

Erkek İnfertilitesinde Seminal Leptin Seviyelerinin Semen Parametreleri ve Dna Fragmantasyonu İle İlişkisi

The Relationship of Seminal Leptin Levels with Semen Parameters and Dna Fragmentation

Şule AYLA ¹, İlknur KESKİN ¹, Tuba Varlı YELKE ²

Tuğçe ÖNEL ¹, Serçin KARAHÜSEYİNOĞLU ³

1. İstanbul Medipol Üniversitesi, Tıp fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Histoloji ve Embriyoloji ABD.

2. Medipol Mega Hastanesi, İstanbul

3. Koç Üniversitesi, İstanbul

ÖZET

Amaç: Bu çalışmamızda insan semen leptin düzeylerini ve semen parametreleri ile ilişkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: YNormal ve oligoastenoteratozoospermik 30 hastalık gruplar oluşturuldu. Hastaların semen örneklerinde leptin ve DNA fragmantasyon düzeyleri incelendi, ayrıca sperm sayısını ve motilite oranlarını içeren semen parametreleri değerlendirildi.

Bulgular: İnfertil hastalarda sperm sayısı ve motilite oranları normal gruba göre anlamlı olarak azalmıştır: $6,40 \pm 4,29$ ($\times 10^6$ /mL), % $38,63 \pm 14,92$ ($p < 0,0001$). DNA fragmantasyon oranları normal grupta % $21,00 \pm 8,23$ olarak gözlenirken infertil erkeklerde % $38,43 \pm 14,23$ oranıyla anlamlı olarak yüksek bulunmuş, semen leptin oraları ise normal grupta $347,58 \pm 111,13$ ng/mL olarak gözlenirken, infertil grupta $267,63 \pm 56,36$ ng/mL düzeyi ile anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir. İnfertil gruplar kendi içinde incelendiği zaman ise semen leptin düzeyi ile yaş, volüm, sperm sayısı ve motilitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı olacak bir ilişki saptanmamıştır.

Sonuç: Çalışmamızda, oligoastenoteratozoospermik erkek infertilitesinde serum leptin seviyelerinin azalmış olduğunu, ama sperm motilitesi ile anlamlı bir ilişkinin bulunmadığı gözlemlenmiştir. Leptinin semende tanısal bir kriter olarak kullanılabilmesi için daha geniş kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: leptin; oligoastenoteratozoospermi; erkek infertilitesi

ABSTRACT

Objective: The objective of this study is to investigate the relationship between human seminal leptin levels and semen parameters.

Material and Methods: Study groups include 30 males with oligoasthenoteratozoospermia and 30 males who have normal semen parameters. Leptin and DNA fragmentation levels were investigated in both groups, along with a variety of semen parameters including sperm count and motility.

Results: In comparison with the normal males, sperm count and motility have decreased significantly in infertile patients: $6,40 \pm 4,29$ ($\times 10^6$ /mL), % $38,63 \pm 14,92$ ($p < 0,0001$). DNA fragmentation levels were found as $21,00 \pm 8,23$ % and $38,43 \pm 14,23$ % in normal and patient groups respectively. Seminal leptin levels were $347,58 \pm 111,13$ ng/mL in the normal group, while there was a significant decrease to $267,63 \pm 56,36$ ng/mL in the infertile group. Among infertile patient groups, no significant difference was observed regarding the relationship between seminal leptin levels and age, volume, sperm count and motility.

Conclusion: In our study it was demonstrated that, serum leptin levels decrease in oligoasthenoteratozoospermic infertile males, while there is not a significant relation with the motility of sperm. In order to use seminal leptin levels as a diagnostic tool more extensive studies are needed.

Keywords: leptin; oligoasthenoteratozoospermia; male infertility

İletişim Bilgileri

Sorumlu Yazar: Dr. Şule AYLA

Yazışma Adresi: İstanbul Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Histoloji ve Embriyoloji ABD. Kavacık Mh. Ekinciler Cad. No:19 34810 Beykoz, İSTANBUL

E-posta: sayla@medipol.edu.tr

Tel: +90 (533) 650 28 15 Fax: +90 (212) 531 75 55

Makale Geliş Tarihi: 31.01.2017

Makale Kabul Tarihi: ???

DOI: <http://dx.doi.org/10.16948/??????>

GİRİŞ

Erkek infertilitesi, kişilerin hem tıbbi, hem de psikolojik olarak etkilendiği problemlerden- dir. Dünya Sağlık Örgütü'nün kayıtlarına göre dünyada 60-80 milyon çift infertilite nedeniyle tedavi görmektedir (1). Erkek infertilitesi, in- feksiyon, varikosel, obstrüksiyon gibi birçok faktöre bağlı olmakla beraber, normal sperma- togenezde endokrin sisteminin rolü büyüktür. Ancak bu mekanizmanın henüz açıklığa kavuş- turulmamış olması, bu konuda yapılan güncel araştırmaların önemini artırmaktadır (2, 3). Günümüzde yapılan epidemiyolojik çalışmalar günlük beslenme alışkanlıkları ile erkek infer- tilitesi arasında bir bağlantı kurmaktadır (4). Son dönemde yapılan yüksek kalorili hayvan deneylerinde yüksek serum leptin seviyeleri ile sperm hareketliliği arasında ters bir ilişkinin ol- duğu gösterilmiştir (5).

Leptin, yağ dokusundan salınan, vücut ağırlığının düzenlenmesinde, hipotalamus-hi- pofiz- gonad aksının metabolik regülasyonun- da, pubertenin başlamasında ve insan üreme sisteminde önemli rol oynadığı düşünülen bir hormondur (6, 7). Semende bulunan leptin, spermin kapasitasyonunda işlevsel bir rol oynayabilir (8). Yapılan hayvan deneylerinde leptin tedavisi ile üreme ile ilgili endokrin sisteminin aktive olduğu gösterilmiş olmasına rağmen, leptinin erkek üreme sistemindeki etkisi tam anlamıyla açıklanamamıştır (9, 10).

Bunun yanı sıra, vücut ağırlığı ile kadın üreme sisteminin işlevleri arasındaki ilişkiyi inceleyen birçok çalışma olmasına karşın, leptin ile erkek infertilite problemleri, özellikle idiyo- patik oligoastenoteratozoospermik hastalarda görülen problemler arasındaki bağlantıyı araş- tıran çalışmaların sayısı yeterli değildir.

Bu çalışmada, oligoastenoteratozoospermik hastalardaki semen leptin seviyelerinin semen parametreleri ile ilişkisinin araştırılması amaç- lanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmaya Medipol Mega Hastaneler Grubu Yardımcı Üreme Tedaviler Merkezi'ne (Tüp bebek) infertilite nedeniyle başvuran 25- 40 yaşları arasında 30 adet normospermik ve 30 adet oligoastenoteratozoospermik erkek hasta dahil edilmiştir. Fizik muayenelerinde varikosel ve ürogenital sistem enfeksiyonu bul- guları olan hastalarla testis tümörü, kemoterapi, radyoterapi, doğumsal ve endokrin hastalık hikayesi ve sistemik hastalık hikayesi bulunan hastalar çalışma gruplarına dahil edilmemiştir.

Ayrıca hastalarda doğumsal penis anoma- lisi, seksüel bozukluk ve retrograd ejakülasyon bulunmamasına dikkat edilmiştir.

Semen Analizi

Hastalardan 3-5 günlük cinsel perhiz süre- sinin ardından steril semen toplama kaplarına masturbasyon yöntemiyle alınan semen örneği likefaksiyon süresinin sonunda sperm konsan- rasyonu ve motilitesi (hareketliliği) yönünden Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) kriterlerine göre Makler sayım kamerasında değerlendiril- di. Morfoloji değerlendirmesi ise spermac kit ile boyama sonrasında, Kruger'in strikt kriterle- rine göre yapıldı Oligoastenoteratozoospermik hastaların sperm konsantrasyonları $<20 \times 10^6$ / ml., normal morfoloji $<4\%$ ve motilite $<50\%$ olarak, normospermik hastaların sperm kon- santrasyonları $>20 \times 10^6$ /ml., normal morfoloji $>4\%$ ve motilite $>50\%$ olarak değerlendirildi.

DNA Fragmantasyonunun Değerlendirilmesi

DNA fragmantasyonu TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kiti kullanılarak incelendi. Semen örneği üzerine 4-5 ml sperm yıkama mediumu eklendi ve 2000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra pellet ve süpernatant olmak üzere iki faz elde edilmiş, süpernatant kısım atılmıştır. Geriye ka- lan pellet, sperm yıkama mediumu ile konsan- tre edilmiştir. Konsantrasyon örnek, iki lam üzerine yayma preparat yapılarak kurumaya bırakıl- mıştır. Kurutulan lamalar 1 saat % 4 PFA içe- risinde fikse edildikten sonra 3x5 dk. PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. TUNEL kitindeki 1. solüsyondan (In Situ Cell Death Detection Kit Enzyme solution) 5 µl, 2. Solüsyondan (In Situ Cell Death Detection Kit Label solution) 45 µl karıştırılarak her lam üzerine 25'er µl damla- tılıp lamelle kapatılmıştır. Işık almayacak şe- kilde 37°C'de 1 saat tutulan lamalar üzerindeki lameller kaldırıldıktan sonra PBS ile yıkanmış- tır. Lamalar nükleusların görünmesi amacıyla 5 dk. DAPI solüsyonu ile muamele edilmiş lamelle kapatılmıştır. ZEISS konfokal mikros- kop (ZEISS LSM 780 NLO) ile 40x büyütme- de toplam 100 sperm hücresi sayılarak DNA fragmantasyonu olan hücreler 'TUNEL pozitif' olarak kaydedilmiştir.

Seminal Plazma Leptin analizi

Ayrılan 1cc.semen 3000g'de 10dk. sant- rifüj edilmiştir ve leptin seviyelerinin belir- lenmesi için kullanılmaya kadar -20 °C'de saklanmıştır. Semen leptin seviyeleri Human Leptin (LEP) ELISA Kit (SHANGHAI YE-

HUA Biological Technology, Shanghai, China) kullanılarak solid-faz sandwich ELISA metodu ile belirlenmiştir.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için SPSS 18.0 paket programı kullanıldı. Veriler aritmetik ortalama, standart sapma şeklinde ifade edildi. Gruplar Student-t independent istatistik analiz yöntemi ile test edildi. Değişkenler arasındaki ilişki Pearson korelasyon testi ile değerlendirildi ve anlamlılık düzeyi olarak $p < 0.05$ olasılık değeri alındı.

BULGULAR

Semen analizinin sonuçları Tablo 1’de özetlenmiştir. İnfertil grubun yaş ortalaması $33,43 \pm 5,50$ (25-40), kontrol grubunun yaş ortalaması ise $31,70 \pm 6,56$ (25-40) olarak bulunmuştur. Her iki gruptaki yaş ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$) (Tablo 1). Bununla birlikte, infertil hastalarda sperm sayısı ve motilite oranları normal gruba göre anlamlı olarak azalmıştır ve sırasıyla: $6,40 \pm 4,29$, ($\times 10^6/\text{mL}$) ve $\% 38,63 \pm 14,92$ ($p < 0,0001$) olarak belirlenmiştir. DNA fragmentasyon (TUNEL pozitif) oranları normal grupta $\% 21,00 \pm 8,23$ olarak gözlenirken infertil erkeklerde $\% 38,43 \pm 14,23$ oranıyla anlamlı olarak yüksek bulunmuş, semen leptin oranı ise normal grupta $347,58 \pm 111,13$ ng/mL olarak gözlenirken, infertil grupta $267,63 \pm 56,36$ ng/mL düzeyi ile anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir (Tablo 1). İnfertil gruplar kendi içinde incelendiği zaman ise, semen leptin düzeyi ile yaş, semen hacmi, sperm sayısı ve motilitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (Tablo 2).

Tablo 1: Normospermik ve oligoastenoteratozoospermik hastalar arasında semen leptin seviyeleri ve semen parametrelerinin ile karşılaştırılması.

	Normospermik grup (n=30)	Oligoastenoteratozoospermik grup (n=30)
Yaş (Yıl)	$31,70 \pm 6,56$	$33,43 \pm 5,50$
Hacim (mL)	$3,20 \pm 1,01$	$3,32 \pm 1,13$
Sperm Sayısı ($\times 10^6/\text{mL}$)	$48,50 \pm 22,08$	$6,40 \pm 4,29^*$
Motilite (%)	$54,83 \pm 8,89$	$38,63 \pm 14,92^*$
(TUNEL pozitif) % DNA fragmentasyon	$21,00 \pm 8,23$	$38,43 \pm 14,23^*$
Leptin (ng/mL)	$347,58 \pm 111,13$	$267,63 \pm 56,36^*$

Veriler aritmetik ortalama, standart sapma şeklinde ifade edildi. * $p < 0,001$

Tablo 2: Farklı parametreler ve semen leptin düzeyinin korelasyonu. (r,P)

	Semen Leptin
Yaş	0,129
Hacim	0,024
Sperm sayısı	0,743
Motilite oranı	0,883
Tunel oranı	0,151
Leptin	

TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki, leptin beklenmedik bir şekilde mide, kas ve plasenta gibi birçok doku ve organda bulunmaktadır (11, 12). Leptinin plasenta tarafından da sentezlendiğinin ve leptin reseptörlerinin plasenta ve overde de eksprese edildiğinin anlaşılması leptinin reproduktif sistem üzerinde de önemli etkilere sahip olabileceğini düşündürmektedir önemli bir keşif olmuştur (13-15).

Yapılan hayvan deneylerinde leptin seviyesi düşük olanlarda rekombinan leptin verilerek üreme fonksiyonlarının düzeltilmesi, leptinin üreme fonksiyonlarını düzenleyebileceğini düşündürmektedir güçlü bir bulgudur (16, 17). Barash ve ark., infertil olup doğumsal leptin eksikliği olan farelere periferik leptin tedavisi vermişler ve leptinin GnRH sekresyonunun santral modülasyonunu sağladığını, dişi farelerde LH seviyesini, erkek farelerde ise FSH düzeyini artırdığını göstermişlerdir (16). Aynı çalışmada, leptin verilen farelerde testiküler ve seminal vezikül hacminin kontrol grubuna göre arttığı rapor edilmiş, ayrıca testislerin histolojik incelemesinde leptin verilmeyen grupta daha fazla anormallik olduğu gösterilmiştir.

Leptinin, seminifer tübülleri veya seminal plazmayı içeren genital sistemdeki varlığı, sperm maturasyonu (18), sperm kapasitasyonu (19, 20) ve spermatozoanın hareketlilik yeteneğinde etkili olabilir (21). Leptin reseptörleri Leydig hücrelerinde de tanımlanmıştır (22, 23). İnsan ejakülatında bulunan leptin ile bu işleyişin ilişkili olabileceği düşünülmüştür (19). Düşük semen leptin seviyeleri, idiyopatik erkek infertilitesinde bir risk faktörü olarak rol oynayabilir (24).

Bir çok çalışmada gonadal fonksiyonlar üzerinde leptinin hem pozitif, hem negatif etkileri olduğu gösterilmiştir (25). Steinman ve ark.’nın 36 azospermik, 16 oligoastenoteratospermik ve 35 fertil erkekten oluşan

kontrollü çalışmasında, serum leptin seviyeleri sırasıyla 7.6 ± 0.8 ; 7.1 ± 1.6 ; 5.0 ± 0.4 ng/ml olarak bulunmuştur (26). Glander ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada ise normal semen örneğine sahip erkeklerde semen leptin seviyelerinin patolojik gruptan daha düşük olduğu gözlenmiştir (21). Tunç ve ark.'nın, yaptığı bir başka çalışmada ise, infertil hasta popülasyonunun serum leptin seviyelerinin sağlıklı erkeklerden daha yüksek olduğu dikkat çekmektedir (27). Jorsaraei ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada normozoospermik, astenozoospermik ve oligoastenozoospermik erkeklerde semen leptin seviyeleri sırasıyla 0.75 ± 0.09 ng/ml, 0.8 ± 0.14 ng/ml and 0.8 ± 0.15 ng/ml. olarak saptanmıştır (28).

Bizim çalışmamızda, oligoastenoteratospermik hasta popülasyonunun seminal leptin seviyeleri sağlıklı erkeklerden daha düşük olarak gözlenmiş ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bunun yanı sıra, oligoastenoteratozoospermik hastaların semen leptin düzeyleri ve sperm hareketliliği arasında bir korelasyon izlenmiştir. Bu korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış olsa da, ortalama değer normalden düşük olduğu görülmüştür. Farkın istatistiksel olarak anlamlı olmaması hasta sayımızın az olmasına bağlı olabileceği gibi, leptin düzeyinin birçok parametreden etkilenebileceği ile de açıklanabilir. Leptinin eksikliğinde olduğu gibi fazlalığında da fertilitenin olumsuz etkilenebileceği düşünülebilir.

Yakın zamanda yayınlanan çalışmalarda, seminal plazmadaki leptin kaynağı olarak sadece spermatozoa düşünülmeyp olası başka faktörlerin seminal vezikül ve prostat dokusunda etkin olabileceği görüşü savunulmuştur (29). Diğer yandan, testis dokusunda seminal leptin üretiminden ve sekresyonundan sorumludur (30).

Çalışmamızda insan seminal plazmasında leptin varlığını gözlemledik ancak leptin sekresyonunun kaynağını açıklayamadık. Bununla birlikte, leptinin spermatogenez veya sperm kapasitasyonunda ve buna bağlı olarak erkek infertilitesinde etkin olduğunu gözlemledik.

Sonuç olarak; bir çok hayvan çalışması leptinin fertilitedeki rolünü açıklayabilmesine rağmen, insanda infertilite etiyolojisinin çok faktörlü olması, leptinin dolaylı yollardan üreme sistemine etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Bu konunun doğru şekilde yorumlanabilmesi ve infertilite üzerinde bu ve benzer hormonların etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla, geniş hasta serileri ve multiparametrik değerlendirmeler içeren kapsamlı çalışmaların yapılmasının gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Jianhua Guo, Yang Zhao, Weiyang Huang, Wei Hu, Jianjun Gu, Chuhong Chen, Juan Zhou, Yubing Peng, Min Gong, Zhong Wang., *Sperm motility inversely correlates with seminal leptin levels in idiopathic asthenozoospermia. Int J Clin Exp Med* 2014;7(10):3550-3555.
2. Sigman M, Howards SS: *Male infertility: Campbell's Urology. (Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ, ed). Seventh edition. Philadelphia, Saunders company. 1998:1287-1330.*
3. Sokol RZ: *Endocrinology and male infertility. Infertility and Reproductive Medicine Clinics of North America. (Werthman PE, ed). Philadelphia, Saunders. 1999:427-434.*
4. Homan GF, Davies M and Norman R. *The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: a review. Hum Reprod Update* 2007; 13: 209-223.
5. Fernandez CD, Bellentani FF, Fernandes GS, Perobelli JE, Favareto AP, Nascimento AF, Cicogna AC and Kempinas WD. *Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. Reprod Biol Endocrinol* 2011; 9: 32.
6. Rosenbaum M, Leibel RL: *The role of leptin in human physiology. N Engl J Med*, 1999; 341: 913-915.
7. Jacobs HS, Seibell MM: *Polycystic Ovary Syndrome. Infertility. (Seibell MM, ed). Second edition. Appleton, 1997; 121-133.*
8. Andò S and Aquila S. *Arguments raised by the recent discovery that insulin and leptin are expressed in and secreted by human ejaculated spermatozoa. Mol Cell Endocrinol* 2005; 245: 1-6.
9. Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, et al: *Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. N Engl J Med*, 1999; 341: 879-884.
10. Nazian SJ, Cameron DF: *Temporal relation between leptin and various indices of sexual maturation in the male rat. J Androl*, 1999; 20: 487-491.
11. Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L: *Anutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. Nature* 1998; 18: 684-688.
12. Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, et al; *The stomach is a source of leptin. Nature* 1998; 20: 790-793.
13. Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, Williams LM, Trayhurn P, Mercer JG. *Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 11073- 8.
14. Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H, Carlsson LMS, Carlsson B. *Expression of functional leptin receptors in the human ovary. J Clin Endocrinol Metab* 1997;82: 4144-8.
15. Chehab FF, Mounzih K, Lu R, Lim ME. *Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. Science* 1997;275: 88-90.
16. Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, et al. *Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. Endocrinology*, 1996;137: 3144-3147.

17. Baskin DG, Hahn TM, Schwartz MW. Leptin sensitive neurons in the hypothalamus. *Horm Metab Res* 1999;31: 345-350.
18. Haron MN, D'Souza UJ, Jaafar H, Zakaria R, Jeet Singh H. Exogenous leptin administration decreases sperm count and increases the fraction of abnormal sperm in adult rats. *Fertil Steril* 2009; 93: 322-324.
19. Aquila S, Gentile M, Middea M, Catalano S, Morelli C, Pezzi V, et al. Leptin secretion by human ejaculated spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 4753-4761.
20. Li HW, Chiu PC, Cheung MP, Yeung WS, O WS. Effect of leptin on motility, capacitation and acrosome reaction of human spermatozoa. *Int J Androl* 2008; 32: 687- 694.
21. Glander HJ, Lammert A, Paasch U, Glasow A, Kratzsch J. Leptin exits in tubuli seminiferi and in seminal plasma. *Andrologia* 2002; 34:227-233.
22. Moschos S, Chan JL, Mantzoros CS. Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril* 2002; 3: 433-444.
23. Caprio M, Fabbrini E, Riccidi G, Bascianic S, Gnessic L, Arizzic M, et al. Ontogenesis of leptin receptor in rat leydig cells. *Biol Reprod* 2003; 68: 1199-1207.
24. Lange Consiglio A, Dell'Aquila ME, Fiandanese N, Ambrosio B, Cho YS, Bosi G, et al. Effects of leptin on in vitro maturation, fertilization and embryonic cleavage after ICSI and early developmental expression of leptin (Ob) and leptin receptor (ObR) proteins in the horse. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7:113.
25. Smith GD, Jackson LM, Foster DL. Leptin regulation of reproductive function and fertility. *Theriogenology* 2002; 57: 73-86.
26. Steinman N, Gamzu R, Yogeve L, et al: Serum leptin concentrations are higher in azoospermic than in normozoospermic men. *Fertil Steril* 2001;75: 821-822, 2001.
27. Tunç L, Tokgöz H, Kordan Y, Biri H, Karaoğlan Ü, Bozkırlı İ. Oligospermik erkek infertilitesinde Leptin'in yeri. *Türk Üroloji Dergisi* 2005;31(2):207-211.
28. Jorsaraei A, Shibahara H, Ayustawati, Hirano Y, Suzuki T, Marzony ET, Zainalzadeh M, Suzuki M. The Leptin concentrations in seminal plasma of men and its relationship to semen parameters. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 2010; 8:3. 95-100.
29. Caprio M, Fabbrini E, Isiodori AM, Aversa A, Fabbrini A. Leptin in reproduction. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12: 65-72.
30. Camina JP, Lage M, Menendez C, Grana M, Garcia-Devesa J, Dieguez C, et al. Evidence of free leptin in human seminal plasma. *Endocrine* 2002; 17: 169-174.