, bu hücrelerin bazal tabakadan bağlantıları kesildiğinde çoğalmanın durduğunu ve apoptoza gittiklerini, ama eğer bağlantısı kesilen ve asıntı haline gelen bu hücrelerin E-kaderin-aracılı bağlantı kompleksleri ile hücre kümeleri yapmaları sağlanırsa hem hayatta kaldıklarını hem de çoğaldıklarını göstermişlerdir. Ancak bu özelliklerinin de yüksek Ca^{+2} varlığında gerçekleştiğini ve E-kaderin fonksiyonlarının bozulmasına neden olan antikorlarla muamele edilmeleri sonucu inhibe edildiğini göstermişlerdir. Bu bulgular ışığında, kaderin-aracılı hücrelerarası bağlantıların, tutunmaya-bağlı

olmayan büyümenin desteklenmesi ve apoptozun baskılanması için çalışan kompensatuar bir mekanizma olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Bergh (8) yaptığı çalışmada elektron mikroskopta hücreler arası alanın dilate olduğunu göstermiştir. Sertoli hücreleri ile germ hücreleri arasındaki alanın dilatasyonunun, bağlantı komplekslerindeki bir bozulmanın göstergesi olduğunu bildirmişlerdir.

Wiebe ve ark. (212) gliserol enjekte ederek yaptıkları çalışmada, hücre iskeletini oluşturan mikrofilaman ve mikrotübül yapılarında bozulmayla birlikte KTB'ni oluşturan moleküllerden birisi olan occludinin yerleşiminin de bozulduğunu göstermişlerdir. Bu durumun Sertoli hücresi iskelet yapısının dağılması ve KTB'nin geçirgen hale gelmesine neden olduğunu bildirmişlerdir. Yapmış oldukları çalışmada gözlenen spermatogenezdeki dejenerasyonun bir sebebinin de iskelet yapısındaki dağılma sonucu KTB'ndeki bozulma olabileceğini ifade etmişlerdir.

Fujioka ve ark. (213) izole edilmiş germ hücrelerini kültür ettikleri çalışmada, Sertoli hücreleri ile birlikte kültür edilen germ hücrelerinde apoptozun, yalnız başına kültür edilen germ hücrelerine nazaran anlamlı oranda düşük olduğunu bulmuşlardır. Ortak kültür olarak iki türlü kültür ortamı kullanmışlardır, birincisinde germ hücrelerinin aynı ortamda ancak Sertoli hücrelerinden bir membranla ayrıldığı bir sistem kullanmışlar, diğerinde ise germ hücrelerini Sertoli hücrelerinin üzerine doğrudan yerleştirmişlerdir. Sertoli hücreleri ile direkt temasta olan germ hücrelerindeki apoptozda azalmanın, Sertoli hücreleri ile direkt temasın olmadığı sisteme nazaran daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışma da Sertoli hücreleri ile teması kesilen germ hücrelerinin apoptozu ugradıklarını göstermektedir.

Tesarik ve ark. (194) non-obstruktif azoospermi gösteren hastaların biyopsi materyallerinde yaptıkları incelemede, bu testislerde apoptozu gittiği görülen germ hücrelerinden bir kısmının caspase-bağımlı bir yol izlediklerini, bir kısmının ise caspase-bağımsız yol izlediklerini göstermişlerdir. Caspase-bağımlı apoptoz gösteren germ hücreleri Sertoli hücreleri ile sıkı bir temas halindeyken,

caspase-bağımsız yol izleyenlerin Sertoli hücreleri ile sıkı bir ilişki içinde olmadıklarını bildirmişlerdir.

Proapoptotik Bcl-2 ailesinden bir molekül olan Bim, normal hücrelerde mikrotübül ilişkili dynein proteinlerine bağlı olarak bulunur. Mikrotübül yapısının bozulması üzerine bu molekül mikrotübüllerden ayrılarak mitokondri duvarına yapışır ve sitokrom C salınımına yol açar (214,215). Yine aynı aile üyesi Bmf ise normal hücrelerde aktin filamanlarına bağlı olarak bulunur ve aktin hücre iskeletinin dejenere olması üzerine aktinden ayrılarak mitokondri membranına bağlanır ve bu da sitokrom C salınımına sebep olur (214). Her iki molekülün salınımı da caspase-bağımsız işleyen olaylardır ve sonuçta apoptoza yol açarlar (214). Bu şekilde hücrenin bağlantılarını kaybetmesi ve hücre iskeleti elemanlarının dejenerasyonu sonucu gelişen apoptoza anoikis adı verilmiştir (216). Sunulan çalışmada germ hücrelerinin Sertoli hücrelerinden ayrılmalar gösterdikleri gözlenmiştir. Germ hücrelerinin Sertoli hücrelerine olan bağlantılarını kaybetmelerinin Sertoli hücrelerinde olduğu gibi germ hücrelerinin iskelet yapılarında da dejenerasyonlar meydana getirdiği göz önüne alınırsa, germ hücrelerinde meydana gelen apoptotik dejenerasyonların, bu şekilde caspase-bağımsız bir yolakla işleyen anoikis olabileceği düşünüldü.

Sertoli hücreleri KTB varlığı nedeniyle polar karakter kazanmış hücrelerdir. Bu polar karakterleri sayesinde luminal kompartımana ABP gibi proteinler salgılanırken, bazal hücre membranı vasıtasıyla glikoz demir gibi moleküllerin alınması, hormonal ve parakrin etkileşimlerin koordinasyonu sağlanmaktadır (209). Sunulan çalışmada kriptorşid testislerde 1. günden itibaren KTB'nin bozulması, Sertoli hücrelerinin 14. günde bazal membrandan ayrılması ve aynı zamanda mikrotübül yapısının bozulması Sertoli hücrelerinin en önemli fonksiyonlarından olan polarize sekresyon özelliğinin kaybolmasına neden olacaktır. Neticede Sertoli hücrelerinin spermatogenez ve spermatogenik hücrelerin desteklenmesine yönelik fonksiyonlarının zarara uğramasına, seminifer tübül lümeninde yoğunlaştırılması gereken ve spermatogenez ve gelişen germ hücrelerin hayatiyeti için gerekli olan ABP glikoz demir gibi moleküllerin tübül lümenine salınımının bozulmasına neden olacaktır. Bu durum

başlı başına kriptorşid testislerde görülen germ hücresi kaybına sebep teşkil edebilecek niteliktedir.

5.5.2. İletişim bağlantıları - Koneksin 43

Sunulan çalışmada testiste seminifer tübüllerdeki iletişim bağlantılarında en çok bulunan koneksin türü olan Cn43 (110) çalışıldı. Çalışma sonucunda Cn43 immün-reaktivitesinin, kontrol grubu testislerinde ve deney grubu hayvanların sağ skrotal testislerinde temel olarak bazale yakın KTB civarında yoğunlaştıkları, bunun yanında seminifer epitel duvarın geri kalan kısımlarında da zayıf ama yayılmış olarak bulunduğu gözlemlendi. Sol kriptorşid testislerde ise bazaldeki yoğunluğunu kaybettiği, seminifer tübül duvarının apikal kısımlarında zayıf ve yayılmış olarak bulunduğu görüldü.

Hejmej ve ark. (217) kriptorşid aygırların testislerinde yaptıkları incelemede, Cn43 immün-reaktivitesinde ciddi bir azalma olduğunu gözlemişlerdir.

Cyr ve ark. (218) yaptıkları çalışmada, occludin ve Cn43 yerleşiminin seminifer epitelin bazalinde olduğunu, occludin ve Cn43'e ait konfokal görüntülerin birlikte değerlendirilmesiyle de occludin ve Cn43'ün temelde aynı yerde birlikte konumlandıklarını göstermişlerdir. Bununla birlikte, Cn43 immün-reaktivitesinin seminifer epitelin occludin reaktivitesi gözlenmeyen daha yukarı kesimlerinde de noktasal odaklar halinde yer aldığını göstermişlerdir; bu boyanmaların Sertoli hücreleri ile germ hücreleri arasındaki bağlantı komplekslerine ait olduklarını belirtmişlerdir. İletişim bağlantısı plakları da seminifer epitelde en çok sıkı bağlantılarla aynı seviyede ve bunların bulunduğu aynı yerde bulunmaktadır (110,218).

Meyer ve ark. (219) hücre kültürü ortamında yaptıkları çalışmada N-kaderin moleküllerini bloke etmeleri durumunda iletişim bağlantılarının oluşmadığını göstermişlerdir. Buradan yola çıkarak N-kaderin gibi adezyon moleküllerinin karşılıklı etkileşiminin, iletişim bağlantılarının oluşumu için bir

gereklilik olduğunu ifade etmişlerdir. Bu çalışma ile Katak ve Kramer (211) tarafından yapılan çalışma birlikte ele alındığında, sunulan çalışmada adezyon bağlantılarının ve sıkı bağlantıların, elektron mikroskopi bulguları ile daha belirgin olarak gözlemlendiği üzere bozulmasının, Sertoli hücreleri ile germ hücreleri arasındaki iletişim bağlantı yolunun bozulmasına da neden olmuş olabileceği düşünüldü.

Yapılan çalışmalarda Cn43'ün sitoplazmik COOH- alanı ile ZO-1 aracılığıyla mikrotübüllere bağlandığı gösterilmiştir (111,112,220,221). Bu yönüyle Cn43'ün mikrotübül dinamiklerini etkileyebileceğini ve düzenleyebileceğini belirtmişlerdir.

Johnson ve ark. (222) bazal düzeyde iletişim bağlantısı gelişimi ve koneksin trafiği için mikrotübüllerin gerekli olduğunu ifade etmişlerdir. Thomas ve ark. (223) çeşitli hücre iskeleti bozucu ajanlar kullanarak yaptıkları çalışmalarında, yeni sentezlenen Cn43 monomerlerinin iletişim bağlantılarının yapısına katılabilmesi için bozulmamış bir mikrotübül yapısının gerekli olduğunu göstermişlerdir.

Sunulan çalışmada seminifer tübüllerin bazal kısmında hem mikrotübül immün-reaktivitesinin hem Cn43 immün-reaktivitesinin birlikte azalmaya başlamışlardır. İletişim bağlantıları ile hücre iskeleti elemanlarının arasındaki bu yakın ilişki göz önüne alındığında, Cn43 ve mikrotübül yapılarının bozulmasının karşılıklı olarak birbirinin nedeni veya sonucu olacak şekilde etki göstermiş olabileceği düşünüldü.

Lee ve ark. (39) yaptıkları çalışmada testiste koneksinlerin bloke edilmesinin germ hücrelerinde apoptoza yol açtığını göstermişlerdir. Sridharan ve ark. (113) ve Roscoe ve ark. (114) yaptıkları çalışmalarında, Sertoli hücrelerindeki Cn43'ün spermatogenez için gerekli olduğunu belirtmişlerdir. Roscoe ve ark. (114) Cn43 yokluğunda spermatogenezin durduğunu bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada kriptorşid testislerde Cn43'ün kontrol ve kontralateral skrotal testislere nazaran seminifer tübüllerin bazalindeki

yoğunluğunun azalmış olmasının, kriptorşid testislerde görülen düşük germ hücresi sayısının bir diğer nedeni olabileceği düşünüldü.

5.6. Sertoli Hücresi İşlevselliği

Sunulan çalışmada elektron mikroskopik bulgulara çalışmanın 1. gününden itibaren Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında dejenerasyon alanlarının belirdiği, ince yapılarının bozulduğu görülmüştür. Sertoli hücrelerinin ince yapısındaki dejenerasyonun Sertoli hücrelerinin spermatogenez sürecinde rol oynayan fonksiyonlarının bozulduğunun da bir göstergesi olabileceği düşünüldü, yapılan çalışmalarda da bu yönde görüşler mevcuttur (155,191).

Kerr ve ark. (151) cerrahi yöntemle oluşturdukları kriptorşidizm sonucunda dokularda elektron mikroskopi düzeyinde bazal bölümde Sertoli hücreleri arasındaki bağlantı komplekslerinin birbirinden uzaklaşmasından kaynaklanan geniş vakuoller, Sertoli hücreleri içinde geniş küresel lipid birikintileri, küçük dilate ER vezikülleri görmüşlerdir.

Lui ve ark. (92) kriptorşid olgularda Sertoli hücresi çoğalması ve farklılaşmasının defektif olduğunu, farklılaşmış Sertoli hücresi sayısının da düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Tek ve çift taraflı kriptorşid hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda (193,224,225), Sertoli hücresi işlevselliğinin bir göstergesi olan seminal sıvı ve ABP salgılanmasının kriptorşid testislerde büyük ve ciddi şekilde düşüş gösterdiğini bulmuşlardır. Bu durumun, abdominal pozisyonda kalan testislerde Sertoli hücresi fonksiyonlarının ciddi oranda bozulduğunu gösterdiğini bildirmişlerdir.

Kawakami ve ark. (226) Sertoli hücresi işlevselliğinin bir göstergesi olan testiküler transferrin üretiminin, kriptorşid testislerde anlamlı oranda azaldığını göstermişlerdir. Kriptorşid testislerde Sertoli hücresi sayısının aynı kalmasına

rağmen testiküler transferrin konsantrasyonunun azalmasını, Sertoli hücresi fonksiyonunun kaybı olarak yorumlamışlardır.

Fiorini ve ark. (112) yaptıkları çalışmada çeşitli hücre zehirleyici ajanların öncelikli olarak occludin, ZO-1 ve Cn43 gibi bağlantı kompleksi proteinlerine hasar verdiğini, bunun sonucunda ise en belirgin olarak Sertoli hücresi fonksiyonlarında değişiklikler ve germ hücresi apoptozu meydana geldiğini belirtmişlerdir.

Zhang ve ark. (32) yaptıkları çalışmada yetişkin hayvanlarda oluşturulmuş kriptorşidizm modelinde Sertoli hücrelerinin sitokeratin 18 ekspresse ettiklerini göstermişlerdir. Sitokeratin 18 ekspresyonu immatür Sertoli hücreleri için ayırıcı bir özellik olarak belirtilmiştir. Bergmann ve Kliesch (227) ise elektron mikroskopi düzeyinde yaptıkları çalışmada infertil erkeklerde Sertoli hücrelerinde fetal veya erginlik öncesi immatür özellikler gözlediklerini bildirmişlerdir. Batias ve ark. (228) yaptıkları çalışmada Cn43 ekspresyonunun 16. günde KTB oluşmadan önce luminal kompartımda, KTB oluşuktan sonra ise seminifer epitelin 1/3 bazal bölümünde yerleştiğini göstermişlerdir. Bergmann ve Kliesch (227) infertil erkek hastalara ait testis dokularında yaptıkları çalışmada ince yapı düzeyinde Sertoli hücrelerinin fetal veya erginlik öncesi Sertoli hücresi görünümünde olduğunu, çekirdeklerinin çentiksiz yuvarlak ya da oval olduğunu belirtmişlerdir. Bu hastalarda spermatogenik aktivitenin spermatogonyum düzeyinde durmasının, Sertoli hücrelerinin farklılaşmamış evreye dönmesi ve dolayısıyla spermatogenezi başlatacak ve destekleyecek kabiliyeti kaybetmesine bağlamışlardır. Rune ve ark. (229) ise kriptorşid hasta çocukların biyopsi materyallerinde yaptıkları çalışmada, elektron mikroskopi düzeyinde Sertoli hücresi çekirdeklerinde uzunlaşma görmüşlerdir. Sunulan çalışmada gerek Cn43 immün-reaktivitesinin bazal bölümdaki yoğunluğunun azalmasının ve gerekse elektron mikroskop düzeyinde 14. gün kesitlerinde Sertoli hücresi çekirdeklerinin uzamış bulunmasının, adı geçen çalışmalarla birlikte değerlendirildiğinde, Sertoli hücrelerinin erişkin karakterlerini kaybetmiş olduklarının bir göstergesi olabileceği düşünüldü.

Bergh ve Söder (7) inmemiş ve inmiş testisler arasındaki sıcaklık farkı 0,7 derece olduğunda abdominal Sertoli hücrelerinin inmiş olanlara nazaran belirli seminifer epitel döngülerinde daha fazla lipid depoladıkları ve seminifer tübül lümenine daha fazla sıvı salgıladıkları; sıcaklık farkı 1,5 dereceye ulaştığında ise bu tübül bölümlerindeki pakiten spermatositlerin birkaç gün sonra öldüklerini bildirilmiştir. Bu bulguyu ise kriptorşidizm olgularında Sertoli hücrelerindeki hasarın ilk önce başladığı, germ hücreleri hasarının ise Sertoli hücresi hasarı neticesinde oluşan fonksiyon bozukluklarının bir sonucu olduğu şeklinde yorumlamışlardır.

Bernal-Manas ve ark. (230) yaptıkları çalışmada kriptorşid testislerde apopitozun bir süre sonra normal seviyeye indiğini ancak proliferasyonun tekrar normal seviyeye dönmediğini göstermişlerdir. Kriptorşid testislerde görülen düşük sperm yoğunluğunun asıl sebebinin apopitozdan ziyade proliferasyonun durması olduğunu ifade etmişlerdir. Sunulan çalışmada yapılan stereolojik sayımlardan elde edilen verilerin istatistikî incelemesi sonucunda kriptorşid testislerdeki germ hücrelerinin sayısının skrotal ve kontrol grubu testislerine nazaran anlamlı düzeyde azalmış bulunmasında, apopitozun olduğu kadar Sertoli hücresinin işlevselliğinde meydana gelen defektler sonucu spermatogenezdeki bu bozulmanın da etkisi olabileceği düşünüldü.

5.7. Kontralateral Skrotal Testis

Kriptorşid olgularda kontralateral skrotal testiste meydana gelen değişikliklerin ne yönde olduğu konusu tartışmalıdır.

Watts ve ark. (15) yaptıkları çalışmada testis ağırlığı ve her bir tübül başına düşen apopitotik hücreler açısından kontralateral skrotal testis ile kontrol grubu arasında fark bulamamışlardır.

Nambirajan ve ark. (51) yaptıkları çalışmada tek taraflı kriptorşidizm oluşturdukları hayvanlarda kontralateral skrotal testislerde herhangi bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir.

Koçak ve ark. (003) yaptıkları çalışmada deneysel kriptorşidizm oluşturulduktan sonraki 60. günde kontralateral skrotal testiste de artmış apoptoz gördüklerini ifade etmişlerdir.

Wang ve ark. (49) yaptıkları çalışmada apoptoz oranının inmemiş testiste olduğu kadar kontralateral skrotal testiste de kontrol grubuna nazaran anlamlı oranda yüksek olduğunu ve spermatogenezin kontralateral skrotal testiste de düşmüş olduğunu bildirmişlerdir.

Zakaria ve ark. (48) cerrahi yöntemle elde ettikleri ve rahim içi hayatta flutamid uygulaması ile elde ettikleri iki grup kriptorşid hayvan modelinde yaptıkları çalışmalarında, flutamid uygulaması ile elde ettikleri modelde kontralateral skrotal testiste dejeneratif değişiklikler gözlerken, cerrahi yöntemle oluşturdukları modelde dejenerasyon görmemişlerdir.

Mendis-Handagama ve ark. (192) kriptorşid testislerde LH seviyelerinin arttığını, bunun da Leydig hücrelerinin testosteron salgılama kapasitesini arttırdığını bildirmişlerdir. Barenton ve ark. (191) kriptorşid testislerde Leydig hücrelerinin sayılarının ve LH reseptörlerinin azalmış olmasına rağmen her bir hücre başına düşen testosteron salgısı miktarının kriptorşid hayvanlarda kontrol grubu hayvanlara nazaran artmış olduğunu gözlemişlerdir.

Sunulan çalışmada her bir deney grubu kendi içinde değerlendirildiğinde, kontrol grubu testisleri ile sağ skrotal testislerin ağırlıkları arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Apoptotik hücrelerin değerlendirilmesi sonucunda da 1. ve 7. günlerde kontrol testisleri ile sağ skrotal testisler arasında skrotal testiste daha fazla apoptoz meydana geldiği yönünde anlamlı fark görülmüştür ancak 14. günde kontrol testisleri ile sağ skrotal testisler arasında apoptotik hücreler yönünden anlamlı fark bulunmamıştır. İlerleyen günlerde apoptotik hücrelerin sayısı daha da düştüğünde bu farksızlığın devam edeceği beklenmelidir. Seminifer tübül duvar kalınlıkları yönünden incelendiğinde sağ skrotal testislerde kontrol grubu testislerine nazaran istatistiki olarak anlamlı bir kalınlaşma mevcuttur. Yukarıda da izah edildiği gibi bu durum, muhtemelen sol kriptorşid testis nedeniyle artmış olan FSH ve testosteron salgıları nedeniyle

meydana gelmektedir. Germ hücrelerinin sayısı yönünden incelendiğinde 3. ve 14. günlerde sağ skrotal testislerde germ hücreleri sayısının kontrol grubu testislerine nazaran daha düşük olduğu gözlenmiştir.

Bütün bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde spermatogenezin yalnızca sol kriptorşid testiste değil aynı zamanda sağ skrotal testiste de etkilenmiş olabileceği düşünülmüştür. Nitekim tübül duvar kalınlığı artmış olmasına rağmen germ hücresi sayısı düşük bulunmuştur. Tübül duvar kalınlığında meydana gelen artmanın bir tür Sertoli hücresi hipertrofisine bağlanabileceği düşünülmüştür. Kontralateral skrotal testislerde meydana gelen ağırlık artışında, sunulan çalışmada irdelenmeyen interstisyel dokudaki bir değişiklikten, veya artmış Sertoli hücresi aktivitesi nedeniyle seminifer tübül lümenlerine daha fazla seminal sıvı salgılanması sonucu meydana gelmiş olabileceği düşünülmüştür. Zira daha önceki çalışmalarda (193) kriptorşid hayvanlarda testislerde Leydig hücresi hipertrofisi ve hiperplazisi olduğu bildirilmiştir.

Tek taraflı kriptorşid olgularda her ne kadar kontralateral skrotal testislerde kompensatuar bir hipertrofi gözlenmiş olsa da, kriptorşid erişkinlerin büyük çoğunluğu subfertil veya infertil bulunmuştur (123,124,125). İnmiş testis tarafından normal sperm üretimi devam ediyor olmasına rağmen bu vakaların subfertil/infertil oluşunda, bozulan KTB nedeniyle germ hücresi antijenlerinin dolaşıma karışması sonucu otoimmün cevap oluşmasının da rolü olabileceği düşünüldü. Nitekim Srinivas ve ark. (231) yaptıkları çalışmada tek taraflı kriptorşid hayvan modelinde anti-sperm antijenleri bakmışlar ve kontrol grubunda anti-sperm antijenleri negatif çıkarken deney grubu hayvanlarında pozitif çıktığını bildirmişlerdir.

5.8. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, kriptorşidizmin inmemiş testislerde Sertoli hücrelerinin gerek hücre iskeleti elemanlarında ve gerekse bağlantı komplekslerinde yaygın dejenerasyona sebep olduğuna karar verildi. Bu dejenerasyonun ise sonuçta germ hücrelerinin apoptozuna ve seminifer epiteli terk etmesine neden olduğu sonucuna varıldı.

Kontralateral skrotal testiste kompensatuar bir ağırlık artışı ve seminifer tübül duvarı kalınlaşması meydana gelmesine rağmen germ hücreleri sayısının kontrol testislere nazaran anlamlı oranda azalmış bulunmasından hareketle, kriptorşidizmin yalnızca inmemiş testiste değil aynı zamanda kontralateral skrotal testis üzerinde de spermiyogenezi olumsuz etkileyen sonuçları olduğuna karar verildi.

Bu nedenlerle kriptorşid vakaların doğumdan sonra mümkün olan en kısa sürede tesbit edilerek kriptorşid testislerin uygun klinik yöntemlerle skrotuma indirilmesinin, bu hastaların üreme sağlıkları açısından son derece önemli olduğu sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

1. Hutson JM, Hasthorpe S, and Heyns CF. Anatomical and Functional Aspects of Testicular Descent and Cryptorchidism. *Endocrine Reviews* 1997; 18(2): 259-280.
2. Virtanen HE and Toppari J. Epidemiology and pathogenesis of cryptorchidism. *Human Reproduction Update* 2008; 14(1): 49–58.
3. Hutson JM, Hasthorpe S. Abnormalities of testicular descent. *Cell Tissue Res* 2005; 322: 155-158.
4. Ivell R. and Hartung S. The molecular basis of cryptorchidism. *Molecular Human Reproduction* 2003; 9(4): 175-181.
5. WHO (2002). International Programme on Chemical Safety (IPCS); Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs). Chapter 5: Human Health, p. 51-87. Erişim: 23.02.2006.
http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/
6. Kaleva M. and Toppari J. Cryptorchidism: an indicator of testicular dysgenesis? *Cell Tissue Res* 2005; 322: 167-172.
7. Bergh A and Söder Olle. Studies of cryptorchidism in experimental animal models. *Acta Pædiatrica* 2007; 96: 617–621.
8. Bergh A. Early morphological changes in the abdominal testes in immature unilaterally cryptorchid rats. *Int J Androl* 1983; 6(1): 73-90.
9. Bergh A, Damber JE, Ritzén M. Early signs of Sertoli and Leydig cell dysfunction in the abdominal testes of immature unilaterally cryptorchid rats. *Int J Androl* 1984; 7(5): 398-408.

- 10.** Tomomasa H, Adachi Y, Oshio S, Umeda T, Irie H, Ishikawa H. Germ cell apoptosis in undescended testis: the origin of its impaired spermatogenesis in the TS inbred rat. *J Urol* 2002; 168(1): 343-347.
- 11.** Ohta Y, Nishikawa A, Fukazawa Y, Urushitani H, Matsuzawa A, Nishina Y, Iguchi T. Apoptosis in adult mouse testis induced by experimental cryptorchidism. *Acta Anat (Basel)* 1996; 157(3): 195-204.
- 12.** Barone JG, Christiano AP, and Ward WS. DNA organization in patients with a history Of cryptorchidism. *Urology* 2000; 56: 1068-1070.
- 13.** Toppari J and Kaleva M. Maldescendus testis. *Horm Res* 1999; 51: 261–269.
- 14.** Ferlin A, Zuccarello D, Garolla A, Selice R, Foresta C. Hormonal and genetic control of testicular descent. *Reproductive BioMedicine Online* 2007; 15(6); 659-665.
- 15.** Watts LM, Hasthorpe S, Farmer PJ, Hutson JM. Apoptotic cell death and fertility in three unilateral cryptorchid rat models. *Urol Res* 2000; 28: 332-337.
- 16.** Ofordeme KG, Aslan AR, Nazir TM, Hayner-Buchan A and Kogan BA. Apoptosis and proliferation in human undescended testes. *BJU Int* 2005; 96(4): 634-638.
- 17.** Tao SX, Guo J, Zhang XS, Li YC, Hu ZY, Han CS, Liu YX. Germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism is mediated by multiple molecular pathways in *Cynomolgus* Macaque. *Front Biosci* 2006; 1(11): 1077-1089.

- 18.** Kwon J, Wang YL, Setsuie R, Sekiguchi S, Sato Y, Sakurai M, Noda M, Aoki S, Yoshikawa Y, and Wada K. Two Closely Related Ubiquitin C-Terminal Hydrolase Isozymes Function as Reciprocal Modulators of Germ Cell Apoptosis in Cryptorchid Testis. *Am J Pathol* 2004; 165(4): 1367-1374.
- 19.** DeFoor WR, Kuan CY, Pinkerton M, Sheldon CA, Lewis AG. Modulation of germ cell apoptosis with a nitric oxide synthase inhibitor in a murine model of congenital cryptorchidism. *J Urol.* 2004;172: 1731-1735.
- 20.** Zhang ZH, Jin X, Zhang XS, Hu ZY, Zou RJ, Han CS, Liu YX. Bcl-2 and Bax are involved in experimental cryptorchidism-induced testicular germ cell apoptosis in rhesus monkey. *Contraception* 2003; 68: 297-301.
- 21.** Henriksén K, Hakovirta H, Parvinen M. In-situ quantification of stage-specific apoptosis in the rat seminiferous epithelium: effects of short-term experimental cryptorchidism. *Int J Androl* 1995; 18(5): 256-262.
- 22.** Koçak I, DüNDAR M, Hekimgil M, Okyay P. Assessment of germ cell apoptosis in cryptorchid rats. *Asian J Androl* 2002; 4: 183-186.
- 23.** Wang ZQ, Watanabe Y, Toki A, and Itano T. Altered Distribution of Sertoli Cell Vimentin and Increased Apoptosis in Cryptorchid Rats. *Journal of Pediatric Surgery* 2002; 37(4): 648-652.
- 24.** Kyoko I, Tanemura K, Gotoh H, Kurohmaru M and Hayashi Y. Apoptosis-Like Cell Death in Experimentally Induced Crpytorchidism in Adult Mice. *J Vet. Med. Sci* 1997; 59(5): 353-359.
- 25.** Matarrese P and Malorni W. Human immunodeficiency virus (HIV)-1 proteins and cytoskeleton: partners in viral life and host cell death. *Cell Death and Differentiation* 2005; 12: 932–941.

- 26.** Grzanka D, Domaniewski J, Grzanka A. Effect of doxorubicin on actin reorganization in Chinese hamster ovary cells. *Neoplasma* 2005; 52(1): 46-51.
- 27.** Richburg JH, Boekelheide K. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly alters both Sertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; 137(1): 42-50.
- 28.** Boekelheide K, Schoenfeld HA. Spermatogenesis by Sisyphus: proliferating stem germ cells fail to repopulate the testis after 'irreversible' injury. *Adv Exp Med Biol.* 2001; 500: 421-428.
- 29.** Correa LM and Miller MG. Microtubule Depolymerization in Rat Seminiferous Epithelium Is Associated with Diminished Tyrosination of alpha-Tubulin. *Biology Of Reproduction* 2001; 64: 1644-1652.
- 30.** Genesc M, Sola A and Hotter G. Actin cytoskeleton derangement induces apoptosis in renal ischemia/reperfusion. *Apoptosis* 2006; 11: 563-571.
- 31.** Fazal F, Gu L, Ihnatovych I, Han YJ, Hu WY, Antic N, Carreira F, Blomquist JF, Hope TJ, Ucker DS, and de Lanerolle P. Inhibiting Myosin Light Chain Kinase Induces Apoptosis In Vitro and In Vivo. *Molecular And Cellular Biology* 2005; 25(14): 6259-6266.
- 32.** Zhang ZH, Hu ZY, Song XX, Xiao LJ, Zou RJ, Han CS and Liu YX. Disrupted expression of intermediate filaments in the testis of rhesus monkey after experimental cryptorchidism. *Int J Androl* 2004; 27:234–239.
- 33.** Fleming SL, Shank PR and Boekelheide K. gamma-Tubulin Overexpression in Sertoli Cells In Vivo: I. Localization to Sites of Spermatid Head Attachment and Alterations in Sertoli Cell Microtubule Distribution. *Biology Of Reproduction* 2003; 69: 310–321.

- 34.** Fleming SL, Shank PR, and Boekelheide K. gamma-Tubulin Overexpression in Sertoli Cells In Vivo. II: Retention of Spermatids, Residual Bodies, and Germ Cell Apoptosis. *Biology Of Reproduction* 2003; 69: 322–330.
- 35.** Ilvesaro J, Tuukkanen J. Gap-junctional regulation of osteoclast function. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2003; 13(2-4): 133-46.
- 36.** Trosko JE and Ruch RJ. Gap Junctions as Targets for Cancer Chemoprevention and Chemotherapy. *Current Drug Targets* 2002; 3: 465-482.
- 37.** Trosko JE, Chang CC. Modulation of cell-cell communication in the cause and chemoprevention/chemotherapy of cancer. *Biofactors* 2000; 12(1-4): 259-263.
- 38.** Jiang JX and Gu S. Gap junction- and hemichannel-independent actions of connexins. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1711: 208-214.
- 39.** Lee NPY, Leung KW, Wo JY, Tam PC, Yeung WSB, Luk JM. Blockage of testicular connexins induced apoptosis in rat seminiferous epithelium. *Apoptosis* 2006; 11: 1215-1229
- 40.** Sluka P, O'Donnell L, Bartles JR, and Stanton PG. FSH regulates the formation of adherens junctions and ectoplasmic specialisations between rat Sertoli cells in vitro and in vivo. *Journal of Endocrinology* 2006; 189: 381-395.
- 41.** Gregorc U, Ivanova S, Thomas M, Turk V, Banks L, Turk B. hDLG/SAP97, a member of the MAGUK protein family, is a novel caspase target during cell-cell detachment in apoptosis. *Biol Chem* 2005; 386(7): 705-710.
- 42.** Baker SF, Yin Y, Runswick SK, Stewart GA, Thompson PJ, Garrod DR, Robinson C. Peptidase allergen Der p 1 initiates apoptosis of epithelial cells independently of tight junction proteolysis. *Mol Membr Biol* 2003; 20(1): 71-81.

- 43.** Bojarski C, Weiske J, Schöneberg T, Schröder W, Mankertz J, Schulzke JD, Florian P, Fromm M, Tauber R and Huber O. The specific fates of tight junction proteins in apoptotic epithelial cells. *Journal of Cell Science* 2003; 117: 2097-2107.
- 44.** Yuasa J, Ito H, Toyama YY, Yuasa S and Masai M. Postnatal development of the testis in Japanese children based on observations of undescended testes. *International Journal of Urology* 2001; 8: 490-494.
- 45.** Cavicchia JC, Sacerdote FL, Ortiz L. The human blood-testis barrier in impaired spermatogenesis. *Ultrastruct Pathol* 1996; 20(3): 211-218.
- 46.** Zhou Y, Takahashi G, Kono S, Takemura H, Shinagawa T. Acquired undescended testis. *Int J Urol* 1998; 5(5): 504-506.
- 47.** Hejmej A, Kotula-Balak M, Sadowska J, Bilińska B. Expression of connexin 43 protein in testes, epididymides and prostates of stallions. *Equine Vet J* 2007; 39(2): 122-127.
- 48.** Zakaria O, Shono T, Imajima T, Suita S. Comparative studies of fertility and histologic development of contralateral scrotal testes in two rat models of unilateral cryptorchidism. *Pediatr Surg Int* 2000; 16: 498-501.
- 49.** Wang ZQ, Todani T, Watanabe Y, Toki A, Ogura K, Miyamoto O, Toyoshima T, Itano T. Germ-cell degeneration in experimental unilateral cryptorchidism: role of apoptosis. *Pediatr Surg Int* 1998; 14: 9-13.
- 50.** Farooqui SM, Al-Bagdadi F, Houslay MD., Bolger GB, Stout R, Specian RD, Cherry JA, Conti M. and O'Donnell JM. Surgically Induced Cryptorchidism-Related Degenerative Changes in Spermatogonia Are Associated with Loss of Cyclic Adenosine Monophosphate-Dependent Phosphodiesterases Type 4 in Abdominal Testes of Rats. *Biology Of Reproduction* 2001; 64:1583-1589.

- 51.** Nambirajan L, Agarwala S, Dinda AK, Mitra DK. Fertility and unilateral undescended testis in the rat model III: ultrastructural changes in the contralateral descended testis. *Pediatr Surg Int* 2002; 18: 276-280.
- 52.** Ross MH, editor. *Histology, A Text and Atlas*. 4th ed. Pennsylvania-USA: Lippincott Williams and Wilkins; 2003. Sayfa: 682-702.
- 53.** Moore KL, Persaud TVN. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. 7th ed. Pennsylvania-USA: Elsevier Science; 2003. Sayfa: 288-328.
- 54.** Pansky B. *Review of Medical Embryology*. Hampshire-UK: Macmillan; 1982. Sayfa: 256-269
- 55.** Sadler TW. *Langman's Medical Embryology*. 9th ed. Pennsylvania-USA: Lippincott Williams and Wilkins; 2004. Sayfa: 337-346, 357-359.
- 56.** Aytekin Y, editor. *Renkli Embriyoloji Atlasi*. İstanbul: Nobel Tip Kitabevleri; 2000. Sayfa: 334-339.
- 57.** Gray's Anatomy; Part-II Embryology: Development of Urogenital Organs. London-UK: Churchill Livingstone; 1988. Sayfa:248-260
- 58.** Feng LX, Chen Y, Dettin L, Pera RA, Herr JC, Goldberg E, Dym M. Generation and in Vitro Differentiation of a Spermatogonial Cell Line. *Science* 2002; 297: 392.
- 59.** Zimmermann S, Steding G, Emmen JMA, Brinkmann AO, Nayernia K, Holstein AF, Engel W, and Adham IM. Targeted Disruption of the *Ins13* Gene Causes Bilateral Cryptorchidism. *Molecular Endocrinology* 1999; 13: 681-691.
- 60.** Beck F, editor. *Human Embryology*. Oxford-UK: Blackwell Scientific Publications; 1985

- 61.** Nef S and Parada LF. Hormones in male sexual development. *Genes & Development* 2000; 14: 3075-3086.
- 62.** Sexton MJ and Anderson P. Undescended testicles. Healthwise Incorporated. [web page on the internet]. Erişim 10.02.2010.
<http://64.143.176.9/library/healthguide/en-us/support/topic.asp?hwid=zm2279>
- 63.** Skinner MK and Griswold MD. Sertoli Cell Biology. California-USA: Elsevier Academic Press; 2005
- 64.** Hughes IA and Acerini CL. Factors controlling testis descent. *European Journal of Endocrinology* 2008; 159: 75-82.
- 65.** Klonisch T, Fowler PA and Hombach-Klonisch S. Molecular and genetic regulation of testis descent and external genitalia development. *Developmental Biology* 2004; 270: 1-18.
- 66.** Clarnette TD and Hutson JM. The Genitofemoral Nerve may Link Testicular Inguinoscrotal Descent with Congenital Inguinal Hernia. *Ausr. N.Z. J. Surg* 1996; 66: 612-617.
- 67.** Levy JB and Husmann DA. The Hormonal Control of Testicular Descent. *Journal of Andrology* 1995; 16(6): 459-463.
- 68.** Hutsona JM and Hasthorpe S. Testicular descent and cryptorchidism: the state of the art in 2004. *Journal of Pediatric Surgery* 2005; 40: 297-302.
- 69.** Canto P, Escudero I, Söderlund D, Nishimura E, Carranza-Lira S, Gutierrez J, Nava A, Mendez JP. A novel mutation of the insulin-like 3 gene in patients with cryptorchidism. *J Hum Genet* 2003; 48:86–90.
- 70.** Hutson JM, Sasaki Y, Huynh J, Yong E, Ting A. The gubernaculum in testicular descent and cryptorchidism. *The Turkish Journal of Pediatrics* 2004; 46: 3-6.

- 71.** Carola R, editor. Human Anatomy. New York-USA: McGraw-Hill, inc.; 1992. Sayfa: 642-666.
- 72.** Junqueira LC and Carneiro J. Basic Histology. 11th edition. New York-USA: McGraw-Hill inc.; 2005. Sayfa: 418-429.
- 73.** Ulkay B. Erker Ratlarda Sentetik Östroje ve Fitoöstrojenin (*Trifolium Pratense*) Genital Sistem Üzerindeki Etkileri. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi; İstanbul 2005.
- 74.** Hess RA. Stages photo. [web page on the internet]. Erişim: 24.02.2010. College of Veterinary Medicine, The University of Illinois at Urbana-Champaign. <http://vetmed.illinois.edu/~rexhess/Images/testis/stgwhel.JPG>
- 75.** França LR, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL, and Russell LD. Germ Cell Genotype Controls Cell Cycle during Spermatogenesis in the Rat. Biology Of Reproduction 1998; 59: 1371-1377.
- 76.** O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, and Simpson ER. Estrogen and Spermatogenesis. Endocrine Reviews 2001; 22(3): 289-318.
- 77.** Gilleron J, Marielle N, Scarabelli L, Senegas-Balas F, Palmero S, Segretain D, Pointis G. A Potential Novel Mechanism Involving Connexin 43 Gap Junction for Control of Sertoli Cell Proliferation by Thyroid Hormones. Journal Of Cellular Physiology 2006; 209:153-161.
- 78.** Show MD, Anway MD, Folmer JS, and Zirkin BaR. Reduced Intratesticular Testosterone Concentration Alters the Polymerization State of the Sertoli Cell Intermediate Filament Cytoskeleton by Degradation of Vimentin. Endocrinology 2003; 144(12): 5530–5536.

- 79.** Mruk DD and Cheng CY. Sertoli-Sertoli and Sertoli-Germ Cell Interactions and Their Significance in Germ Cell Movement in the Seminiferous Epithelium during Spermatogenesis. *Endocrine Reviews* 2004; 25(5):747-806.
- 80.** Breckwoldt M, editor. *Exempla Endocrinologica*. Volume:1. Munich-DE: Schering AG Medical Service; 1994 Sayfa: 92-117
- 81.** Nakai M, Hess RA, Netsu J and Nasu T. Deformation of the Rat Sertoli Cell by Oral Administration of Carbendazim (Methyl 2-Benzimidazole Carbamate). *J Androl* 1995; 16: 410-416.
- 82.** Azmi TI, Bongso TA, Harisah M and Basrur PK. The Sertoli Cell of the Water Buffalo - An Electron Microscopic Study. *Can J Vet Res* 1990; 54: 93-98.
- 83.** Cheng CY and Mruk DD. Cell Junction Dynamics in the Testis: Sertoli-Germ Cell Interactions and Male Contraceptive Development. *Physiol Rev* 2002; 82: 825-874.
- 84.** Mruk DD and Cheng CY. Cell-cell interactions at the ectoplasmic specialization in the testis. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 2004; 15(9): 439-447.
- 85.** Zhu LJ, Zong SD, Phillips DM, Moo-Young AJ, and Bardin CW. Changes in the Distribution of Intermediate Filaments in Rat Sertoli Cells During the Seminiferous Epithelium Cycle and Postnatal Development. *Anat. Rec.* 1997; 248: 391-405.
- 86.** Tanemura K, Kurohmaru M, Kuramoto K, Matsumoto M, Hayashi Y. Age-related changes in cytoskeletal components of the BDF1 mouse Sertoli cell. *Tissue Cell*. 1994; 26(3): 447-55.

- 87.** Kurohmaru M, Kanai Y, Hayashi Y. A cytological and cytoskeletal comparison of Sertoli cells without germ cell and those with germ cells using the W/WV mutant mouse. *Tissue Cell* 1992; 24(6): 895-903.
- 88.** Siu MKY and Cheng CY. Dynamic cross-talk between cells and the extracellular matrix in the testis. *BioEssays* 2004; 26: 978-992.
- 89.** Lee NP and Cheng CY. Nitric Oxide/Nitric Oxide Synthase, Spermatogenesis, and Tight Junction Dynamics. *Biology Of Reproduction* 2004; 70: 267–276.
- 90.** Lui WY, Lee WM. Regulation of junction dynamics in the testis-Transcriptional and post-translational regulations of cell junction proteins. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2006; 250: 25-35.
- 91.** Balda MS. and Matter K. Transmembrane proteins of tight junctions. *Cell & Developmental Biology* 2000; 11: 281-289.
- 92.** Lui WY, Mruk D, Lee WM, and Cheng CY. Sertoli Cell Tight Junction Dynamics: Their Regulation During Spermatogenesis. *Biology Of Reproduction* 2003; 68: 1087-1097.
- 93.** Mitic LL, van Itallie CM, and Anderson JM. Molecular Physiology and Pathophysiology of Tight Junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: 250-254.
- 94.** Fanning AS, Mitic LL, and Anderson JM. Transmembrane Proteins in the Tight Junction Barrier. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1337-1345.
- 95.** Florin A, Maire M, Bozec A, Hellani A, Chater S, Bars R, Chuzel F and Benahmed M. Androgens and Postmeiotic Germ Cells Regulate Claudin-11 Expression in Rat Sertoli Cells. *Endocrinology* 2005; 146(3):1532-1540.

- 96.** Kollmar R, Nakamura SK, Kappler JA and Hudspeth AJ. Expression and phylogeny of claudins in vertebrate primordia. *PNAS* 2001; 98(18): 10196-10201.
- 97.** Morita K, Sasaki H, Fujimoto K, Furuse M, and Tsukita S. Claudin-11/OSP-based Tight Junctions of Myelin Sheaths in Brain and Sertoli Cells in Testis. *The Journal of Cell Biology* 1999; 145(3): 579-588.
- 98.** Hellani A, Ji J, Mauduit C, Deschildre C, Tabone E and Benahmed M. Developmental and Hormonal Regulation of the Expression of Oligodendrocyte-Specific Protein/Claudin 11 in Mouse Testis. *Endocrinology* 2000; 141(8): 3012-3019.
- 99.** Olive V, Cuzin F. The spermatogonial stem cell: from basic knowledge to transgenic technology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2005; 37: 246-250.
- 100.** Chiba H, Osanai M, Murata M, Kojima T, Sawada N. Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochimica et Biophysica Acta* 2008; 1778: 588-600.
- 101.** Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S and Tsukita S. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J. Cell Biol* 2005; 171(6): 939-945.
- 102.** Dym M and Fawcett DW. The Blood-Testis Barrier in the Rat and the Physiological Compartmentation of the Seminiferous Epithelium. *Biology Of Reproduction* 1970; 3: 308-326.
- 103.** Bart J, Groen HJM, van der Graaf WTA, Hollema H, Hendrikse NH, Vaalburg W, Sleijfer DT, and de Vries EGE. An oncological view on the blood–testis barrier. *Lancet Oncol* 2002; 3: 357-363.

- 104.** Mulholland DJ, Dedhar S, and Vogl AW. Rat Seminiferous Epithelium Contains a Unique Junction (Ectoplasmic Specialization) with Signaling Properties Both of Cell/Cell and Cell/Matrix Junctions. *Biology Of Reproduction* 2001; 64: 396–407.
- 105.** Guttman JA, Kimel GH and Vogl AW. Dynein and plus-end microtubule-dependent motors are associated with specialized Sertoli cell junction plaques (ectoplasmic specializations). *Journal of Cell Science* 2000; 113: 2167-2176.
- 106.** Lee NPY and Cheng CY. Adaptors, Junction Dynamics, and Spermatogenesis. *Biology Of Reproduction* 2004; 71: 392-404.
- 107.** Siu MKY, Mruk DD, Lee WM, and Cheng CY. Adhering Junction Dynamics in the Testis Are Regulated by an Interplay of beta1-Integrin and Focal Adhesion Complex-Associated Proteins. *Endocrinology* 2003; 144 (5): 2141-2163.
- 108.** Takai Y and Nakanishi H. Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *Journal of Cell Science* 2003; 116: 17-27.
- 109.** Pointis G and Segretain D. Role of connexin-based gap junction channels in testis. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 2005; 16(7): 300-306.
- 110.** Pointis G, Fiorini C, Defamie N, Segretain D. Gap junctional communication in the male reproductive system. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1719: 102-116.
- 111.** Giepmans BNG. Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovascular Research* 2004; 62: 233-245.
- 112.** Fiorini C, Tilloy-Ellul A, Chevalier S, Charuel C, Pointis G. Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. *Reproductive Toxicology* 2004; 18: 413-421.

- 113.** Sridharan S, Brehm R, Bergmann M, and Cooke PS. Role of Connexin 43 in Sertoli Cells of Testis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007; 1120: 131–143.
- 114.** Roscoe WA, Barr KJ, Mhawi AA, Pomerantz DK and Kidder GM. Failure of Spermatogenesis in Mice Lacking Connexin43. *Biology Of Reproduction* 2001; 65: 829-838.
- 115.** Risley MS, Tan IP. Cell-, age- and stage-dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes. *J. Cell Sci.* 1992; 103: 81-96.
- 116.** Hess RA, Cooke PS, Hofmann MC, Murphy KM. Mechanistic Insights into the Regulation of the Spermatogonial Stem Cell Niche. *Cell Cycle* 2006; 5(11): 1164-1170.
- 117.** Fujisawa M. Cell-to-cell cross talk in the testis. *Urol Res* 2001; 29: 144-151.
- 118.** Wong CH, Cheng CY. Mitogen-activated protein kinases, adherens junction dynamics, and spermatogenesis: A review of recent data. *Developmental Biology* 2005; 286: 1-15.
- 119.** MacKinnon AE. The Undescended Testis. *Indian J Pediatr* 2005; 72(5): 429-432.
- 120.** D'Cruz AJ. and Das K. Undescended Testes. *Indian J Pediatr* 2004; 71(12): 1111-1115.
- 121.** Virtanen HE, Bjerknes R, Cortes D, Jørgensen N, Rajpert-de Meyts E, Thorsson AV, Thorup J, Main KM. Cryptorchidism: classification, prevalence and long-term consequences. *Acta Pædiatrica* 2007; 96: 611–616.
- 122.** Virtanen HE, Cortes D, Rajpert-de Meyts E, Ritzen EM, Nordenskjöld A, Skakkebaek NE, Toppari J. Development and descent of the testis in relation to cryptorchidism. *Acta Pædiatrica* 2007; 96: 622–627.

123. Foresta C, Bettella A, Vinanzi C, Dabrilli P, Meriggiola MC, Garolla A, and Ferlin A. Insulin-Like Factor 3: A Novel Circulating Hormone of Testis Origin in Humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5952-5958.

124. Adham IM, Emmen JMA, Engel W. The role of the testicular factor INSL3 in establishing the gonadal position. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2000; 160: 11–16.

125. Kvist K, Thorup J, Byskov AG, Høyer PE, Møllgård K and Andersen CY. Cryopreservation of intact testicular tissue from boys with cryptorchidism. *Human Reproduction* 2006; 21(2): 484-491.

126. Liu SF, Lu GX, Liu G, Xing XW, Li LY, and Wang Z. Cloning of a full-length cDNA of human testis-specific spermatogenic cell apoptosis inhibitor TSARG2 as a candidate oncogene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004; 319: 32-40

127. Wong WY, Thomas CMG, Merkus JMWM, Zielhuis GA and Steegers-Theunissen RPM. Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. *Fertil Steril* 2000; 73: 435-42.

128. Thonneau PF, Candia P, and Mieusset R. Cryptorchidism: Incidence, Risk Factors, and Potential Role of Environment; An Update. *Journal of Andrology* 2003; 24(2): 155-162.

129. Yılmaz Ö. Rat Deneysel Kriptorşidizm Modelinde beta-hCG Tedavisinin Testiste Neden Olduğu Makroskopik ve Histopatolojik Değişikliklerin İncelenmesi. T.C. Genelkurmay Başkanlığı Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Üroloji Programı, Tıpta Uzmanlık Tezi; İstanbul 2007.

130. Berkowitz GS and Lapinski RH. Risk factors for cryptorchidism: a nested case control study. *Paediatric and Perinatal Epidemiology* 1996, 10: 39-51.

- 131.** Tan KAL, de Gendt K, Atanassova N, Walker M, Sharpe RM, Saunders PTK, Denolet E, and Verhoeven G. The Role of Androgens in Sertoli Cell Proliferation and Functional Maturation: Studies in Mice with Total or Sertoli Cell-Selective Ablation of the Androgen Receptor. *Endocrinology* 2005; 146(6): 2674-2683.
- 132.** Nef S, Shipman T, and Parada LF. A Molecular Basis for Estrogen-Induced Cryptorchidism. *Developmental Biology* 2000; 224: 354-361.
- 133.** Toppari J, Kaleva M, Virtanen HE, Main KM, Skakkebaek NE. Luteinizing hormone in testicular descent. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2007; 269: 34-37.
- 134.** Yuan FP, Lin DX, Rao CV and Lei ZM. Cryptorchidism in LhrKO animals and the effect of testosterone-replacement therapy. *Human Reproduction* 2006; 21(4): 936-942.
- 135.** Ferlin A, Bogatcheva NV, Giansello L, Pepe A, Vinanzi C, AgoulNIK AI and Foresta C. Insulin-like factor 3 gene mutations in testicular dysgenesis syndrome clinical and functional characterization. *Molecular Human Reproduction* 2006; 12(6): 401-406.
- 136.** Adham IM and AgoulNIK AI. Insulin-like 3 signalling in testicular descent. *International Journal of Andrology* 2004; 27: 257-265.
- 137.** Adham IM, Steding G, Thamm T, Büllesbach EE, Schwabe C, Paprotta I and Engel W. The Overexpression of the InsL3 in Female Mice Causes Descent of the Ovaries. *Molecular Endocrinology* 2002; 16(2): 244-252.
- 138.** Ferlin A, Simonato M, Bartoloni L, Rizzo G, Bettella A, Dottorini T, Dallapiccola B, and Foresta C. The INSL3-LGR8/GREAT Ligand-Receptor Pair in Human Cryptorchidism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2003; 88(9): 4273-4279.

- 139.** Toppari J, Virtanen H, Skakkebaek NE, Main KM. Environmental effects on hormonal regulation of testicular descent. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2006; 102: 184-186.
- 140.** Abney TO. The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: A review. *Steroids* 1999; 64: 610-617.
- 141.** Tomiyama H, Hutson JM, Truong A, and AgoulNIK AI. Transabdominal Testicular Descent is Disrupted in Mice With Deletion of Insulinlike Factor 3 Receptor. *J Pediatr Surg* 2003; 38:1793-1798.
- 142.** Fisher JS, Macpherson S, Marchetti N and Sharpe RM. Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Human Reproduction* 2003; 18(7): 1383-1394.
- 143.** Weidner IS, Möller H, Jensen TK, and Skakkebak NE. Cryptorchidism and Hypospadias in Sons of Gardeners and Farmers. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 793-796.
- 144.** Garcia-Rodriguez J, Garcia-Martin M, Nogueras-Ocaña M, Luna-del-Castillo JD. Garcia ME, Olea N, Lardelli-Claret P. Exposure to Pesticides and Cryptorchidism: Geographical Evidence of a Possible Association. *Environ Health Perspect* 1996; 104: 1090-1095.
- 145.** Foster PND, Mylchreest E, Gaido KW and Sar M. Effects of phthalate esters on the developing reproductive tract of male rats. *Human Reproduction Update* 2001; 7(3): 231-235.
- 146.** Saradha B, Mathur PP. Effect of environmental contaminants on male reproduction. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2006; 21: 34-41.

- 147.** Gray LE Jr, Wilson VS, Stoker T, Lambright C, Furr J, Noriega N, Howdeshell K, Ankley GT. and Guillette L. Adverse effects of environmental antiandrogens and androgens on reproductive development in mammals. *International Journal Of Andrology* 2006; 29: 96–104.
- 148.** Amann RP. Detection of Alterations in Testicular and Epididymal Function in Laboratory Animals. *Environmental Health Perspectives* 1986; 70: 149-158.
- 149.** Dündar M, Koçak I, Çulhaci N. A new experimental model for cryptorchidism: inguinoscrotal approach. *Urol Res* 2001; 29: 178-181
- 150.** Shono T, Suita S. The effect of the excision of future scrotal skin on testicular descent in neonatal rats: a new experimental model of cryptorchidism. *J Pediatr Surg* 1995; 30(5): 734-738.
- 151.** Kerr JB, Richi KA and de Kretser DM. Effects of Experimental Cryptorchidism on the Ultrastructure and Function of the Sertoli Cell and Peritubular Tissue of the Rat Testis *Biology Of Reproduction* 1979; 21: 823-838.
- 152.** Han XB, Zhou XC, Hu ZY, Zhang ZH, Liu YX. Cloning and characterization Of temperature-related gene TRS1. *Archives of Andrology* 2002; 48: 273-280.
- 153.** Yin Y, Hawkins KL, Dewolf WC and Morgentaler A. Heat Stress Causes Testicular Germ Cell Apoptosis in Adult Mice. *J Androl* 1997; 18: 159-165.
- 154.** Juenemann KP, Kogan BA, Abozeid MH. Fertility in cryptorchidism: an experimental model. *J Urol* 1986; 136: 214-216.
- 155.** Shikone T, Billig H, and Hsueh AJW. Experimentally Induced Cryptorchidism Increases Apoptosis in Rat Testis. *Biology Of Reproduction* 1994; 51: 865-872.
- 156.** Steers WD. 5 α -Reductase Activity in the Prostate. *Urology* 2001; 58: 17–24.

- 157.** Husmann DA, McPhaul MJ. Reversal of flutamide-induced cryptorchidism by prenatal time-specific androgens. *Endocrinology* 1992; 131(4): 1711-1715.
- 158.** Husmann DA, McPhaul MJ. Time-specific androgen blockade with flutamide inhibits testicular descent in the rat. *Endocrinology* 1991; 129(3):1409-1416.
- 159.** Spencer JR, Torrado T, Sanchez RS, Vaughan ED Jr, Imperato-McGinley J. Effects of flutamide and finasteride on rat testicular descent. *Endocrinology* 1991; 129(2): 741-748.
- 160.** Kogan BA, Gupta R, Juenemann KP. Fertility in cryptorchidism: further development of an experimental model. *J Urol* 1987; 137(1):128-131.
- 161.** Hall ES, Hall SJ, Boekelheide K. Sertoli cells isolated from adult 2,5-hexanedione exposed rats exhibit atypical morphology and actin distribution. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992; 117(1): 9-18.
- 162.** Sobarzo CM, Lustig L, Ponzio R, Suescun MO, and Denduchis B. Effects of Di(2-ethylhexyl) Phthalate on Gap and Tight Junction Protein Expression in the Testis of Prepubertal Rats. *Microsc. Res. Tech.* 2009; 72: 868-877.
- 163.** Furuse M. Knockout animals and natural mutations as experimental and diagnostic tool for studying tight junction functions in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009; 1788: 813-819.
- 164.** Penson DF, Lugg JA, Coyne C, Sadeghi F, Freedman AL, Gonzalez-Cadavid NF, Rajfer J. Effect of cryptorchidism on testicular histology in a naturally cryptorchid animal model. *J Urol.* 1997; 158(5):1978-1982.
- 165.** van Straaten HWM and Wensing CJG. Histomorphometric Aspects of Testicular Morphogenesis in the Naturally Unilateral Cryptorchid Pig. *Biology Of Reproduction* 1977; 17: 473-479.

- 166.** Pinart E, Bonet S, Briz M, Pastor IM, Sancho S, Garcia N, Badia E and Bassols J. Morphological and histochemical characteristics of the lamina propria in scrotal and abdominal testes from postpubertal boars: correlation with the appearance of the seminiferous epithelium. *Anat.* 2001; 199: 435-448.
- 167.** Zhou B, Hutson JM, Hasthorpe S. Histomorphometric study on germ cell differentiation of unilateral cryptorchidism in the immature pig. *J Pediatr Surg* 1996; 31(10): 1364-1366.
- 168.** Pinart E, Sancho S, Briz M, and Bonet S. Morphologic Study of the Testes from Spontaneous Unilateral and Bilateral Abdominal Cryptorchid Boars. *Journal Of Morphology* 1999; 239: 225–243.
- 169.** Shono T, Zakaria O, Imajima T, Suita S. Extra abdominal fixation of the gubernaculum inhibits testicular descent in newborn rats. *J Pediatr Surg* 1996; 31(4): 503-506.
- 170.** Dündar M, Koçak I, Çulhaci N, Erol H. Determination of Apoptosis Through Bax Expression in Cryptorchid Testis: an Experimental Study. *Pathology Oncology Research* 2005; 11(3): 170-173.
- 171.** Heide S. Perfusion fixation of rat molar pulp tissue for light microscopy. *Scand. J . dent. Res.* 1973; 81: 135-144
- 172.** Abcam Inc. Pressure Perfusion Application Note. [web page on the internet]. Erişim: 01.11.2007.
<http://www.myneurolab.com/global/Manuals/About%20Perfusion.pdf>
- 173.** Moss MB. and Rosene DL. A Perfusion-Fixation Procedure for the Concurrent Demonstration of Timm's, Horseradish Peroxidase (HRP), and Acetylcholinesterase (AChE) Histochemistry. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1984; 32(10): 1113-1116.

- 174.** Leica Microsystems. Perfusion Fixation. [web page on the internet] Erişim: 01.11.2007. <http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/perfusion.pdf>
- 175.** Levy S, Serre V, Hermo L and Robaire B. The Effects of Aging in the Seminiferous Epithelium and the Blood-Testis Barrier of the Brown Norway Rat. *Journal of Andrology* 1999; 20(3): 356-365.
- 176.** Connell CJ. A freeze-fracture and lanthanum tracer study of the complex junction between sertoli cells of the canine testis. *The Journal Of Cell Biology* 1978; 76: 57-75.
- 177.** Nilsson H, Dragomir A, Ahlander A, Ljungkvist M, and Roomans GM. A Modified Technique for the Impregnation of Lanthanum Tracer to Study the Integrity of Tight Junctions on Cells Grown on a Permeable Substrate. *Microscopy Research And Technique* 2006; 69: 776-783.
- 178.** Shaklai M and Tavassoli M. A Modified Technique To Obtain Uniform Precipitation Of Lanthanum Tracer In The Extracellular Space. *The Journal Of Histochemistry And Cytochemistry* 1977; 25(8): 1013-1015.
- 179.** Tisher CC and Yarger WE. Lanthanum permeability of tight junctions along the collecting duct of the rat. *Kidney International* 1975; 7: 35-43.
- 180.** Soares AMV, Arana-Chavez VE, Reid AR. and Katchburian E. Lanthanum tracer and freeze-fracture studies suggest that compartmentalisation of early bone matrix may be related to initial mineralisation. *J. Anat* 1992; 181: 345-356.
- 181.** Harvey MC, Hinsch GW, Cameron DF. Sites of lanthanum occlusion in the testis of the crayfish *Procambarus paeninsulanus* (*Crustacea: Cambaridae*). *Tissue & Cell* 2001; 33(6): 562-569.
- 182.** Mackenzie ML, Ghabriel MN and Allt G. The blood-nerve barrier: an in vivo lanthanum tracer study *J. Anat* 1987; 154: 27-37.

- 183.** Taniwaki NN, Katchburian E. Ultrastructural and lanthanum tracer examination of rapidly resorbing rat alveolar bone suggests that osteoclasts internalize dying bone cells. *Cell Tissue Res* 1998; 293: 173-176.
- 184.** Morales A, Cavicchia JC. Spermatogenesis and blood-testis barrier in rats after long-term Vitamin A deprivation. *Tissue & Cell* 2002; 34(5): 349–355.
- 185.** Barqawi A, Trummer H, Meacham R. Effect of prolonged cryptorchidism on germ cell apoptosis and testicular sperm count. *Asian J Androl* 2004; 6: 47-51.
- 186.** Li YC, Hu XQ, Xiao LJ, Hu ZY, Guo J, Zhang KY, Song XX, Liu YX. An oligonucleotide microarray study on gene expression profile in mouse testis of experimental cryptorchidism. *Front Biosci.* 2006; 1(11): 2465-2482.
- 187.** Hayashi T, Yoshida S, Yoshinaga A, Ohno R, Ishii N And Yamada T. HtrA2 is up-regulated in the rat testis after experimental cryptorchidism. *International Journal of Urology* 2006; 13:157-164.
- 188.** Ishikawa T, Kondo Y, Goda K and Fujisawa M. Overexpression of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Transgenic Mice Accelerates Testicular Germ Cell Apoptosis Induced by Experimental Cryptorchidism. *Journal of Andrology* 2005; 26(2):281-288.
- 189.** Plotton I, Sanchez P, Perrard MH, Durand P and Lejeune H. Quantification of stem cell factor mRNA levels in the rat testis: usefulness of clusterin mRNA as a marker of the amount of mRNA of sertoli cell origin in post pubertal rats *Journal of Endocrinology* 2005; 186: 131-143.
- 190.** Mirando MA, Hoagland TA, Woody CO Jr, and Riesen JW. The influence of Unilateral Castration on Testicular Morphology and Function in Adult Rams. *Biology Of Reproduction* 1989; 41: 798-806.

- 191.** Barenton B, Blanc MR, Caraty A, Hochereau-de Reviers MT, Perreau C, Saumande J. Effect of cryptorchidism in the ram: changes in the concentrations of testosterone and estradiol and receptors for LH and FSH in the testis, and its histology. *Mol Cell Endocrinol* 1982; 28(1): 13-25.
- 192.** Mendis-Handagama SMLC, Kerr JB, and de Kretser DM. Experimental Cryptorchidism in the Adult Mouse: I. Qualitative and Quantitative Light Microscopic Morphology. *Journal of Andrology* 1990; 11(6): 539-547.
- 193.** Jegou B, Peake RA, Irby DC and de Kretser DM. Effects of the Induction of Experimental Cryptorchidism and Subsequent Orchidopexy on Testicular Function in Immature Rats. *Biology Of Reproduction* 1984; 30: 179-187.
- 194.** Tesarik J, Ubaldi F, Rienzi L, Martinez F, Iacobelli M, Mendoza C and Greco E. Caspase-dependent and -independent DNA fragmentation in Sertoli and germ cells from men with primary testicular failure: relationship with histological diagnosis *Human Reproduction* 2004; 19(2): 254-261.
- 195.** Blanco-Rodrguez J And Martinez-Garcia C. Apoptosis Pattern Elicited by Several Apoptogenic Agents on the Seminiferous Epithelium of the Adult Rat Testis *Journal of Andrology* 1998; 19(4): 487-497.
- 196.** de Rooij DG. The Spermatogonial Stem Cell Niche. *Microsc. Res. Tech.* 2009; 72: 580-585.
- 197.** Yoshida S, Sukeno M, Nabeshima Y. A Vasculature-Associated Niche for Undifferentiated Spermatogonia in the Mouse Testis. *Science* 2007; 317: 1722.
- 198.** Matsuki S, Iuchi Y, Ikeda Y, Sasagawa I, Tomita Y, and Fujii J. Suppression of cytochrome c release and apoptosis in testes with heat stress by minocycline. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 312: 843-849.

- 199.** Thonneau P, Bujan L, Multigner L and Mieusset R. Occupational heat exposure and male fertility: a review. *Human Reproduction* 1998; 13(8): 2122-2125.
- 200.** Francavilla S, D'abrizio P, Rucci N, Silvano G, Properzi G, Straface E, Cordeschi G, Necozone S, Gnassi L, Arizzi M, and Ulisse S. Fas and Fas Ligand Expression in Fetal and Adult Human Testis with Normal or Deranged Spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(8): 2692-2700.
- 201.** Yin Y, Stahl BC, Dewolf WC, and Morgentaler A. p53 and Fas Are Sequential Mechanisms of Testicular Germ Cell Apoptosis. *Journal of Andrology* 2002; 23(1): 64-70.
- 202.** E. Anton. Arrested apoptosis without nuclear fragmentation produced by efferent duct ligation in round spermatids and multinucleated giant cells of rat testis. *Reproduction* 2003; 125: 879-887.
- 203.** Turner TT and Lysiak JJ. Oxidative Stress: A Common Factor in Testicular Dysfunction. *J Androl* 2008; 29: 488-498.
- 204.** Viguera-Villasenor RM, Molina-Ortiz D, Reyes-Torres G, del A`ngel DS, Moreno-Mendoza NA, Cruz MEG, Cuevas-Alpuche O, Rojas-Castaneda JC. Effect of allopurinol on damage caused by free radicals to cryptorchid testes. *Acta histochemica* 2009; 111: 127-137.
- 205.** Show MD, Anway MD and Zirkin BR. An Ex Vivo Analysis of Sertoli Cell Actin Dynamics Following Gonadotropic Hormone Withdrawal. *Journal of Andrology* 2004; 25(6): 1013-1021.
- 206.** Young KA, Zirkin BR and Nelson RJ. Short Photoperiods Evoke Testicular Apoptosis in White-Footed Mice (*Peromyscus leucopus*). *Endocrinology* 1999; 140(7): 3133-3139

- 207.** Romeo R, Castorina S, Marcello MF. Intermediate filaments of human Sertoli cells in germinal alterations. *Ital J Anat Embryol* 1995; 100(2): 75-81.
- 208.** Ozaki-Kuroda K, Nakanishi H, Ohta H, Tanaka H, Kurihara H, Mueller S, Irie K, Ikeda W, Sakai T, Wimmer E, Nishimune Y and Takai Y. Nectin Couples Cell-Cell Adhesion and the Actin Scaffold at Heterotypic Testicular Junctions. *Current Biology* 2002; 12: 1145-1150.
- 209.** Neely MD and Boekelheide K. Sertoli Cell Processes Have Axoplasmic Features: An Ordered Microtubule Distribution and an Abundant High Molecular Weight Microtubule-associated Protein (Cytoplasmic Dynein). *The Journal of Cell Biology* 1988; 107: 1767-1776.
- 210.** Kopecky M, Semecky V, Nachtigal P. Vimentin expression during altered spermatogenesis in rats. *Acta histochemica* 2005; 107: 279-289
- 211.** Kantak SS. and Kramer RH. E-cadherin Regulates Anchorage-independent Growth and Survival in Oral Squamous Cell Carcinoma Cells. *J Biol. Chem* 1998; 273(27): 16953-16961.
- 212.** Wiebe JP, Kowalik A, Gallardi RI, Egeler O, and Clubb BH. Glycerol Disrupts Tight Junction–Associated Actin Microfilaments, Occludin, and Microtubules in Sertoli Cells. *Journal of Andrology* 2000; 21(5): 625-635.
- 213.** Fujioka H, Fujisawa M, Tatsumi N, Kanzaki M, Okuda Y, Okada H, Arakawa S, and Kamidono S. Sertoli cells inhibited apoptosis Of pachytene spermatocytes and round spermatids. *Endocrine Research* 2001; 27(1&2): 75-90.
- 214.** Frisch SM and Screaton RA. Anoikis mechanisms. *Current Opinion in Cell Biology* 2001; 13: 555–562.

- 215.** Zhu Y, Swanson BJ, Wang M, Hildeman DA, Schaefer BC, Liu X, Suzuki H, Mihara K, Kappler J and Marrack P. Constitutive association of the proapoptotic protein Bim with Bcl-2-related proteins on mitochondria in T cells. *PNAS* 2004; 101(20): 7681-7686.
- 216.** Frisch SM. and Francis H. Disruption of Epithelial Cell-Matrix Interactions Induces Apoptosis. *J. Cell Biol* 1994; 124(4): 619-626.
- 217.** Hejmej A, Kotula-Balak M, Sadowska J, Bilińska B. Expression of connexin 43 protein in testes, epididymides and prostates of stallions. *Equine Vet J.* 2007; 39(2): 122-127.
- 218.** Cyr DG, Hermo L, Egenberger N, Mertineit C, Trasler JM, and Laird DW. Cellular Immunolocalization of Occludin during Embryonic and Postnatal Development of the Mouse Testis and Epididymis. *Endocrinology* 1999; 140: 3815-3825.
- 219.** Meyer RA, Laird DW, Revel JP, and Johnson RG. Inhibition of Gap Junction and Adherens Junction Assembly by Connexin and A-CAM Antibodies. *J. Cell Biol* 1992; 119(1): 179-189.
- 220.** Giepmans BNG, Verlaan I and Moolenaar WH. Connexin-43 Interactions with ZO-1 and alfa- and beta-tubulin. *Cell Communication & Adhesion* 2001; 8(4): 219-223.
- 221.** Giepmans BNG, Verlaan I, Hengeveld T, Janssen H, Calafat J, Falk MM. and Moolenaar WH. Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. *Current Biology* 2001; 11:1364-1368.
- 222.** Johnson RG, Meyer RA, Li XR, Preus DM, Tan L, Grunenwald H, Paulson AF, Laird DW and Sheridan JD. Gap Junctions Assemble in the Presence of Cytoskeletal Inhibitors, but Enhanced Assembly Requires Microtubules. *Experimental Cell Research* 2002; 275: 67-80.

- 223.** Thomas T, Jordan K, and Laird DW. Role of Cytoskeletal Elements in the Recruitment of Cx43-GFP and Cx26-YFP into Gap Junctions. *Cell Communication & Adhesion* 2001; 8(4): 231-236.
- 224.** Dressler JB, Allison JE. and Chung KW. Ectopic Testes: A Heritable Mutation in the King-Holtzman Rat: Androgen-Binding Protein in Testes and Epididymides. *Biology Of Reproduction* 1983; 29: 1313-1317.
- 225.** Hagenas L, Ritzen EM. Impaired Sertoli cell function in experimental cryptorchidism in the rat. *Mol Cell Endocrinol* 1975 Dec-1976 Jan; 4(1): 25-34.
- 226.** Kawakami E, Hori T and Tsutsui T. Function of Contralateral Testis after Artificial Unilateral Cryptorchidism in Dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 1999; 61(10): 1107-1111.
- 227.** Bergmann M, Kliesch S. The distribution pattern of cytokeratin and vimentin immunoreactivity in testicular biopsies of infertile men. *Anat Embryol (Berl)* 1994; 190(6): 515-520.
- 228.** Batias C, Siffroi JP, Fénichel P, Pointis G and Segretain D. Connexin43 Gene Expression and Regulation in the Rodent Seminiferous Epithelium. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2000; 48(6): 793-805.
- 229.** Rune GM, Mayr J, Neugebauer H, Anders C, Sauer H. Pattern of Sertoli cell degeneration in cryptorchid prepubertal testes. *Int J Androl* 1992; 15(1): 19-31.
- 230.** Bernal-Manas CM, Morales E, Pastor LM, Pinart E, Bonet S, de la Rosa P, Briz MD, Zuasti A, Ferrer C, Canteras M. Proliferation and apoptosis of spermatogonia in postpubertal boar (*Sus domesticus*) testes with spontaneous unilateral and bilateral abdominal cryptorchidism. *Acta Histochemica* 2005;107: 365-372.

- 231.** Srinivas M, Agarwala S, Gupta SD, Das SN, Shaha C, Mitra DK. Fertility and unilateral undescended testis in the rat model II. *Pediatr Surg Int* 1998; 13: 392-395.

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI



Sayı : 30823
Konu :

Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Başkanlığına

İstanbul, ... / /

29 Kasım 2006

İLGİ: 29.08.2006 tarihli, 1740 sayılı yazınıza :

Bölümünüze bağlı Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında görevli **Doktora Öğr. MEHMET TÜRKER**'in yürüteceği " Deneyel Unilateral Kriptorşidizm Oluşturulmuş Ratlarda Sertoli Hücreleri ve Bağlantı Komplekslerindeki Değişikliklerin İmmunohistokimyasal, Stereolojik ve Elektronmikroskopik Yöntemlerle İncelenmesi" başlıklı tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri 03 Ekim 2006 tarihinde toplanan Fakültemiz Deney Hayvanları Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup, oy birliği ile çalışmanın başlaması uygun bulunmuştur.

Bilgilerinizi, durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini saygılarımla

rica ederim.
EKİ
1 dosya

Tuncay Altuğ
Prof.Dr.Tuncay ALTUĞ
Deney Hayvanları Etik
Kurul Başkanı

Prof.Dr. ÖNER SÜZER
Farmakoloji Anabilim Dalı

Prof.Dr. SERGÜLEN DERVİŞOĞLU
Patoloji Anabilim Dalı

Prof.Dr. PERVİN BOZKURT (YILLIK İZİNDE)
Anesteziyoloji Anabilim Dalı

Prof.Dr.HAKKI OKTAY SEYMEN
Fizyoloji Anabilim Dalı

Prof.Dr. METİN CANER
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Prof.Dr. AHMET DİRİCAN
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Doç.Dr. FADIL AYAN
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Doç.Dr. HATUN HANZADE AKDENİZ DOĞAN
Deontoloji ve Tıp Tarihi

Yard.Doç.Dr. SERDAR UĞURLU
Veteriner Hekim

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	MEHMET	Soyadı	TÜRKER
Doğ.Yeri	ERBAA-TOKAT	Doğ.Tar.	25.07.1970
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	42151970290
Email	mehmettturker@gmail.com	Tel	0536.2260602

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi - Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2010
Yük.Lis.	Celal Bayar Üniversitesi - Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2000
Lisans	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp F. Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü	1993
Lise	Erbaa Lisesi	1988

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Doktora Öğrencisi	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji A. D.	2003-2010
2.	Biyolog	Dr. Pakize Tarzi Laboratuvarları	2001-2003
3.	Araştırma Görevlisi	Celal Bayar Ü. Tıp Fakültesi	1996-2000

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İNGİLİZCE	ÇOK İYİ	İYİ	ÇOK İYİ	ÜDS 96.25	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	52,563	55,475	58,387
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
M.S. Ofis Uygulamaları	Çok İyi

Yayınları

Senkul T, Gurkan L, Aydın M, **Türker M**, Alkan F, Akçetin Z.
Comparative Effect of Finasterid and Dutasterid on Penile Ultrastructure
Journal of Sexual Medicine (yayında)

Özbilgin K, Coşkun Ş, Yüksel H, Tuğlu İ, **Türker M**, Onağ A.
Sigara Dumanına Maruz Kalan Sıçanların Akciğerlerinin Işık Mikroskopik
Yöntemlerle İncelenmesi.
(Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi. 2001, 16(1):25-33)

Yüncü M, Günen A, Çerci M, Sadıkoğlu Y, **Türker M**.
İnsan Burun Mast Hücrelerinin Işık Mikroskopik Düzeyde İncelenmesi.
(Kulak Burun Boğaz İhtisas Dergisi. Yıl:8, Cilt:5, Sayı:1, Nisan 1998.)

Tebliğleri

Şenkul T, **Türker M**, Aydın M, Akçetin Y.Z, Alkan F.
Dutasterid, Finasterid ve Kastrasyonun Fare Penis Dokusunda Oluşturduğu
Elektron Mikroskobu Değişiklikleri ile Periferik Androjen ve Nitrik Oksit
Seviyeleri Üzerine Olan Etkilerinin Karşılaştırılması
(18. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 2007)

Başar M, **Türker M**, Arda O, İrez T.
Süperovulasyonun Ovaryum Dokusu Yapısı Üzerine Etkilerinin Morfolojik
Yönden Araştırılması
(İstanbul Üniversitesi II. Bilim Günleri, 2007)

Tuğlu İ, Baka M, Özbilgin K, Vural K, **Türker M**, Yurtseven ME.

Distribution of Adhesion Molecules and Description of Ultrastructure of Newborn Rat Spinal Cord

(14. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 1999)

Tuğlu İ, Baka M, Özbilgin K, Vural K, **Türker M**, Yurtseven ME.

Transient Expression of Laminin in Postnatal Mouse Retina and Optic Nerve.

(14. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 1999)

Vatansever S, İnan S, Özbilgin K, **Türker M**, Yağçeken S, Benli Z, Ertopçu K, Özelmaz I.

Menstrüal Siklüsün Değişik Fazlarında Ve Erken Gebelik Döneminde Tuba Uterina Etipel Hücrelerinin Fotometrik Yöntemlerle Değerlendirilmesi

(Türk Alman Jinekoloji Derneği, Jinekoloji ve Obstetrik Kongresi, 1999)

Vatansever S, Özbilgin K, **Türker M**, Arı Z.

Diz Eklemindeki Sinovial Effüzyonların Histokimyasal Analizi

(Türk Spor Yaralanmaları, Artroskopi ve Diz Cerrahisi Kongresi, 1998)

Sertifikaları

- İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi “Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu”
Sertifikası (Eylül 2005)

- M.Ü. Atatürk Eğitim Fakültesi Öğretmenlik Sertifika (Mayıs 1994)

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Tarih, sosyal antropoloji, elektronik devreler, motosiklet sporları, günlük yazmak ve fotoğraf