

ABDULLAH SAİD TEKİN

DİCLE ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DIYARBAKIR-2025



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YAVRU VE YETİŞKİN KEDİ TESTİSİNDE KEMİK MATRİKS
PROTEİNLERİNİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL
LOKALİZASYONU**

Abdullah Said TEKİN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ

Doç. Dr. Uğur TOPALOĞLU

DİYARBAKIR-2025



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YAVRU VE YETİŞKİN KEDİ TESTİSİNDE KEMİK MATRİKS
PROTEİNLERİNİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL
LOKALİZASYONU**

Abdullah Said TEKİN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ

Doç. Dr. Uğur TOPALOĞLU

DİYARBAKIR-2025



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Abdullah Said TEKİN'in hazırladığı “Yavru ve yetişkin kedi testisinde kemik matriks proteinlerinin immunohistokimyasal lokalizasyonu” başlıklı tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Doç. Dr. Uğur TOPALOĞLU

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı Prof. Dr. Turgay DEPREM

Üye Prof. Dr. Mehmet Erdem AKBALIK

Üye Doç. Dr. Uğur TOPALOĞLU

Tarih: 26/06/2025

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/....../.... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Mahmut BALKAN

Dicle Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

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 çalışmasıyla 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 olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

26/06/2025

Abdullah Said TEKİN

İmza

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlık ve çalışma süreçlerinde bilgi, tecrübe ve desteğini esirgemeyen değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Uğur TOPALOĞLU'na, hayatımda ve akademik sürecimde, tecrübe ve bilgisiyle bana her türlü konuda destek olan ve yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. M. Erdem AKBALIK'a, ayrıca fikirleri ile destek veren anabilim dalı hocalarımız Prof. Dr. M. Aydın KETANİ, Prof. Dr. Berna GÜNEY SARUHAN ve Prof. Dr. Hakan SAĞSÖZ'e,

Bugünlere gelmemde ve eğitim hayatım boyunca üzerimde çok büyük emekleri olan, her kararında yanımda duran ve destekleyen babam Şehmus TEKİN'e ve annem Gülay TEKİN'e, her türlü konuda yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen canım kardeşim Ammar TEKİN'e, hayatımda girdiğim her işte ve her türlü zorlukta desteğini gördüğüm, yanımda hissettiğim ve beni her an motive eden biricik müstakbel eşim Büşra KELEŞ'e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

BEYAN	I
TEŞEKKÜR.....	II
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	IX
TEZ METNİ.....	1
Özet.....	1
Abstract.....	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Testisin Gelişimi	7
2.2. Testisin Anatomik Yapısı	8
2.2.1. Scrotum.....	8
2.2.2. Testis.....	8
2.2.2.1. Embriyolojik Gelişim ve Yerleşim.....	8
2.2.2.2. Morfoloji ve Büyüme.....	9
2.2.3.Duktus Epididimis.....	9
2.2.4.Duktus Deferens.....	9
2.2.5. Testis Damar, Lenf ve Sinir Ağı.....	10
2.3. Testisin Histolojisi.....	10
2.3.1. Stroma.....	10
2.3.2. İnterstisyel Hücreler (Leydig Hücreleri).....	11
2.3.3. Kıvrımlı Seminifer Tubüller	11
2.3.4. Duktus Epididimis.....	12
2.3.5. Duktus Deferens.....	12
2.4. Testis Fizyolojisi.....	12
2.5. Osteokalsin.....	14
2.6. Osteokalsinin Genital Sistemdeki Rolü.....	16
2.7. Osteonektin.....	17
2.8. Osteonektinin Genital Sistemdeki Rolü.....	18
2.9. Osteopontin.....	18

2.10. Osteopontinin Genital Sistemdeki Rolü.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. Doku Örneklerinin Temini.....	21
3.2. Rutin Histolojik Doku Takibi ve Kesit Alma.....	22
3.3. Yöntem.....	22
3.4. Histolojik Boyama.....	22
3.5. İmmunohistokimyasal Boyama.....	23
3.6. Yarı Kantitatif Değerlendirme.....	25
4. BULGULAR.....	26
4.1. Histolojik Bulgular.....	26
4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	27
4.2.1. Osteokalsin.....	27
4.2.2. Osteonektin.....	28
4.2.3. Osteopontin.....	30
5. TARTIŞMA.....	32
6. SONUÇ.....	39
7. KAYNAKLAR.....	40
EKLER.....	47
EK-1 Etik Kurul Karar Belgesi.....	47
ÖZGEÇMİŞ.....	48
ORJİNALLİK RAPORU.....	49

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

OC	:	Osteokalsin
OPN	:	Osteopontin
ON	:	Osteonektin
NK	:	Natural Killer
IL-6	:	Interlökin 6
RGD	:	Arjinin-Glikin-Aspartik Asit Sekansı
LH	:	Luteinleştirici Hormon
FSH	:	Folikül Stimüle Edici Hormon
GnRH	:	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
SF-1	:	Steroidojenik Faktör-1
HPG Aksı	:	Hipotalamik Pituitar Gonadal Aks
ABP	:	Androjen Bağlayıcı Protein (Androgen Binding Protein)
SPARC	:	Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine
BME-40	:	Bazal Membran-40
B-GLAP	:	Bone Gamma Karboksiglutamik Asit Proteini
GLA	:	Gamma Karboksiglutamik Asit
GPRC6A	:	G Proteinine Bağlı Reseptör Ailesi, C Grubu 6a Üyesi
cOC	:	Karboksile Osteokalsin
ucOC	:	Ankarboksile Osteokalsin
GLP-1	:	Glukagon Benzeri Peptit 1
GPCR	:	G protein Coupled Receptor
GPRC	:	G protein Kenetli Reseptörü
cAMP	:	Halka Yapılı Adenozin Monofosfat
CREB	:	cAMP Response Element Binding Protein
PDGF	:	Platelet Derived Growth Factor
TGF-β	:	Transforming Growth Factor Beta
OC -	:	Osteokalsin Negatif
LH -	:	Lüteinleştirici Hormon Negatif
LHR -	:	Lüteinleştirici Hormon Reseptörü Negatif
DAB	:	3,3'-diaminobenzidin tetra hidroklorür
Ln.	:	Lymph Node

N.	:	Nervous
VDRE	:	Vitamin-D Response Element
Vit.	:	Vitamin
PBS	:	Phosphate Buffer Saline
FTIR	:	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
ST	:	Seminifer Tübül
EE	:	Epididimis Epiteli
DE	:	Duktus Deferens Epiteli
KK	:	Kas Katmanı
KD	:	Kan Damarı
BH	:	Bağdoku Hücresi
TA	:	Tunika Alba
µm	:	Mikrometre
mm	:	Milimetre
mg	:	Miligram
kDa	:	Kilo Dalton
mRNA	:	Messenger Ribonükleik Asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1:** Osteokalsin'in tüm vücut metabolizması üzerindeki hormonal etkileri. Osteokalsin; Pankreasta insülin üretimi, yağ dokusunda insülin duyarlılığı, beyinde nörotransmitter üretimi, testislerde testosteron üretimine etki ettiğinin şematik görüntüsü (32).....15
- Şekil 2:** Kısırlaştırma işlemi sonucu elde edilen testis gösterimi.....21
- Şekil 3.** Yavru ve yetişkin kedi testis, duktus epididimis ve duktus deferens'in morfolojik değerlendirilmesi. TA: Tunika Albuginea, ST: Seminifer Tubül, EE: Epididimis Epiteli, BH: Bağdoku Hücreleri, DE: Deferens Epiteli, KK: Kas Katmanı, KD: Kan Damarı, Sarı ok: Leydig Hücreleri Bar: 50 µm (A,C,D,E,F), 100 µm (B).....27
- Şekil 4.** Yavru ve yetişkin kedi testis, duktus epididimis ve duktus deferensteki osteokalsinin immunohistokimyasal ekspresyonu. ST: Seminifer Tubül, EE: Epididimis Epiteli, BH: Bağdoku Hücreleri, DE: Deferens Epiteli, KK: Kas Katmanı, KD: Kan Damarı, Sarı ok: Leydig Hücreleri, Kırmızı ok: Germ hücreleri, Siyah ok: Sertoli hücreleri, Sarı ok başı: Spermatid, Siyah ok başı: Spermatozoid, Kırmızı ok başı: Spermogonyum, Mavi ok başı: Sertoli hücresi, Yeşil ok başı: Leydig hücresi. Bar: 50 µm (B, C, D, E, F), 25µm (A, d)..... 28
- Şekil 5.** Yavru ve yetişkin kedi testis, duktus epididimis ve duktus deferensteki osteonektinin immunohistokimyasal ekspresyonu. ST: Seminifer Tubül, EE: Epididimis Epiteli, BH: Bağdoku Hücreleri, DE: Deferens Epiteli, KK: Kas Katmanı, KD: Kan Damarı, Sarı Ok: Leydig hücreleri, Kırmızı ok: Germ hücreleri, Siyah ok: Sertoli hücreleri, Sarı ok başı: Spermatid, Siyah ok başı: Spermatozoid, Kırmızı ok başı: Spermogonyum, Mavi ok başı: Sertoli Hücresi, Yeşil Ok Başı: Leydig Hücresi. Bar: Bar: 50 µm (B, C, D, E, F), 25µm (A, d). 29
- Şekil 6.** Yavru ve yetişkin kedi testis, duktus epididimis ve duktus deferensteki osteopontinin immunohistokimyasal ekspresyonu ST: Seminifer Tubül, EE: Epididimis Epiteli, BH: Bağdoku Hücreleri, DE: Deferens Epiteli, KK: Kas Katmanı, KD: Kan Damarı, Sarı ok: Leydig hücreleri, Kırmızı ok: Germ hücreleri, Siyah ok: Sertoli hücreleri, Sarı ok başı: Spermatid, Siyah ok başı:

Spermatozit, Kırmızı ok başı: Spermatogonyum, Mavi ok başı: Sertoli hücresi, Yeşil ok başı: Leydig hücresi. Bar: 50 µm (A, B, C, D, E, F), 25µm (a, d)..... 30

Şekil 7. Osteokalsin, osteonektin ve osteopontin proteinleri için negatif kontrol immünoreaktivitesinin gösterimi. Bar: 100 µm (A), 25 µm (B, C)..... 31



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Kullanılan Antikorlar.	24
Tablo 2. Osteokalsin, osteonektin ve osteopontinin; yavru ve yetişkin testis, epididimis ve deferens kanallarındaki immunohistokimyasal ekspresyon yoğunluğunun semi-kantitatif olarak değerlendirilmesi.	25



Yavru ve Yetişkin Kedi Testisinde Kemik Matriks Proteinlerinin İmmunohistokimyasal Lokalizasyonu

Öğrencinin Adı ve Soyadı: Abdullah Said TEKİN

Danışmanın Adı ve Soyadı: Doç. Dr. Uğur TOPALOĞLU

Anabilim Dalı: Veteriner Histoloji ve Embriyoloji

Özet

Amaç: Bu çalışma, osteokalsin, osteonektin ve osteopontin proteinlerinin; a) olgunluk dönemlerine göre kedi testislerindeki lokalizasyon ve dağılımlarındaki farklılıkları immunohistokimyasal yöntemle belirlemek, b) testisin yapısal bileşenlerine katılıp katılmadıklarını ortaya koymak ve c) erkek kedi üreme fizyolojisindeki olası rollerini saptamak amacı ile tasarlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Sunulan çalışmada, Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Polikliniğine ve Diyarbakır'da bulunan bazı özel veteriner kliniklerine kısırlaştırma amacıyla getirilen, yaşları ve ırkları farklı olan sağlıklı erkek kedilerden elde edilen toplam 30 adet testis dokusu kullanıldı. Dokular, %10'luk nötral tamponlu formalin solüsyonu ile tespit edildi ve daha sonra rutin histolojik aşamalardan geçirilerek parafin blokları haline getirildi. Parafin bloklarından 5 mikrometre kalınlığında seri kesitler alındı. Alınan kesitlerin bir kısmı Crossman'ın üçlü boyaması ile diğer bir kısmı ise immunohistokimya yöntemi ile boyandı.

Bulgular: Çalışmadan elde edilen immunohistokimyasal bulgular sonucunda; osteokalsin, osteonektin ve osteopontin proteinlerinin yavru ve yetişkin testiste bulunan hücrelerde farklı yoğunluklarda lokalize ve dağılım gösterdiği tespit edildi. Osteokalsin, osteonektin ve osteopontin proteinlerinin; yavruardaki sertoli, leydig ve bazı germ hücrelerinde güçlü, duktus deferenslerde ise zayıf yoğunlukta bir immunreaksiyon gösterdiği belirlendi. Bununla birlikte osteopontin immunreaktivitesi epididimis epitel hücrelerinde zayıftan orta seviyeye doğru iken, bağ doku hücrelerinde negatif olduğu gözlemlendi. Yetişkin testisteki spermatositlerde osteonektin ve osteopontin immunreaksiyon yoğunluğunun güçlü, osteokalsinin ise orta seviyelerde olduğu saptandı. Sertoli ve leydig hücrelerinde ise osteokalsinin orta seviyelerde immunreaktivite şekillendirirken, osteonektin ve osteopontinin yok denecek kadar zayıf olduğu belirlendi. Ayrıca osteokalsin immunreaktivitesinin, epididimis epitel hücrelerinde güçlü seviyede şekillendiği gözlenirken, duktus

deferensin epitel hücrelerinde osteonektin ile birlikte orta seviyede olduğu tespit edildi.

Sonuç: Osteokalsin, osteonektin ve osteopontin proteinin; yavru ve yetişkin kedilerdeki testis, epididimis ve deferens kanallarında farklı yoğunluklarda ekspresse olduğu gözlenmiştir. Gözlemlenen ekspresyonun boyama yoğunluğu ve dağılımı açısından kedi ırkları arasında herhangi bir farklılığın bulunmadığı ortaya konulmuştur. Elde edilen bulgulara bakıldığında osteokalsin, osteonektin ve osteopontinin; germ hücrelerinin farklılaşp çoğalmasında, leydig hücrelerinde doğrudan testosteron salınımının düzenlenmesinde ve seminifer tubül duvarındaki hücrelerin metabolik ve mitotik aktivitelerinde olası işlevlere sahip olabileceğini akla getirmiştir.

Anahtar Kelimeler: Osteokalsin, Osteonektin, Osteopontin, Testis, İmmunohistokimya

Immunohistochemical Localization of Bone Matrix Proteins in the Testes of Immature and Mature Cats

Student Surname and Name: TEKİN Abdullah Said

Advisor of Thesis: Doç. Dr. Uğur TOPALOĞLU

Department: Veterinary Histology and Embryology

Abstract

Aim: This study was designed to a) determine the differences in the localization and distribution of osteocalcin, osteonectin and osteopontin proteins in cat testes according to maturity stages by immunohistochemical method, b) reveal whether they participate in the structural components of the testis and c) determine their possible roles in the reproductive physiology of the male cat.

Materials and Methods: In the presented study, a total of 30 testicular tissue samples were obtained from healthy male cats of different ages and breeds, brought for castration to the Dicle University Veterinary Faculty Polyclinic and some private veterinary clinics in Diyarbakır, were used. The tissues were fixed with 10% neutral buffered formalin solution and then processed into paraffin blocks by routine histological stages. Serial sections of 5 micrometer thickness were taken from the paraffin blocks. Some of the sections were stained with Crossman's triple staining and the other part with immunohistochemistry.

Results: As a result of the immunohistochemical findings obtained from the study, it was determined that osteocalcin, osteonectin and osteopontin proteins were localized and distributed in different densities in the cells of the immature and mature testes. It was determined that osteocalcin, osteonectin and osteopontin proteins showed a strong immunoreaction in Sertoli, Leydig and some germ cells in the immature, and a weak immunoreaction in the ductus deferens. However, osteopontin immunoreactivity was weak to moderate in epididymis epithelial cells, while it was negative in connective tissue cells. In spermatocytes of adult testes, osteonectin and osteopontin immunoreaction intensity was found to be strong, while osteocalcin was at moderate levels. In Sertoli and Leydig cells, osteocalcin formed a moderate immunoreaction, while osteonectin and osteopontin were determined to be almost nonexistent. In addition, osteocalcin immunoreactivity was observed to be strong in epididymis

epithelial cells, while it was found to be at a moderate level together with osteonectin in ductus deferens epithelial cells.

Conclusion: It was observed that osteocalcin, osteonectin and osteopontin proteins were expressed in different densities in the testis, epididymis and deferens ducts of kittens and adult cats. It was revealed that there was no difference between cat breeds in terms of staining intensity and distribution of the observed expression. When the findings were examined, it was suggested that osteocalcin, osteonectin and osteopontin may have possible functions in the differentiation and proliferation of germ cells, in the regulation of direct testosterone secretion in Leydig cells and in the metabolic and mitotic activities of cells in the seminiferous tubule wall.

Key words: Osteocalcin, Osteonectin, Osteopontin, Testis, Immunohistochemistry

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Erkek üreme sisteminin özelleşmiş organı olan testis, spermatozoa ve erkek cinsiyet hormonlarının üretimi ve salınımını gerçekleştirerek türün devamlılığını sağlar (1, 2). Testis spermatogenezis ve steroidogenezis olaylarının şekillendiği seminifer tubüller ve onları saran interstisyel bölümlerinden oluşur. Gevşek bağdokudan oluşan interstisyel bölüm ise testosteron hormonunu üreten leydig hücreleri, fibroblastlar, bağışıklık hücreleri, kan ve lenf damarları ile sinirleri içerir (3, 4). Spermatogenezisin ardından spermiyumlar morfolojik olarak olgunlaşır ancak ileri hareketlilik ve döllenme yeteneğine sahip değildir. Spermiyumlar oldukça kıvrımlı bir kanal olan epididimiste moleküler ve fizyolojik değişikliğe uğrayarak olgunlaşırlar (5, 6). Daha sonra, olgun spermiyumlar eklenik genital bezlerin salgıları ile birlikte epididimis ve duktus deferens aracılığı ile dışarı atılır (7). Bu süreçlerin gerçekleşmesi için bazı moleküler ve hormonal faktörlere gerek vardır. Kemik doku organik ve inorganik maddelerden oluşan, kemik iliği ve bunları çevreleyen bir bağ dokuya (periosteum) sahip sinir yönünden oldukça zengindir (8, 9). Kemik doku; ilk olarak vücudun hareketini sağlamak ve vital organların korunması gibi önemli fonksiyonlarının yanı sıra kan hücrelerinin oluşumu (hematopoiesis), bu hücrelerin sistemik dolaşıma salınması, yaygın organ disfonksiyonlarında asit- baz dengesini ayarlaması ve kalsiyum, fosfor, sitokinler, büyüme faktörleri gibi maddelerin depolanması olmak üzere birçok göreve sahiptir (10). Kemik, hücreler ve ekstrasellüler matriksten oluşan bir doku olup, ekstrasellüler matriks de Tip-I kolajen, proteoglikanlar, glikoproteinler ve sialoproteinler gibi çok sayıda matriks proteinlerinden meydana gelir. Bu matriks proteinlerinin bir kısmı, osteokalsin, osteonektin ve osteopontindir. Bu proteinlerin birçok hücre ve dokularda farklı metabolik ve biyolojik fonksiyonlara sahip olduğu bilinmektedir. Erkek üreme sisteminde başta testislerin farklı hücrelerini etkileyerek hem hormonal mekanizmanın devam etmesini hem de üreme için gerekli olan hücrelerin oluşumuna, bölünmesine, gelişmesine ve farklılaşmasına katkıda bulunurlar.

Bu tez çalışması, immunohistokimya yöntemine göre osteokalsin, osteonektin ve osteopontin proteinlerinin; i) kedilerin yavru ve yetişkin dönemlerine göre lokalizasyonlarında ve dağılımlarında farklılıklar gösterip göstermeyeceğini, ii) testis,

duktus epididimis ve duktus deferensin yapısal bileşenlerine katılıp katılmayacaklarını ve iii) testisteki olası fizyolojik etkilerinin aydınlatılmasına yönelik bilgilerin ortaya koyulması amacı ile tasarlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testisin Gelişimi

Embriyonun kromozomal ve genetik cinsiyeti, sekonder oositin döllenmesinde görev alan spermiyumun türüne bağlı olarak fertilizasyon aşamasında belirlenir (11). Primordiyal gonadın mezenkimal bölümü, insan embriyosunun 10-12. dorsaldeki kısımlarında büyümeye devam ederken, gelişimin 3. haftasında primordiyal germ hücreleri, allantoisin başlangıç yerine yakın bir konumda, yolk kesesi duvarında ve endoderm hücreleri arasında ortaya çıkar (12). Bu ilkel germ hücreleri, beşinci haftanın başlarında amfibimsi hareketlerle son bağırsak mezenterinin dorsal yüzeyinden ilerleyerek primitif gonadlara ulaşır. Altıncı haftada genital kıvrımlara tamamen yerleşerek, henüz farklılaşmamış olan fetal gonadın oluşumunu tamamlarlar (13). Her iki cinsiyete ait farklılaşmamış gonadlar, gebeliğin yedinci haftasına kadar benzer yapıya sahiptir ancak yedinci haftayla birlikte, gonadlar XX veya XY kromozom yapısına bağlı olarak erkek ya da dişi yönünde farklılaşmaya başlar (11). Bu haftanın başında, genetik olarak XY kromozomlarına sahip embriyoda, primitif germ kordonları Y kromozomu üzerindeki testis belirleyici faktörün (SRY) etkisiyle hızlıca çoğalır. Gonadın medulla bölgesini dolduran bu kordonlar, testis veya meduller kordonlar olarak adlandırılır. Bu yapılar zamanla gonadın hilusunda daha ince kordonlara ayrılarak ağ benzeri bir yapıya dönüşür ve “rete testis”i meydana getirir (12). Gelişim ilerledikçe testis kordonları, testis yüzeyindeki fibröz yapıdaki tunika albuginea sayesinde yüzey epiteliyle olan bağlantılarını kaybederler (13). Bu kordonlar puberteye kadar kapalı kalır. Puberte döneminde ise içlerinde lümen (boşluk) oluşur ve bu sayede seminifer tübüller şekillenir. Bu tübüller, rete testis lümeniyle bağlantı kurarak duktuli efferentes aracılığıyla Wolf kanalına açılır ve böylece duktus deferens oluştururlar. Gebeliğin 8-18. haftaları arasında, testisin interstisyel dokusunda bulunan mezenkimal hücrelerin hızlı dönüşümüyle birlikte Leydig hücreleri gelişmeye başlar. Bu dönemde leydig hücreleri testis hacminin yaklaşık %50’sini oluştururken, gebeliğin ortalarından itibaren ve doğuma yaklaştıkça sayılarında azalma görülür (14). Başlangıçta bel (lumbal) bölgesinde yer alan testisler, üçüncü fetal aydan itibaren skrotuma doğru inişe geçerler. Bu inişin geliştirilen bazı hipotezlere göre (15), iki evrede gerçekleşir: İlk olarak, transabdominal evre yer alır.

Bu evre, androjenden bağımsız olup anti-Müllerian hormonun etkisiyle testisin karın arka duvarı boyunca aşağıya doğru hareket ettiği dönemdir. Testis bu süreçte, gebeliğin 17. haftasında iç inguinal halka hizasına ulaşır ve yaklaşık 28. haftaya kadar burada kalır. Ardından gelen inguinokrotal evrede ise testis, inguinal kanaldan geçerek karın ön duvarını aşar ve skrotuma iner. Gebeliğin yedinci ayından sonra inguinal kanaldan geçmiş olan testis, doğumdan hemen önce nihai yerine ulaşarak gelişimini tamamlamış olur (14).

2.2 Testis Anatomisi

Erkek üreme sistemi, spermatozoon üretimi ve olgunlaşmasının yanı sıra bu hücrelerin taşınması ve dış genital sistemine aktarılmasından sorumlu olan, birbiriyle ilişkili iç ve dış genital yapılardan meydana gelir. Bu yapıları; skrotum, testisler, epididimis, duktus deferens, üretra, aksesuar bezler ve penis oluşturur (16).

2.2.1. Skrotum

Skrotum, testisleri çevreleyen ve vücut dışına sarkan deri ve deri altı dokulardan oluşan bir kesedir. Anatomik olarak anüsün ventralinde, prepusyumun dorsalinde yer alır ve kuyruk yukarı kaldırıldığında gözlemlenebilir. Kedilerde scrotum, tüylerle kaplı olup ince ve elastik bir yapıya sahiptir. Testisleri dış çevre koşullarına göre daha düşük sıcaklıkta tutarak spermatogenezis için gerekli olan fizyolojik ısıyı ayarlanmasına olanak tanır. Bu ısı düzenlenmesi, skrotumun yüzeysel venöz ağı (özellikle plexus pampiniformis) ile birlikte sağlanır (16).

2.2.2. Testis

2.2.2.1. Embriyolojik Gelişim ve Yerleşim

Testisler, embriyolojik olarak gonadal primordiumdan köken alır ve fetal gelişim sırasında karın boşluğundaki bel hizasından scrotum içine doğru göç ederler (descensus testis). Bu göçün gerçekleşmesini sağlayan ve testisleri skrotuma yönlendiren de fibröz yapı olan gubernakulum testistir. Kedilerde testisler 12-14 haftalarda skrotum içine inerek kalıcı pozisyonlarını alır. Bununla birlikte testisler doğumdan pubertaya kadar ki sürede inguinal kanal boyunca hareketli olabilirler (16, 17).

2.2.2.2. Morfoloji ve Büyüme

Erişkin erkek kedilerde testisler yaklaşık olarak $1.5 \times 1 \times 1$ cm boyutlarında, 2- 4 gram ağırlığındadır. Doğumda yaklaşık 20 mg olan testis ağırlığı, puberta ile birlikte 500 mg'a kadar çıkabilir. Yapı olarak küre-oval formda olan testisler, tunika vaginalis adı verilen çift katmanlı bağ dokusu ile sarılmıştır. Bu zar, peritondan köken alır ve testisin skrotum içerisindeki seröz örtüsünü oluşturur. Testis parankimi büyük oranda seminifer tübüllerden oluşur. Spermatozoon üretimi bu tübüller içerisinde ve ortalama 45 gün içerisinde gerçekleşir. Seminifer tübül somatik Sertoli hücreleri ve germ hücrelerinden oluşan sütunlu bir epitel ile kaplanmıştır. Destek hücresi olarak görev yapan Sertoli hücreleri, spermatogenezi düzenleyici hormonal sinyalleri alır ve spermatozoonların gelişimini destekler. Bununla birlikte seminifer tübül bazal membranı içerisinde spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatidler içerir (18), (19). Ardından seminifer tübüller, medullaya doğru düzleşerek tubuli rektiye meydana getirir ve rete testis ile devam eder. Rete testis, spermatozoonları duktuli efferentes aracılığıyla epididimise taşır. Testis interstisyel dokusunda ise Leydig hücreleri yer alır ve bu hücreler hipofizden salgılanan LH (Luteinize edici hormon) etkisiyle testosteron üretir. Testosteron, ikincil cinsiyet karakterlerinin oluşumu ve spermatogenezin sürdürülmesi için oldukça önemlidir (16, 17).

2.2.3. Duktus Epididimis

Epididimis, testislerin dorsolateralinde yer alır ve testisin proksimal ucundan distaline kadar uzanan tekil ve kıvrımlı bir kanaldan oluşur. Epididimis; kaput (başlangıç), korpus (orta) ve kauda (son) olacak şekilde üç anatomik bölmeyle ayrılır. Kedilerde duktus epididimis yaklaşık 4-6 metre uzunluğunda olup, başlangıç ve orta kısımlarında spermatozoonların olgunlaşması, son kısımda ise depolanması sağlanır (16, 17).

2.2.4. Duktus Deferens

Kauda epididimisten başlayan duktus deferens, spermiyumları epididimisten üretraya taşıyan çift yönlü, düz ve kaslı bir kanaldır. Bu kanalın duvarındaki dairesel ve longitudinal düz kas tabakaları, ejakulasyon sırasında peristaltik kasılmalarla spermiyumların taşınmasını sağlar. Kedilerde duktus deferens, diğer bazı türlerde

olduğu gibi üretra ile birleşmeden önce ampulla adı verilen genişlemeyi oluşturmaz (16).

2.2.5. Testislerin Damar, Lenf ve Sinir Ağı

Arteria testikularis, aorta abdominalis'ten doğrudan çıkar ve testise plika vaskulosa içerisinde ulaşır. Bu arterin çevresinde gelişen plexus pampiniformis, venöz dönüş sırasında ısının uzaklaştırılmasına yardımcı olarak testis sıcaklığını düzenler. Vena testikularis, plexus pampiniformis'in birleşmesiyle oluşur ve vena kava kaudalis'e dökülür. Sağ testiküler vena direkt vena kava kaudalis'e açılırken, sol testiküler vena ise vena renalis sinistraya açılır. Bunlarla birlikte lenfatik damarlar, hormon taşıma ve immün savunma açısından önemlidir. Sinirsel innervasyon sempatik (plexus testikularis) ve parasempatik (n. pelvikus) sinir lifleriyle sağlanır. Bu sinirler, vasküler tonusun düzenlenmesinde ve ejakulasyon sürecinde görev alır (17).

2.3. Testisin Histolojisi

Bir çift olarak bulunan testisler, spermatozoaların üretiminden ve erkek cinsiyet hormonlarının sentezinden sorumludur. Yapısal ve işlevsel özelliklerine dayanılarak testis içerisindeki dokular stroma ve parankima olacak şekilde sınıflandırılır. Stroma; Tunika vaginalis, Tunika albuginea, Septula testi, Mediastinum testis, Lobuli testis, İnterstisyel bağ dokusu (intestinum testis) ile Leydig hücrelerinden meydana gelir. Parankima; Kıvrımlı seminifer tübüller (Tübüli seminiferi kontorti), Düz seminifer tübüller (Tübüli seminiferi recti), Rete testis, Duktulus efferentes testis kısımlardan oluşur (20).

2.3.1. Stroma

Kolajenden zengin olan bu bağ doku katmanı yaklaşık 1-2 mm kalınlığında ki tunika albuginea ile çevrilidir. Tunika albuginea, tunika vaginalisin viseral tabakasının hemen içerisinde yer alır. Arterler ve venler tunika albuginea içinde dallanır ve burada damar tabakası olarak adlandırılan bir bölgeyi (tunika vasküloza) oluşturur. Bağ dokusu septaları (septula testis) albugineadan başlayıp organın iç kısmına doğru ilerler ve orta kısımda mediastinum testisi (mediyastinum testis) oluştururlar. Septula testis, testis parankimasını, her biri iki ile beş arasında kıvrımlı seminifer tübül içeren çok sayıda piramidal lobüle (lobuli testis) ayırır (20).

2.3.2. İnterstisyel Hücreler (Leydig hücreleri)

Leydig hücreleri, kümeler veya kordonlar halinde bulunup, sayıları yaşa ve türe göre farklılık gösterir. Birbirlerine gap junctionlar ile bağlı olan leydig hücreleri, genellikle kapiller damarlara bitişik şekilde bulunurlar. Histolojik olarak ortaya konulmasında asidik boyalar kullanılır. Küresel şekilli ve ökromatik olan çekirdeklerinde belirgin bir çekirdekçik görülürken, sitoplazmalarında çok sayıda lipid vakuolü, lizozom, peroksizom ve yaygın granülsüz ER yer alır. Granülsüz ER, androstenedionun testosterona dönüşümünü katalize eden 17-R-hidroksisteroid dehidrojenaz içerir. Androjenlerin (testosteron) interstisyel hücreler tarafından üretimi, hipofiz tarafından üretilen luteinize edici hormon (LH) tarafından uyarılması ile gerçekleşir. Bununla birlikte erkeklerde testosteronun %90'ından fazlası bu interstisyel hücreler tarafından üretildiği ifade edilmiştir (21). Testosteron; spermatogenezi (FSH birlikte), cinsel davranışları, eklenik genital bezlerin fonksiyonlarını, ikincil cinsiyet özelliklerin gelişimini ve anabolizmanın düzenlenmesinde rol alır. Testosteron salgılanması, hipotalamus ve hipofizi içeren negatif geri bildirim mekanizmalarına tabidir. İnterstisyel hücreler ayrıca parakrin veya otokrin (protein metabolizmasının düzenlenmesi) olarak etki gösteren çeşitli peptitlerin sentezlenmesinden sorumludurlar (20, 21).

2.3.3. Kıvrımlı Seminifer Tübüller (Tubulus seminiferous kontortus)

Seminifer tübüller bir lamina propriya ile çevrilidir. Lamina propriyanın en içteki tabakası, seminifer tübüllerin bazal laminası ile temas halindedir. Kolajen ve elastik lifler peritübüler hücreleri (miyoid) çevreleyen ince bir tabaka oluşturmak üzere yoğunlaşır. Bu hücreler aktin demetleri içerir ve miyofibroblastlar gibi seminifer tübüllerin kasılmasını sağlar. Bu kasılma, spermiyasyonu (spermilerin tübüler lümene salınmasını) ve spermiyumların tübüller boyunca taşınmasını kolaylaştırır. Erkek gametlerin oluşumu, tübüllerin duvarını kaplayan spermatogonik hücreler ve sertoli hücrelerinden oluşan epitelde gerçekleşir (20, 21). Seminifer epitelin spermatogenik hücreleri, embriyonik gelişim sırasında gonadlara göç eden primordiyal germ hücrelerinin farklılaşması sonucu oluşurlar. Bunlarla birlikte yer alan Sertoli hücreleri, spermatogenik hücrelerinin çoğalmasına ve farklılaşmasına çeşitli şekillerde katkıda

bulunur. Bu katkılar; yapısal destek ve beslenme, fagositoz, proteinlerin sentezi ve salgılanması, spermatogenik hücrelerinin epitel içi göçünü ve spermiyumun tübüler lümenine salınmasını (spermiasyon) kolaylaştırma, kan-testis bariyeri oluşumu şeklinde sıralanmaktadır (20).

2.3.4. Duktus Epididimis

Morfolojik özelliklerine dayanarak, duktus epididimis, her biri farklı işlevlere sahip olan kaput, korpus ve kauda kısımlara ayrılmaktadır. Epididimis kanalı histolojik olarak bakıldığında; yalancı çok katlı prizmatik epitel ile kaplıdır. Distale doğru epitel yüksekliğinin azaldığı ve epitelin kuyrukta belirgin şekilde kalınlaşan düz kas ile çevrili olduğu gösterilmiştir. Kanal duvarına bitişik olarak bulunan gevşek bağ dokusu bol miktarda damar ve sinir ağına sahip olup, içerisinde makrofajlar ve lökositler bulunur. Ayrıca duktus epididimisin; spermilerin olgunlaşması, depolanması ve duktus deferense iletilmesi, sperm sıvılarının emilimi ve metabolik olarak aktif maddelerin salgılanması gibi birçok işleve sahiptir (20, 21).

2.3.5. Duktus Deferens

Duktus deferens; epididimal kanaldan pelvik üretraya kadar uzanmış olup, başlangıç kısmı hafifçe kıvrılarak testisin medial tarafında yer alır. Duktus deferens, testiküler arter, testiküler ven, lenfatik damarlar ve sempatik sinirlerle birlikte spermatik kordon içinden geçer. Diğer canlılardan farklı olarak aygır, boğa ve köpekte bir genişleme (ampulla duktus deferentes) oluşturur. Histolojik olarak duktus deferens, açıkça ayırt edilebilen katmanlardan oluşur. Bu katmanlar; mukoza (tunika mukoza) belirgin uzunlamasına kıvrımlara (plika mukoza) sahiptir. Başlangıçta yalancı çok katlı prizmatik olan epitel, kanalın sonuna doğru tek katlı prizmatik hale gelir. Epitel yüzeyinde bazen kısa stereosilyumlar görülür ve dar bir lamina propriya mukozanın dışına doğru uzanır. Pars glandularise kadar uzanan lamina propriyada geniş elastik lifler bulunurken, bezlere rastlanmaz. En dışta oldukça kalın olan ve düz kaslardan oluşan tunika muskularis yer alır (21, 22).

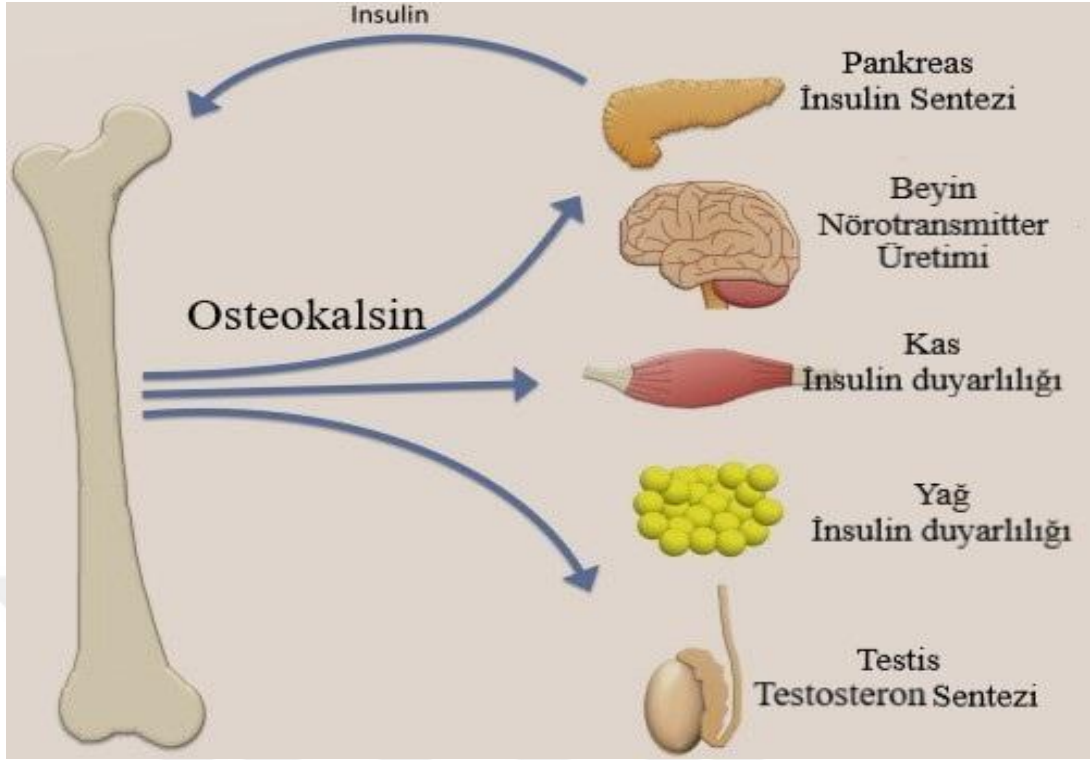
2.4. Testis Fizyolojisi

Evcil dişi kediler mevsime bağlı üreme özelliği gösterirken, erkek kedilerde üreme faaliyetlerinin yıl boyu devam ettiği belirtilmektedir. Ancak erkek kediler ile ilgili görüşler çelişkilidir (23-25). Mevsimsel değişimler evcil erkek kedilerde sperm

miktarı ve hormon üretimini orta düzeyde etkilediği, sperm fonksiyonunda da ihmal edilemeyecek değişimler olduğu kaydedilmiştir (24). Erkek kedilerin spermatogenezinde diğer hayvanlarda olduğu gibi testosteron, FSH, LH ve Androjen Bağlayıcı Protein (ABP) etkilidir. Ayrıca yetersiz beslenme, çevre ısısı, sık çiftleşme ve günlük ışık miktarı gibi faktörler de sperm üretimi üzerine etki etmektedir (26). Spermatogenez erkek kedilerde ortalama 20 haftalık yaşta başlar, 30'cu hafta civarında spermatidler testisler içinde belirgin olarak görülürler. Erkek kedilerde spermatogenez fonksiyonu 8-10 aylıkken olgunlaşır. Spermatogenezis, hipotalamustan salgılanan GnRH'nin etkisiyle hipofizde oluşan gonadotropik hormonların denetimi altındadır. LH testisin interstisyel dokusunda bulunan Leydig hücrelerini uyararak testosteron salınımını sağlar. Kan ve lenf yoluyla tubulusların lumenine gelen testosteron ve dihidrotestosteron gibi androjenler, FSH'nin etkisiyle Sertoli hücrelerinden salgılanan Androjen Binding Protein (ABP) ile birleşir ve bu sayede spermatogenezis başlar. Androjenler hipotalamus ve hipofize yaptıkları uyarımlarla LH salınımını kontrol ederler. Spermatogenezisin gerçekleşebilmesi için ortalama olarak 62 gün gerekmektedir (27). Bunlarla birlikte erkek kedilerde reproduktif aktivitenin yaklaşık 14 yıl kadar sürdüğü ve optimum döl verimi yaşının 4-6 yaş civarında olduğu bildirilmektedir (28). Kemik doku; organik ve inorganik maddelerden oluşan ve kemik iliği ile bunları çevreleyen bir bağ dokuya (periosteum) sahip olup, sinir yönünden oldukça zengindir (8, 9). Kemikler, öncelikle vücudun hareket sistemini sağlamak ve hayati öneme sahip organların korunması gibi önemli fonksiyonlara sahiptir. Daha sonra yapılan çalışmalar sonucunda kemiklerin; kan hücre oluşumu (hematopoiesis), bu hücrelerin sistemik dolaşıma salınması, yaygın organ disfonksiyonlarında asit-baz dengesini ayarlamak ayrıca kalsiyum, fosfor, sitokinler, büyüme faktörleri gibi maddeleri depolamak gibi birçok işleve sahip olduğu ortaya konulmuştur (10). Kemik, kemik doku hücreleri ve ekstrasellüler matriksten oluşmaktadır. Ekstra sellüler matriks de; Tip-1 kolajen, proteoglikanlar, glikoproteinler, sialoproteinler ve osteokalsin (OC), osteopontin (OPN) ve osteonektin (SPARC, ON) başta olmak üzere çok sayıda matriks proteininden meydana gelir (8).

2.5. Osteokalsin

Kemik, uzun süre boyunca sadece koruma ve destek rolü üstlenen, fosfat ve kalsiyum homeostazisini düzenleyen statik bir organ olarak düşünülmüştür. Fakat son yıllarda yapılan güncel çalışmalar sonucunda ise kemiğin çeşitli hormonları salgılayarak bazı fizyolojik yolların kontrol edilmesinde rol alan bir endokrin organ olarak da kabul edilmiştir. Kemik, osteoblastlar, osteoklastlar ve osteosit hücrelerinden destek olarak vücut için gerekli desteği sağlamaktadır. Osteoblast ve osteoklastlar kemiğin yıkılma ve yeniden oluşturulması sürecinde görev almaktadır. Ayrıca osteoblastlar, hücre dışı matriksi sentezleme ve koruma, Tip-I kolajenin sentezlenmesinden ve osteoklastların farklılaşmasında da rol üstlenmektedir (29). Bunlarla birlikte; kemik dokunun endokrin rolünü üstlenen osteoblastlar, sahip oldukları kemik GLA proteini (B-GLAP) tarafından sentezlenen, non-kollajenöz osteokalsin ile bu rolü gerçekleştirirler (30). Osteokalsin, osteoblastlar tarafından salgılanmakla birlikte kemik mineralizasyonu üzerinde yalnızca küçük bir etkiye sahiptir. Ancak burada önemli olan, osteokalsinin kemik mineralizasyonu ve farklılaşma sürecinin son aşamalarında, yani olgun osteoblastlar tarafından sentezlenmesidir. Bu da osteokalsini kemik formasyonunun bir markırı yapmaktadır. Her ne kadar osteokalsin osteospesifik bir ürün olsa da son yapılan çalışmalarda megakaryositler ve adipoz hücrelerinden de salgılandığı rapor edilmiştir (31). Kemik gama glutamik asit proteini (B-GLAP) olarak adlandırılan ve öncelikle osteoblastlar tarafından üretilen osteokalsin, 46-50 amino asitli ve alfa-heliks konformasyonel düzeninde olan 5.6 kDa ağırlığında bir glikoproteindir. Osteokalsin kemik dokunun endokrin işlevini üstlenmesinin yanı sıra, glikoz metabolizmasının düzenlenmesi, üreme, infertilite ve bilişsel süreçlerin kontrolü gibi birçok role sahiptir. Osteokalsin, beyinde nörotransmitter üretimini artırmak, pankreas vasıtası ile enerji metabolizmasını düzenlemek ve insülin seviyesini kontrol ederek hücrelerin işlevsel fizyolojisine etki ettiği gösterilmiştir (32, Şekil 1).



Şekil 1. Osteokalsin'in tüm vücut metabolizması üzerindeki hormonal etkileri. Osteokalsin; Pankreasta insülin üretimi, yağ dokusunda insülin duyarlılığı, beyinde nörotransmitter üretimi, testislerde testosteron üretimine etki ettiğinin şematik görüntüsü (32).

Osteokalsin, çeşitli büyüme faktörleri, hormonlar (parathormon, östrojen vb.), sitokinler ve vitaminlerin (D3, K Vit. vb.) uyarısıyla sentezlenir. D vitamini; B-GLAP geninde bulunan kendine özgü bölge (Vitamin D Response Element- VDRE) aracılığıyla osteokalsin transkripsiyonunu direkt stimüle ederken, K vitamini ise osteokalsini karboksile etmede rol oynar. BGLAP geni, osteoblast proliferasyonunda inaktif rol alırken, osteoblastların farklılaşması esnasında aktif hale geçmektedir. Preproosteokalsin transkripsiyonu D vitamininin stimülasyonu ile gerçekleşir. Ardından proteoliz süreci başlayarak prepeptid ve proosteokalsin oluşur (9, 33). Bunlar karboksillenme seviyelerine göre; proteolitik süreç ile karboksile osteokalsin (cOC) ve ankarboksile osteokalsin (ucOC) formudur. Her iki formunda oluşumu kalsiyuma bağlı olup, cOC kalsiyuma ve hidroksiapetite bağlanır ve kemik matriksinde OC birikimi sağlar. ucOC ise hidroksiapetite düşük afiniteye sahip olduğu için sistemik dolaşıma geçer. cOC biyolojik olarak inaktif iken, ucOC aktif olup

hormon karakterindedir (30). cOC kemik mineralizasyonunu desteklenmesi ve kemik gücünün artırılmasında rol alır iken, ucOC ise pankreas, gonadlar ve yağ dokusunu hedef alan ve çeşitli fonksiyonları olan endokrinolojik formdur. ucOC formunun pankreasta GPRC6A reseptörüne bağlanarak beta-hücre çoğalmasını ve insülin üretilmesini destekler. Bu osteokalsinin pankreas ile kemik arasında pozitif feedback sağladığını göstermiştir. Ayrıca ucOC formu, yağ dokusundan adinopektin salgılanmasını, iskelet kas kapasitesinin artırılmasını ve testislerde testosteron salgısının artırılmasını da sağlar. Bağırsakta ise glukagon benzeri peptid (GLP-1) ekspresyonunu artırarak beyindeki bilişsel işlevleri aktive eder (34). Bunlarla birlikte Aurora Patti ve arkadaşları (33) osteokalsinin; insülin metabolizması, obezite, testosteron sentezinde ve kas kütlesinin kontrolünde kritik rollere sahip olduğunu ifade etmişlerdir (33). Osteokalsin; kemik oluşumunu ve mineralizasyonda, vasküler düz kas hücrelerinin kalsifikasyonunda, bilişsel algıda, kan beyin bariyerini kolayca aştığı, öğrenme ve hafıza merkezlerinin oluşumunu destekleyerek dopamin, serotonin ve epinefrin gibi nörotransmitterler sentezlenmesinde görev aldığı belirtilmiştir (29, 32, 35, 36, 37). Özet olarak osteokalsin, kemikten salgılanarak çeşitli formları aracılığıyla vücudun birçok yerinde ve birçok mekanizmasında aktif olarak görev almaktadır. Bazı organlarda direk hormon olarak görev yaparken bazı organ ve dokularda ise hormonlara ve hücreler arası iletişimin düzenlenmesine katkı sağlamaktadır.

2.6. Osteokalsinin Genital Sistemdeki Rolü

Osteokalsin; öncelikle iskelet sistemi, kas dokusu, yağ dokusu, karaciğer ve pankreas gibi organlara etki ederek birçok fizyolojik işleve sahiptir. Daha sonra yapılan çalışmalarda osteokalsinin, erkek genital sistem üzerinde de rollere sahip olduğu gösterilmiştir. Özellikle steroid hormonlarının sentez ve düzenlenmesinde rol alarak; testis, epididimis ve seminal vezikül, leydig hücre yapısı, testosteron ve sperm miktarı üzerinde doğrudan bir etkisi olduğu belirtilmiştir. Ayrıca osteokalsinin; dişi üreme sisteminde başta uterus yapısı, ovaryumların hacmi, follikül sayısı ve hormon seviyelerinin kontrolünde etkin bir role sahip olduğu da bilinmektedir (30). Embriyonal dönemde osteokalsinin, steroidojenik faktör 1 (SF1) için pozitif bir düzenleyici ve adrenal bez gelişiminin kontrolünü sağlayan önemli bir hormon olduğu gösterilmiştir. Yani gelişmekte olan adrenal korteks hücrelerinde GPR 158 reseptörü aracılığıyla adrenal korteksin oluşumu sağlanır ve yaşam boyunca adrenal

steroidogenezin bir belirleyicisi olur (36). Bunlarla birlikte osteokalsinin testisler için, leydig hücrelerine ait olan özel reseptör GPCR6 ile (G-Protein Coupled Receptor) etkileşime girerek fonksiyonel özellik kazandığı bildirilmiştir. Osteokalsin, LH reseptörünü pas geçip, GPRC6A'ya bağlanarak cAMP'yı artırır. Böylece artan cAMP, testosteron biyosentezini regüle eder ve transkripsiyonel faktör CREB'i uyarır. CREB aktivasyonu ile steroidojenik enzim proteinlerinin ekspresyonu uyarılır ve sonuç olarak testosteron sentezi başlamış olur (30).

2.7. Osteonektin

Osteonektin diğer bir ismi ile SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine), kollajen bağlayıcı, çok işlevli ve matrisellüler yapıda olup 32 kDa ağırlığında bir glikoproteindir (38). SPARC'ın üç domaini bulunur: Asidik domain: Kalsiyuma bağlanma afinitesi düşük olan ve SPARC ailesi proteinleri arasında farklılığı oluşturan bölümdür. Ekstrasellüler matriks üretimini, hücre yayılmasını ve kemotaksisi engellediği tespit edilmiştir. Sisteince zengin domain: Follistatin benzeri olan bu domain bakır (Cu^{2+}) bağlanma bölgesine sahip olup hücre proliferasyonunu engelleyebilir. Ekstrasellüler Ca^{2+} bağlanma domaini: Osteonektinin karboksi ucunda bulunarak hücre ve kollajen tiplerine bağlanma özelliği kazandırır. Kemik dokuda kalsiyum iyonuna bağlanarak mineralizasyona katkıda bulunması ve kemik matriksinde en yaygın non-kolajen protein olması SPARC'ın en iyi bilinen özelliklerindendir. Ayrıca SPARC hücre adezyonu, hücre sirkülasyonu ve belirli büyüme faktörlerine dokunun verdiği yanıtı engellemekle tanınmaktadır. Bunlarla birlikte SPARC ekstrasellüler matriks ve matriks metaloproteinazlarının sentezini düzenleyerek anjiyogenez, tümörögenez, kataraktogenez ve yara iyileşmesinde aktif rol oynar. Kalsiyum iyonuna bağlanma afinitesinden dolayı, kalsiyum iyonlarının seviyesi osteonektin üretimini kontrol eder. SPARC platelet kaynaklı büyüme faktörüne (Platelet derived growth factor- PDGF) bağlanarak bu büyüme faktörünün fibroblastlarda bulunan reseptörlere bağlanmasını engeller. Böylece SPARC'ın PDGF, VEGF gibi büyüme faktörlerine bağlanması ve hücre proliferasyonunu engellemesi osteonektinin anjiyogenezde etkin rol oynadığını gösterir. Bununla birlikte osteonektinin bağ doku şekillenmesi ve ekstrasellüler matriks protein salgılanmasında önemli olan TGF β ile sinerji içerisinde olduğu da bildirilmiştir (37). SPARC'ın dokuların yenilenmesi ve yeniden şekillenmesi ile birlikte embriyonik gelişim ve hücrelerin

birbiri arasındaki farklı etkileşimleri kontrol eden olaylarda rol aldığı gösterilmiştir. Özellikle embriyonal gelişim esnasında kalp primordialarında, kıkırdak, kemik, bağırsak epiteli, deri ve kan damarlarında gözlendiği, anjiyogenez ile maksimum düzeyde ilişkili olduğu bildirilmiştir (38). Bunlarla beraber gelişmekte olan kemik ve dişlerde aktive olmuş trombosit ve megakaryositlerde SAPRC'nin var olduğu gösterilmiştir (40). Genel olarak bakıldığında osteonektin; dokuların yeniden şekillenmesi, yara onarımı, hücre göçü, hücre adezyonlarının kontrolü, kollajen liflerinin morfolojik ve fizyolojik fonksiyonlarının düzenlenmesi gibi birçok role sahiptir (39, 41, 42).

2.8. Osteonektinin Genital Sistemdeki Rolü

Erkek genital sistemi ile ilgili olarak osteonektinin; testislerde özellikle sertoli hücreleri, peritübüler hücreler ve leydig hücreleri tarafından salgılandığı, germ hücrelerinin olgunlaşmasında rol aldığı belirtilmiştir. Ayrıca salgılanan osteonektinin doğrudan gelişmekte olan germ hücreleriyle etkileşime girdiği ve spermatogenez ile testisin somatik hücrelerinin otokrin veya parakrin davranışlarını kontrol edebildiği ifade edilmiştir. Bununla birlikte leydig ve sertoli hücrelerinin morfolojisini etkileyerek biyolojik işlevlerini düzenleyebildiği de düşünülmüştür (43).

2.9. Osteopontin

Osteopontin; 44 kDa ağırlığında, arginin, glisin ve aspartat içeren asidik yapılı, non-kolajen yapıda olan bir glikoproteindir. Birçok dokuda bulunan osteopontin (OPN), küçük integrin bağlayıcı ligandlı N-bağlı glikoprotein (SIBLING) ailesine ait, glikozile olmuş asidik bir fosfoproteindir. İlk olarak sığır kemiğinin mineralize olmamış matriksinde tanımlanan OPN (1986), daha sonra birçok doku ve sıvıda tanımlanmıştır. OPN; glutamik asit, aspartik asit ve serin kalıntıları açısından zengin bir protein olup, hidroksiapatit ve kalsiyum iyonlarına bağlanabilmesini sağlayan bir poliaspartik asit motifine ve hücrelerin integrinlere bağlanmasını destekleyen RGD (Arg-Gly-Asp) amino asit dizisine sahiptir. OPN bir ekstrasellüler matrix proteini olup hücre adezyonu, anjiyogenez, tümör metastazı ve dokuların yeniden şekillenmesi gibi birçok görevde rol alır. Ayrıca kemik şekillenmesi ve kemik matriksinin mineral yapısına osteoklastlar ile katılarak kemik bütünlüğünün korunması ve şekillenmesinde

önemli bir görev alır. Bununla birlikte OPN Tip-1 yardımcı hücre sitokinlerin üretimini düzenlenmesi, immün yanıtın oluşması, doğal ve kazanılmış immün sistemlerin aktivasyonunda rol alır. Ayrıca OPN başlıca osteoblastlardan ve hemopoetik organlardan sentezlense de nötrofillerden, dentrik hücrelerden, NK (doğal öldürücü) hücrelerden, T ve B hücreleri, beyin, düz kas dokusu, dişler, meme bezlerinin endotel hücreleri, pankreas, safra kesesi, plasenta, erkek ve dişi genital yolları olmak üzere vücudun birçok yerinden salgılanmaktadır (44). Bununla birlikte kan, idrar, safra, süt başta olmak üzere bashedilen organların salgılarında da OPN varlığından bahsedilmektedir (45). OPN; hücreyel adhezyon ve migrasyonu kolaylaştırmak, endotel, mezenkimal, epitel ve inflamatuvar hücrelerin yapışması ve göçünü düzenlemek gibi başlıca fonksiyonlarda görev alır. OPN, hücre yüzeyinde ki integrin reseptörlerine bağlanarak hücre-hücre bağlanmasını ve hücre yayılmasını da teşvik eder (46). Bir diğer ifadeye göre OPN hücre adhezyon ve migrasyonun yanı sıra, anjiyojenik özelliklerinin de olduğu belirtilmiştir. Ayrıca OPN, monosit düzenleyici olarak rol alarak, yara iyileşmesi ve inflamasyon da belirgin bir artış gösterdiği tespit edilmiştir (47). Son olarak embriyonun implantasyonu sırasında, OPN endometriyum hücre yüzeyinde ki integrin 8 reseptörlerine bağlanarak implantasyonu desteklediği de ifade edilmiştir (44).

2.10. Osteopontinin Genital Sistemdeki Rolü

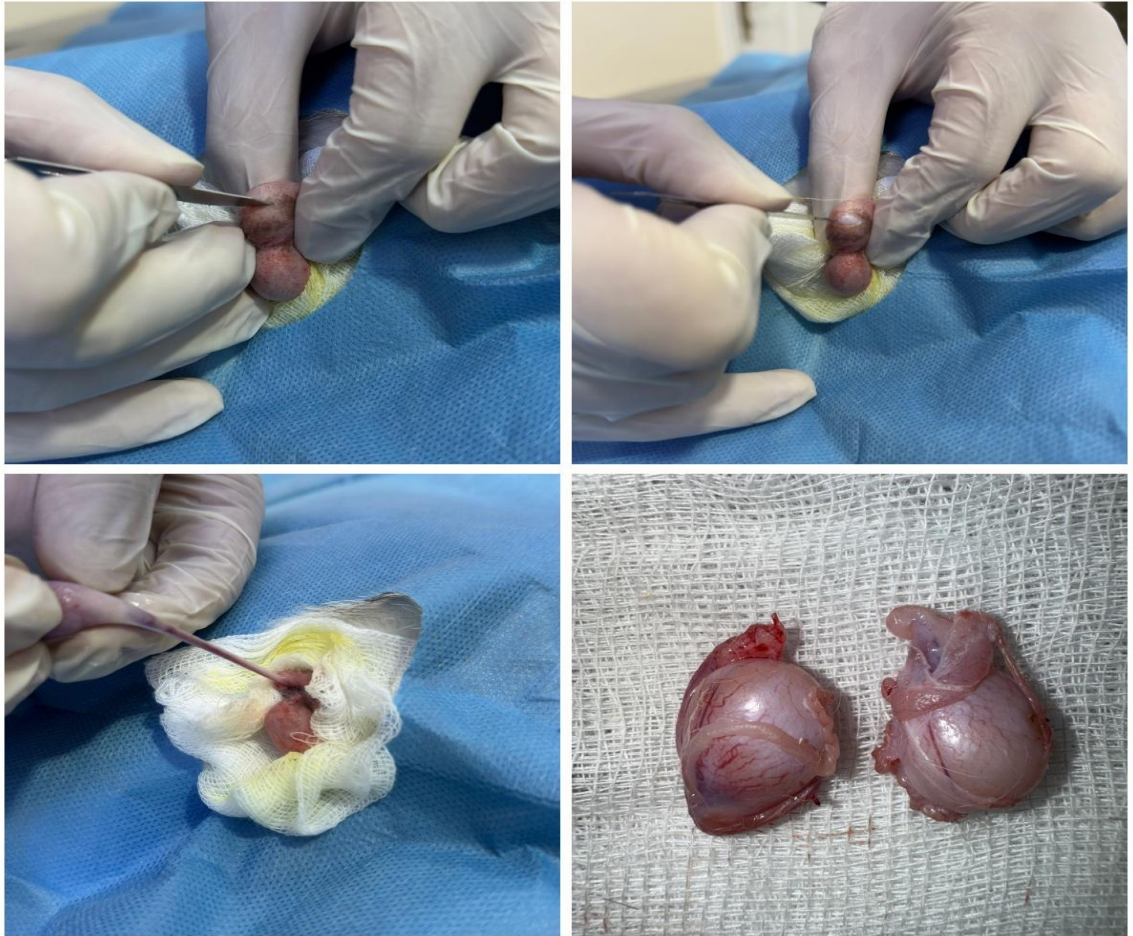
Erkek genital sistem ile ilgili olarak OPN'nin; testis germ hücreleri başta olmak üzere spermatogonyumlar ve spermatositlerin yapısında var olduğu belirtilmiştir. Spermatogonyum ve spermatositlerin bir yandan bazal membran ile bir yandan da sertoli hücreleri ile temas kurduğundan, OPN erken germ hücrelerinin farklılaşmasını sağlayarak, hücre yüzeyine bağlama yetenekleri yoluyla hem hücre dışı matris bileşenlerine hem de sertoli hücrelerine bağlayabilir (48). OPN özellikle testis farklılaşmasının erken aşamalarında, embriyonik testis gelişimi sırasında sertoli hücrelerinin sitoplazmasında tespit edildi. Bunun nedeni olarak sertoli hücrelerinde germ hücrelerini çevrelemek ve beslemek için kordonlara doğru uzanan sitoplazmik süreç oluşumu gösterilmiştir. Ayrıca, osteopontinin gelişmekte olan testis kordonlarının sertoli hücreleri tarafından, her iki cinsiyetin mezonefrik tübüllerinde ve geçici olarak her iki cinsiyetin müllerian kanallarında sentezlendiği belirlenmiştir (49). Bunlarla birlikte OPN'nin epididimiste hücreyel ve bölgesel alanların yanı sıra,

efferent kanallarındaki silyasız hücrelerde de ekspresse olduğu ve fonksiyonel roller üstlendiği ifade edilmiştir (48, 50). Yapılan çalışmalarda arıtılmış sıgır OPN'sine (anti-OPN) karşı üretilmiş bir poliklonal tavşan antikoru ile sperm zarlarında, testis homojenatlarında ve kauda epididimal sıvıda OPN bahsedilmiştir. OPN'nin sperm kapasitasyonunu indüklediği ve sperm canlılığına pozitif yönde etki ettiği söylenmiştir. OPN'inin dişilerdeki üreme sistemindeki işlevi ile ilgili; enzimler, büyüme faktörleri, sitokinler, lenfokinler, hormonlar, taşıma proteinleri ve diğer maddeleri içeren endometriyal bez sekresyonlarının önemli bir bileşeni olduğu ve gebe hayvanların uterusunda varlığında artış meydana geldiği belirtilmiştir (51). OPN, implantasyon ve plasantasyonu kolaylaştırmak için trofektoderm ve endometriyumdaki integrinlere bağlanan bir ligand olarak görev almaktadır. Ayrıca burda OPN'nin, CD44 gibi birçok antijene bağlanarak hücre göçü, hücreler arası bağlantı, kalsifikasyonun inhibisyonunu sağladığı belirtilmiştir. Böylece OPN'nin transkripsiyonel olarak progesteron sentezini ve foliküler anjiyogenezi artırdığı da ortaya koyulmuştur (47).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Doku Örnekleri Temini

Bu tezde kullanılan testis örnekleri; Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Polikliniğine ve Diyarbakır'da bulunan bazı özel veteriner kliniklerine kısırlaştırma amacıyla getirilen yaşları ve ırkları farklı olan sağlıklı erkek kedilerden elde edilmiştir (Şekil 2). Elde edilen 30 çift testis örneği hasta sahiplerinin beyan ettiği ve kedi kimliklerinin dikkate alınması sonucunda, yavru (6 aydan küçük 15 kedi) 15 adet çift testis ve yetişkin (1 yaşından büyük 15 kedi) 15 adet çift testis olacak şekilde gruplandırıldı. Çalışmada kullanılan doku örnekleri; 15.02.2014 tarihli Resmi Gazetede ilan edilen Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliği'nin K bendinde belirtildiği kategoriler içerisinde olup HADYEK iznine tabi değildir.



Şekil 2. Kısırlaştırma işlemi sonucu elde edilen testis gösterimi.

3.2. Rutin Histolojik Doku Takibi ve Kesit Alma

Cerrahi operasyon ile alınan doku örnekleri hemen tespit solüsyonuna alındı. Tespit solüsyonunun dokulara daha iyi nüfuz etmesi amacıyla, dokular tespit solüsyonuna alındıktan kısa bir süre sonra dokuda hissedilen hafif sertlik sonucunda tam ortadan olacak şekilde iki parçaya ayrıldı. Sonrasında her iki gruptaki testis dokuları 24 saat boyunca %10'luk nötral tamponlu formalin solüsyonunda tespit edildi. Ardından dokulardaki tespit solüsyonunu uzaklaştırmak amacı ile dokular bir gece boyunca çeşme suyu altında yıkamaya bırakıldı. Yıkama işleminin sonrasında doku örnekleri sırasıyla %70'lik, %80'lik, %96'lık, Absolut I, Absolut II ve Absolut III alkol serilerinde 1'er saat tutuldu. Bunu takiben 48 saat süresince metilbenzoatta bekletildi ve sonrasında her birinde 45 dakika olacak şekilde benzol I ve benzol II serilerinden geçirildi. Hemen arkasında dokuların parafine alışması için 15 dakika süresince benzol-paraplastta bekletildi. Daha sonra doku örnekleri ez az 3 saat olacak şekilde sıvı parafin içerisinde tutuldu ve sonrasında parafine gömülerek blok şekline getirildi. Ardından elde edilen parafin bloklardan rotary mikrotomunda (Leica RM-2125, Germany) 5 µm kalınlığında seri kesitler alındı.

3.3. Yöntem

Kesitler, yavru ve yetişkin dönemlerdeki testislerin yapısal özelliklerini ortaya koymak amacıyla Crossman'ın üçlü boyama tekniği ile boyandı. Adezivli lamlara alınan diğer kesitler de çalışmada belirtilen faktörlere özgü antikorlar kullanılarak immunohistokimyasal yöntem ile boyandı.

3.4. Histolojik Boyama

Kesitler, deparafinizasyon amacıyla her birinde 5 dakika süresince ksilol I ve ksilol II'de tutuldu. Daha sonra kesitlerin rehidrasyonu için derecesi azalan alkol serilerinin (%100, %96, %80 ve 70 alkol) her birinde sırasıyla 3'er dakika bekletildi. Bu işlemin ardından kesitler distile suya alınarak yıkandı ve sonrasında çekirdek boyaması için Weigert hemotoksilen solüsyonunda 8 dakika süresince reaksiyona bırakıldı. Süre sonunda dokular hemotoksilen solüsyonundan alınarak çeşme suyu altında yıkamaya alındı ve su berraklaşınca kadar yaklaşık 5 dakika süreyle yıkama

işlemi devam etti. Yıkamadan alınan dokular Metil karbonatta 1 dakika süresince çalkalandı ve sonrasında çeşme suyu içinde 4 dakika, distile suyunda 3 dakika boyunca yıkamaya bırakıldı. Kesitler bu kez sitoplazma boyaması için asit fuksin'de 1 dakika tutuldu ardından su berraklaşınca kadar distile suda yıkandı. Ardından dokular önce 6 dakika fosfotungustik asit I, daha sonra 8 dakika fosfotungustik asit II'de bekletilerek boyanın dokuya daha iyi nüfuz etmesi sağlandı. Arkasında 5 dakika süresince distile suda yıkanmaya bırakıldı. Dokulardaki bağ dokunun boyaması için kesitler; 1 dakika süresince Anilin blue'da reaksiyona bırakıldı ve sonrasında su berraklaşınca kadar yaklaşık 5 dakika boyunca distile suda yıkandı. Ardından kesitler sırasıyla %2'lik asetik asitte 7-8 kez çalkalandı, %96 alkolde çalkalayarak hızlıca geçirildi, Absolut alkol I'de 2 dakika, Absolut alkol II'de 3 dakika tutuldu ve daha sonra 15 dakika Ksilol I'de, ardından 30 dakika Ksilol II'de bekletilip entellan ile kapatıldı.

3.5. İmmunohistokimyasal Boyama

İmmunohistokimyasal boyama, streptavidin-biyotin-peroksidaz kompleks yöntemi kullanılarak yapıldı. İmmunohistokimya boyaması için adesivli lamlara alınan seri kesitlerin deparafinizasyon ve dehidrasyon işlemleri uygulandı ve distile suya alındı. Daha sonra, dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için metanolde hazırlanmış %3'lük H_2O_2 'de 20 dakika inkübe edildi ve arkasında phosphate buffer saline (PBS) ile 2x5 yıkandı. Yıkamayı takiben kesitler antijen retrieval işlemi için hazırlanan sitrat buffer tamponunda (0.01 M, pH 6), 95 °C'de 15-20 dakika süresince kaynatılma işlemine tabi tutuldu ve bu işlemten sonra soğumaya bırakıldı. Normal oda sıcaklığında olacak şekilde soğuyan kesitler 0.01M phosphate buffer saline (PBS)'de 3X5 kez yıkandı. Sonrasında kesitler spesifik olmayan boyanmayı önlemek üzere protein blocking çözeltisi (Ultra V Blok, Thermo Fisher Scientific, Lab Vision Corporation) ile oda sıcaklığında 10 dakika süresince inkübasyona bırakıldı. Bu işlemin ardından kesitler Tablo-1'deki primer antikolarla +4°C'de 18 saat süresince inkübasyona bırakıldı. Boyanma tekniğinin doğruluğunu kanıtlama açısından negatif kontroller (antikor yerine PBS ile inkübasyona bırakıldı) kullanıldı. İnkübasyon sonunda kesitler 0.01M PBS'de 3X5 dk. yıkandı ve ardından primer antikora bağlanma sağlamak amacı ile oda sıcaklığında 20 dk boyunca biotinlenmiş sekonder antikora (Histostain Plus Bulk Kit, Zymed) maruz bırakıldı. Bu işlemten sonra preparatlar 0.01M PBS'de her biri beş dakikadan üç kez yıkanması sağlandı.

Dokularda şekillenmiş olan antijen-antikor reaksiyonlarını göstermek amacıyla da kromojen olarak 3,3'-diaminobenzidine hydrochloride (DAB) substrate ile 5-10 dakika (mikroskopta gözlenen renk oluşumuna göre) inkübe edildi ve immunoreaksiyonun meydana gelmesine göre preparatlar distile suya aktararak reaksiyon oluşumuna son verildi. Ardından zemin boyaması için preparatlar 2-3 dk süresince Mayer's hematoksilene maruz bırakıldı ve sonrasında preparatlar mavi renk alana kadar akan çeşme suyu altında yıkandı. Son olarak distile suda çalkalama işlemi yapıp alınan preparatlar sırasıyla alkol ve ksilol serilerinden geçirildi ve entellan ile kapatıldı. Bu işlemler sonucunda preparatlardaki immunohistokimyasal boyanmalar, dijital bir kamera (Nikon Coolpix 4500) ile donatılmış araştırma mikroskobu (Nikon Eclipse E400, Tokyo, Japonya) ile fotoğraflandı ve kayıt edildi.

Tablo 1. Kullanılan Antikorlar.

Antikorlar	Antikor Türü	Elde Edildiği Hayvan	Sulandırma Oranı	Katalog Numarası
Osteokalsin	Polyclonal, IgG	Tavşan	1/200	Santa Cruz, katalog no: sc-30044
Osteonektin	Polyclonal, IgG	Tavşan	1/200	Santa Cruz, katalog no: sc-25574
Osteopontin	Monoclonal, IgG	Fare	1/200	Santa Cruz, katalog no: sc-21742

3.6. Yarı Kantitatif Değerlendirme

İmmünohistokimyasal boyanma analizleri, boyanma yoğunluğu esas alınarak yapılan yoğunluk skoru (intensity score) üzerinden değerlendirildi. Osteokalsin, osteonektin ve osteopontin'in immünohistokimyasal ekspresyonları, pozitif reaksiyon gösteren hücreler baz alınarak nitel (kalitatif) olarak incelendi. Pozitif boyanma gösteren hücreler, boyanma şiddetine göre dört dereceli bir skalada sınıflandırıldı: (-) negatif, (+) zayıf, (++) orta ve (+++) güçlü (52). Bu değerlendirmeler, bağımsız iki uzman araştırmacı (U.T. ve M.E.A.) tarafından ayrı ayrı gerçekleştirildi ve elde edilen skorların ortalamaları alındı. Testis kesitlerinde osteokalsin, osteonektin ve osteopontin ekspresyonları sırasıyla X40, X100 ve X400 büyütmelemlerde ve her kesitten rastgele seçilen beş alanda incelendi. Bulgular; germ hücreleri, Sertoli ve Leydig hücreleri, spermatid, spermatosit, spermatogonyum, epididimis epitel, bağ dokusu hücreleri, duktus deferens epitel ve kas tabakasındaki hücreler olmak üzere her hücre tipi ayrı ayrı analiz edilerek değerlendirildi (Tablo 2).

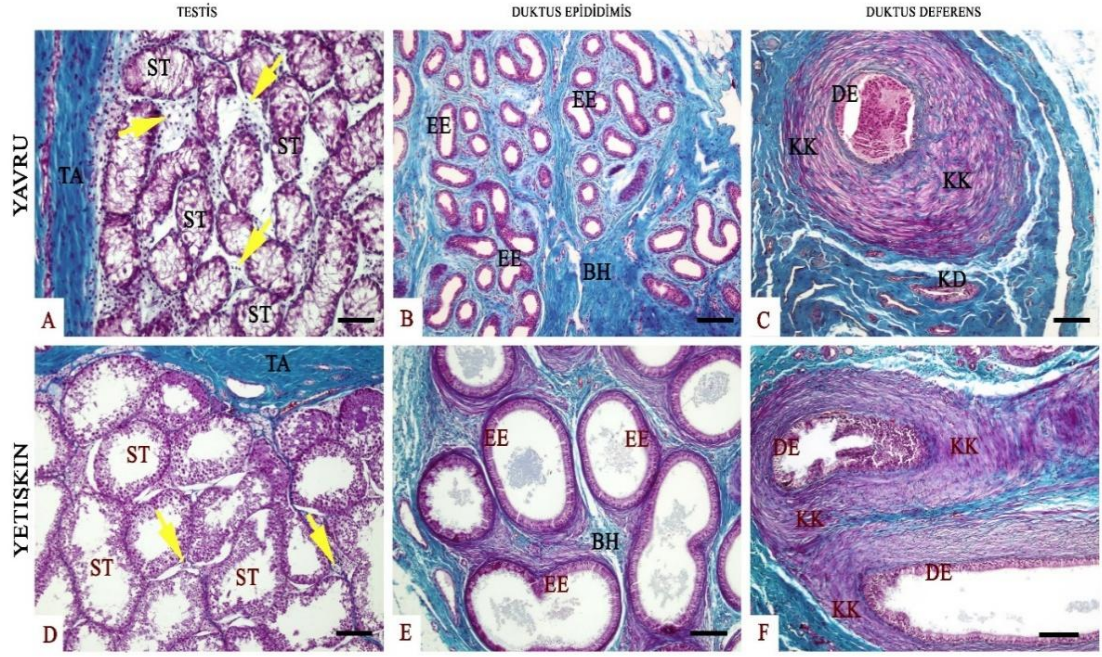
Tablo 2. Osteokalsin, osteonektin ve osteopontinin; yavru ve yetişkin kedilerin testis, epididimis ve deferens kanallarındaki immunohistokimyasal ekspresyon yoğunluğunun semi-kantitatif olarak değerlendirilmesi.

Dönemler	Organ Kısımları	Hücreler	Immunohistokimyasal Parametreler		
			Osteokalsin	Osteonektin	Osteopontin
YAVRU	Testis	Germ	++/+++	+++	++/+++
		Sertoli	+++	+++	++/+++
		Leydig	+++	+++	++/+++
	Epididimis	Epitel	+++	+++	+ / ++
		Bağdoku Hücreleri	+++	+++	-
		Epitel	+	- / +	+
	D.Deferens	Kas Katmanı Hücreleri	+	+++	-
YETİŞKİN	Testis	Spermatogonyum	+	+	-
		Spermatositler	++	++/+++	+++
		Spermatid	+	-	-
		Sertoli	++	-	-
		Leydig	++	+	-
	Epididimis	Epitel	+++	+	+
		Bağdoku Hücreleri	+	-	-
		Epitel	++	++	+
	D.Deferens	Kas Katmanı Hücreleri	+	-	- / +

4. BULGULAR

4.1. Histolojik Bulgular

Yavru ve yetişkin kedilere ait testis dokularından elde edilen seri kesitler, gelişimsel evrelere göre testisin morfolojik özelliklerini değerlendirmek amacıyla Crosman'ın üçlü boyama yöntemi kullanılarak boyanmış ve ışık mikroskobu altında analiz edilmiştir. Histolojik değerlendirmelerde; tubulus seminiferus'ların konturları, lümen oluşumu, seminifer epitel tabakasının organizasyonu, Sertoli hücreleri, Leydig hücreleri ve kapiller damar ağı dikkate alınmıştır. Hem yavru hem de yetişkin kedilere ait testis dokularının yoğun fibröz bağ dokusundan oluşan tunika albuginea ile çevrelendiğı ve bu bağ dokusunun testis parankimini septalar aracılığıyla lobüllere ayırdığı belirlenmiştir (Şekil 1). Yavru testisine ait parankimde bulunan seminifer tübüllerin lümensiz olduğı; bu tübüllerin olgunlaşmamış germ hücreleri ile Sertoli hücrelerini içerdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, interstisyel bağ doku içerisinde epididimal kanal ve duktus deferens'e ait erken gelişim evrelerine özgü yapıların farklılaşma gösterdiği saptanmıştır (Şekil 1A, B, C). Yetişkin testisinde ise seminifer tübüllerde lümen oluşumunun tamamlandığı ve çeşitli evrelerdeki spermatojenik hücre serilerinin ayırt edilebilir hale geldiğı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, epididimis ve duktus deferens kanallarının daha geniş ve belirgin bir yapıya ulaştığı gözlenmiştir (Şekil 1D, E, F).



Şekil 3. Yavru ve yetişkin kedi testis, duktus epididimis ve duktus deferens'in morfolojik değerlendirilmesi. TA: Tunika Albuginea, ST: Seminifer Tubül, EE: Epididimis Epiteli, BH: Bağdoku Hücreleri, DE: Deferens Epiteli, KK: Kas Katmanı, KD: Kan Damarı, Sarı ok: Leydig Hücreleri Bar: 50 μ m (A, C, D, E, F), 100 μ m (B).

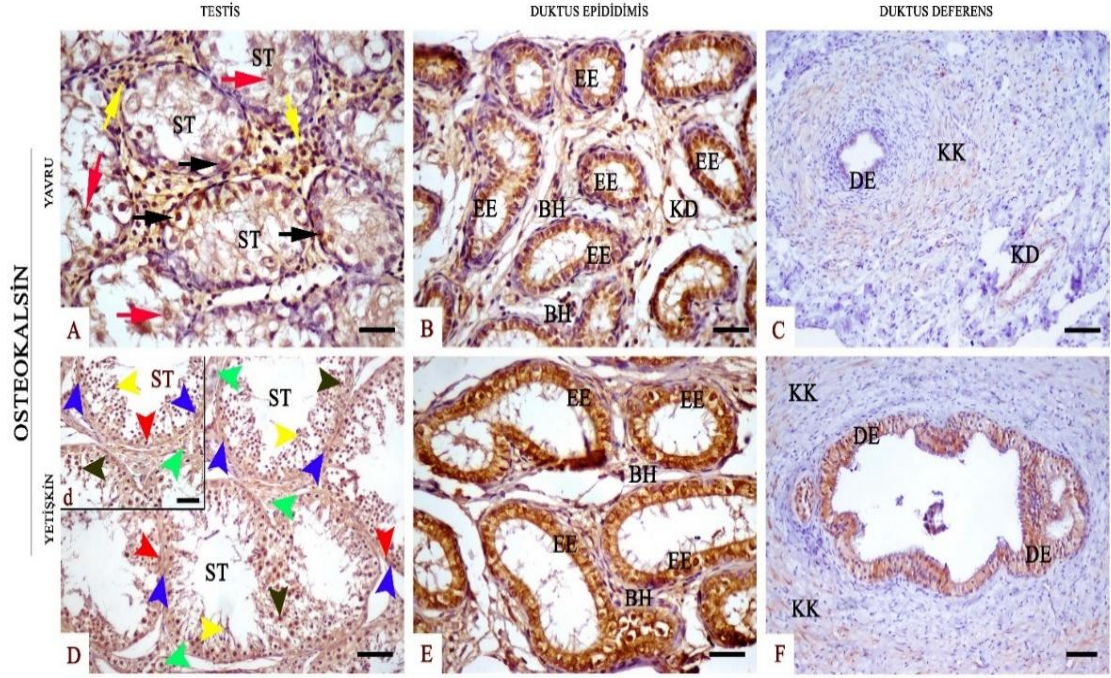
4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

4.2.1. Osteokalsin

Yapılan boyamada osteokalsinin yavru kedi testisindeki bazı sertoli ve leydig hücrelerinde güçlü, germ hücrelerinde ise orta ve ortadan güçlüye doğru yoğunlukta bir immunreaksiyon şekillendirdiği gözlemlendi (Şekil 2A). Bununla birlikte epididimis epitel hücreleri ve bazı bağ doku hücrelerinin yanı sıra bazı kan damarı duvarındaki hücrelerde de güçlü seviyede meydana gelen immunreaksiyonun nükleer ve sitoplazmik şekillendiği belirlendi (Şekil 2B). Ancak immunreaksiyonun duktus deferensin epitel hücrelerinde ve kas katmanındaki hücrelerde zayıf, kan damarı duvarında ise orta seviyede olduğu görüldü (Şekil 2C). Yetişkin kedi testisinin seminifer tubül duvarında yer alan sertoli ve spermatosit hücrelerinde orta seviyede gözlenen immunreaksiyonun spermatogonyumlarda ve spermatidlerde zayıf düzeyde

olduğu görüldü. İntertisyel alanda bulunan leydig hücrelerinde ise immunreaksiyon yoğunluğunun orta seviyelerde şekillendiği tespit edildi (Şekil 2D)

Epididimis epitel hücrlerinde güçlü gözlenen immunreaksiyonun bağ doku hücrelerinde zayıf olduğu saptandı (Şekil 2E). Duktus deferens epitel hücrelerinde ise immunreaksiyon yoğunluğunun orta seviyelerde şekillendiği gözlenirken kas katmanındaki hücrelerde ise zayıf olduğu görüldü (Şekil 2F).



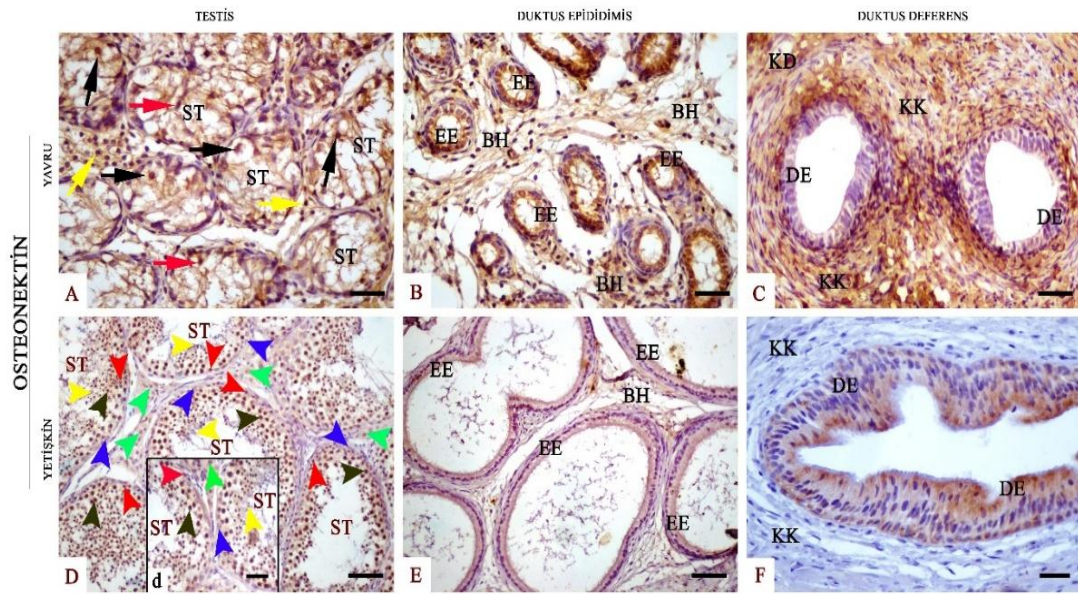
Şekil 4. Yavru ve yetişkin kedi testis, duktus epididimis ve duktus deferensteki osteokalsinin immunohistokimyasal ekspresyonu. ST: Seminifer Tubül, EE: Epididimis Epiteli, BH: Bağdoku Hücreleri, DE: Deferens Epiteli, KK: Kas Katmanı, KD: Kan Damarı, Sarı ok: Leydig Hücreleri, Kırmızı ok: Germ hücreleri, Siyah ok: Sertoli hücreleri, Sarı ok başı: Spermatid, Siyah ok başı: Spermatozoid, Kırmızı ok başı: Spermatozoid, Mavi ok başı: Sertoli hücresi, Yeşil ok başı: Leydig hücresi. Bar: 50 µm (B, C, D, E, F), 25µm (A, d).

4.2.2. Osteonektin

Yavru kedi testisinde bulunan bazı germ, sertoli ve leydig hücrelerinde şekillenen immunreaksiyonun güçlü seviyede olduğu belirlendi (Şekil 3A). Buna paralel şekilde immunreaksiyonun epididimisin epitel ve bazı bağ doku hücrelerinde de güçlü seviyede olduğu görüldü (Şekil 3B). Ancak şekillenen immunreaksiyonun duktus

deferensin epitel hücrelerinde yok denecek kadar zayıf olduğu gözlenirken, kas katmanındaki bazı hücrelerde ise güçlü şekillendiği saptandı (Şekil 3C).

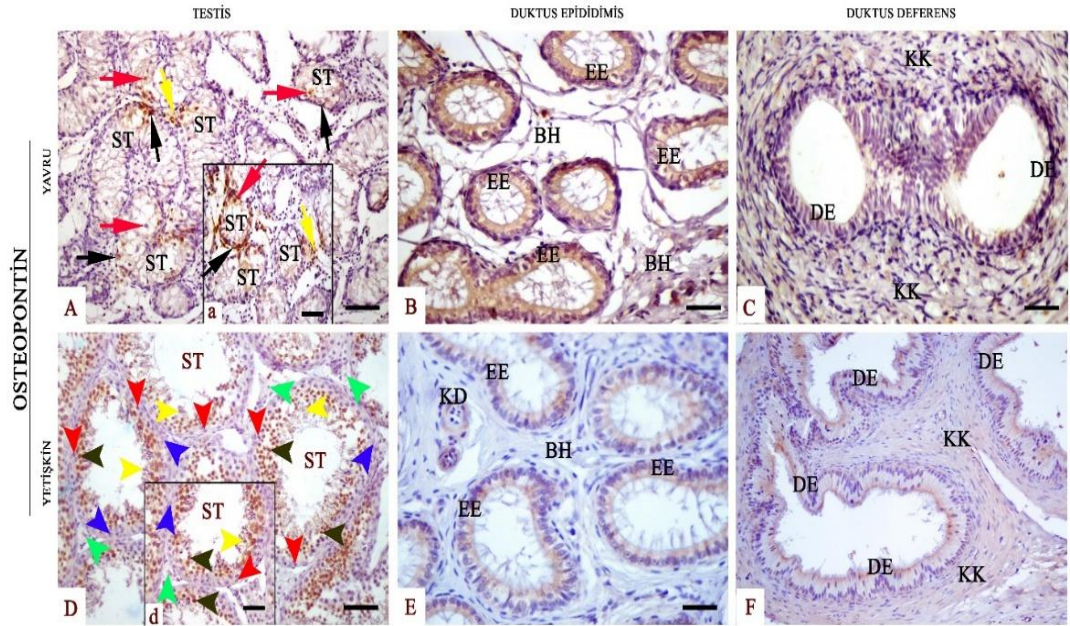
Yetişkin testisteki osteonektin immunreaktivitesinin; sertoli hücrelerinde ve spermatidlerde negatif olduğu görüldü. Bununla birlikte immunreaksiyonun spermatogonyumlarda ve leydig hücrelerinde zayıf, spermatositlerde ise ortadan güçlüye doğru bir düzeyde olduğu belirlendi (Şekil 3D). Ayrıca immunreaksiyon yoğunluğu; epididimis epitel hücrelerinde zayıf, deferens epitel hücrelerinde orta seviyede gözlenirken, bağ doku ve kas katmanındaki hücrelerde ise negatif olduğu saptandı (Şekil 3E, F).



Şekil 5. Yavru ve yetişkin kedi testis, duktus epididimis ve duktus deferensteki osteonektinin immunohistokimyasal ekspresyonu. ST: Seminifer Tubül, EE: Epididimis Epiteli, BH: Bağdoku Hücreleri, DE: Deferens Epiteli, KK: Kas Katmanı, KD: Kan Damarı, Sarı Ok: Leydig hücreleri, Kırmızı ok: Germ hücreleri, Siyah ok: Sertoli hücreleri, Sarı ok başı: Spermatid, Siyah ok başı: Spermatosit, Kırmızı ok başı: Spermatogonyum, Mavi ok başı: Sertoli Hücresi, Yeşil Ok Başı: Leydig Hücresi. Bar: Bar: 50 µm (B, C, D, E, F), 25µm (A, d).

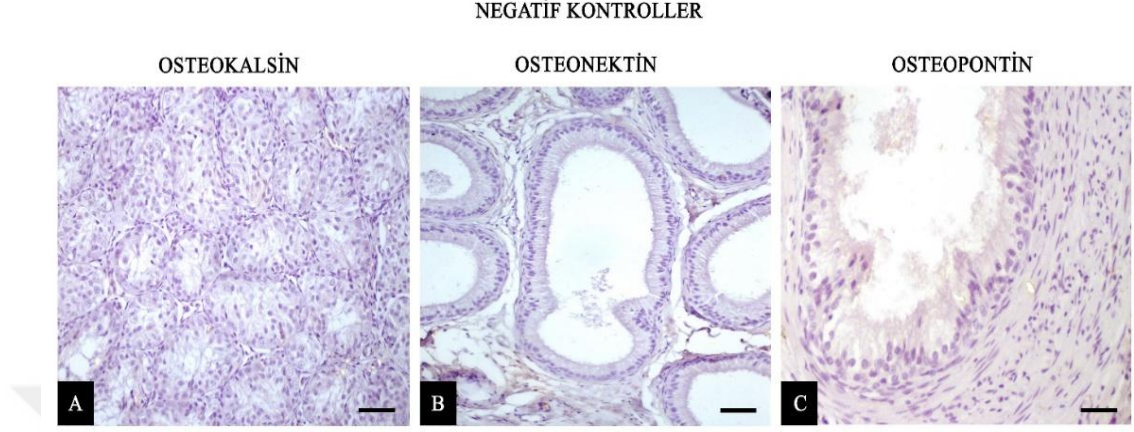
4.2.3. Osteopontin

Yavru kedi testisinde gözlemlenen immunreaksiyonun bazı sertoli, germ ve leydig hücrelerinde orta ve güçlü seviyede olduğu görüldü (Şekil 4A). Fakat immunreaksiyon epididimisin epitel hücrelerinde zayıftan ortaya doğru, duktus deferensin epitel hücrelerinde zayıf seviyede şekillenirken, epididimisin bağ doku hücrelerinde ve deferensin kas katmanındaki hücrelerinde ise negatif olduğu belirlendi (Şekil 4B, C). Yetişkin kedi testisinin seminifer tubülunda yer alan sertoli, spermatogonyumlar, spermatidlerin yanı sıra leydig hücrelerinde de osteopontin immunreaktivitesinin negatif olduğu görüldü. Ancak spermatositlerde ise immunreaktivitenin güçlü seviyede şekillendiği gözlemlendi (Şekil 4D). Bunlarla birlikte immunreaksiyonun epididimis ve deferens epitel hücrelerinde olduğu gibi kan damarında ve kas katmanı hücrelerinde zayıf seviyede meydana geldiği saptandı. (Şekil 4E, F).



Şekil 6. Yavru ve yetişkin kedi testis, duktus epididimis ve duktus deferensteki osteopontinin immunohistokimyasal ekspresyonu ST: Seminifer Tubül, EE: Epididimis Epiteli, BH: Bağdoku Hücreleri, DE: Deferens Epiteli, KK: Kas Katmanı, KD: Kan Damarı, Sarı ok: Leydig hücreleri, Kırmızı ok: Germ hücreleri, Siyah ok: Sertoli hücreleri, Sarı ok başı: Spermatid, Siyah ok başı: Spermatosit, Kırmızı ok başı: Spermatogonyum, Mavi ok başı: Sertoli hücresi, Yeşil ok başı: Leydig hücresi. Bar: 50 µm (A, B, C, D, E, F), 25µm (a, d).

Elde edilen verilerin doğruluğunu ve immunohistokimya yönteminin spesifikliğini teyit etmek amacıyla, uygulanan boyama protokolüne karşı her üç antikor içinde herhangi bir immünreaksiyonun gözlenmediğini gösteren negatif kontroller(Şekil5).



Şekil 7. Osteokalsin, osteonektin ve osteopontin proteinleri için negatif kontrol immünoreaktivitesinin gösterimi. Bar: 100 µm (A), 25 µm (B, C).

5. TARTIŞMA

Erkek üreme sistemi; testisler, epididimis kanalı, deferens kanalı ve eklenti bezleri gibi yapılardan oluşmaktadır. Bu yapılar, üreme için elzem olan spermilerin; oluşumunu, dölleme yeteneğini kazanmasını, depolanmasını ve boşalmasını sağlamak ve erkek gelişimi için önemli androjenler üretmek gibi birçok önemli işleve sahiptir (53). Androjenler; testislerdeki leydig hücreleri tarafından üretilen testesteron ve Sertoli hücreleri tarafından üretilen inhibin B ve Müllerian inhibitör madde (MIS) hormonlarıdır. Bu hormonların kontrolü ön hipofiz bezinden salgılanan ve hipotalamus tarafından üretilen gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) tarafından düzenlenen folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinize edici hormonudur (LH). Bu hormonlar vasıtasıyla erkek cinsel gelişimi ve işlevin sürdürülmektedir (54). Erkek üreme sisteminin bu dinamik yapısının korunması ve devamlılığı için birçok hormonal ve moleküler faktörün etkili olduğu bilinmektedir. Bu faktörlerden bir kısmının osteokalsin, osteonektin ve osteopontin proteinleri olduğu ifade edilmiştir (35, 55, 56). Ancak yapılan literatür taramasında bu proteinlerin erkek üreme sistemindeki rolleri ve etkileri hala tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Bu nedenle sunulan çalışma; literatüre yeni katkılar sunması ve kedi testisi ile ilgili ilk çalışma olması bakımından önem arz etmektedir.

Osteokalsin; kemikte en bol bulunan proteinlerden biri olup sadece osteoblastlar tarafından üretilmektedir. Başlangıçta kemik mineralizasyonunun bir inhibitörü olduğu düşünülen osteokalsinin tüm vücut metabolizması ve üremenin düzenlenmesine kadar uzanan daha geniş bir rolü olduğu öne sürülmüştür. Bununla birlikte osteokalsinin insülin mekanizmasına etki ederek iskelet ve yağ dokunun fizyolojisine katkı sağlayabildiği ve ayrıca testislerdeki leydig hücrelerinde ifade edilerek testosteron üretiminin uyarılmasına aracılık ettiği bildirilmiştir (32). Haspolat ve ark. yaptığı çalışmada osteokalsinin başta kas, yağ doku, karaciğer vb. organ ve dokulara etki ettiği ve bununla birlikte genital sistemde de önemli bir rol oynadığı ileri sürülmüştür (57). Bir diğer çalışmada osteokalsinin özellikle steroid hormonların sentez ve düzenlenmesinde etkin rol oynadığı belirtilmiştir (30). İnsanlarda yapılan deneysel çalışmada Osteokalsinin testosteron üretiminin düzenleyicisi olarak işlev aldığı gösterilmiştir. Buna paralel olarak Osteokalsinin ve kemik dönüşümünün genel

popülasyonda ve kemik bozuklukları olan hastalarda testosteron dolaşım seviyeleriyle sinerjik bir ilişki içinde olduğu gösterilmiştir (58). Ayrıca erkeklerde ergenliğin ortasında serum osteokalsini ve testosteron seviyeleri arasında önemli bir ilişki olduğuna dikkat çekilmiştir (59). Bununla birlikte insanlarda osteokalsin ve reseptörü olan Gprc6a'nın birincil testis yetmezliğinin gelişimi ile doğrudan ilişkili olabileceği de öne sürülmüştür (60). Farelerde yapılan çalışmada osteokalsinin; direkt leydig hücrelerini etkileyerek testesteron salınımını arttırdığı, doğurganlığı ve canlı büyümeği doğrudan etkilediği hatta testis boyutu ve ağırlığına da olumlu yönde etki ettiği ifade edilmiştir. Bununla birlikte OC eksikliği olan farelerde epididim ve seminal vezikül ağırlıklarında azalma meydana gelmesinin yanı sıra spermiyum sayısında ve hareketinde azalma şekillendiği bildirilmiştir. Bunlar sonucunda da osteokalsinin direk doğurganlığa pozitif yönden katkı sağladığına ve germ hücrelerde apoptozusu engellediğine kanaat getirmişlerdir (61). Karsenty'in, (2023); yaptığı çalışmada osteokalsinin erkek üreme işlevinin bir düzenleyicisi olduğu ve özellikle testesteron biyosentezinde rol aldığını belirtmiştir. Bunula birlikte osteokalsinin, Gprc6a aracılığıyla leydig hücrelerine etki ettiği ve bunların çoğalmasını sağlayarak testosteron üretimini ve erkek doğurganlık testosteronunu artırdığı ifade edilmiştir (36, 62). Bir başka çalışmada, osteokalsin seviyelerinin erkeklerde testosteron seviyeleriyle ilişkili olduğunu ve osteokalsin'nin testosteron üretimini desteklerken testosteronun osteoblastlardan osteokalsin salınımını etkilediği ve potansiyel bir düzenleyici geri bildirim döngüsü olduğunu göstermektedir (63). Bu çalışmaların yanı sıra osteokalsinin kas dokunun gelişimi ve enerji metabolizmasının düzenlenmesinde rol aldığı ve özellikle osteoporoz, paget hastalığı, prostat kanseri, meme kanseri ve kemik tümörlerinde hücrelerin çoğalıp farklılaşmasını etkilediği ve bu hastalıkların tanısında kullanılan önemli bir klinik belirteç olduğu gösterilmiştir (64-68). Sunulan çalışmada; insan (32, 36) ve fare (61) çalışmalarında olduğu gibi osteokalsinin yavru ve yetişkin testislerin leydig hücrelerinde de lokalize olduğu gözlenmiştir. Lokalizasyonun yavru leydig ve sertoli hücrelerinde daha yoğun gözlenmesi, osteokalsinin bu dönemdeki hücrelerin gelişimi ve fizyolojik etkileri üzerinde doğrudan bir etkisi olabileceğini akla getirmiştir. Aynı şekilde yavru testisin germ hücrelerinde, yetişkin testisin spermatosit ve sertoli hücrelerinde orta ve güçlüye doğru bir lokalizasyonun gözlendiği ve bununla osteokalsinin bu hücrelerin bölünmesine, çoğalıp ve farklılaşmasına etki

ederek cinsel aktiviteyle doğrudan pozitif bir ilişkisi olabileceği düşünülmüştür. Yavru ve yetişkin epididimiste immunreaksiyonun güçlü seviyede gözlenmesi; osteokalsinin yavru ve yetişkin epididimisin hücrel yapısına katılarak gelişiminde ve büyümesinde rol oynayabileceği, yetişkinlerde ise spermiyumların olgunlaşması ve depolanması gibi fizyolojik fonksiyonlarına katkı sağlayabileceği kanaatine varılmıştır. Bunlarla birlikte osteokalsin immunreaksiyon yoğunluğu yavru duktus deferenste yok denecek kadar zayıf iken yetişkin deferens epitelinde ise orta seviyelerde gözlenmesi, osteokalsinin yetişkin dönemdeki deferensin fizyolojik rollerinin yerine getirilmesinde ve hücrelerinin çoğalıp farklılaşmasında etkili bir role sahip olabileceği düşüncesindeyiz. Ayrıca bazı damarlarda immunreaksiyonun gözlenmesi, osteokalsinin endotel hücrelerin çoğalmasında etkili olabileceği kanaatine varılmıştır.

Osteonektin; hücrelere ve hücre dışı matris (ECM) bileşenlerine bağlanan biyolojik olarak aktif glikoprotein ailesinin bir prototipidir. Embriyogenezis, doku yeniden şekillenmesi ve onarımı sırasında mekansal ve zamansal olarak ifade edildiği bildirilmiştir. Ayrıca osteonektinin; hücrelerin yapışması, çoğalması, göçünü ve farklılaşmasını modüle ettiğine dikkat çekilmiştir. Bununla birlikte osteonektinin testis gelişiminin regülasyonunda kritik bir rol alarak leydig ve sertoli hücrelerinde ifade edildiği belirtilmiştir (69, 56). Yapılan çalışmada osteonektinin doğrudan gelişmekte olan germ hücreleriyle etkileşime girdiği, spermatogenezi uyarıcı, testis somatik hücrelerinin otokrin veya parakrin ağlar aracılığıyla davranışlarını düzenleyebildiği belirtilmiştir. Ayrıca bu glikoprotein, Leydig ve Sertoli hücrelerinin morfolojisini etkileyerek işlevlerini düzenleyebileceği de düşünülmektedir (43). Wilson ve ark. (2006) farelerde yapmış oldukları immünohistokimyasal tespit çalışmasında Anti-SPARC antikoruyla, Sertoli ve germ hücrelerinin sitoplazmasında ve testis kordlarının içinde pozitif olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte SPARC'ın Sertoli, Leydig ve germ hücrelerinin yapısında görülmesi, SPARC'ın fotal testis gelişimi sırasında bu hücreler için hücre içi düzenleyicisi olarak bir rol oynadığını bildirmişlerdir. Özellikle, fotal testiste SPARC ekspresyonunda artış olduğunu ve Sertoli ile Leydig hücrelerinde yoğun bir şekilde bulunduğunu göstermektedir. Ayrıca SPARC'ın testis germ hücrelerinin farklılaşmasına testis gelişimine ve doğurganlığın kontrolünde kritik rollere sahip olabileceği ifade edilmiştir (56). Farelerde yapılan bir başka araştırmada da SPARC'ın yetişkin testisinin leydig hücrelerinde ekspresse

olduğu bildirilmiştir (70). Holland ve ark. (1987) yapmış oldukları deneysel çalışmada yetişkin ve olgunlaşmamış iki haftalık farelerin testislerinde SPARC ekspresyon yoğunluğunun, seminifer tübüllerde (Sertoli hücreleri ve gelişen spermatogonyumlar) düşük seviyelerde iken, interstisyel hücrelerde (leydig), endotel hücrelerinde ve kapsülde yüksek seviyelerde olduğu gösterilmiştir (71). Osteonektin ile yapılan çalışmaların çoğunda, osteonektinin hücre yapışması, çoğalması, göçü ve dokuların yeniden şekillenmesinin düzenlenmesinde rol oynadığı ve yara iyileşmesi ile tümör ilerlemesi gibi hücre dışı matris yenilenmesini gerektiren gelişim süreçlerinde ekspresse olduğu da bildirilmiştir (72-74). Yapılan literatür taramasında Osteonektinin erkek üreme sistemi ile ilgili çalışmaların oldukça kısıtlı olması çalışmamızı değerli ve güncel kılmıştır. Çalışmamızda yavru testisteki bazı germ, sertoli ve leydig hücrelerinde güçlü seviyede immunreaksiyon olduğu ve bununda yapılan çalışmaları (43, 56, 70, 71) destekler nitelikte olduğu belirlenmiştir. Ancak yetişkin kedi testisi için Holland ve ark. (71) ifade etmiş olduklarının aksine leydig hücrelerinde immunreaksiyon negatif gözlenirken, yetişkin sertoli hücreleri için ise paralel bulgular olduğu görülmüştür. Leydig hücrelerindeki bu değişimin de türler arasındaki farklılıktan kaynaklanabileceği ön görülmüştür. Bununla birlikte spermatositlerdeki immunreaksiyonun güçlü seviyeye yakın olarak gözlenmesi, osteonektinin bu hücrelerin direk yapısına katılabileceği ve olgunlaşmasında rol alabileceğini düşündürdü. Bununla birlikte osteonektinin yavru epididimiste, yetişkine oranla daha güçlü seviyede olması osteonektinin epididimisin gelişim ve farklılaşmasını doğrudan etkileyebileceği ve buna bağlı olarak gelişim ilerledikçe mitojenik aktivitenin azalmasına paralel olacak şekilde ekspresyonda azalma olduğu düşüncesindeyiz. Osteonektin ekspresyon yoğunluğunun yavru duktus deferensin kas katmanındaki düz kas hücrelerinde güçlü gözlenmesi, osteonektinin doğrudan bu hücrelerin farklılaşmasına, çoğalmasına ve bölünmesine etki edebileceği ve yapısına katılabildiğini düşündürdü. Yetişkin deferensin epitel hücrelerinde ekspresyonunun yavrulardakine oranla daha güçlü ve orta seviyelerde gözlenmesi, osteonektinin belli bir büyümeye ve gelişimden sonra deferens epiteline etki ettiği ve seksüel olgunluğa ulaşmakla paralel olabileceği düşünülmüştür.

Osteopontin, başlangıçta sığır diafiz kemiğinin mineralize matrisinden izole edilen oldukça asidik bir glikoprotein olarak bilinir. Daha sonra yapılan araştırmalarda OPN'nin böbrek, beyin ve erkek seminal sıvıları dahil olmak üzere çeşitli dokularda var olduğu da bildirilmiştir (55). OPN'nin işlevi, ekspresse olduğu hücre tipine bağlı olsa da, başlıca rollerinin hücrelerin yapışması, hücre içi sinyallerin üretimine yol açan hücre aktivasyonu ve çoğalması olabileceği ifade edilmiştir (75, 76). İnsanlarda yapılan deneysel çalışmalarda OPN'nin spermelerde var olduğu ve kısır erkeklerde OPN seviyesinin normal doğurgan erkeklere oranla belirgin bir seviyede düştüğü ifade edilmiştir. Bununla birlikte çalışmada OPN'nin spermelerin hareketi, konsantrasyonu ve kalitesi üzerinde pozitif etkiye sahip olabileceği ve kısırlık tedavisinin moleküler mekanizmasında rol alabileceğine dikkat çekilmiştir (77). Luedtke ve ark. ratlarda yaptıkları çalışmada osteopontinin spermatosit ve spermatogonyumlarda, efferent kanalları ile epididimiste ekspresse olduğu bildirilmiştir. Özellikle OPN reaktivitesinin epididmis hücrelerinin apikal bölgesinde görülmesinin, OPN'nin epididim lümeninden kalsiyumu uzaklaştırmaya ve böylece mineral birikimini ve buna bağlı sperm doğurganlığındaki azalmayı önlemeye hizmet edebileceğini öne sürmüştür (48). Ratlarda yapılan bir başka çalışmada Luedtke ve ark. paralel şekilde osteopontinin testis, ve epididimal spermatozoalarda pozitif bir immün reaksiyon meydana getirirken, epididimisin epitel hücrelerinde negatif olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada OPN immünlokalizasyonun seminifer tubülün bazal ve adluminal bölgesinde görülmesi ile osteopontinin bir Sertoli hücre ürünü olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca epididimal olgunlaşma sırasında testis hücrelerinin yapışmasında rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (78). Boğalarda yapılan çalışmada OPN'nin testiste spermatositlerde, sperm zarlarında, epididimiste ve epididimal sıvılarda tespit edildiği ve buna bağlı olarak da OPN'nin döllenme sürecinde doğrudan bir rol alabileceği ifade edilmiştir (51). Köpek, boğa ve domuzda yapılan çalışmalarda OPN varlığı ve seviyesinin sperm hareketliliği ve doğurganlık arasında bir ilişki olup olmadığının ortaya konulması amaçlanmıştır. Bunlar sonucunda osteopontinin sperm kalitesini ve hacmine etki ederek doğurganlıkta kritik bir rol alabileceğini bildirmişlerdir (79-83). Farklı olarak (55), OPN'nin farklı gelişim aşamalarında domuz testisinde esas olarak spermatosit, sertoli hücreleri ve leyding hücrelerinde ifade edildiğini bulmuşlardır.

Koyun erkek üreme sistemi ile ilgili yapılan çalışmada OPN immunreaksiyonunun yaşa ve dokuya özgü farklılıklar gösterdiği belirtilmiştir. Puberta öncesi koyunlardaki immunreaksiyonun testisin interstisyel alanında pozitif olduğu gözlenirken, cinsel olgunluğa ulaşan testiste seminifer tubüllerdeki spermatidlerde pozitif şekillendiği gösterilmiştir. Epididimisin caput ve corpus kısımlarında, OPN immünoreaktivitesi puberta öncesi koyunlarda gevşek bağ dokusunda ve düz kaslarda pozitif iken cinsel olgunluğa ulaşanlarda ise OPN'nin epitelde yoğun bir immünoreaktivite meydana getirdiği belirtilmiştir. Ayrıca OPN immunreaktivitesinin puberta öncesi duktus deferens epitelinde negatif iken yaşın ilerlemesine bağlı ve puberta sonrası pozitif olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlarında, OPN ekspresyonunun Hu koyunlarında spermatogenez ve spermatozoa fonksiyonu ile yakından ilişkili olabileceği ifade edilmiştir (84). Bu çalışmaların yanı sıra osteopontinin; beyin, meme, akciğer, mide, karaciğer, pankreas ve göz kanserinin gelişimi ve yayılmasında rol oynadığı, farklı reseptörlerle etkileşime girerek çeşitli kanser sinyal yollarını başlattığı ve kanser hücrelerinin hayatta kalmasını, yayılmasını, göçünü ve istilasını artırdığı da bildirilmiştir (85). Sunulan bu tez çalışması, Siiteri ve ark., 1995 (78), Kim ve Shin, 2007 (55), Zhang ve ark. 2016 (77) yapmış oldukları çalışmalara paralel olacak şekilde yavru kedi testisinde yer alan germ, sertoli ve leydig hücrelerinde osteopontin immunolikalizasyonu güçlü seviyede görüldü. Özellikle güçlü gözlenen bu ekspresyon ile osteopontinin bu hücrelerin farklılaşp gelişmesinde ve testosteron salınım mekanizmasının kontrolünde rol alabileceğini düşündürdü. Koyunlarda (84) elde edilen bulgularda olduğu gibi bu tezde de osteopontin immunreaksiyonunun deferens kanalının epitel hücrelerinde yavru kedi testisinde çok zayıf, yetişkin kedilerde ise daha yoğun olduğu görüldü. Ancak koyunlarda ifade edilenin aksine yavru kedilerin epididimis epitelindeki ekspresyon yoğunluğunun yetişkinlerinkine kıyasla daha güçlü olduğu belirlendi. Böylece osteopontinin deferens ve epididimisteki bazı hücrelerin bölünmesine ve farklılaşmasına katkı sağlayabileceği kanaatine varıldı. Ayrıca Erikson ve ark. (51) bulgularında olduğu gibi çalışmamızda da yetişkin testis hücrelerinde sadece spermatositlerde güçlü reaksiyonun gözlemlendiği ve bununla osteopontinin olası olarak bu hücrelerin yapısına katılabildiği ve bu hücrelerin metabolik ile fizyolojik fonksiyonlarında rol oynadığını aklı getirmiştir.

Bununla birlikte; bizim tez sonuçlarımız ile yukarda bahsettiğimiz çalışmaların sonuçları kıyaslandığında, OPN'nin ekspresyon yoğunluğunun farklı türlerin veya dokuların karakteristik özelliklerine göre OPN'nin farklı biyolojik işlevlere sahip olabileceğini düşündürmüştür.



6. SONUÇ

Birçok metabolik ve biyolojik fonksiyona sahip olan ostaokalsin, osteonektin ve osteopontin proteinlerinin yavru ve yetişkin kedi testisindeki varlıkları ilk olarak bu çalışma ile ortaya konulmuştur. Her üç proteinin yavru ve yetişkin kedilerdeki testis, epididimis ve deferens kanallarında farklı yoğunluklarda ekspresse olduğu gözlenmiştir. Gözlemlenen ekspresyonun boyama yoğunluğu ve dağılımı açısından kedi ırkları arasında herhangi bir farklılığın bulunmadığı ortaya konulmuştur. Elde edilen sonuçlara bakıldığında osteokalsin, osteonektin ve osteopontinin; germ hücrelerinin farklılaşp çoğalmasında, leydig hücrelerinde doğrudan testesteron salınımının düzenlenmesinde ve seminifer tubül duvarındaki hücrelerin metabolik ve mitotik aktivitelerinde olası işlevlere sahip olabilecekleri akla getirilmiştir. Böylece osteokalsin, osteonektin ve osteopontinin spermilerin; üretimi, hareketliliği taşınması ve depolanmasında kritik işlevler üstlenerek doğurganlık için kritik roller alabilecekleri kanaatine varılmıştır. Sonuç olarak; elde edilen immunohistokimyasal bulgular ile başta kediler olmak üzere birçok memeli hayvanın erkek üreme sistemi ve doğurganlık ile ilgili çalışmalara kaynaklık edebileceği, nesli tükenme tehlikesi altında olan canlılar ile ilgili araştırmalara katkı sağlayabileceği düşünülmüştür. Ayrıca erkek genital sisteme ait başta kısırlık olmak üzere çok sayıda kalıtsal ve patolojik problemlerin çözülmesi ve tedavi edilmesi için yeni yöntemlerin ortaya çıkmasına katkı sağlayabileceğini kanaatindeyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Ilacqua A, Francomano D, Aversa A. The physiology of the testis. In: Belfiore A, Leroith D, eds. *Endocrinology: Principles of Endocrinology and Hormone Action*. 1st ed. Switzerland: Springer International Publishing; 2017, p:455-495.
2. Özbek M, Hitit M, Yıldırım N, Özgenç Ö, Ergün E, Ergün L, et al. Expression pattern of galectin-1 and galectin-3 in rat testes and epididymis during postnatal development. *Acta Histochem*. 2018; 120(8): 814-827.
3. Basciani S, Mariani S, Spera G, Gnassi L. Role of platelet-derived growth factors in the testis. *Endocr Rev*. 2010; 31(6): 916-939.
4. Ge R, Hardy MP. Regulation of Leydig cells during pubertal development. In: Payne AH, Hardy MP, eds. *The Leydig Cell in Health and Disease*. 1st ed. Totowa, NJ: Springer-Humana; 2007, p:55-70.
5. Kaur G, Mital P, Dufour JM. Testis immune privilege - Assumptions versus facts. *Anim Reprod*. 2013; 10(1): 3-15.
6. Rinaldi VD, Donnard E, Gellatly K, Rasmussen M, Kucukural A, Yukselen O, et al. An atlas of cell types in the mouse epididymis and vas deferens. *eLife*. 2020; 9: e55474.
7. Steers WD. Physiology of the vas deferens. *World J Urol*. 1994; 12(5): 281-285.
8. Topaloğlu U, Ketani MA, Saruhan BG. Kemik doku ve kemikleşme çeşitleri. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*. 2017; 10(1): 62-71.
9. Yazıcı M, Kutlu M. Kemiğin yapısı ve kemik döngüsünün düzenlenmesi. *Türkiye Klinikleri Endocrinology-Special Topics*. 2011; 4(2): 1-8.
10. İnsal B, Pişkin İ. Kemik dokusunun fizyolojisi. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*. 2017; 28(1): 28-32.
11. Şeftalioğlu A. Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi. Ankara: Feryal Matbaası; 1998.
12. Moore KL. *The Developing Human*. 4th ed. Philadelphia: Saunders Co.; 1988.
13. Sadler TW. *Langman's Medical Embryology*. Çeviren: Başaklar AC. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul; 2012.
14. Petorak İ. *Medikal Embriyoloji*. Beta Basım Dağıtım A.Ş., İstanbul; 1986.
15. Hutson JM. Pediatric surgery. In: O'Neill JA, Rowe MI, Grosfeld JL, Fonkalsrud EW, Coran AG, eds. *Pediatric Surgery*. 5th ed. St. Louis: Mosby-Year Book Inc.; 1998.
16. Liebich HG, Maierl J, König HE. Anatomie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. In: König HE, Liebich HG, eds. Stuttgart: Schattauer GmbH; 2015, p:163-168.
17. Chaudhary AK, Purohit GN, Mehta JS, Ravi SK, Talluri TR. Serum testosterone profile in Marwari stallions and its relationship with testicular parameters, semen characteristics, reaction time, stallion age, body weight, and height. *Reprod Fertil Dev*. 2020; 32(2): 144.
18. Wagner MS, Wajner SM, Maia AL. The role of thyroid hormone in testicular development and function. *J Endocrinol*. 2008; 199(3): 351-365.
19. Mruk DD, Cheng CY. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev*. 2004; 25(5): 747-806.
20. Eroschenko VP. *Di Fiore's Atlas of Histology with Functional Correlations*. 12th ed. USA: Wolters Kluwer; 2017.

21. Gartner LP, Hiatt JL. Color Atlas of Histology. 5th ed. Holland: Wolfe Medical Publications; 2009.
22. Tanyolaç A. Genital sistem. In: Tanyolaç A, ed. Özel Histoloji. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi; 1993, p:74.
23. Axner E, Linde Forsberg C. Sperm morphology in the domestic cat and its relation with fertility: A retrospective study. *Reprod Domest Anim.* 2007; 42(3): 282-291.
24. Blottner S, Jewgenow K. Moderate seasonality in testis function of domestic cat. *Reprod Domest Anim.* 2007; 42(5): 536-540.
25. Tsutsui S, Yamaguchi M, Hirasawa A, Nakamura O, Watanabe T. Common skate (*Raja kenoei*) secretes pentraxin into the cutaneous secretion: The first skin mucus lectin in cartilaginous fish. *J Biochem.* 2009; 146(2): 295-306.
26. Kaya M, Daşkın A. Reproduction of the domestic cat and biotechnology. *Lalahan Hayvancılık Araşt Enst Derg.* 1997; 37(2): 109-120.
27. França LR, Godinho CL. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol Reprod.* 2003; 68(5): 1554-1561.
28. Coşkun N, Topaloğlu C, Karaca F. Erkek kedilerde üreme organları, spermanın alınması ve spermatolojik muayeneler. Ankara: Bidge Yayınevi; 2024, s:1-12.
29. Moser SC, van der Eerden BC. Osteocalcin-A versatile bone-derived hormone. *Front Endocrinol.* 2019; 9: 794.
30. Coskun G, Sencar L, Tuli A, Saker D, Alparslan MM, Polat S. Effects of osteocalcin on synthesis of testosterone and INSL3 during adult Leydig cell differentiation. *Int J Endocrinol.* 2019; 2019: 1041760.
31. Çatık S. Negatif Enerji Dengesindeki Süt Sığırlarında Serum Osteokalsin Düzeyinin Değerlendirilmesi; Serum Esterleşmemiş Yağ Asiti (Nefa), Beta Hidroksibütirik Asit (Bhba), Glukoz Ve Osteokalsin Düzeyleri Arasındaki İlişkilerin Belirlenmesi. B.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2015, Bursa (Danışman: Prof. Dr. Engin Kennerman).
32. Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC. New insights into the biology of osteocalcin. *Bone.* 2016; 82: 42-49.
33. Patti A, Gennari L, Merlotti D, Dotta F, Nuti R. Endocrine actions of osteocalcin. *Int J Endocrinol.* 2013; 2013: 846480.
34. Martiniakova M, Biro R, Kovacova V, Babikova M, Zemanova N, Mondockova V, et al. Current knowledge of bone-derived factor osteocalcin: Its role in the management and treatment of diabetes mellitus, osteoporosis, osteopetrosis and inflammatory joint diseases. *J Mol Med.* 2024; 102(4): 435-452.
35. Komori T. Functions of osteocalcin in bone, pancreas, testis, and muscle. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(20): 7513.
36. Karsenty G. Osteocalcin: A multifaceted bone-derived hormone. *Annu Rev Nutr.* 2023; 43: 55-71.
37. Rubert M, de la Piedra C. La osteocalcina: De marcador de formación ósea a hormona; y el hueso, un órgano endocrino. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2020; 12(4): 146-151.
38. Brekken RA, Sage EH. SPARC, a matricellular protein: At the crossroads of cell-matrix. *Matrix Biol.* 2000; 19(7): 569-580.
39. Karabacak AR. Deneysel Hipertiroidi Oluşturulmuş Gebe Sıçanların Uterus Ve Plasenta Dokularında ON (SPARC) Ve TGF-B1 Dağılımının

- İmmünohistokimyasal Olarak İncelenmesi. T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2015, Edirne (Danışman: Prof. Dr. Turan Karaca).
40. Motamed K. SPARC (osteonection/BM-40). *Int J Biochem Cell Biol.* 1999; 31(12): 1363-1366.
 41. Mısırlı D, Bingöl Özakpınar Ö, Şekerler T, Aru B, Yanıkkaya Demirel G, Tunoğlu S, ve ark., Effects of SPARC and possible receptors on colon cancer cell line. *Clin Exp Health Sci.* 2023; 13(2): 316-322.
 42. Bradshaw AD. The role of SPARC in extracellular matrix assembly. *J Cell Commun Signal.* 2009; 3(3-4): 239-246.
 43. Vernon RB, Sage EH. The calcium-binding protein SPARC is secreted by Leydig and Sertoli cells of the adult mouse testis. *Biol Reprod.* 1989; 40(6): 1329-1340.
 44. Kardelen E. Endometrial Kanserlerde Metastaz Gelişiminde Osteopontinin Rolü Ve Epitelyal-Mezenkimal Geçişte Sinyal Yolaklarının Araştırılması. Adnan Menderes Üniv. Tıp Fak., Tıpta Uzmanlık Tezi, 2020, Aydın (Danışman: Belirtilmemiş).
 45. Ecer B. Prostat Kanseri Tanısında Osteopontin ve Anjiyogenez Parametrelerinin Değerlendirilmesi. S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıpta Uzmanlık Tezi, 2022, Konya (Danışman: Prof. Dr. Ali Ünlü).
 46. Giachelli CM, Steitz S. Osteopontin: A versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol.* 2000; 19(7): 615-622.
 47. Johnson GA, Spencer TE, Burghardt RC, Taylor KM, Gray CA, Bazer FW. Progesterone modulation of osteopontin gene expression in the ovine uterus. *Biol Reprod.* 2000; 62(5): 1315-1321.
 48. Luedtke CC, McKee MD, Cyr DG, Gregory M, Kaartinen MT, Mui J, et al. Osteopontin expression and regulation in the testis, efferent ducts, and epididymis of rats during postnatal development through to adulthood. *Biol Reprod.* 2002; 66(5): 1437-1448.
 49. Wilson MJ, Liaw L, Koopman P. Osteopontin and related sibling glycoprotein genes are expressed by Sertoli cells during mouse testis development. *Dev Dyn.* 2005; 233(4): 1488-1495.
 50. Cancel AM, Chapman DA, Killian GJ. Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. *Biol Reprod.* 1999; 60(2): 454-460.
 51. Erikson DW. Role of Osteopontin In Bovine Sperm Capacitation and Fertilization. The Pennsylvania State University, Doctoral Dissertation, 2007, Pennsylvania.(Thesis Adviser: Prof. Dr. Gary J. Killian)
 52. Devkota B, Sasaki M, Takahashi K, Matsuzaki S, Matsui M, Haneda S, et al. Postnatal developmental changes in immunohistochemical localization of α -smooth muscle actin (SMA) and vimentin in bovine testis. *J Reprod Dev.* 2006; 52(1): 43-49.
 53. Tiwana MS, Leslie SW. Anatomy, abdomen and pelvis: Testes. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing; 2025. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553176/>. Erişim tarihi: 19 Haziran 2025.
 54. Mawhinney M, Mariotti A. Erkek üreme sisteminin fizyolojisi, patolojisi ve farmakolojisi. *Periodontol* 2000. 2013; 61(1): 232-251.
 55. Kim S, Shin T. Immunohistochemical study of osteopontin in boar testis. *J Vet Sci.* 2007; 8(2): 107-112.

56. Wilson MJ, Bowles J, Koopman P. The matricellular protein SPARC is internalized in Sertoli, Leydig, and germ cells during testis differentiation. *Mol Reprod Dev.* 2006; 73(5): 531-539.
57. Haspolat DYK, Aktar Y, Yolbaş Dİ. Adolesanda kemik sağlığı ve spor. Ankara: Cinius Yayınları; 2015, s:222-241.
58. Hannemann A, Wallaschofski H, Loppnow H, Nauck M, Völzke H, Meng W, et al. Osteocalcin is associated with testosterone in the general population and selected patients with bone disorders. *Andrology.* 2013; 1(3): 469-474.
59. Kirmani S, Atkinson EJ, Melton LJ, Ames R, Monroe DG, Wilt TJ, et al. Relationship of testosterone and osteocalcin levels during growth. *J Bone Miner Res.* 2011; 26(9): 2212-2216.
60. Karsenty G, Oury F. Regulation of male fertility by the bone-derived hormone osteocalcin. *Mol Cell Endocrinol.* 2014; 382(1): 521-526.
61. Oury F, Sumara G, Sumara O, Ferron M, Chang H, Smith CE, et al. Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell.* 2011; 144(5): 796-809.
62. Taib IS, Jayusman PA. The role of bone-derived osteocalcin in testicular steroidogenesis: Contributing factor to male fertility. *Diseases.* 2024; 12(12): 335.
63. Jawich K, Rocca MS, Al Fahoum S, Alhalabi M, Di Nisio A, Foresta C, et al. RS2247911 polymorphism of GPRC6A gene and serum undercarboxylated-osteocalcin are associated with testis function. *J Endocrinol Invest.* 2022; 45(8): 1673-1682.
64. Nowicki JK, Jakubowska-Pietkiewicz E. Osteocalcin: Beyond bones. *Endocrinol Metab (Seoul).* 2024; 39(3): 399-406.
65. Salem AM, Zohny SF, Abd El-Wahab MM, Hamdy R. Predictive value of osteocalcin and beta-CrossLaps in metastatic breast cancer. *Clin Biochem.* 2007; 40(16-17): 1201-1208.
66. Ye R, Pi M, Cox JV, Nishimoto SK, Quarles LD. CRISPR/Cas9 targeting of GPRC6A suppresses prostate cancer tumorigenesis in a human xenograft model. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017; 36(1): 90.
67. Nakashima K, de Crombrughe B. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genet.* 2003; 19(8): 458-466.
68. Atalay S, Elci A, Kayadibi H, Onder CB, Aka N. Diagnostic utility of osteocalcin, undercarboxylated osteocalcin, and alkaline phosphatase for osteoporosis in premenopausal and postmenopausal women. *Ann Lab Med.* 2012; 32(1): 23-30.
69. Motamed K. SPARC (osteonectin/BM-40). *Int J Biochem Cell Biol.* 1999; 31(12): 1363-1366.
70. Howe CC, Overton GC, Sawicki J, Solter D, Stein P, Strickland S. Expression of SPARC/osteonectin transcript in murine embryos and gonads. *Differentiation.* 1988; 37(1): 20-25.
71. Holland PW, Harper SJ, McVey JH, Hogan BL. In vivo expression of mRNA for the Ca⁺⁺-binding protein SPARC (osteonectin) revealed by in situ hybridization. *J Cell Biol.* 1987; 105(1): 473-482.
72. Koblinski JE, Kaplan-Singer BR, VanOsdol SJ, Wu M, Engbring JA, Wang S, et al. Endogenous osteonectin/SPARC/BM-40 expression inhibits MDA-MB-231 breast cancer cell invasion. *Cancer Res.* 2005; 65(16): 7370-7377.

73. Rosenblatt S, Bassuk JA, Alpers CE, Gordon K, Montgomery K, Jensen M, et al. Differential modulation of cell adhesion by interaction between adhesive and counter-adhesive proteins: Characterization of the binding of vitronectin to osteonectin (BM40, SPARC). *Biochem J.* 1997; 324(1): 311-319.
74. Sage EH, Vernon RB, Funk SE, Everitt EA, Angello J. SPARC, a secreted protein associated with cellular proliferation, inhibits cell spreading in vitro and exhibits Ca²⁺-dependent binding to the extracellular matrix. *J Cell Biol.* 1989; 109(1): 341-356.
75. Wai PY, Kuo PC. The role of osteopontin in tumor metastasis. *J Surg Res.* 2004; 121(2): 228-241.
76. Weber GF, Cantor H. The immunology of Eta-1/osteopontin. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996; 7(3): 241-248.
77. Zhang P, Leng Y, Liu Y, Liu J, Li C, Qin J. Associations between seminal plasma osteopontin level and sperm motility in infertile men with asthenozoospermia. *Front Endocrinol.* 2025; 16: 1487650.
78. Siiteri JE, Ensrud KM, Moore A, Hamilton DW. Identification of osteopontin (OPN) mRNA and protein in the rat testis and epididymis, and on sperm. *Mol Reprod Dev.* 1995; 40(1): 16-28.
79. Tekin K, Kurtdele E, Salmanoğlu B, Uysal O, Stelletta C. Osteopontin concentration in prostate fractions: A novel marker of sperm quality in dogs. *Vet Sci.* 2023; 10(11): 646.
80. Abedin SN, Leela V, Devendran P, Suganya G, Rangasamy S, Loganathasamy K. Seminal plasma osteopontin: A marker for potential fertility in dogs. *Indian J Anim Res.* 2021; 55(6): 658-662.
81. Souza FF, Chirinéa VH, Martins MI, Lopes MD. Osteopontin expression in seminal plasma and sperm membrane of dogs. *Reprod Domest Anim.* 2009; 44(Suppl 2): 283-286.
82. Cunha-Bustamante FI, Menegassi SR, Pereira GR, Salton GD, Mosena MF, Schneider RM. Bovine seminal plasma osteopontin: Structural modelling, recombinant expression and its relationship with semen quality. *Andrologia.* 2021; 53(2): e13905.
83. Michos I, Tsantarliotou M, Boscós CM, Tsousis G, Basioura A, Tzika ED. Effect of boar sperm proteins and quality changes on field fertility. *Animals.* 2021; 11(6): 1813.
84. Zhang GM, Lan S, Jia RX, Yan GY, Wang LZ, Nie HT, et al. Age-associated and tissue-specific expression of osteopontin in male Hu sheep reproductive tract. *Tissue Cell.* 2016; 48(5): 496-502.
85. Kumari A, Kashyap D, Gupta S. Osteopontin in cancer. *Adv Clin Chem.* 2024; 118: 87-110.

EKLER

EK-1. Etik Kurul Karar Belgesi

15 Şubat 2014 CUMARTESİ

Resmî Gazete

Sayı : 28914

YÖNETMELİK

Orman ve Su İşleri Bakanlığından:

HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURULLARININ ÇALIŞMA USUL VE

ESASLARINA DAİR YÖNETMELİK

BİRİNCİ BÖLÜM

Amaç, Kapsam, Dayanak, Tanımlar ve Kısaltmalar

Amaç

MADDE 1 – (1) Bu Yönetmeliğin amacı, deney hayvanları ile yapılacak olan bilimsel araştırma, test, eğitim, öğretim gibi temel etkinliklerde kullanılan yöntem ve materyaller ile ilgili kabul edilebilir etik standartların belirlenmesine, hayvan deneyleri merkezi etik kurulu ve hayvan deneyleri yerel etik kurullarının kuruluş ve çalışmalarına, yapılması planlanan işlemlerin sunulmasına, araştırma ve çalışma önerilerinin incelenmesi ve izin verilmesine, uygulamaların izlenmesine, deney hayvanları üzerinde yapılan bütün prosedürlerin kayıt altına alınmalarına ve bu prosedürlerin anında ya da geriye doğru izlenebilmelerine, bütün işlemlerin denetlenebilirliğinin sağlanmasına ve ilgili işlemlerin gerektiğinde sonlandırılmalarına ilişkin esasları belirlemektir.

h) HADYEK üyelerine ait başvurular görüşülürken ilgili kurul üyesi görüşmelere katılamaz ve oy kullanamaz.

i) Hakkında “Düzeltilmesi gerekir” kararı verilen projeler, düzeltildikten sonra tekrar değerlendirilir. “Şartlı olarak uygun” kararı verilen projeler, HADYEK tarafından belirlenecek bir süre boyunca, hayvan refahı birimi tarafından izlenip, istenen şartların yerine getirilip getirilmediği değerlendirildikten sonra uygun ya da uygun değildir şeklinde karara bağlanır ve proje ile ilgili HADYEK’e rapor verilir.

j) İzin verilen projelerde hayvan refahını olumsuz etkileyecek herhangi bir değişiklik olup olmadığı yerel etik kurulu tarafından denetlenir. Yerel etik kurulu, onaylanan projeye uyulmaması durumunda, verilen izni iptal eder. İznin iptal edilmesi durumunda; hayvan refahı birimi tarafından, projede kullanılan veya kullanılması öngörülen hayvanların refahının olumsuz yönde etkilenmemesi sağlanır.

k) HADYEK onayı alındıktan sonra projedeki ve çalışmaya katılacak kişilerdeki değişiklikler proje yürütücüsü tarafından HADYEK’e yazılı olarak bildirilir ve onayı alınır.

k) Aşağıdaki müdahaleler HADYEK iznine tabi değildir:

1) Teşhis ve tedavi amaçlı klinik uygulamalar.

2) Ölü hayvan veya dokusu, mezbaha materyalleri, atık fetuslar ile yapılan prosedürler.

3) Süt sağma.

4) Dışkı veya altlık örneği toplama.

5) Sürüntü ile örnek alma.

l) Tür tanımlama ile ilgili doğadan yaban hayvanı kullanılmasında Genel Müdürlükten alınan izin, HADYEK izni yerine geçer.

m) Saha araştırmalarının birden fazla ilde yürütülmesi halinde sadece bir yerin HADYEK onayının alınması yeterlidir.

n) Kayıtlar HADMEK ve Bakanlığın denetimine açık tutulur. HADYEK, gerektiğinde konusunda deneyimli uzmanların yazılı görüşlerini alabilir veya HADYEK toplantısına davet ederek sözlü veya yazılı görüş isteyebilir.

ÖZGEÇMİŞ

EĞİTİM DÜZEYİ

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	D. Ü Sağlık Bil. Enst. Veteriner Histoloji ve Embriyoloji AD	2023-
Lisans	Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2021
Lise	Nevzat Ayaz Anadolu Lisesi	2014

İŞ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre(Yıl-Ay)
Veteriner Hekim	Gültepe Veteriner Polikliniği	1
Veteriner Hekim	OR-CA Veteriner Polikliniği	1

YDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	56.25							

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	80.09	78.83	76.83

ORJİNALLİK RAPORU



Sayfa 1 of 43 • Kapak Sayfası

Gönderi Kimliği: trnoid::13286624488

Abdullah Said TEKİN

YAVRU VE YETİŞKİN KEDİ TESTİSİNDE KEMİK MATRİKS PROTEİNLERİNİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL LOKALİZASYO...

YAVRU VE YETİŞKİN KEDİ TESTİSİNDE KEMİK MATRİKS PROTEİNLERİNİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL LOKALİZASYONU

Said TEKİN

Diççe Üniversitesi

Belge Ayrıntıları

Gönderi Kimliği:

trnoid::13286624488

Gönderi Tarihi:

28 Haz 2025 17:27 GMT+3

İndirme Tarihi:

28 Haz 2025 17:28 GMT+3

Dosya Adı:

turnitin_pen_hali_said.docx

Dosya Boyutu:

2.5 MB

39 Sayfa

7.978 Sözcük

57.931 Karakter



Sayfa 1 of 43 • Kapak Sayfası

Gönderi Kimliği: trnoid::13286624488

6% Genel Benzerlik

Her veri tabanı için çıkarılan kaynaklar da dâhil tüm eşleşmelerin kombine toplamı.

Ön Sıradaki Kaynaklar

- 5% İnternet kaynakları
- 1% Yayınlar
- 1% Gönderiden çalışmalar (Öğrenci Makaleleri)

Bütünlük Bayrakları

İnceleme için 0 Bütünlük Bayrağı

Herhangi bir çöpheli metin manipülasyonu bildirilmedi.

Sistemimizin algoritmaları bir belgede, onu normal bir gönderiden ayırtabilecek her türlü tutarlılığı denetlemesine inder. Tuhaf bir şey fark edersek incelemeniz için bayrak ederiz.

Bir Bayrak mutlaka bir sorun olduğunu göstermez. Ancak daha fazla inceleme için etkileşimli verimliliği öneririz.

Ön Sıradaki Kaynaklar

- 5%  İnternet kaynakları
- 1%  Yayınlar
- 1%  Gönderilen çalışmalar (Öğrenci Makaleleri)

Ön Sıradaki Kaynaklar

Gönderi içinde en yüksek eşleşme sayısına sahip kaynaklar. Çakışan kaynaklar görüntülenemeyebilir.

1	İnternet	earsiv.atauni.edu.tr	1%
2	İnternet	acikerisim.dicle.edu.tr	1%
3	İnternet	search.trdizin.gov.tr	<1%
4	İnternet	acikbilim.yok.gov.tr	<1%
5	Öğrenci makaleleri	Sağlık Bilimleri Üniversitesi	<1%
6	İnternet	veteriner.harran.edu.tr	<1%
7	İnternet	pubmed.ncbi.nlm.nih.gov	<1%
8	Yayın	KAYA, Mustafa and DAŞKIN, A.İ. "Evcil kedide dölerme ve biyoteknolojik uygulama..."	<1%
9	İnternet	docplayer.biz.tr	<1%
10	İnternet	www.pure.ed.ac.uk	<1%
11	İnternet	docslib.org	<1%