**T.C.**

**SELÇUK ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# BILDIRCIN TESTİSLERİNDE PREPUBERTAL VE PUBERTAL DÖNEMLERDE ZO-1 VE KLAUDİN-1 PROTEİNLERİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL GÖSTERİMİ

**İlknur ÜNDAĞ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI**

**Danışman**

**Prof. Dr. Hasan Hüseyin DÖNMEZ**

**KONYA-2017**

**T.C.**

**SELÇUK ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# BILDIRCIN TESTİSLERİNDE PREPUBERTAL VE PUBERTAL DÖNEMLERDE ZO-1 VE KLAUDİN-1 PROTEİNLERİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL GÖSTERİMİ

**İlknur ÜNDAĞ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI**

**Danışman**

**Prof. Dr. Hasan Hüseyin DÖNMEZ**

2016-ÖYP-007 numaralı ÖYP projesi ile desteklenmiştir.

**KONYA-2017**

## ÖNSÖZ

Bu çalışmada immünohistokimya ve immünfloresan boyama yöntemleri uygulanarak kan-testis bariyerinin oluşmasında rol alan proteinlerden olan Klaudin-1 ve Zonula okludens-1 proteinlerinin prepubertal ve pubertal dönem bıldırcın testislerindeki varlıkları ve lokasyonları incelenmiş. Ayrıca Crosman's üçülü boyaması gerçekleştirilerek iki farklı dönemdeki bıldırcın testislerinin genel histolojik değerlendirmesi yapılmıştır. Testisleri dıştan saran tunika katmanı ve testislerin fonksiyonel birimleri olan seminifer tübül çapları da ölçülerek istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Klaudin-1 ve Zonula okludens-1 proteinlerinin prepubertal ve pubertal dönem bıldırcın testislerinde gösterimi amaçlanan bu çalışma Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu'nun 29.06.2016 tarih ve 2016/54 sayılı etik kurul onayı alınarak gerçekleştirildi. Bu çalışmadan elde edilen sonuçların daha sonra yapılacak olan çalışmalara hem yöntem hem de bulgu açısından temel veri sağlaması ve ayrıca mevcut literatüre katkı sağlaması da hedeflenmiştir.

Yüksek lisans eğitimim süresince akademik bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, beni her türlü konuda destekleyen ve çalışmanın yürütülmesi sırasında fikirleri ile bana yol gösteren değerli Anabilim Dalı Başkanı ve danışman hocam olan Prof. Dr. Hasan Hüseyin DÖNMEZ'e çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımda immünfloresan boyamanın gerçekleştirilmesi sırasında desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Tıp Fakültesi Anabilim Başkanı Prof. Dr. Ender ERDAĞAN'a ve Arş. Gör. Seda ATAY'a teşekkür ederim. İmmünfloresan resimlerin çekilmesi için laboratuvarını açan ve yardımlarını esirgemeyen Suni Tohumlama Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN ve Arş. Gör. Mustafa BODU'ya; verilerin istatistiki analizlerinin yapılmasında desteklerini gördüğüm Arş. Gör. Tuba BALAK'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim sürecinde bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, tez çalışmamda bana her türlü yardım ve destekte bulunan Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Emrah SUR, Prof. Dr. Yasemin ÖZNURLU, Prof. Dr. Murat BOYDAK ve Doç. Dr. Tuğba ÖZAYDIN'a, laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan Yüksek Lisans Öğrencisi Didem YILMAZ' a teşekkür ederim.

Bütün eğitim hayatı boyunca manevi desteklerini benden hiç esirgemeyen canım Annem Kudret TEKDEMİR, Babam Kadir TEKDEMİR ve Kardeşim Hüseyin TEKDEMİR'e teşekkür ederim. Tez çalışmalarım sırasında desteğini her zaman hissettiğim sevgili eşim Ersin ÜNDAĞ'a teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

**SİMGELER KISALTMALAR** ..... **iv**
**1.GİRİŞ** ..... **1**
1.1.Testis Dokusu ..... 3
1.1.1. Testislerin Embriyonik Gelişimi ..... 3
1.1.2.Testislerin Anatomik Yapısı ..... 4
1.1.3.Testislerin Histolojik Yapısı ..... 5
1.1.4. Testislerin Histofizyolojisi ..... 6
1.2.Kan-Testis Bariyerinin Fonksiyonu ve Yapısı ..... 7
1.2.1.Kan-Testis Bariyerinin Fonksiyonu ..... 7
1.2.2. Kan-Testis Bariyerinin Yapısı ..... 8
1.3. Kan-Testis Bariyeri Tight Junction Bağlantı Proteinleri ..... 9
1.3.1. İntegral Membran Proteinleri ..... 9
1.3.2. Periferal Membran Proteinleri ..... 11
**2. GEREÇ VE YÖNTEM** ..... **15**
2.1. Işık Mikroskobik Doku Takibi ..... 15
2.2. Crossman'ın Üçlü Boyama Protokolü ..... 15
2.2.3 İmminohistokimya Boyama Protokolü ..... 15
2.2.4. İmmünfloresans İşaretleme Protokolü ..... 17
**3. BULGULAR** ..... **18**
3.1. Makroskobik Bulgular ..... 18
3.2 Işık Mikroskobik Bulgular ..... 18
3.3. İmmünohistokimya Bulguları ..... 20
3.4. İmmünfloresans İşaretleme Bulguları ..... 22
**4.TARTIŞMA** ..... **24**
**5. SONUÇ VE ÖNERİLER** ..... **27**
**6. KAYNAKLAR** ..... **28**
**7. EKLER** ..... **31**
EK A: Etik Kurul Kararı ..... 31
**8. ÖZGEÇMİŞ** ..... **32**

## SİMGELER KISALTMALAR

**µm:** Mikrometre

**COOH:** Karboksil grubu

**dk:** Dakika

**FSH:** Folikül Stimülan Hormon

**JAM:** Junctional Adhezyon Molekülü

**kDa:** Kilo Dalton

**LH:** Lüteinizan Hormon

**M:** Molar

**MDCK:** Madin Darby Köpek Böbreği

**NH2:** Amin Grubu

**PBS:** Fosfatlı Tuz Tamponu

**PDZ:** Postsynaptic Density-95/Discs-large/ zonula okludens-1

**SRY:** Y kromozomu üzerinde bulunan cinsiyet belirleme bölgesi

## ŞEKİLLER VE ÇİZELGELER LİSTESİ

Şekil 1.1. Memeli erkek üreme sistemi

Şekil 1.2. Kanatlı erkek üreme sistemi

Şekil.3.1.Bıldırcın erkek genital organlarının makroskobik görünümü. A) Prepubertal dönem. B) Pubertal dönem.

Şekil 3.2. Prepubertal bıldırcın testisinin genel histolojik görünümü.

Şekil 3.3. Pubertal bıldırcın testisinin genel histolojik görünümü.

Şekil 3.4.Prepubertal bıldırcın testisinde klaudin-1 antikorunun immünohistokimyasal değerlendirilmesi. A-B-C) klaudin-1 immünohistokimya boyaması. D) negatif kontrol boyama.

Şekil 3.5. A-B-C) Pubertal bıldırcın testisi klaudin-1 immünohistokimya boyaması. D) Negatif kontrol boyama.

Şekil 3.6. Prepubertal bıldırcın testisinin immünfloresan gösterimi. A) zonula okludens-1immünfloresans boyaması B) Negatif kontrol boyama.

Şekil 3.7. Pubertal bıldırcın testisinin immünfloresan gösterimi. A-B-C) zonula okludens-1immünfloresans boyaması D) Negatif kontrol boyama.

Çizelge 3.1. Prepubertal ve pubertal dönemde bıldırcın testislerinin seminifer tübül çapları.

Çizelge 3.2. Prepubertal ve pubertal dönemde bıldırcın testislerinin kapsül kalınlıkları.

# ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BILDIRCIN TESTİSLERİNDE PREPUBERTAL VE PUBERTAL DÖNEMLERDE ZO-1 VE KLAUDİN-1 PROTEİNLERİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL GÖSTERİMİ**

**İlknur ÜNDAĞ**

**Histoloji ve Embriyoloji (Vet) Anabilim Dalı**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ/ KONYA-2017**

Kan-testis bariyerinin temelini tight junctionlar oluşturur. Klaudin-1 ve Zonula okludens-1 proteinleri sırası ile tight junction integral ve periferal membran proteinleridir. Bu proteinler kan-testis bariyerinin oluşumunda önemli rol alırlar. Bu çalışmada, prepubertal ve pubertal dönem bıldırcın testisinin genel histolojik yapısının değerlendirilmesi ve klaudin-1 ve zonula okludens -1 proteinlerinin varlığının ve lokasyonunun belirlenmesi amaçladı.

Bu çalışmada 6 adet prepubertal ve pubertal dönemlerdeki bıldırcınlardan elde edilen testis dokuları kullanıldı. Dokular %10'luk nötral formaldehitte fikse edildi. Rutin doku takibi işleminden geçirildikten sonra parafin bloklar elde edildi. Genel histolojik değerlendirme için Crossman'ın üçlü boyama yöntemi kullanıldı. Klaudin-1 ve Zonula Okludens-1 proteinlerinin gösterimi için sırası ile immünohistokimya ve immünfloresan boyamaları gerçekleştirildi.

Elde ettiğimiz bulgularda bıldırcın testislerinin kanatlıların bilinen testis histolojisine sahip olduğu görüldü. Klaudin-1 immünreaktivitesi prepubertal dönemde gözlenmedi. Pubertal dönemde klaudin-1 immünreaktivitesi seminifer tübüllerin bazal bölgesinde Sertoli hücrelerinde sitoplazmik ve membransel olarak ayırt edildi. Zonula okludens-1'in immünfloresan boyamasında prepubertal dönemde testiste ışımanın olmadığı, pubertal dönemde seminifer tübül epitelinde Sertoli hücrelerinde ışımanın olduğu gözlendi.

Sonuç olarak diğer kanatlılarda olduğu gibi bıldırcınlarda da prepubertal dönemde kan testis bariyerinin gelişiminin tamamlanmamış olduğu; pubertal dönemde ise kan-testis bariyerinin oluşumuna katılan klaudin-1 ve zonula okludens-1 proteinlerinin varlığının tespitiyle bu bariyerin varlığı sonucuna ulaşılmıştır.

## SUMMARY

REPUCLIC of TURKEY
SELCUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCE INSTITUTE

**Expression of ZO-1 and Claudin-1 Proteins in Prepubertal and Pubertal Stage Japanese Quail Testis.**

**İlknur ÜNDAĞ**

**Department of Histology and Embryology (Vet)**

**MASTER THESIS/KONYA-2017**

Tight junctions form the basis of the blood-testis barrier. Claudin-1 and zonula occludens-1 proteins are tight junction integral membrane and peripheral membrane proteins, respectively. These proteins play an important role in the formation of blood-testis barriers. In this study, we aimed to evaluate the general histological structure of testis in prepubertal and pubertal stages of quails and to determine the presence and location of claudin-1, zonula occludens-1 proteins.

In this study, testicular tissues obtained from six prepubertal and pubertal stage quails were used. Tissue samples was fixed in neutral formaldehyde and processed for paraffin embedding. Crossman's triple staining method was used for general histological evaluation. Immunohistochemistry and immunofluorescent staining were performed for the expression of claudin-1 and zonula occludens-1 proteins, respectively.

We found that Japanese quail testes have normal poultry testicle histology. Claudin-1 immunoreactivity was not found in the prepubertal quail testis. In pubertal period, claudin-1 immunoreactivity was found in cytoplasm and cell membran of Sertoli cells in the basal region of seminiferous tubules. While zonula occludens-1 immunoreactivity was not found in testis in prepubertal period, it was found in Sertoli cells in seminiferous tubule in pubertal period.

As a result, the development of the blood testis barrier in the prepubertal period was not completed in quails, as in other wings; In the pubertal period, this barrier has been reached as a result of the presence of claudin-1 and zonula occludens-1 proteins involved in the formation of blood-testis barriers.

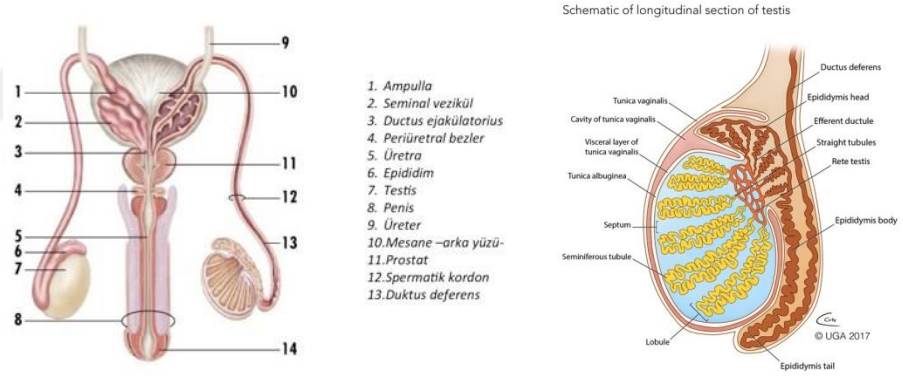
# 1.GİRİŞ

Üreme sistemi neslin devamlılığı için gerekli olan en önemli unsurlardan biridir. Üreme fonksiyonlarını gerçekleştiren ve bununla ilişkili hormonları üreten organların tümüne üreme sistemi denir. Üreme sisteminde erkek ve dişi üreme organları şekil, konum ve yapı bakımından farklılıklar gösterirler (Halldin 2005).

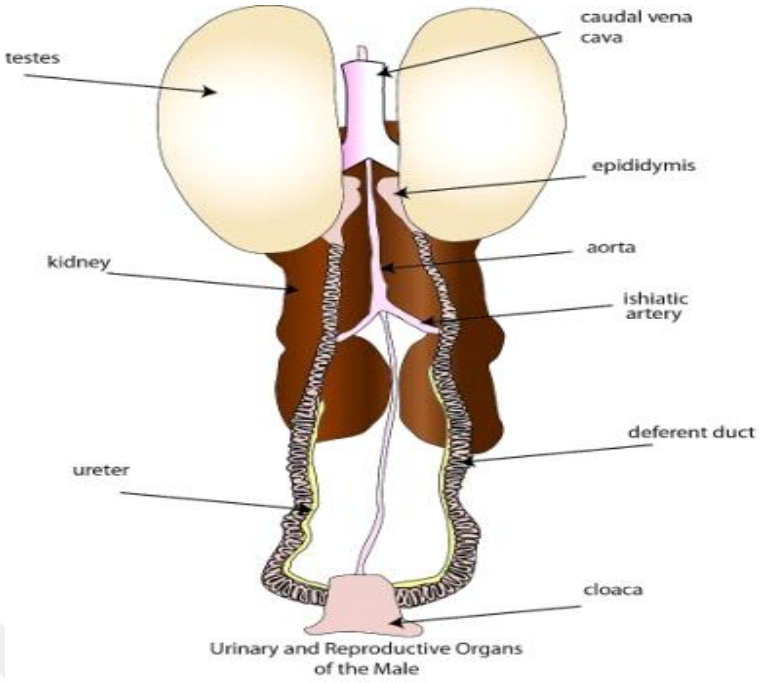
Dişi üreme sistemi iç ve dış genital organlar olarak iki kısımdan oluşur. İç genital organlar eşey hücrelerini üreten ovaryumlar, bu hücrelerin iletilmesini sağlayan tuba uterinalardan, uterus ve vaginadan oluşur. Dış genital organlar ise vulva ve klitoristen oluşur (Ergün 2008). Dişi üreme sistemi erkek ve dişi gametlerin birleşmesini, embriyonun implantasyonunu, hormonların salgılanmasını ve doğuma kadar olan süreçte embriyonun gelişimini destekler (Dursun 2008). Kanatlılarda embriyonik dönemde iki gonad oluşmasına rağmen sağ ovaryum ve oviduct süreç içinde redüksiyona uğrarlar. Sağ tuba uterina nadiren rudimenter olarak kalır. Sol ovaryum gelişimini tamamlar. Nadir olarak da doğan, atmaca gibi bazı kanatlılarda sağ ovaryum gözlenir (Kahvecioğlu ve Çalışırlar 2002).

Erkek üreme sistemi organları testisler, genital kanallar ile eklenik genital bezler ve penisten oluşur. Erkek üreme sistemi, gametlerin sürekli olarak üretilmesi, beslenmesi, geçici olarak depo edilmesi, androjenlerin sentezlenmesi ve sekresyonundan sorumludur. Erkek üreme sisteminin birincil cinsiyet organı testislerdir. Testisler memelilerde karın boşluğu dışında skrotum içinde yer alırken kanatlılarda ise karın boşluğu içinde yer almaktadır (Ergün 2008). Bu fark dışında birkaç özellik bakımından da kanatlı testisi ile memeli testisi ayrılır. Memelilerde bulunan eklenik genital bezler ve penis kanatlı erkek üreme sisteminde yoktur, penis yerine bunun karşılığı olan fallus bulunur (Korkmaz ve Özcan 2011). Memelilerde testisi dıştan saran kalın bir tunika albuginea tabakası bulunur. Bu bağ doku tabakası testis içine uzantılar göndererek organı lobçuklara ayırır. Buna karşın kanatlılarda bu tabaka çok incedir ve organı lobçuklara ayıran gerçek bir septa yapısı yoktur bunun yerine seminifer tübüllerin yer aldığı lobülleri oluşturmak için çok ince bir bağ doku uzantısı tunika albuginea katmanı içinden geçer. Seminifer tübüller kanatlılarda memelilerdeki gibi kör uçla başlamaz her iki ucu da rete testise açılan anastomazlar oluşturmuş borular halindedir. Seminifer tübül epiteli memelilerdeki gibi çok katlı bir yapıya sahip olmasına rağmen memelilerden farklı olarak Sertoli hücresi ve ona

tutunan spermatojenik hücreler lümene doğru uzanmış olan sütunlar şeklinde izlenmektedir (Hodges 1974). Memelilerde seminifer tübüllerde üretilen germ hücreleri epididimiste depo edilir ve burada hareket yeteneği (kapasitasyon) kazanır. Daha sonra dişi genital kanalında rekapasitasyon geçirerek fertilizasyon yeteneği kazanırlar. Kanatlılarda ise epididimis kısmı çok kısadır, spermler burada depo edilip olgunlaşmaz bunun yerine duktus deferenste olgunlaşıp fertilizasyon yeteneği (kapasitasyon) kazanırlar (Çoyan ve ark 2002). Kanatlılarda sprematozoonların fertilizasyon yeteneği kazanmaları için rekapasitasyon reaksiyonu geçirmezler (Howarth Jr 1971). Kanatlıların oldukça az sperm depoları vardır ve spermler üretildikten hemen sonra atılırlar (Akbalık ve ark 2016). Memelilerde ejekülasyondan sonra spermlerin 24-72 saat fertilizayon yetenekleri korunurken kanatlılarda bu süre daha uzundur; haftalarca fertilizasyon yeteneklerini koruyabilirler. Memelilerde bulunan mediyastinum testis yapısı kanatlı testisinde bulunmaz (Hodges 1974).




Şekil 1.1. Memeli erkek üreme sistemi(UGA 2017, ÜroKlinik 2017).




Şekil 1.2. Kanatlı erkek üreme sistemi (PoultryHub 2017).

## 1.1.Testis Dokusu

### 1.1.1. Testislerin Embriyonik Gelişimi

Primordiyal germ hücreleri erken embriyonik dönemde epiblast içinde görülürler. Bu hücreler önce sulkus primitivus ardından vitellus kesesi ve allantois yoluyla göç edip ön bağırsak duvarında yer alan genital çıkıntıya yerleşirler. Memelilerde primordiyal germ hücreleri aktif göç ile hareket ederken kanatlılarda bu göç kan akımı ile gerçekleşir. Primordiyal germ hücrelerinin göç edip yerleştiği genital çıkıntı daha sonra farklılaşmamış gonadı oluşturur. Faklılaşmamış gonadlar primordiyal germ hücrelerinden ve mezenşim hücrelerinden oluşur. Mezonefrozun medialinde yer alan mezotelin ve altındaki mezenşimin proliferasyonu ile gonadal kabarıklık oluşur. Bu farklılaşmamış gonad ön bölgesinde rete kanalları orta bölgesinde ise cinsiyet kanallarını içerir. Bu cinsiyet kanalları seminifer kordonlar olarak bilinir ve içlerinde primordiyal germ hücresi bulunur. Seminifer kordonlar daha sonra kıvrımlı hale gelerek tubulus seminiferus kontortusları oluşturur (McGeady ve ark 2006). Testisler şekillendikten sonra anti müllerian hormonun etkisiyle müller kanalı gerilemeye başlar. Anti müllerian hormon Sertoli hücre

öncüleri tarafından salgılanan bir glikoproteindir. Testisin gelişmesi sırasında mezenşim hücreleri tunika albuginea denen kapsülü oluşturur. Memelilerde tunika albuginea testisin içine doğru uzanarak seminifer tübüllerin arasında, testisi lobçuklara bölen septumlar oluşturur. Kanatlılarda seminifer tübüllerin arasında sadece ince bir bağ doku bulunur gerçek bir septum oluşmaz. Çıkımdan sonra testislerin gelişimi ile Sertoli hücre ve spermatogonium proliferasyonunu, Sertoli hücrelerinin farklılaşmasını ve fonksiyonel işlevinin gelişimini, spermatogonyumların farklılaşmasını içeren süreçler gözlenir. Genç kanatlılarda seminifer tübül epitelinde çok sayıda Sertoli hücresi ve spermatogonium bulunur. Erginlerde Sertoli hücreleri ile gelişimin farklı evrelerinde yer alan spermatojenik germ hücreleri gözlenir ve seminifer tübül spermatogenezin gerçekleştiği yer olarak görülür (Whittow 1999).

Kanatlılarda cinsiyet belirlenmesi memelilerde olduğu gibi seks kromozomlarına dayanır. Memelilerde dişi cinsiyeti homogametik kromozomla, erkek cinsiyeti heterogametik kromozomla belirlenirken kanatlılarda tam tersi durum söz konusudur. Memelilerde erkek cinsiyet kromozomu XY, dişi cinsiyet kromozomu XX olduğu halde kanatlılarda erkek cinsiyet kromozomu ZZ, dişi cinsiyet kromozomu ZW'dir. Memelilerde cinsiyetin belirlenmesinde rol alan Y kromozomu üzerinde bulunan cinsiyet belirleme (SRY) geni kanatlılarda bulunmamaktadır. Kanatlılarda SRY geni dışında farklı genlerin cinsiyetin belirlenmesinde rol aldığı varsayılıyor (Shimada 2002).

### 1.1.2.Testislerin Anatomik Yapısı

Memeli hayvanlarda testisler vücut boşluğu dışında skrotum adı verilen bir kese içinde asılı bir şekilde bulunan bir çift bezdir (Kierszenbaum 2006). Kanatlılarda ise testis karın boşluğu içinde sölom çatısının orta hattının iki kenarında simetrik biçimde yerleşmiştir. Testisler karın boşluğunda böbreğin kranial kısmında kranio-ventral olarak uzanır. Kranial bölgede akciğerlerin ventral kısmı ile ilişkilidir. Medial bölgede aort, vena cava caudalis ve adrenal beze yakın olarak yerleşmiştir. Mezenteryum epididimisi ventral bölgeden örterek testisin aort ve böbrek arasında sölom çatısına bağlar. Fasulye biçiminde olan olan testisler prepubertal dönemde sarımsı veya siyahımsı renkte olup pubertal dönemde rengi beyaza döner. Kanatlılarda testislerin kranial bölgelerinde hava keseleri bulunmaktadır, bu hava

keselerinin testisin soğutulmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Kanatlılarda genellikle sol testis, sağ testisten daha büyüktür (Kahvecioğlu ve Çalışırlar 2002). Bıldırcınlarda da aynı şekilde sol testis sağ testisten daha büyüktür (Akbar ve Qureshi 2012). Testislerin büyüklükleri yaşa ve vücut ağırlıkları ile orantılıdır. Memeliler ile kıyaslandıklarında kanatlı testislerinin vücut ağırlıklarına göre oranlandığında çok daha büyük oldukları görülür, testis ağırlıkları beden ağırlıklarının yaklaşık %1'i kadardır (Kahvecioğlu ve Çalışırlar 2002). Bıldırcın testisinin ağırlığı, uzunluğu, genişliği gibi morfometrik parametreleri inaktif dönem ile kıyaslandığında aktif dönemde daha büyüktür. Serum testosteron seviyesi gibi immün parametreler tam aksine aktif dönemde inaktif döneme göre azalmaktadır. Seminifer tübül çapı gibi histometrik ölçümlerde de inaktif faz ile karşılaştırıldığında aktif fazda artış gözlendiği bildirilmektedir (Akbar ve Qureshi 2012).

### 1.1.3.Testislerin Histolojik Yapısı

Kanatlılarda testis dıştan tunika albuginea ile örtülüdür. Tunika albuginea tabakası kanatlılarda memelilerin aksine oldukça incedir. Bu tabaka düz kas hücrelerinden fibroblastlardan ve kollajen iplik demetlerinden oluşur. Tunika albuginea organ içine septalar göndermediği için gerçek lobüller bulunmaz. Seminifer tübüller arasında ince bir bağ dokusu yer alır. Bu interstisyel doku içinde bağ doku iplikleri, düz kas telleri, kan damarları, sinir telleri, fibroblastlar, Leydig hücreleri bulunur. Oldukça kıvrımlı ve sık anastomozlaşan seminifer tübül çok katlı yapı gösterir. Seminifer tübül Sertoli hücreleri ve gelişimin çeşitli aşamalarındaki spermatojenik hücreleri içerir (Hodges 1974). Bazal membran üzerine oturan seminifer epitel memeli hayvanlardan farklı olarak duvar yapısında değil kolon yapısında izlenmektedir. Yani hücrelerin birbirleriyle ilişkileri segmentler halinde değil, sütunlar halindedir. Seminifer tübülde bazalden apikale doğru gidildikçe daha olgun germ hücreleri gözlenir. Bazal bölgede spermatogonyumlar bulunur daha sonra primer spermatositler ardından sekonder spermatositler ve en üstte yani apikalde spermatozoonlar gözlenir. Kanatlılarda seminifer tübüllerin uç kısımları direkt rete testise açılır. Rete testis intrakapsüler olarak gözlenir. Kanatllarda epididimis; duktus efferentis, bağlayıcı kanallar ve duktus epididimisten oluşur (Ergün 2008).

### 1.1.4. Testislerin Histofizyolojisi

Testislerin iki önemli fonksiyonu mevcuttur bunlar endokrin ve ekzokrin fonksiyonlardır. Testislerin ekzokrin fonksiyonları spermatozoon üretimi iken endokrin fonksiyonu testosteron, dihidrotestosteron gibi androjenler adı verilen birçokhormonun üretimidir. Testosteron testislerin intertübüler alanında yer alan Leydig hücreleri tarafından sentezlenir. Diğer androjenlere göre çok daha fazla bulunan testosteron en önemli testis hormonu olarak kabul edilir. Seminifer tübüllerde testosteron spermatogenezin gerçekleşmesini sağlar. Kan dolaşımında bulunan testosteron ise kas gelişmesi, ses kalınlaşması, boynuz, yele, ibik ve sakalın büyümesi gibi sekonder seks karakterlerinin gelişmesini sağlar. Leydig hücresinden salgılanan testosteronun üretilmesi lüteinizan hormon (LH) tarafından uyarılır. LH ve folikül stimülan hormon (FSH) hipotalamustan salgılanan gonadotropin-salgılatıcı hormonun etkisi ile adenohipofizden üretilir. FSH seminifer tübülde Sertoli hücresine bağlanarak androjen bağlayıcı protein, testiküler transferin gibi çeşitli proteinlerin sentezlenmesini sağlayarak spermatogenezi uyarır (Ergün 2008).

Kanatlı hayvanlarda dişilerde sadece sol ovaryum fonksiyonel iken erkeklerde her iki testis de fonksiyoneldir. Memelilerde spermatogenez fonksiyonunu 34-35 $^{o}$C'de skrotum içinde gerçekleştirir (Kierszenbaum 2006). Kanatlılarda bu fonksiyon karın boşluğu içinde 41-42 $^{o}$C vücut sıcaklığında gerçekleşir (Kahvecioğlu ve Çalışırlar 2002). Memelilerde funikulus spermatikus içinde bulunan pleksus pampiniformis adı verilen kan damarı ağı termoregülasyon sağlayarak testislerin sıcaklığının vücut sıcaklığı altında tutulmasını sağlar. Kanatlılarda bu pleksus pampiniformisler bulunmaz bunun yerine testislerin kranial bölgesinde bulunan hava keselerinin bu soğutma işlemini gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Razi ve ark 2010). Hava keseleri çıkarılan horozlarla ilgili yapılan bir çalışmada semen kalitesi bakımından deney grupları ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı, aynı şekilde testiküler ısı ve rektal ısı ölçülüp hava kesesine ait sıcaklık ile karşılaştırdıklarında da önemli bir fark gözlenmemiştir. Elde ettikleri sonuçlar hava keselerinin testisin soğutulmasında görev almadığı ve kanatlı testisinde spermatogenezin yüksek sıcaklıkta gerçekleşebileceği şeklinde yorumlamışlardır (Herin ve ark 1960).

## 1.2.Kan-Testis Bariyerinin Fonksiyonu ve Yapısı

### 1.2.1.Kan-Testis Bariyerinin Fonksiyonu

Germ hücrelerinin farklılaşması immün sistemin olgunlaşmasından ve sistemin kendinden olan ile olmayanı ayırt etmesinden çok sonra ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle germ hücreleri immün sistem için kaçınılmaz bir tehdittir. Puberte döneminde germ hücreleri mayoz bölünmeye girer ve özelleşmiş spermatozoa üretimi gerçekleşir. Bu süreç boyunca oldukça fazla yüzey ve intrasellüler protein sentezi gerçekleşir. İmmün sistem tarafından ortaya çıkan bu yeni antijenler tehdit olarak algılanır ve yok edilmeye çalışılır. Bu nedenle germ hücreleri sistemik sirkülasyonda yer alan belirli antijenlerden ayrı tutularak korunmuş bir ortamda yer alması gerekmektedir .Testiste var olan kan-testis bariyeri ortaya çıkan bu olumsuz durumdan germ hücrelerini ayrı tutarak, hücrelerin korunmuş bir ortamda yer almasını sağlar (Fijak ve Meinhardt 2006).

Seminifer tübül epitelinde yer alan kan-testis bariyeri Sertoli hücreleri arasında bulunur. Seminifer tübül epitelinin üçte birlik bazal kısımda yerleşmiş olan kan-testis bariyeri hücreler arası bağlantı kompleksleri ile sağlanır. Kan-testis bariyerinin bu yerleşimi seminifer tübül epitelini iki bölgeye ayırır. Bunlar; seminifer tübül lümenine bakan kısım olan apikal bölge ve bazal membrana bakan kısım olan bazal bölge. Seminifer epitelin bazal bölgesinde spermatogonia ve preleptoten spermatositler bulunur, apikal bölgede ise primer ve sekonder spermatositler, round spermatidler, elongating/elongated spermatidler bulunur. Apikal bölgede bulunan germ hücreleri kan-testis bariyeri sayesinde sistemik dolaşımda bulunan antijenlerden ayrı tutularak korunmuş bir ortamda yer alır (Mruk ve Cheng 2004).

Tight junction bağlantıları seminifer tübül epitelinde sadece Sertoli hücreleri arasında bulunur. Germ hücrelerinde tight junction proteini bulunmaz. Tight junctionların epitelde iki farklı fonksiyonu bulunur bunlar; kapı ve çit foksiyonudur. Tight junctionların kapı fonksiyonu parasellüler alan arasında suyun, çözünen maddelerin ve diğer büyük moleküllerin geçişini engeller yani bir bariyer oluşturur, çit fonksiyonu proteinlerin ve lipitlerin apikal ve bazolateral alanlar arasındaki hareketini kısıtlar yani hücre kutupluluğu üretir (Mruk ve Cheng 2015).

### 1.2.2. Kan-Testis Bariyerinin Yapısı

Kan-testis bariyeri Sertoli hücreleri arasında yer alan okludin bağlantıları ve adherens junctionlar ile yaratılır. Testiste bilinen tek okludin bağlantısı tight junctionlardır. Bu bariyerin temeli tight junction'lar ile sağlanırken diğer bağlantılar bu bariyerin oluşmasına desteklik sağlar (Cheng ve Mruk 2002). Genelikle diğer epitellerde bu bağlantıların göreceli lokasyonları aynı olmasına rağmen seminifer epitelde bu bağlantıların lokasyonları diğer epitellerden farklıdır. Epitel hücrelerinin çoğunda apikal kısmında tight junctionlar bulunur, bunları adherens junctionlar takip eder ve ardından desmosomlar yer alır. Bu bağlantı kompleslerinin yanı sıra gap junctionlar ve ek desmozomlar; tight junctionlar ve adherens junctionlar ile sıkı bir şekilde düzenlenmiş değillerdir ve ekstrasellüler matriks ile bağlantılı epitel hücresinde dağınık bulunabilirler. Bu durumda tight junctionlar ekstrasellüler matriksten uzak konumda yer alırken testiste kan-testis bariyerini oluşturan tight junctionlar seminifer epitelin bazal kompartmanında yerleşim gösterirler (Lui ve ark 2003). Kan-testis bariyerinin gelişimi ergenlik döneminde spermatogenezin ilk dalgasıyla birlikte başlar. Bu sürecin Sertoli hücre çoğalmasının sona ermesi ve işlevsel olgunlaşması ile çakıştığı düşünülmektedir (Gerber ve ark 2016).

Olgun germ hücrelerinin oluşumuyla sonuçlanan hücresel olayların kronolojik serisini kapsayan sürece spermatogenezis denir. Kan-testis bariyeri spermatogenezis sırasında preleptoten spermatositlerin bazal bölgeden apikal bölgeye geçişine izin verecek şekilde açılıp kapanabilen dinamik bir yapıya sahiptir. Spermatogenesiz boyunca kan-testis bariyerinde yer alan tight junctionların açılıp kapanması ile ilgili literatürde 3 teori bulunur (Cheng ve Mruk 2002).

Fermuar teorisi: bazal bölgeden adluminal bölgeye preleptoten ve leptoten spermatositlerin geçişi sırasında tight junction bölgeleri bir fermuar şeklinde açılıp kapanır. Bu açılıp kapanma sırasında kan-testis bariyeri bozulmadan işlevine devam eder (Cheng ve Mruk 2002).

Hücreler arası kompartman teorisi: Russel (1977) tarafından önerilen bu teoriye göre bazal bölgeden adluminal bölgeye geçiş sırasında germ hücreleri tarafından işgal edilen bir kompartman mevcuttur. Bu kompartman sayesinde kan

testis bariyeri bozulmadan germ hücrelerinin bazal bölgeden apikal bölgeye hareket edebildiği bildirilmiştir (Russell 1977).

Her iki teoride de kan-testis bariyerinden germ hücrelerinin geçebilmesi için tight junction fibrillerinin ayrılıp birleşmesini başlatan uyaranın ne olduğu bilinmemektedir (Cheng ve Mruk 2002).

Stres teorisi: Pelletier ve Byers (1992) tarafından önerilen stres teorisine göre germ hücrelerinin gelişimi tight juction bölgesinde bir stres yaratıyor ve bunun sonucu olarak germ hücrelerinin apikal bölgeden bazal bölgeye geçişine izin verecek şekilde tight junction fibrilleri açılıp kapanıyor (Pelletier ve Byers 1992).

### 1.3. Kan-Testis Bariyeri Tight Junction Bağlantı Proteinleri

Tight junction bağlantısında integral membran proteinleri ve periferal membran proteinleri yer alır (Mruk ve Cheng 2004).

#### 1.3.1. İntegral Membran Proteinleri

İntegral membran proteinlerinin en çok bilinenleri okludin, klaudin juncitonal adhesion molekülü ve trisellulindir. Bunun dışında varlığı belirlenen integral membran proteinleri de mevcuttur (Mruk ve Cheng 2004).

##### 1.3.1.1. Okludin

Okludin ilk kez 1993 yılında Furuse ve ark (1993)tarafından civciv karaciğerinde keşfedilmiştir. Tek polipeptid zincirinden oluşan okludinler 60-65 kDa ağırlığında hücreler arası adezyon kuvvet molekülüdür (Furuse ve ark 1993, Cummins 2012). Daha sonra yapılan çalışmalar ile okludin molekülünün memeli ve kanatlı hayvanlarda %90 oranında benzer olduğu gösterilmiştir (Ando-Akatsuka ve ark 1996). Her bir okludin molekülü 4 transmembran bölge, 2 ekstrasellüler bölge, 1 intrasellüler bölge, bir küçük amin ($NH_2$) sitosolik bölge ve bir büyük karboksil (COOH-) sitosolik bölgeden oluşur (Cheng ve Mruk 2002, Mruk ve Cheng 2004, Morrow ve ark 2010). Bu bölgeler arasında ilk ekstrasellüler bölge tirozin ve glisinden zengindir ve bu farklı memeli türleri arasında iyi korunmuştur. Sitosolik COOH- kısım 1:1 oranında zonula okludens ile bağlantılıdır. Okludin kan-testis bariyer fonksiyonu için önemlidir fakat zorunlu değildir. Okludin tek başına bariyer

fonksiyonunu gerçekleştiremez kaludin ile birlikte bu fonksiyonu yerine getirebilir (Saitou ve ark 2000, Heiskala ve ark 2001). Fare ve sıçan testislerinde okludinlerin Sertoli hücreleri arasında kan-testis bariyerinin bulunduğu bölgede yer aldığı ve maturasyonla yoğunluğunun arttığı gösterilmiştir fakat insan ve kobayda Sertoli hücrelerinde okludinin bulunmadığı belirtilmiştir (Moroi ve ark 1998, Feldman ve ark 2005). Okludinler testiste Sertoli hücre membranında bazale yakın olarak ve Sertoli hücre sitoplazmasında bulunur. Sertoli hücrelerinde bazolateral membranda tight junction fibrilleri olarak düzenlenmemiş küçük bir okludin havuzu bulunur. Bu okludin havuzu molekül rezervi olarak bulunur ve hızlı okludin değişimlerinde kullanılır (Cheng ve Mruk 2002).

#### 1.3.1.2. Klaudin

Furuse ve ark. tarafından 1998 yılında keşfedilen klaudin yaklaşık 22 kDa ağırlığındadır (Furuse ve ark 1998). Klaudinler bir kısa $NH_2$ sitoplazmik bölge, iki ekstrasellüler bölge, dört transmembran bölge ve bir uzun COOH sitoplazmik bölgeden oluşur. Klaudin ve okludin benzer bir topolojik yapıya sahiptir fakat klaudinlerin sitoplazmik bölgeleri ve ikinci ekstrasellüler bölgesi daha küçüktür. Yeni tanımlanan üç klaudin molekülü ile birlikte farklı epitellerde tanımlanmış olan toplan 27 farklı klaudin molekülü bulunur (Mineta ve ark 2011, Günzel ve Alan 2013). Testiste klaudin 1, 3, 5, 7, 8 ve 11 olmak üzere toplam 7 farklı klaudin molekülü tanımlanmıştır. Bunlardan klaudin 3, 5 ve 11'in kan-testis bariyerinin bütünlüğünün sağlanmasında rol aldığı gösterilmiştir. Klaudin ekspresyonu ile kan-testis bariyerinin oluşumu aynı zamanlarda gerçekleşir (Morrow ve ark 2010).

Klaudin nakavt fareler ile yapılan çalışmalarda farklı epitellerin bariyer bütünlüğünün düzenlenmesinde klaudinin önemi ortaya konulmuştur. Örneğin klaudin-1 nakavt farelerin epidermal bariyerin bozulmasından dolay doğumdan kısa bir süre sonra öldüğü gösterilmiştir (Furuse ve ark 2002). Klaudin-5 nakavt farelerde neonatal ölüm (Nitta ve ark 2003), klaudin-11 nakavt ferelerde ise infertilite gözlenmiştir (Gow ve ark 1999).

#### 1.3.1.3. Junctional Adhezyon Molekülleri

Junctional adhezyon molekülleri (JAM) immünoglobülin süper ailesinin bir üyesidir. Farklı dokularda 36-42 kDa molekül ağırlığına sahiptir. JAM bir

ekstrasellüler bölge, bir intrasellüler bölge ve bir transmembran bölgeden oluşur. Ekstrasellüler bölge iki zincirler arası disülfit bağları ile iki V şekilli immünoglobülin benzeri halkadan oluşur. JAM'ın intrasellüler bölgesi zonula okludens-1'in Postsynaptic Density-95/Discs-large/ zonula okludens-1 (PDZ) bölgesi ile bağlantılıdır (Mruk ve Cheng 2004). JAM'ın üç klasik üye (JAM-A, B ve C) ve dört ilişkili (JAM-4, JAM-L, CAR ve ESAM) proteinler olmak üzere toplamda 7 farklı üyesi bulunur. JAM-A, B ve C öncelerde sırası ile JAM-1, 2 ve 3 olarak adlandırılmış olmasına rağmen daha sonra isimleri değiştirilmiştir (Muller 2003). JAM-A ve -B Sertoli hücreleri tarafından, JAM-C spermatidler tarafından eksprese edilir. Sertoli hücresinde JAM-A kan-testis bariyerinde bulunur. JAM-B ise hem kan-testis bariyerinde hem de ektoplazmik özelleşmelerde yer alır. JAM-C ektoplazmik özelleşmelerde spermatidlerde bulunur (Zhang ve Lui 2015).

#### 1.3.1.4. Trisellulin

Ikenouchi ve ark (2005) tarafından ilk kez 2005 yılında keşfedilen trisellulin özellikle üç hücrenin kesiştiği bölgelerde dikey olarak yerleşim gösteren tight junction integral membran proteinidir. Epitelyal hücre tiplerinin hepsinde gözlenen trisellulinin yapılan çalışmalarda iki hücrenin kesiştiği noktalarda da yerleştiği belirtilmiştir. Tanımlanan beş trisellulin formu bulunur, bunlar trisellulin-a, b, c, d ve e olarak isimlendirilir. Trisellulin olarak bahsedilen protein trisellulin-a izoformudur. Trisellulin yapısal olarak dört transmembran bölge, bir COOH- bölge ve bir $NH_2$ bölge içerir. Trisellulin proteini baskılandığı zaman biselluler ve triselluler tight junctionların yapısının düzensizleştiği ve bariyer fonksiyonunun zarar gördüğü izlenmiştir (ikenouchi ve ark, 2005). Trisellulinin fazla eksprese edilmesinin tight junctionların moleküler yapısını etkilemediği buna rağmen iyonların ve büyük moleküllerin geçişini daha etkili bir şekilde engellediği gösterilmiştir. Trisellulin işitme duyusu için çok önemlidir. Trisellulin geninde meydana gelen bir mutasyon veya delesyon sonucunda sağırlık meydana gelir (Riazuddin ve ark 2006).

### 1.3.2. Periferal Membran Proteinleri

En çok çalışılan tight junction periferal membran proteini zonula okludenslerdir. Bunların dışında iyi bilinen diğer proteinler ise cingulin ve

symplekinlerdir. Bu proteinler dışında bilinen başka periferal membran proteinleri de mevcuttur (Mruk ve Cheng 2004).

#### 1.3.2.1. Zonula Okludens

Membrane-Associated Guanylate Kinase homolog protein ailesinin bir üyesi olan zonula okludensin zonula okludens-1,-2 ve -3 olarak üç üyesi bulunur. Zonula okludens yapısal olarak guanilat kinaz benzeri bölge, src-eşleşme bölgesi ve üç PDZ bölgesi olmak üzere üç farklı bölgeden oluşur (Tsukita ve ark 2001). Bu bölgeler zonula okludenslerin tight junction fonksiyonunu destekleyen proteinlerle bağlanmasına izin verir. Zonula okludens tight junction bölgesi dışında çekirdekte ve diğer hücre bağlantılarında da bulunur. Testiste kan-testis bariyeri dışında elongated spermatidlerin etrafında apikal ektoplazmik özelleşmelerde de yer alır. Zonula okludens proteinleri hüre çoğalmasını, farklılaşmasını düzenlerler, membran organizasyonunu kontrol ederler, sinyal ileti yolaklarını yönetirler ve hücre kutuplaşmasını düzenlerler (Mruk ve Cheng 2004).

Zonula okludens-1 tanımlanan ilk zonula okludens proteinidir. ilk kez hepatosit membranında tanımlanan zonula okludens-1 proteini 225 kDa ağırlığındadır. Testiste zonula okludens-1, konneksin-43 ile kolokalizedir ve gap junction bağlantısının düzenlenmesini sağlar. Zonula okludens-1 gap junctionların negatif düzenleyicisidir ve konneksin-43'ün fosforilenmesi zonula okludens-1 ile konneksin 43 iletişimine zarar verir, gap junction bağlantısını arttırır. Zonula okludens okludin ve klaudin gibi diğer proteinler ile de bağantılıdır. Bu transmembran proteinlerin hücre iskeletine bağlanması zonula okludensler aracılığı ile gerçekleşir. Testiste Sertoli hücreleri tarafından sentezlenen zonula okludens-1 proteini germ hücreleri tarafından sentezlenmezler. Zonula okludens-1'in ekspresyonu fare ve ratlarda testiste 7-14 günlük iken gerçekleşir. Bu yaklaşık doğumdan sonraki 13-15 gün sonrasında kan-testis bariyerinin oluştuğu zamana denk gelir. Zonula okludens-1'in bilinen iki izoformu vardır bunlar α+ ve α- formlarıdır. Bu izoformlar tight junction bağlantısının oluşmasında sürdürülmesinde ve düzenlenmesinde önemli rol oynar. Her iki izorform testiste gençlik ve erişkinlik dönemlerinde yoğun olarak eksprese edilir (Willott ve ark 1992). Zonula okludens-1'in sıkı bağlanma özelliğine katkı sağlamanın yerine Tight junctionın membran altı hücre iskeleti ile integral membran komponentleri arasında mekanokimyasal bağlantı

yarattığı iddia edilmektedir. Zonula okludens-1'in PDZ bölgesi klaudin ve okludin proteinlerinin COOH-ucuna 1:1 oranında bağlanır (Mruk ve Cheng 2004).

Zonula okludens-2 160 kDa ağırlığında olan bir diğer zonula okludens proteinidir. İlk kez Madin Darby köpek böbrek (MDCK) hücrelerinde tanımlanan zonula okludens-2'nin testiste varlığı gösterilmiş fakat çok çalışılmamıştır. Zonula okludens-1 ile bağlantı sağlayan zonula okludens-2 ayrıca okludin ve klaudinlerle de bağlantı sağlar (Mruk ve Cheng 2004).

Zonula okludens-3 ilk kez MDCK hücrelerinde tanımlanmış 130 kDa ağırlığında olan zonula okludens proteinidir. Başlangıçta p130 olarak isimlendirilmesine karşın zonula okludens-1 ve zonula okludens-2 ile benzer homoloji paylaşması nedeni ile daha sonralarda zonula okludens-3 olarak isimlendirilmiştir. zonula okludens-3 tight junction bölgelerinde zonula okludens-1 ile kolokalizedir. Ayrıca okludin, klaudin ve aktin ile bağlantılı olmasına rağmen zonula okludens-2 ile bağlantılı değildir. zonula okludens-3'ün cDNA sekansı bilinmesine rağmen testiste varlığı gösterilememiştir (Mruk ve Cheng 2004).

#### 1.3.2.2. Cingulin

Cingulin tight junctionların sitoplazmik kısımlarında bulunan 140 kDa ve 108 kDa ağırlığında iki farklı moleküler yapısı bulunan bir fosfoproteindir (Citi ve ark 1989). Testiste tight junction bölgelerinde bulunur. Bu bölgede zonula okludens-1'den daha uzakta bulunmasına rağmen seçici bariyerin sürdürülmesi için gereklidir. Cingulin miyozin ve paramiyozin gibi diğer hücre iskeleti proteinleriyle yüksek oranda yapısal bir eşleşme gösterir. Yapılan in vitro immünopresipitasyon çalışmaları ile cingulin proteininin diğer tight junction proteinleriyle özellikle zonula okludens-1, zonula okludens-2, zonula okludens-3, AF-6 ve miyosin ile etkileşim içinde oldukları, bunların dışında okludin ile de iletişim içinde olduğu gösterilmiştir. Rat ve fare testisinde cingulin kan-testis bariyeri yakınında bazal kısımda zonula okludens-1 ile aynı bölgede bulunur. Sertoli-Sertoli hücre bağlantısının yanı sıra Sertoli-spermatid hücre bağlantısında da cingulinin bulunduğu gösterilmiştir (Mruk ve Cheng 2004).

#### 1.3.2.3. Symplekin

Symplekin 126,5 kDa ağırlığında bir protein olup epitelde Tight junction'ların bulunduğu bölgelerde bulunur. Yapılan immünohistokimya ve immüngold elektron mikroskobi çalışmalarıyla Sertoli hücresinde varlığı gösterilmiştir fakat damar endotelinde varlığı gözlenmemiştir (Keon ve ark 1996). Tigh junction bölgesindeki lokalizasyonlarına ek olarak symplekin proteinine hücrelerin çekirdek plazmasında da sık rastlanır (Mruk ve Cheng 2004). Symplekin dört ayırıcı alana sahiptir: N-terminal Ssu72 bağlama alanı (NTD), 32 CstF-64 bağlanma alanı, CPSF-73 bağlama bölgesi ve C-terminal bölgesi (Keon ve ark 1996)

Yaptığımız bu çalışmanın amacı prepubertal ve pubertal bıldırcın testislerinin genel histolojik değerlendirmesinin yapılması, kan-testis bariyerinin temelini oluşturan tight junction proteinlerinden klaudin -1 ve zonula okludens-1'in varlığının ve lokasyonlarının belirlenmesidir.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu'nun 29.06.2016 tarih ve 2016/54 sayılı kararı ile onaylandı. Çalışmamızda Protenyum kümes hayvanları çiftliğinden elde edilen 6 adet 30 günlük prepubertal, 6 adet 70 günlük pubertal erkek Japon bıldırcını (*Coturnix coturnix japonica*) kullanıldı. Hayvanlar servikal dislokasyonla sakrifiye edildikten sonra testis dokuları alınıp rutin doku takibi işlemi yapıldı. Genel histolojik değerlendirme için Crossman'ın üçlü boyama yöntemi kullanıldı (Crossmon 1937). Klaudin-1 ve Zonula Okludens-1 proteinlerinin gösterimi için sırası ile immünohistokimyasal ve immünfloresan boyamalar gerçekleştirildi.

### 2.1. Işık Mikroskobik Doku Takibi

Testis dokuları fiksayon işlemi için %10'luk Nötral Formaldehit solüsyonunda 24 saat bekletildi. Fiksasyon işleminden sonra 1 gece akarsu altında yıkanan dokular rutin doku takip yöntemi ile takibi yapılarak bloklandılar.

Parafin bloklardan mikrotomda (Mikrotom Leica, RM2125RT) 3-5 µm kalınlığında kesitler elde edildi.

### 2.2. Crossman'ın Üçlü Boyama Protokolü

Alınan kesitler genel histolojik değerlendirmeler yapmak üzere Crosman'ın üçlü boyama yöntemi ile boyandı (Crossmon 1937). Hazırlanan preparatlarda genel histolojik incelemeler yapıldı, kapsül kalınlığı ve seminifer tübül çapı ölçüldü. Tüm incelemeler ve ölçümler DFC-320 model kamera ataçmanı olan Leica DM-2500 model ışık mikroskobu ile yapıldı ve resimleri çekildi. Ölçümlerden elde edilen verilerin istatistiki analizi MİNİTAB 14 paket programı kullanılarak yapıldı. Analizler için bağımsız örnek T testi metodu kullanıldı. P değeri 0.05'den küçük olan değerler istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

### 2.2.3 İmminohistokimya Boyama Protokolü

- Parafin bloklardan alınan 3-5 µm kalınlığındaki kesitler deparafinizasyon işlemi için 2x15 dk ksilolde bekletildi.
- Rehidrasyon işlemi için sırası ile 3'er dk %100, %100, %96, %80 ve %70'lik azalan dereceli alkol serisinden ve en son distile sudan geçirildi.

- Antijen maskelenmesini önlemek için mikrodalgada (750W) 1M sitrat tampon (pH:6) içinde 3x5 dk bekletildikten sonra 20 dk soğumaya bırakıldı.
- Fosfatlı tuz solüsyonunda (PBS) 3x3 dk yıkandı.
- Nonspesikik antikor bağlanmasını ve zemin boyamasını engellemek için Protein blok ile 5 dk inkübe edildi.
- Kesitler üzerinden protein blok uzaklaştırılık yıkama yapılamadan antikor sulandırma solüsyonu ile 1/100 oranında sulandırılmış Klaudin-1 primer antikoru (invitrogen, cat. no: 51-900) damlatıldı. Kesitler nemlendirilmiş kap içerisinde buzdolabında 1 gece bekletildi.
- PBS ile 3x5 kez yıkandı
- Kesitler üzerine polyvalent sekonder antikor damlatılıp 30 dk bekletildi.
- PBS ile 3x5 kez yıkandı
- Endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için metanol ile hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksitaz ($H_2O_2$) içinde 30 dk bekletildi.
- PBS ile 3x5 kez yıkandı.
- Kesitler üzerine HRP konjuge streptavidin damlatılıp 30 dk bekletildi.
- PBS ile 3x5 kez yıkandı
- Diaminobenzidin (DAB) damlatılıp 2 dk bekletildi.
- Distile sudan geçirildi.
- Zıt boyama için Mayers Hematoksilen içinde 2 dk bekletildi.
- Akarsu altında yıkama yapıldı.
- Kesitler 3'er dk bekletilerek artan dereceli alkol serisinden geçirildi (%70, 80, 96, 96, Absol, Absol).
- Şeffaflandırma için Ksilolde 2x3 bekletildi
- Kesitler entellan ile kapatıldı.

Negatif kontrol için primer antikor yerine kesitler üzerine PBS damlatıldı. Ardından protokol aynı şekilde devam ettirildi. Hazırlanan doku kesitleri DFC-320 model kamera ataçmanı olan LeicaDM-2500 model ışık mikroskobu ile incelenip resimleri çekildi.

### 2.2.4. İmmünfloresans İşaretleme Protokolü

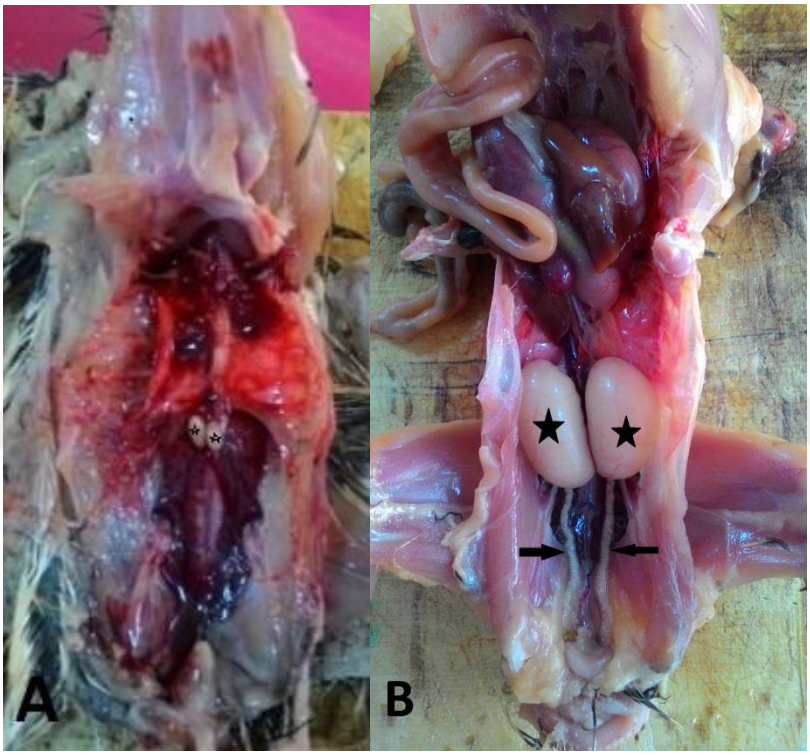
- İmmünfloresans işaretleme için testis doku bloklarından alınan 3-5 µm kalınlığındaki kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 37 $^{o}$C etüv içinde ardından 2x15 dk ksilol içinde bekletildi.
- Rehidrasyon işlemi için sırası ile 3'er dk azalan dereceli alkol serisinden (%100, %100, %96, %80 ve %70) geçirildi.
- PBS ile 3x5 dk yıkandı.
- Kesitler üzerine PBSTriton-X100 Normal goat serum damlatılıp 15 dk bekletildi.
- Kesitler üzerinden protein blok uzaklaştırılıp yıkama yapılamadan antikor sulandırma solüsyonu ile 1/100 oranında sulandırılmış Zonula Okludens-1 primer antikoru (abcam, cat. no: ab59720) damlatıldı. Kesitler nemlendirilmiş kap içerisinde buzdolabında 1 gece bekletildi.
- PBS ile 3x5 dk yıkandı.
- Blok solüsyonu ile 1/1000 oranında sulandırılmış FITC konjuge Goat anti-Rabbit IgG (abcam, ab6717) sekonder antikor damlatılıp oda sıcaklığında, karanlık ve nemli ortamda 3 saat bekletildi.
- PBS ile 3x5 dk yıkandı.
- Kesitler üzerine nükleer boyama için DAPI damlatılıp lamel ile kapatıldı.

Negatif kontrol için primer antikor yerine kesitler üzerine PBS damlatıldı. Ardından protokol aynı şekilde devam ettirildi. Hazırlanan doku kesitleri immünfloresan mikroskobu ile incelenip resimleri çekildi.

# 3. BULGULAR

## 3.1. Makroskobik Bulgular

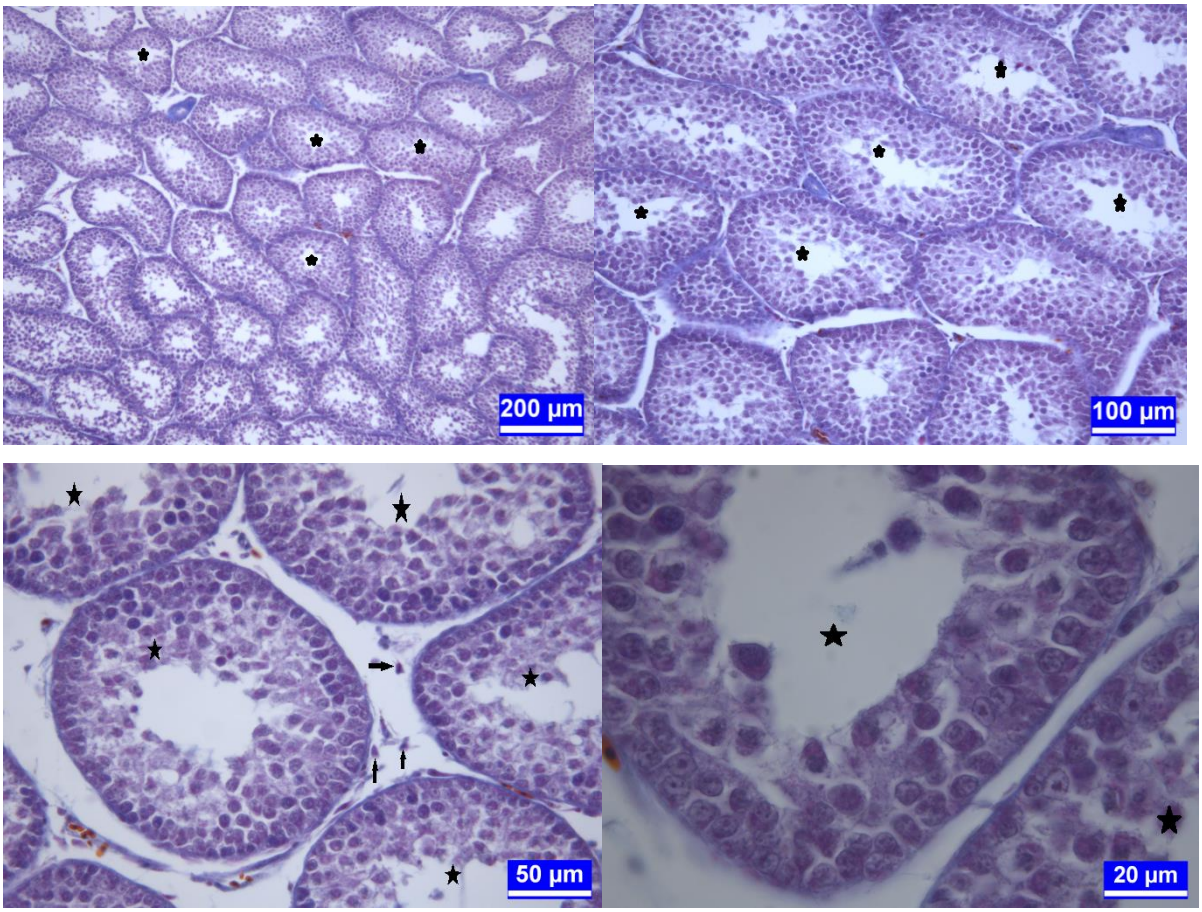
Prepubertal dönem bıldırcın testislerinin karın boşluğu içinde yerleştiği, oval şekilli ve küçük olduğu, belirgin olmayan duktus deferenslerin varlığı gözlendi. Pubertal dönem bıldırcın testislerinin aynı şekilde karın boşluğu içinde yerleştiği ve oval şekilli olduğu gözlendi. Duktus deferenslerin belirginleştiği ve kloakaya açıldığı gözlendi. Pubertal bıldırcın testislerinin prepubertal bıldırcın testisi ile kıyaslandığında oldukça büyük olduğu gözlendi (Şekil 3.1).




**Şekil 3.1.** Bıldırcın erkek genital organlarının makroskobik görünümü. **A)** Prepubertal dönem. **B)** Pubertal dönem. Yıldızlar: testis, oklar: duktus deferens

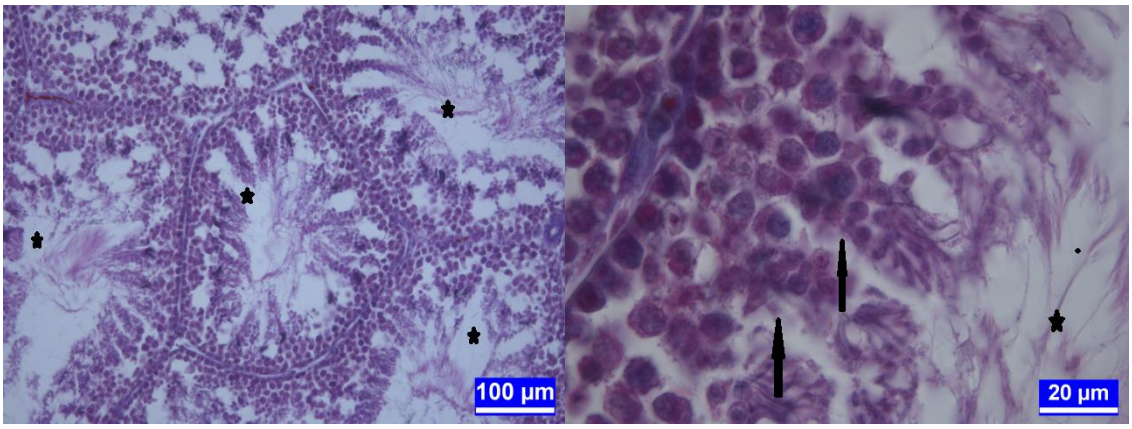
## 3.2 Işık Mikroskobik Bulgular

Prepubertal dönemdeki bıldırcın testislerinde üçlü boyama metodu ile hazırlanan doku kesitlerinde seminifer tübüllerin Sertoli hücrelerinden ve spermatagonyumlardan oluştuğu gözlendi. Sertoli hücreleri bazale oturmuş ve apikale doğru uzanan, üçgen şekilli çekirdeklere sahip hücreler şeklinde olduğu, seminifer tübüllerin etrafında belirgin bir bazal membran olduğu gözlendi. İntersitisyel alanda çok ince bir bağ dokusuna, kan damarlarına ve Leydig hücrelerine rastlandı (Şekil 3.2.).




**Şekil 3.2.** Prepubertal bıldırcın testisinin farklı büyütmelerde genel histolojik görünümü. (yıldız: seminifer tübül, oklar: Leydig hücresi), Crossman'ın üçlü boyaması.

Pubertal dönem bıldırcın testisinde seminifer tübül epitelinde Sertoli hücrelerinin ve gelişimin çeşitli aşamalarındaki spermatojenik germ hücrelerinin bulunduğu bu hücrelerin lümene doğru uzanan sütunlar şeklinde olduğu gözlendi. Seminifer tübül lümeninde spermiyumların varlığı dikkat çekmiştir. Seminifer tübüllerin etrafında belirgin bir bazal membranın yer aldığı görülmüştür. İntersitisyel alanda çok ince bir bağ dokusu, kan damarları ve Leydig hücreleri gözlenmiştir (Şekil 3.3.).




**Şekil 3.3**. Pubertal bıldırcın testisinin farklı büyütmelerde genel histolojik görünümü. (yıldız: seminifer tübül, ok: hücre kordonları), Crossman'ın üçlü boyaması.

Prepubertal ve pubertal bıldırcın testislerinde seminifer tübül çapı ve kapsül kalınlığı ölçümü ile elde edilen veriler bağımsız örnek T testi metodu kullanılarak istatistiksel değerlendirme yapılmış ve pubertal dönemde seminifer tübül çapının ve kapsül kalınlığının arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir.

**Çizelge 3.1.** Prepubertal ve pubertal dönemde bıldırcın testislerinin seminifer tübül çapları.

| | Ölçüm Sayısı | Ortalama | Standart Hata | Minimum | Maksimum |
|---|---|---|---|---|---|
| **Prepubertal** | 60 | 158,4[b] | 3,7 | 101,29 | 234,7 |
| **Pubertal** | 60 | 294,8[a] | 8,9 | 176,6 | 472,2 |

[a,b]: gruplar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir (P<0,001).

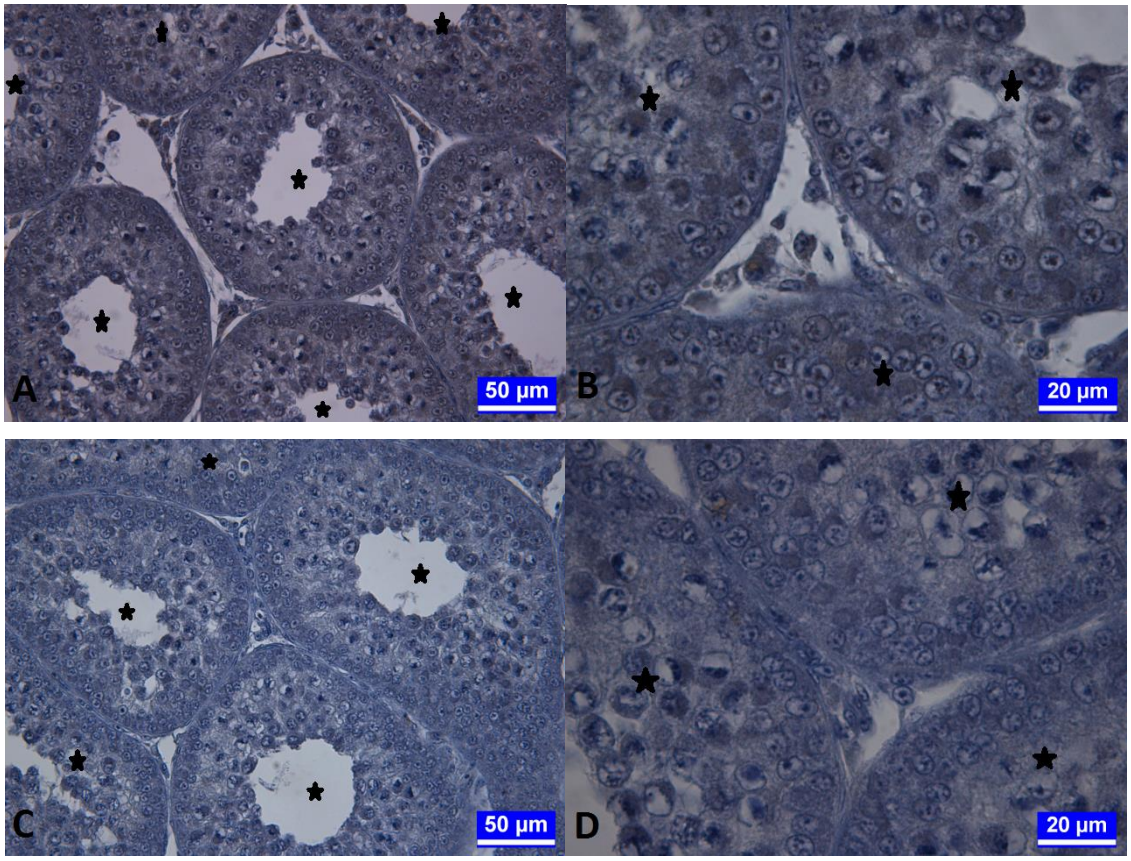
**Çizelge 3.2.** Prepubertal ve pubertal dönemde bıldırcın testislerinin kapsül kalınlıkları.

| | Ölçüm Sayısı | Ortalama | Standart Hata | Minimum | Maksimum |
|---|---|---|---|---|---|
| **Prepubertal** | 60 | 29,04[b] | 0,98 | 16,5 | 49,75 |
| **Pubertal** | 60 | 37,92[a] | 0,76 | 26 | 49,51 |

[a,b]: gruplar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir (P<0,001).

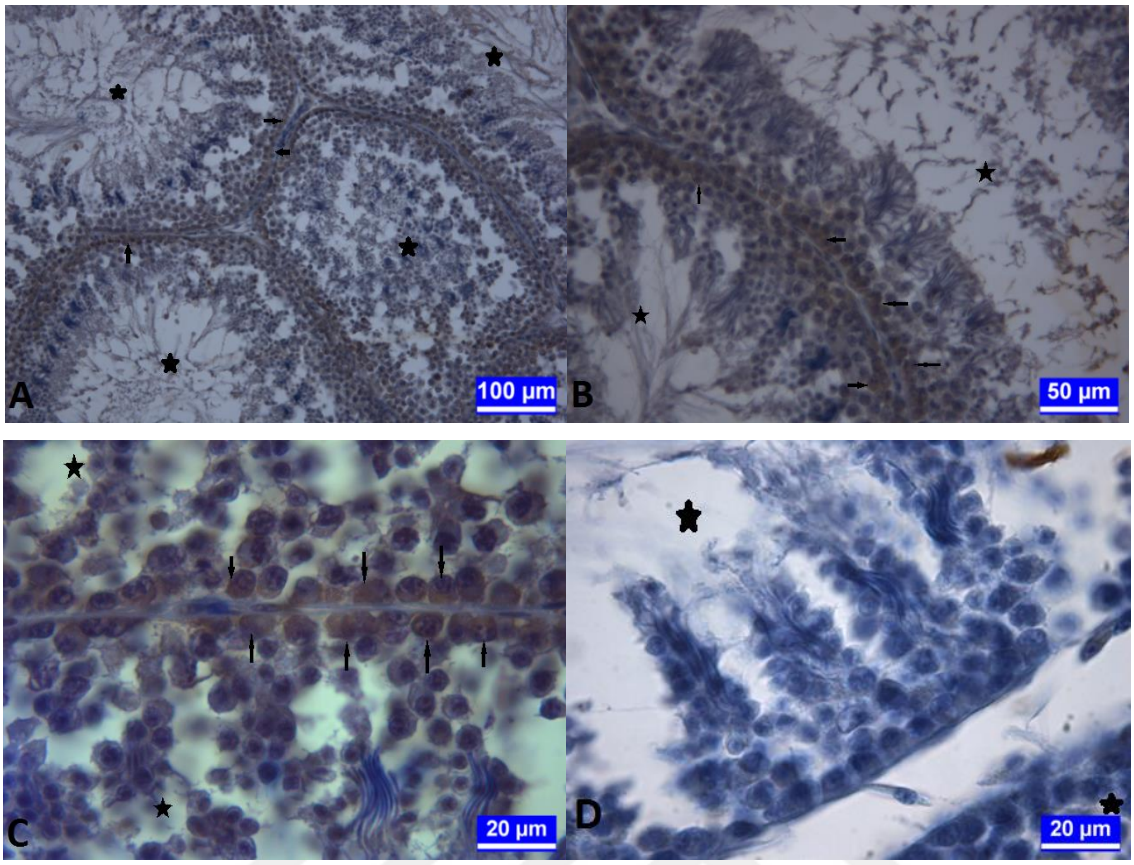
### 3.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

Prepubertal bıldırcın testislerinin immünohistokimyasal değerlendirilmesi sonucunda seminifer tübüllerde klaudin -1 immünreaktivitesi gözlenmedi (Şekil 3.4).




**Şekil 3.4.** Prepubertal bıldırcın testisinde klaudin -1 antikorunun immünohistokimyasal değerlendirilmesi. A-B-C: klaudin -1 immünohistokimya boyaması. D: İmmünohistokimya negatif kontrol boyaması. (yıldızlar: seminifer tübül)

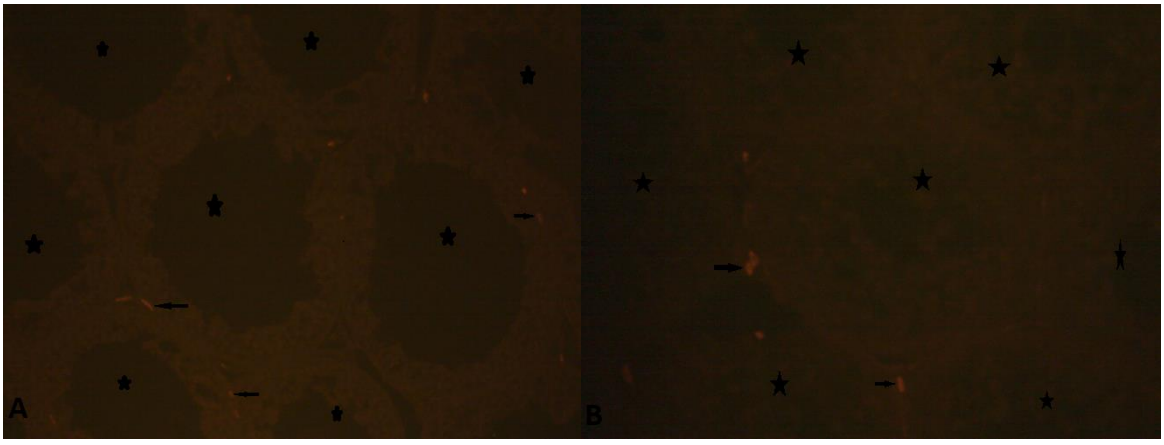
Pubertal bıldırcın testis kesitlerinde klaudin-1 primer antikoru kullanılarak yapılan immünohistokimyasal boyama sonucu, immünreaktivite seminifer tübüllerin bazal bölgesinde gözlendi. Klaudin-1 immünreaktivitesi Sertoli hücrelerinde sitoplazmik ve membransel olarak ayırt edildi. Klaudin -1'in özellikle kan-testis bariyerinin oluştuğu bölgede yer aldığı dikkati çekti. Negatif kontrol kesitlerinde herhangi bir immünreaktivite gözlenmedi (Şekil 3.5).




**Şekil 3.5.**A-B-C) Pubertal bıldırcın testisi klaudin-1 immünohistokimya boyaması. D) Negatif kontrol. (yıldız: seminifer tübül, ok: klaudin-1 immünreaktivitesi)

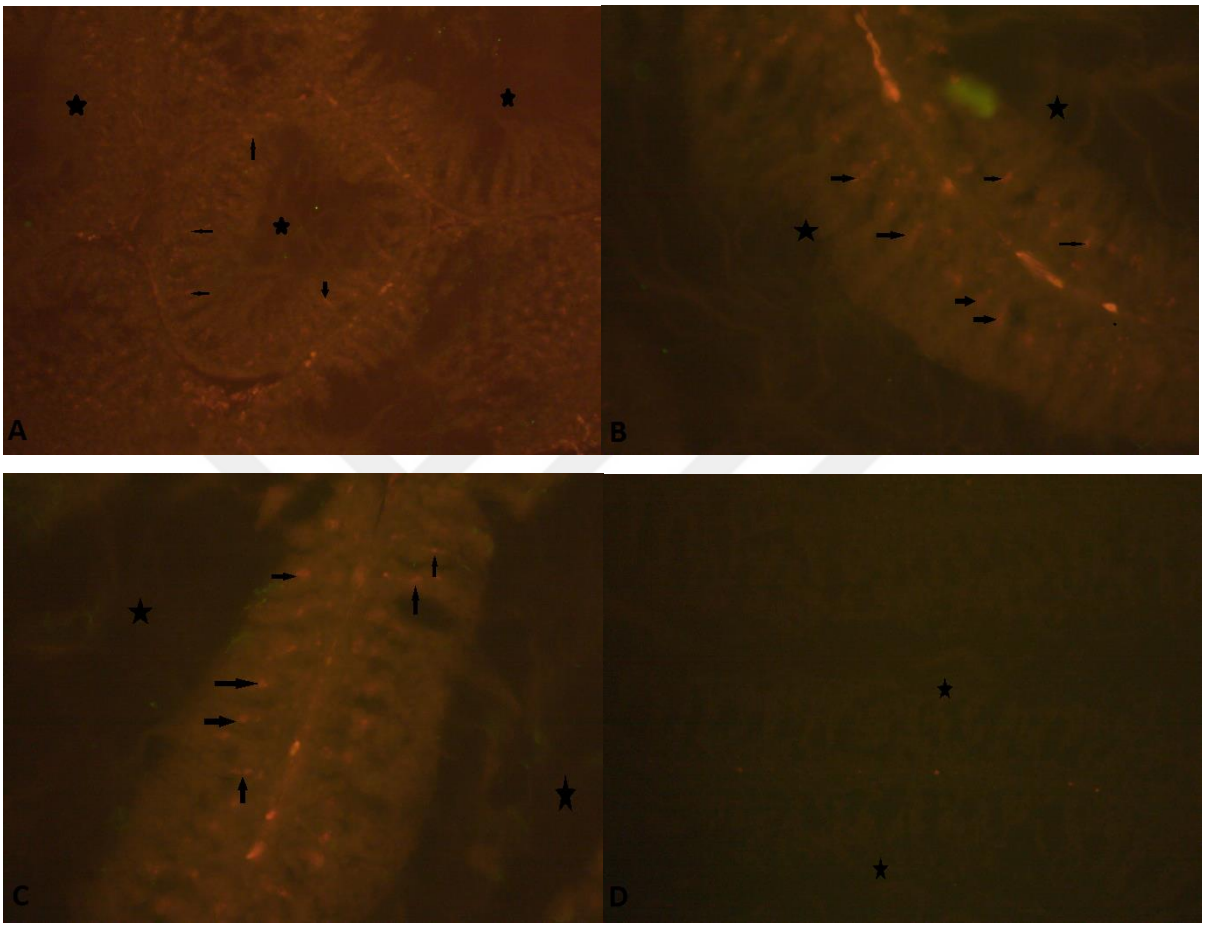
### 3.4. İmmünfloresans İşaretleme Bulguları

Prepubertal bıldırcın testisinde zonula okludens-1 primer antikor kullanılarak yapılan immünfloresan değerlendirilmesi sonucunda seminifer tübüllerde zonula okludens-1 immünreaktivitesi gözlenmedi (Şekil 3.6)




**Şekil 3.6.** Prepubertal bıldırcın testisinin immünfloresan gösterimi. A) zonula okludens-1 immünfloresans boyaması B) zonula okludens-1 immünfloresan negatif kontrol (yıldız: seminifer tübül, ok: kan damarı).

Pubertal bıldırcın testis kesitlerinde zonula okludens-1 primer antikoru kullanılarak yapılan immünfloresan boyama sonucu, immünreaktivite seminifer tübüllerin bazal yarımında gözlendi (Şekil 3.7.A, B, C). Işımanın özellikle seminifer tübüllerde Sertoli hücrelerinde olduğu dikkati çekti. Negatif kontrol kesitlerinde herhangi bir immünreaktivite gözlenmedi (Şekil 3.7.D).




**Şekil 3.7.** Pubertal bıldırcın testisinin immünfloresan gösterimi. A-B-C) zonula okludens-1 immünfloresans boyaması D) zonula okludens-1 immünfloresan negatif kontrol (yıldız: seminifer tübül, ok: zonula okludens-1 immünreaktivitesi).

## 4.TARTIŞMA

Kanatlı testisleri karın boşluğu içinde bulunan, vücut sıcaklığında fonksiyonunu gerçekleştiren bir bezdir. Testisler neslin devamlılığı için gerekli olan en önemli unsurlardan biri olan spermlerin üretilmesinden sorumludur. Spermler testislerin fonksiyonel birimleri olan seminifer tübüllerde üretilir. Prepubertal dönemde seminifer tübüllerde germ hücreleri ve spermatogonyumlar bulunur (Hodges 1974). Spermatogonyumların mayoz bölünmeye girdiği dönem olan puberte döneminde bazı değişiklikler gerçekleşir. Bu değişikliklerin başında germ hücre yüzeylerinde oluşan proteinlerin sentezi gelir. Germ hücrelerinde üretilen yüzey proteinleri immün sistemin gelişmesinden çok sonra ortaya çıktığı için germ hücre yabancı olarak algılanıp yok edilmek istenir (Fijak ve Meinhardt 2006). Kan-testis bariyerinin oluşumu germ hücrelerinin farklılaştığı pubertal dönem ile aynı dönemde gerçekleşir. Sertoli hücreleri arasında oluşan bu bariyer sistemik sirkülasyondaki antijenlerden spermatojenik hücreleri ayrı tutarak yok edilmesini önlemektedir (Mruk ve Cheng 2010).

Korkmaz ve Özcan (2011) bıldırcın erkek genital sisteminin yapısı üzerine yaptıkları çalışma ile ergin bıldırcın testisinin iri yuvarlak şekilli olduğu, epididimislerin varlığını ve kloakaya açılan duktus deferensleri gözlemişlerdir. Ayrıca seminifer tübüllerde Sertoli hücrelerini ve spermatojenik hücreleri ayırt etmişlerdir. Bu hücrelerin lümene doğru uzanan sütunlar şeklinde olduğunu göstermişlerdir. İntersitisyel alanda iki tip leydig hücresinin bulunduğunu ayırt etmişlerdir (Korkmaz ve Özcan 2011). Iczkowski ve ark (1991) tavşan testisi üzerine morfometrik analizler gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları bu çalışmada seminifer tübül çaplarını değerlendirip prepubertal dönem ile pubertal dönem arasındaki farklılıkları izlediklerinde seminifer tübül çapının arttığını belirtmişlerdir (Iczkowski ve ark 1991). Bu çalışmada 70 günlük dönemdeki bıldırcınların testislerinin tübül çaplarının 30 günlük bıldırcınlarınkine göre önemli oranda yüksek olduğu gözlenmiştir.

Horozlarda kan-testis bariyerinin belirlenmesi ile ilgili olarak Bergmann ve Schindelmeiser (1987) yaptıkları çalışmada puberta öncesinde işlevsel bir bariyerin bulunmadığını fakat puberte ile işlevsel bir bariyerin oluştuğunu gözlemişlerdir (Bergmann ve Schindelmeiser 1987). Osman ve ark (1980) matur horozlarda yaptığı çalışmada Sertoli hücreleri arasında spermatogonyumların bulunduğu bölgenin üst kısmında tight junction bağlantılarının bulunduğunu göstermişlerdir. Boyar madde enjeksiyonu gerçekleştirilen testislerde bu maddenin kan-testis bariyerinin ötesine geçmediğini göstermişlerdir (Osman ve ark 1980). Bu çalışmada kan-testis bariyerinin varlığının göstergelerinden olan klaudin-1 ve

zonula okludens-1 proteinlerinin varlığı, dolayısı ile prepubertal dönemde gelişmemiş olan kan-testis bariyerinin pubertal dönemde gelişmiş olduğu ortaya konmuştur.

Tight juntion integral membran proteini olan klaudin-1 farklı epitellerde bariyer fonksiyonun düzenlenmesinde oldukça önemlidir. Fruse ve ark (2002) klaudin-1 yetersiz fareler ile yaptığı çalışma sonucunda doğumdan kısa süre sonra epidermal bariyerin bozulmasından dolayı farelerin öldüğünü gözlemişlerdir (Furuse ve ark 2002). Gilio ve ark. (2013)'nın fare testisi üzerine yaptıkları çalışmada klaudin-1 proteininin immünohistokimyasal boyamasını gerçekleştirmişler. Çalışmanın kontrol grubunda yetişkin fare testislerinin seminifer tübüllerinde klaudin-1'in bazal kompartmanda koyu kahverengi olarak immünreaktivite gösterdiğini buna ek olarak klaudin-1'in premiyotik hücrelerde de bulunduğunu belirtmişlerdir (Gilio ve ark 2013). Park ve ark (2011)'nın immatür ve yetişkin sülün testisi üzerine yaptıkları çalışmada PCR ve western blot uygulamalarının tersine immünohistokimyasal değerlendirmede immatür (3 ve 6 hafta) sülünlerde zayıf immunreaktivite gözlediklerini; matür (50 hafta) sülünlerde klaudin-1'in komşu Sertoli hücreleri arasında, Sertoli hücre ve gonositler arasında, Sertoli hücresinin bazal laminaya komşu olduğu bazal membranda güçlü reaktivite gösterdiğini gözlemişlerdir (Park ve ark 2011). Bu çalışmada klaudin-1'in immünhistokimyasal boyaması ile pubertal bıldırcın testislerinde immünreaktivitenin bazal kompartmanda Sertoli hücreleri arasında olduğu gözlendi. Sertoli hücrelerinde klaudin-1 immünreaktivitesi sitoplazmik ve membransel olarak ayırt edildi. Klaudin-1 seminifer tübülün bazale yakın bölgesinde özellikle kan-testis bariyerinin oluştuğu bölgede immünreaktivite gösterdiği gözlenmiştir. Klaudin-1 kan-testis bariyerinde yer alan önemli bir proteindir ve birçok çalışma (Osman ve ark 1980, Bergmann ve Schindelmeiser 1987, Karateke 2013) ile prepubertal dönemde kan-testis bariyerinin henüz oluşmamış olduğu pubertal dönemle birlikte bu bariyerin varlığına rastlandığı gösterilmiştir. Bu çalışmada prepubertal dönemde klaudin-1 immünreaktivitesi testiste gözlenmemiştir. Bunun prepubertal dönemde henüz kan-testis bariyerinin oluşmamasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Pubertal dönem bıldırcın testisinde Sertoli hücreleri arasında kan-testis bariyerinin oluştuğu bölgede klaudin-1 immünreaktivitesinin gözlenmesi klaudin-1 proteinin bu bariyerde yer aldığını ve bariyerin bu dönemde oluştuğunu düşündürmüştür.

Zonula okludens proteinleri tight junction bölgesinde integral membran proteinlerinin membran altı aktin filamanlarına bağlanmasını sağlayarak Sertoli hücreleri arasında bütünlüğün korunmasında rol alır (Bauer ve ark 2010). Gilula ve ark (1976) memeli testisi üzerine yaptığı çalışmada immatur memeli testisinde tight junctionların bulunmadığını

bildirmişlerdir (Gilula ve ark 1976). Stevenson ve ark (1986) fare testisinde zonula okludens-1 proteininin immünfloresan boyamasını gerçekleştirmiş ve Sertoli hücreleri arasında bazal ve adluminal bölgenin ayrıldığı yerde zonula okludens-1'in ışıma gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca seminifer tübüller arasında arteriyollerde de zonula okludens-1ışıması gözlemişlerdir (Stevenson ve ark 1986). Fink ve ark (2006) testis kanseri bulunan hastalardan ve sağlıklı kişilerden aldıkları testis dokularına immünohistokimya boyması uygulamışlardır. Sağlıklı bireylerde zonula okludens-1 proteininin immünreaktivitesinin Sertoli hücreleri arasında kan-testis bariyerinde var olduğunu göstermişlerdir. Fakat testis kanseri bulunan bireylerde zonula okludens-1 immünreaktivitesinin azaldığını ve sitoplazmaya yayıldığını belirtmişlerdir. Gerçekleştirdikleri western blot analizleri, bu sonucu doğrulamış ayrıca lanthanum boyası ile sağlıklı kişilerle kıyaslandıklarında kan-testis bariyerinin bozulduğunu görmüşlerdir (Fink ve ark 2006). Byers ve ark (1991) fare testisinde zonula okludens-1 dağılımını incelemişler, immatür fare testisinde tight junction kompleksinin mevcut olmadığını bildirmişlerdir. Fakat matür fare testisinde zonula okludens-1'in genelde Sertoli hücre membranında apikolateral olarak dağıldığını, bazalde bulunmadığını belirtmişlerdir (Byers ve ark 1991). Park ve ark (2011) sülün testisi üzerine yaptığı çalışma ile zonula okludens-1'in immünfloresan boyaması gerçekleştirilmiş ve zonula okludens-1 immünreaktivitesini immatür (3 ve 6 hafta) sülün testisinde Sertoli hücresinde bazal membrana komşu olan kısmında, sitoplazmasında ve komşu Sertoli hücreleri arasında apikolateral olarak gözlediklerini bildirmişlerdir. Buna rağmen matür (50 hafta) sülün testisinde zonula okludens-1 immünreaktivitesinin seminifer tübül epitelinde azaldığı ve seminifer epitelin bazalinde güçlü immünreaktivitenin olduğunu gözlemişlerdir (Park ve ark 2011). Bu çalışmada prepubertal dönem bıldırcın testisinde zonula okludens-1'in immünfloresan boyaması sonucu testiste seminifer tübüllerde ışımanın olmadığı görülürken; pubertal dönemde testiste seminifer tübül epitelinde komşu Sertoli hücreleri arasında ışımanın olduğu görülmüştür. Bu sonuca bağlı olarak prepubertal dönemde kan-testis bariyerinin oluşmadığı ya da oluşumunu tamamlamadığı; pubertal dönemde kan-testis bariyerinin oluşması ile zonula okludens-1 proteinin immünfloresan olarak görünür hale geldiği düşünülmüştür.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışma ile prepubertal (30 gün) ve pubertal (70 gün) dönem bıldırcın testisleri değerlendirilmiş, bıldırcın testisinin genel histolojik görünümlerinin kanatlı testisi histolojisi ile benzer olduğu; ayrıca seminifer tübül çapının ve kapsül kalınlığının prepubertal dönem ile karşılaştırıldığında pubertal dönemde arttığı sonucuna ulaşılmıştır.

Klaudin-1 ve zonula okludens-1 proteinlerinin sırası ile immünohistokimyasal ve immünfloresan boyamaları sonucu testiste seminifer tübül epitelinde prepubertal dönemde aktif bir kan-testis bariyerinin henüz oluşmamasından kaynaklı olarak immünreaktivite göstermediği fakat pubertal dönem ile birlikte oluşan kan-testis bariyeri ile seminifer epitelin bazal kısmında immünreaktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak elde edilen bu sonuçların bıldırcın testisi ve/veya kan-testis bariyeri ile ilgili yapılacak çalışmalarda dikkate alınması gerektiği kanaatine varılmıştır.

## 6. KAYNAKLAR


Akbalık ME, Saruhan BG, Topaloğlu U, Ketani MA, 2016. Kanatlılarda Genital Sistem Histolojisi.

Akbar Z, Qureshi AS, 2012. Effects of Seasonal Variation in Different Reproductive Phases on the Cellular Response of Bursa and Testes in Japanese Quail (Coturnix japonica). Pakistan Veterinary Journal, 32, 4.

Ando-Akatsuka Y, Saitou M, Hirase T, Kishi M, Sakakibara A, Itoh M, Yonemura S, Furuse M, Tsukita S, 1996. Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues. The Journal of Cell Biology, 133, 1, 43-7.

Bauer H, Zweimueller-Mayer J, Steinbacher P, Lametschwandtner A, Bauer H, 2010. The dual role of zonula occludens (ZO) proteins. BioMed Research International, 2010.

Bergmann M, Schindelmeiser J, 1987. Development of the blood-testis barrier in the domestic fowl (Gallus domesticus). International journal of andrology, 10, 2, 481-8.

Byers S, Graham R, Dai HN, Hoxter B, 1991. Development of Sertoli cell junctional specializations and the distribution of the tight-junction-associated protein ZO-1 in the mouse testis. Developmental Dynamics, 191, 1, 35-47.

Cheng CY, Mruk DD, 2002. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. Physiological reviews, 82, 4, 825-74.

Citi S, Sabanay H, Kendrick-Jones J, Geiger B, 1989. Cingulin: characterization and localization. Journal of Cell Science, 93, 1, 107-22.

Crossmon G, 1937. A modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. The Anatomical Record, 69, 1, 33-8.

Cummins PM, 2012. Occludin: one protein, many forms. Molecular and cellular biology, 32, 2, 242-50.

Çoyan K, Ataman MB, Kaya A, Karaca F, 2002. Evcil Hayvanlarda Dölerme ve Sun'i Tohumlama, p.

Dursun N, 2008. Veteriner Anatomi, Ankara, Medisan Yayınevi, p. 139-178.

Ergün L, 2008. Erkek Genital Sistem. In: Veteriner Özel Histoloji. Eds: Özer A. Ankara: Nobel Yayın, p. 251-68.

Feldman GJ, Mullin JM, Ryan MP, 2005. Occludin: structure, function and regulation. Advanced drug delivery reviews, 57, 6, 883-917.

Fijak M, Meinhardt A, 2006. The testis in immune privilege. Immunological reviews, 213, 1, 66-81.

Fink C, Weigel R, Hembes T, Lauke-Wettwer H, Kliesch S, Bergmann M, Brehm RH, 2006. Altered expression of ZO-1 and ZO-2 in Sertoli cells and loss of blood-testis barrier integrity in testicular carcinoma in situ. Neoplasia, 8, 12, 1019-27.

Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S, 1998. Claudin-1 and-2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. The Journal of cell biology, 141, 7, 1539-50.

Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S, 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier. The Journal of cell biology, 156, 6, 1099-111.

Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tstlkita S, 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. J Cell Biol, 123, 6 Pt 2, 17771788.

Gerber J, Heinrich J, Brehm R, 2016. Blood–testis barrier and Sertoli cell function: lessons from SCCx43KO mice. Reproduction, 151, 2, R15-R27.

Gilio JM, Portaro FC, Borella MI, Lameu C, Camargo AC, Alberto-Silva C, 2013. A bradykinin-potentiating peptide (BPP-10c) from Bothrops jararaca induces changes in seminiferous tubules. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 19, 1, 28.

Gilula NB, Fawcett DW, Aoki A, 1976. The Sertoli cell occluding junctions and gap junctions in mature and developing mammalian testis. Developmental biology, 50, 1, 142-68.

Gow A, Southwood CM, Li JS, Pariali M, Riordan GP, Brodie SE, Danias J, Bronstein JM, Kachar B, Lazzarini RA, 1999. CNS Myelin and Sertoli Cell Tight Junction Strands Are Absent in Osp/Claudin-11 Null Mice. Cell, 99, 649-59.

Günzel D, Alan S, 2013. Claudins and the modulation of tight junction permeability. Physiological reviews, 93, 2, 525-69.

Halldin K, 2005. Impact of endocrine disrupting chemicals on reproduction in Japanese quail. Domestic animal endocrinology, 29, 2, 420-9.

Heiskala M, Peterson PA, Yang Y, 2001. The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport. Traffic, 2, 2, 92-8.

Herin RA, Booth NH, Johnson RM, 1960. Thermoregulatory effects of abdominal air sacs on spermatogenesis in domestic fowl. American Journal of Physiology--Legacy Content, 198, 6, 1343-5.

Hodges RD, 1974. The Histology of the Fowl, London, Academic Press, p.

Howarth Jr B, 1971. Transport of spermatozoa in the reproductive tract of turkey hens. Poultry science, 50, 1, 84-9.

Iczkowski KA, Sun EL, Gondos B, 1991. Morphometric study of the prepubertal rabbit testis: germ cell numbers and seminiferous tubule dimensions. Developmental Dynamics, 190, 3, 266-72.

Kahvecioğlu O, Çalışırlar T, 2002. Ürogenital ve Endokrin Sistemi. In: Evcil Kuşların Anatomisi. Eds: Dursun N. Ankara: Medisan, p. 103-28.

Karateke H, 2013. Ratlarda Postnatal Dönemde Testis Dokusu İle Kan Testis Bariyerinin Gelişiminin Histomorfometrik Ve İmmunohistokimyasal Değerlendirilmesi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Keon BH, Schäfer S, Kuhn C, Grund C, Franke WW, 1996. Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein. The Journal of cell biology, 134, 4, 1003-18.

Kierszenbaum AL, 2006. Histology and Cell Biology, p.

Korkmaz D, Özcan Z, 2011. Bıldırcın (Coturnix coturnix japonica) erkek genital sisteminin yapısı üzerinde ışık ve elektron mikroskobik çalışmalar. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg, 58, 79-84.

Lui W-Y, Mruk D, Lee WM, Cheng CY, 2003. Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. Biology of reproduction, 68, 4, 1087-97.

McGeady TA, Quinn PJ, FitzPatrick ES, T. RM, 2006. Veterinary Embryology, p.

Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, Saito K, Tamura A, Igarashi M, Endo T, Takeuchi K, 2011. Predicted expansion of the claudin multigene family. FEBS letters, 585, 4, 606-12.

Moroi S, Saitou M, Fujimoto K, Sakakibara A, Furuse M, Yoshida O, Tsukita S, 1998. Occludin is concentrated at tight junctions of mouse/rat but not human/guinea pig Sertoli cells in testes. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 274, 6, C1708-C17.

Morrow CM, Mruk D, Cheng CY, Hess RA, 2010. Claudin and occludin expression and function in the seminiferous epithelium. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 365, 1546, 1679-96.

Mruk DD, Cheng C, 2010. Tight junctions in the testis: new perspectives. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 365, 1546, 1621-35.

Mruk DD, Cheng CY, 2004. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. Endocrine reviews, 25, 5, 747-806.

Mruk DD, Cheng CY, 2015. The mammalian blood-testis barrier: its biology and regulation. Endocrine reviews, 36, 5, 564-91.

Muller WA, 2003. Leukocyte–endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. Trends in immunology, 24, 6, 326-33.

Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S, 2003. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5–deficient mice. The Journal of cell biology, 161, 3, 653-60.

Osman D, Ekwall H, Plöen L, 1980. Specialized Cell Contacts and the Blood-testis Barrier in the Seminiferous Tubules of the Domestic Fowl (Gallus domesticus). International journal of andrology, 3, 1-6, 553-62.

Park C, Lee J, Oh Y, Shim S, Nah W, Choi K, Gye M, 2011. Expression of claudin-1 and-11 in immature and mature pheasant (Phasianus colchicus) testes. Theriogenology, 75, 3, 445-58.

Pelletier R, Byers SW, 1992. The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: Structural considerations. Microscopy research and technique, 20, 1, 3-33.

Reproductive system, 2017. Erişim tarihi 22 Haziran 2017. Erişim adresi, http://www.poultryhub.org/physiology/body-systems/reproductive-system/.

Razi M, Hasanzadeh S, Najafi G, Feizi S, Moshtaghi M, Janbaz H, Amin M, 2010. Histological and anatomical study of the White Rooster: testis, epididymis and ductus deferens. Iranian Journal of Veterinary Medicine, 4, 4.

Riazuddin S, Ahmed ZM, Fanning AS, Lagziel A, Kitajiri S-i, Ramzan K, Khan SN, Chattaraj P, Friedman PL, Anderson JM, 2006. Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. The American Journal of Human Genetics, 79, 6, 1040-51.

Russell L, 1977. Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. Developmental Dynamics, 148, 3, 313-28.

Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke J-D, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S, 2000. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. Molecular biology of the cell, 11, 12, 4131-42.

Shimada K, 2002. Sex determination and sex differentiation. Avian and Poultry Biology Reviews, 13, 1-14.

Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA, 1986. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. The Journal of cell biology, 103, 3, 755-66.

Tsukita S, Furuse M, Itoh M, 2001. Multifunctional strands in tight junctions. Nature reviews Molecular cell biology, 2, 4, 285-93.

Testis, 2017. Erişim tarihi 22 Haziran 2017. Erişim adresi, www.coteillustration.com.

Erkek Üreme Sistemi Nedir, 2017. Erişim tarihi 22 Haziran 2017. Erişim adresi, http://uroklinik.com.tr/uzmanlik-alanlarimiz/erkek-ureme-sistemi/.

Whittow GC, 1999. Sturkie's avian physiology, Academic Press, p.

Willott E, Balda MS, Heintzelman M, Jameson B, Anderson JM, 1992. Localization and differential expression of two isoforms of the tight junction protein ZO-1. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 262, 5, C1119-C24.

Zhang X, Lui W-Y, 2015. Transforming growth factor-β3 regulates cell junction restructuring via MAPK-mediated mRNA destabilization and Smad-dependent protein degradation of junctional adhesion molecule B (JAM-B). Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 1849, 6, 601-11.

## 7. EKLER

## EK A: Etik Kurul Kararı

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ DENEY HAYVANLARI
ÜRETİM VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
ETİK KURULU (SÜVDAMEK) KARARLARI

| Toplantı Tarihi | 29.06.2016 | Toplantı Sayısı | 2016/06 | Karar Sayısı | 2016/54 |
|---|---|---|---|---|---|

S.Ü. Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hasan Hüseyin DÖNMEZ tarafından sunulan "**Bıldırcın Testislerinde Prepubertal ve Pubertal Dönemlerde ZO-1 ve Klaudin-1 Proteinlerinin Immünohistokimyasal Gösterimi**" başlıklı Tez Projesi başvurusu değerlendirilmiştir.

Bu araştırma ile kan - testis bariyerini oluşturan tight junction proteinlerinden olan ZO-1 ve Klaudin-1'in bıldırcın testislerinde varlığı ve yerinin belirlenmeye çalışılacağı ifade edilmektedir.

Başvuruda, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu (SÜVDAMEK) Yönergesi ilkelerine uyulduğuna, projenin araştırma etiği açısından "**Uygun olduğuna**" oy birliği ile karar verilmiştir.

| | |
|---|---|
| Prof. Dr. Nurcan DÖNMEZ<br>Başkan | Doç. Dr. Özgür ÖZDEMİR<br>Başkan Yardımcısı |
| Prof. Dr. Mutlu SEVİNÇ<br>Üye | Doç. Dr. Serdar İZMİRLİ<br>Raportör Üye |

| | | |
|---|---|---|
| Doç. Dr. Mustafa GARİP<br>Üye | Ayşegül KURTBEYOĞLU<br>Konya Doğayı ve Hayvanları Koruma Derneği Üyesi | Salih Zeki ALPTEKİN<br>Sivil Üye<br>(Katılmadı) |

## 8. ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Mersin'de doğdu. İlköğretim hayatını 1994-2002 yılları arasında İleri İlköğretim Okulunda tamamladı. Lise eğitimini 2002-2005 yılları arasında Cemile Hamdi Ongun Lisesinde tamamladı. 2006 yılında başladığı Mersin Üniversitesi Biyoloji Bölümünden 2011 yılında mezun oldu. Yüksek lisans eğitimine 2012 yılında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda başladı. 2014 yılında aynı Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak atandı. 2015 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandı ve halen bu görevini sürdürmektedir. Aynı yıl Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalın'da Yüksek Lisans eğitimine başladı.