

Leptinin yenidoğan sıçanların testis germ hücrelerine etkisinin ışık mikroskop düzeyinde incelenmesi

The effect of Leptin on testis germ cells of new born rats: a light microscopic study

Asiye Usta, Hatice Oruç, Gülçin Abban Mete

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD., Denizli

Özet

Amaç: Genetik olarak leptin proteini olmayan (ob/ob) dişi farelerin kısır olması ve bu farelerin sürekli pubertal dönemde bulunması leptinin üreme üzerindeki etkisinin ne denli önemli olduğunu göstermektedir. Leptin seviyesi ve etkisi pubertal dönemden sonra dişi ve erkeklerde farklılık göstermektedir. Kadınlarda östrojen, leptin salınmasını artırırken testosteron azaltmaktadır. Leptinin pubertal dönemde erkek üreme organları üzerindeki etki mekanizması tam olarak açık değildir. Bu çalışmada leptinin yeni doğandan puberteye kadar olan dönemde testis germ hücrelerinde oluşturduğu yapısal değişimlerin ışık mikroskop düzeyinde incelenmesi amaçlandı.

Gereç ve yöntem: Çalışmamızda yeni doğan erkek sıçanlara doğumun birinci gününden başlayarak 14 gün süreyle leptin uygulandı. Testisler doğumu izleyen 15, 25, 35 ve 45. günlerde çıkarılarak çeşitli histokimyasal boyalarla boyandı ve ışık mikroskobu düzeyinde incelendi.

Bulgular: Bu çalışmada testis gelişimi açısından leptin uygulanan gruplarla kontrol grupları arasında organın işlevini değiştirebilecek önemli bir bulguya rastlanmadı. En belirgin farklılığın 35 ve 45. günlerde olduğu saptandı. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, 35 günlük deney grubunda seminifer tübül duvarında spermatogonyum, spermatozoid I ve II'lerin yanı sıra erken tipte spermatitler de vardı. 45 günlük deney grubunda ise kontrolden farklı olarak geç tipte spermatit ve spermiuma da rastlandı.

Sonuç: Leptinin testisin erken dönem gelişiminde önemli bir rolü olmadığı histolojik olarak gösterilmiştir. Bulgularımız, leptinin puberteyi erken başlatabileceğini düşündürmemektedir.

Pam Tıp Derg 2012;5(2):75-83

Anahtar sözcükler: Leptin, germ hücreleri, seminifer tübül

Abstract

Aim: The ob/ob (obese) female rats which are infertile and are always in pubertal term. This condition shows leptin's effects on reproductive as an important factor. Leptin level rises on females and males after the term of puberty which may trigger the onset of puberty. Whereas estrogen increases the secretion of leptin, and decrease the testosterone. The effect mechanism of leptin in pubertal term and reproductive system of male is completely unknown. Therefore we wanted to investigate the structural differences in testis germ cell caused by leptin from newborn until puberty at the level of light microscopic.

Materials and methods: In this study, leptin is applied to the newborn male rate from first day of birth to fourteenth days. The testis are taken out on the 15th., 25th., 35th. and 45th. days after birthday and are stained with various histochemical dyes and examined under light microscope.

Results: In this study, no differences were found on the development of testis between the experiment and control groups. The most definite differences were detected on the 35th. and 45th. days. On the 35th. day, experiment group spermatogonium, spermatozoid I and II, early spermatid was observed together at seminifer tubule wall. On the 45th. day, experiment group showed delayed and different type of spermatid and spermium which is different from control.

Conclusion: Leptin does not have any important role on the early development of testis which has been shown histologically. Our findings do not suggest that leptin back dates puberty.

Pam Med J 2012;5(2):75-83

Key words: Leptin, germ cells, seminifer tubule

Hatice Oruç

Yazışma Adresi: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD., Denizli

e-mail: horuc@pau.edu.tr

Gönderilme tarihi: 20.03.2012

Kabul tarihi: 14.06.2012

Giriş

Leptin, 16 kDa ağırlığında, 167 aminoasitten oluşan, ob geninin ürünü olan bir proteindir [1-4]. Esas olarak beyaz yağ dokuda sentezlenen leptin, az miktarlarda kahverengi yağ doku, hipotalamus, gastrik epitel, iskelet kası, hipofiz, plasenta ve meme epitelinde de sentezlenir [1,4-7].

İnsan fizyolojisinde leptinin rolü gittikçe açıklık kazanmaktadır. İnsanlarda yiyecek alımı ve obezitede, enerji dengesinin düzenlenmesinde, pubertenin başlangıcının kontrolünde, hipotalamik – pituiter fonksiyonların düzenlenmesinde ve insülin direncinde önemli roller oynamaktadır [8,9]. İlave olarak, otonomik sistem, kardiyovasküler ve üriner sistem çalışması üzerine etkilidir. Ayrıca leptin hematopoezizde de önemli role sahiptir [10-22]. Yukarıda sayılan etkiler pek çok hayvan araştırması ile tespit edilmiş olmakla beraber [12], insanlardaki etkileri halen çok açık değildir [23].

Leptin, pubertenin başlangıcı, menstrual siklus ve üreme için gerekli olan yağ depolarının kritik miktarlarını beyine iletir. Leptin ve LH salınımı ve hipotalamik pituiter gonadal aks arasındaki ilişkinin kesin mekanizması bilinmemekle beraber puberte öncesi farelere ve primatlara leptin verildiğinde pubertenin hızlandığı görülmüştür. Normal çocuklarda vücut yağ kitlesinin artmasıyla puberteden önce leptin düzeyleri yükselir ve pubertenin başlangıcında pik yapar. Buna göre insanlarda pubertenin başlamasında leptinin rolü olabileceği öne sürülmüştür [9,24]. Serum leptin seviyesinin dişi pubertal gelişim boyunca artışı, FSH-LH-östradiol hormonların artışından önce gelmektedir [25-28].

Leptinin dişi fertilitedeki etkisinin kanıtlanmasına karşın erkek üreme işlevindeki etkisi tartışmalıdır. Pubertal gelişim boyunca sağlıklı erkeklerde leptin seviyesinin değerlendirilmesinde, kızların aksine, serum leptin konsantrasyonu 5 ile 10 yaşları arasında artmış fakat daha sonra devamlı bir şekilde düşmüştür [25]. Dişilerdeki gibi, hipogonadotropik hipogonadizm ve infertilite erkek ob/ob farelerde de yaygın şekilde görülür. Leptin tedavisi ile erkek ob/ob'de üreme işlevi düzenlenebilir [29-31]. İnsanda endojen leptin yokluğu hipogonadizm ve pubertal gelişimi etkiler [32,33]. Dişi ob/ob'ler dikkate değer bir şekilde infertil iken, ob/ob erkeklerde bu oran daha düşüktür [34].

Yapılan kaynak taramalarında leptinin kadın üreme sistemi organlarına olası etkilerini açıklayan pek çok çalışmaya rastlanmıştır. Ancak erkek üreme sistemi üzerine etkisini inceleyen çalışmalar sınırlı sayıdadır. Leptinin testis işlevine olan etkilerinin değerlendirildiği çalışmalara rastlanmış ancak germ hücrelerinin gelişimi üzerindeki etkilerini histolojik olarak değerlendiren çalışmaların sayıca son derece az olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, çalışmamızda, leptinin yeni doğandan puberteye kadar olan dönemde, testis germ hücreleri üzerindeki etkilerinin ışık mikroskop düzeyde incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma hayvan deneyleri etik kurulundan gerekli izinler alındıktan sonra Pamukkale Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji AD'da yapıldı.

Bu çalışmada 80 adet *Wistar* tipi yeni doğan erkek sıçan kullanıldı. Denekler kontrol ve deney grubu olarak ikiye ayrıldı. Deney grubu (40 adet) yavrulara doğdukları günden itibaren 14 gün boyunca sabah ve akşam 0,25'er µg/mL olmak üzere toplam 0,5 µg/mL leptin enjeksiyonu subkutan olarak gerçekleştirildi. Kontrol grubu (40 adet) yavrulara hiçbir şey verilmedi. 15, 25, 35 ve 45. günlerde her iki gruba ait sıçanların testis dokuları anestezi altında alındı. Testis dokuları Bouin solüsyonunda 12 saat tespit edildi ve %50'lik etil alkol içinde birkaç kez değiştirilerek yıkandı. Alınan testis dokularından 5 µm kesitler alınarak hematoksilen-eosin (H-E) boyama yapıldı. Yine 5 µm kesitler alınan dokular periyodik asit schiff (PAS) boyama tekniği ile boyandı. Kesitler ışık mikroskopunda karşılaştırmalı olarak değerlendirildi ve resimlendi.

Bulgular

Bu çalışmada, yeni doğan erkek sıçanlardan deney ve kontrol olmak üzere 2 grup oluşturuldu. Deney grubuna doğumdan itibaren 14 gün süreyle leptin uygulandı. 15, 25, 35 ve 45. günlerde her iki gruba ait sıçanların testis dokuları alınıp farklı histolojik boyalar kullanılarak ışık mikroskopunda incelendi ve aşağıdaki bulgular saptandı.

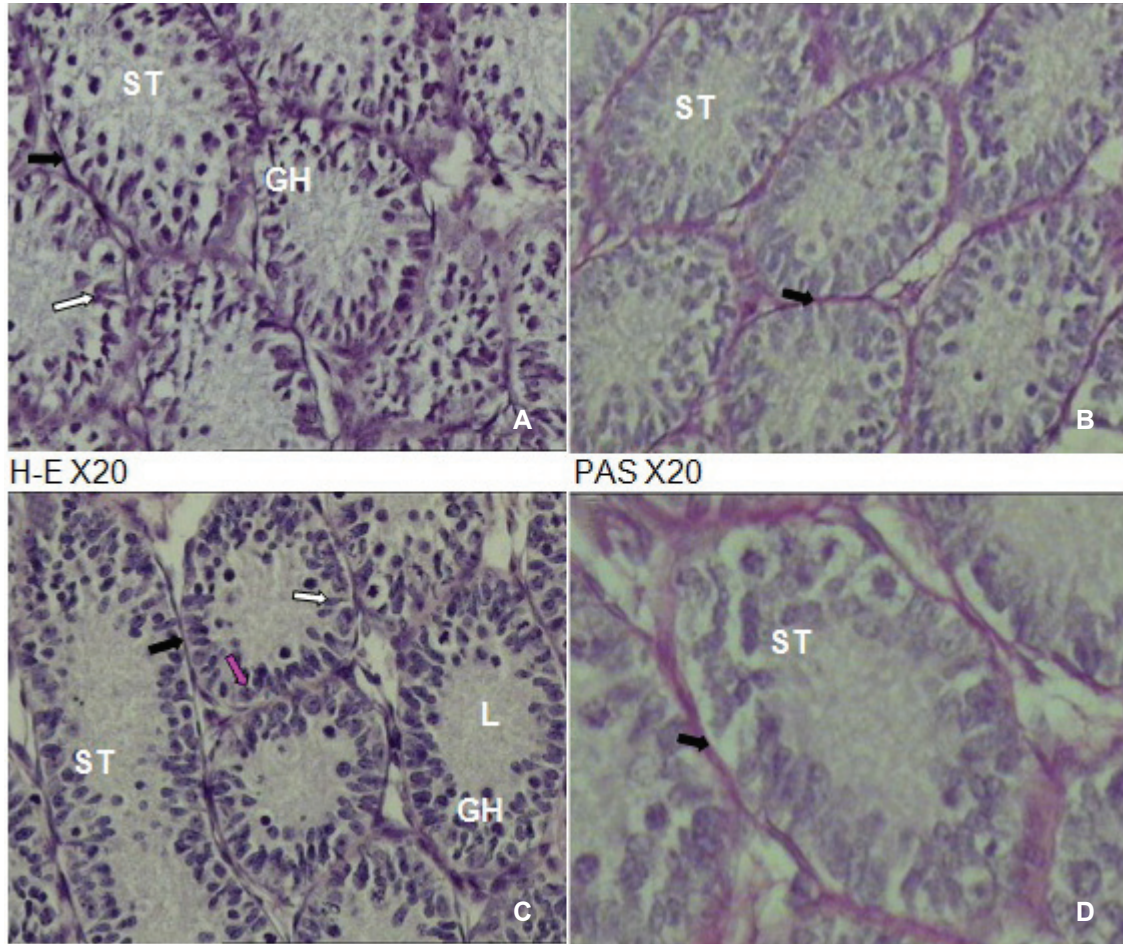
Doğumu izleyen 15 günlük kontrol grubunda testisi oluşturan seminifer tübüller ve interstisyel doku normal yapıda izlendi. Seminifer tübüllerin lümenlerinin fibrin benzeri açık renkte bir maddeyle kapalı olduğu belirlendi. Tübüller içerisinde germ hücre serisinin tam olarak ayırt edilemediği ve tübül duvarının oldukça ince olduğu gözlemlendi. Seminifer tübülde

spermatogonyumlar az sayıda izlenirken Sertoli hücrelerinin sayısının fazlalığı dikkat çekiciydi. Yer yer primer spermatozoidlerin izlendiği kesitlerde sekonder spermatozoidler ve spermatozoidler gözlenmedi. İnterstisyel doku ise, Leydig hücrelerinin sayısının erişkin dokuya oranla az olduğu saptandı. PAS ile boyanan bazal membranlar normal yapıdaydı (Resim 1A,1B).

Doğumu izleyen 14 gün süreyle leptin uygulanan ve 15. günde testisleri çıkarılan grupta, testis dokusunun genel olarak erişkindekine benzer görünüme yaklaştığı saptandı. Tübül duvarında germ hücre serisinin daha organize olduğu bazaldan apikale doğru spermatogonyumların ve spermatozoidlerin ayır edilebildiği gözlemlendi. Spermatogonyumların bazal membran üzerinde yuvarlak çekirdekleri ile çok düzenli yerleştikleri izlendi. Çekirdekleri ile karakterize primer spermatozoidlerin de

varlığı gözlemlendi. Ayrıca bazı tübüllerde lümeneye yakın bölgelerde sekonder spermatozoidlerinde farklılığı ilgiyi çekti. Bu hücreler arasında oval ve ökromatik çekirdekleri ile karakterize Sertoli hücreleri de belirgin olarak izlendi. İnterstisyel doku değerlendirildiğinde ise, kontrol grubundan farklı olarak bağ dokunun son derece gelişkin olduğu, fibroblastların belirgin olarak seçilebildiği ayrıca Leydig hücrelerinin sayılarının göreceli olarak artmış oldukları gözlemlendi. PAS ile yapılan boyamalarda seminifer tübül ve kapillerler normal yapıdaydı (Resim 1C,1D).

Doğumu izleyen 25 günlük kontrol grubunda seminifer tübüllerde spermatogonyumlar bazal membran üzerine yuvarlak çekirdekleri ile tek sıra halinde yerleşmiş olarak izlenirken primer spermatozoidlerin sayılarının arttığı ve lümeni daraltan şekilde yayılım gösterdikleri belirlendi. Tübül duvarında birkaç sıra halinde gözlenen primer spermatozoidlerin yanında sekonder

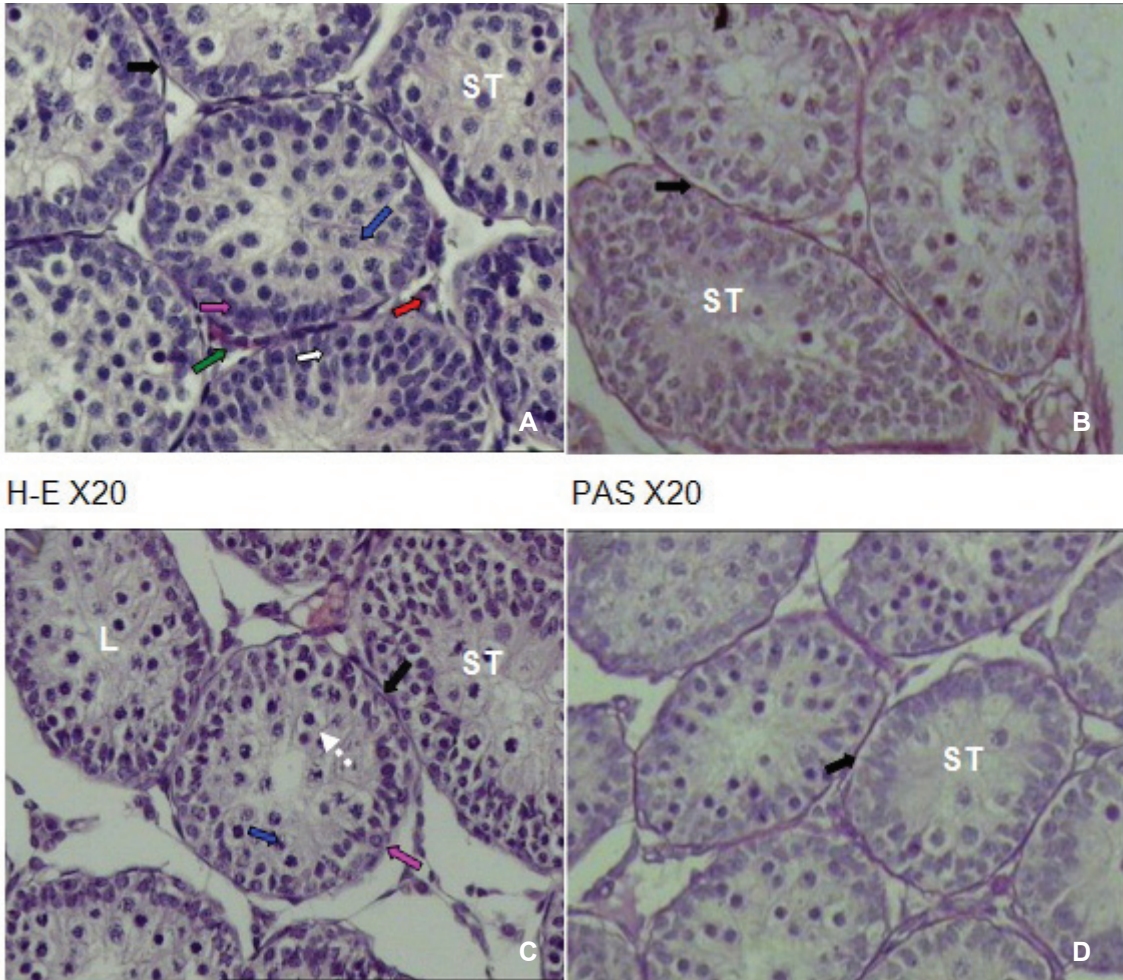


Resim 1 (A,B): 15. günde testisleri çıkarılan kontrol grubu deneklerinde seminifer tübül (ST), bunlar arasında ki bağ dokusu bölmeleri (*siyah ok*) ve seminifer tübüller içerisinde germ hücre serisi (GH). **Resim 1(C,D):** 14 gün süreyle leptin verilip 15. günde testisleri çıkarılan deneklerde seminifer tübül(ST) ve bunlar arasında bağ dokusu bölmeleri (*siyah ok*), spermatogonyum (*pembe ok*); limen (L), Sertoli (*beyaz ok*) ve seminifer tüpler içerisinde germ hücre serisi (GH).

spermatositler ile spermatitler de izlenmekteydi. Bu grupta Sertoli hücrelerinin göreceli olarak daha az sayıda oldukları saptandı. İntertisyumda Leydig hücreleri ile düzensiz şekilde yerleşmiş geniş kapillerler izlendi. PAS boyamalarda yapılar normal görünümdeydi (Resim 2A,2B).

Doğum sonrası 25 günlük leptin grubunda, seminifer tübüllerin erişkin yapıya benzer görünümde oldukları saptandı. Spermatogonyumlar bazal membran üzerine tek sıra oturmuş olarak primer spermatositler ise 2-3 sıra halinde izlendi. Ayrıca sayıca

artmış sekonder spermatositlerin, lümene yakın olarak yerleştikleri gözlemlendi. Bu grupta germ hücrelerin yüksek bölünme yeteneğinde oldukları ve bu nedenle lümenin daraldığı ve yıldız şeklinde bir görünüm sergilediği saptandı. Ancak henüz spermatit ve olgun spermiumların henüz farklanmadığı dikkati çekti. İnterstisyel doku incelendiğinde, kapillerlerin son derece genişlediği ve Leydig hücrelerinin gruplar oluşturmaya başladıkları saptandı. PAS ile yapılan boyamalarda bazal membran yer yer kalın olmakla birlikte normale yakın görünümdeydi (Resim 2C,2D).



Resim 2 (A,B): 25. günde testisleri çıkarılan kontrol grubu deneklerinde seminifer tübül (ST), bağ dokusu (siyah ok), spermatogonyum (pembe ok), spermatosit I (mavi ok), damar (kırmızı ok), Sertoli (beyaz ok) ve seminifer tübüller arasındaki Leydig hücreleri (yeşil ok).

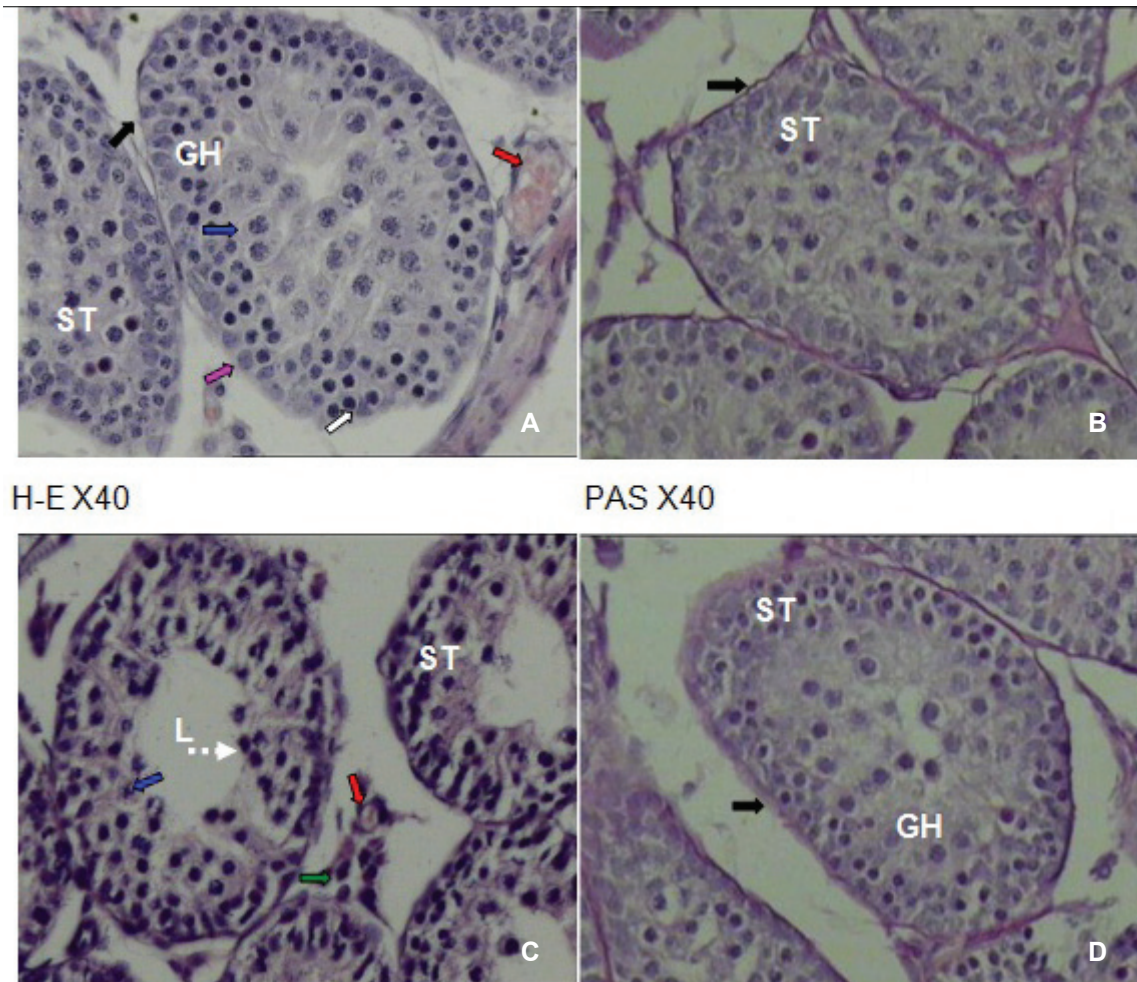
Resim 2 (C,D): 14 gün süreyle leptin verilip 25. günde testisleri çıkarılan deneklerde seminifer tübül (ST), bağ dokusu (siyah ok), spermatogonyum (pembe ok), spermatosit I (mavi ok), spermatosit II (kesikli ok), lümen (L).

Doğum sonrası 35 günlük kontrol grubunda, Sertoli hücreleri sayıca azalmış ve erişkin görünümüne kavuşmuş olarak izlendi. Seminifer tübülde çeşitli gelişim evrelerindeki spermatojenik hücreler belirlenmekle birlikte, bir önceki grupla benzer olarak olgun spermiumların olmadığı saptandı. Kapillerler normal boyutta olup aralarda Leydig hücre grupları saptandı (Resim 3A). PAS boyamalarda bazal membranın normal kalınlıkta olduğu izlendi (Resim 3B).

Doğumdan itibaren 14 gün süreyle leptin uygulanıp 35.günde testisleri çıkarılan deneklerin seminifer tübüllerinde lümenin açıldığı izlendi. Tübül duvarında spermatogonyumlar, primer spermatozitler kontrol grubundan farklı olarak da bazı tübüllerde sekonder spermatozitlerin oluştuğu izlendi (Resim 3C,3D).

Doğumu izleyen 45 günlük kontrol grubunda seminifer tübüller ve tübüller arası bağ doku belirgindi. Seminifer tübüllerin oldukça organize olduğu izlendi. Lümen açıklığı belirgindi. Tübüller arası bağ dokuda kan damarları ve çevrelerinde Leydig hücreleri seçilmekteydi. Seminifer tübülde spermatogonyumlar, primer spermatozitler, sekonder spermatozitler ve erken tipte spermatitler ayırt edildi (Resim 4A,4B).

Doğumdan itibaren 14 süreyle leptin uygulanıp 45. günde testisleri çıkarılan grupta seminifer tübüller ve aradaki bağ doku izlenmekteydi. Bağ dokusunda damarlar ve bunlar etrafında iri Leydig hücreleri oldukça belirgin olarak izlendi. Seminifer tübüllerde spermatogonyumlar, primer spermatozitler, sekonder spermatozitler, erken tipte spermatitler



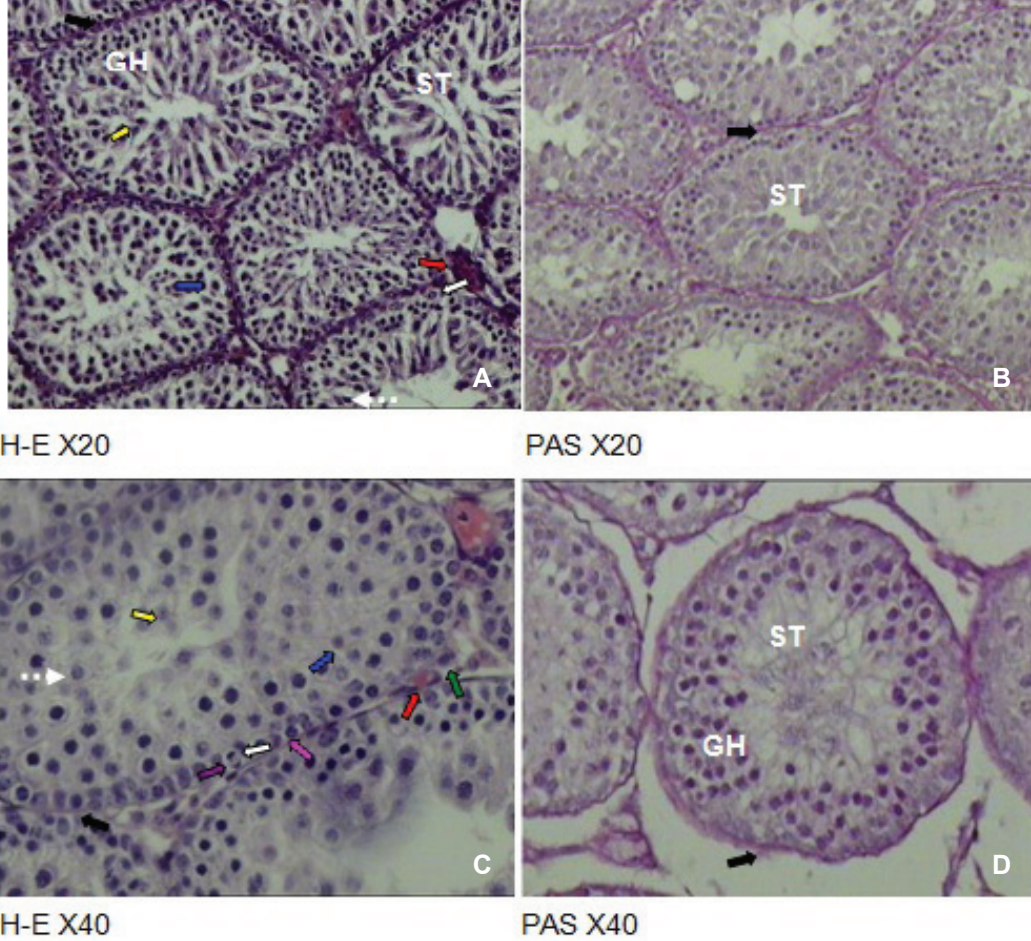
Resim 3 (A,B): 35. günde testisleri çıkarılan kontrol grubu deneklerinde seminifer tübül (ST), bağ dokusu (siyah ok), spermatogonyum (pembe ok), spermatozite I (mavi ok), damar (kırmızı ok), Sertoli hücresi (beyaz ok).

Resim 3 (C,D): 14 gün süreyle leptin verilip 35. günde testisleri çıkarılan deneklerde seminifer tübül(ST) bağ dokusu (siyah ok), spermatozite I (mavi ok), spermatozite II (kesikli ok), lümen (L), damar (kırmızı ok), ve seminifer tübüller arasındaki Leydig hücreleri (yeşil ok).

ve bazı tübüllerde de başları Sertoli hücrelerine gömülü geç tipte spermatitlere rastlandı. Ayrıca tübüllerin çok azında lümene salınmış halde spermium izlendi. Bununla birlikte diğer gruplardan farklı olarak spermatogonyum çekirdeklerinde mitozu simgeleyen görünümüler oldukça dikkat çekiciydi (Resim 4C,4D).

Tartışma

Leptin vücut ağırlığının düzenlenmesinde rol oynayan ve ob geni tarafından üretilen 16 kD ağırlığında bir hormondur. Beyaz yağ dokusu tarafından üretilir ve daha sonra beyine taşınır [35,36]. Beyinde çeşitli merkezlerden yiyecek alımının azalması, enerjinin ve fiziksel



Resim 4 (A,B): 45. günde testisleri çıkarılan kontrol grubu deneklerinde seminfer tübül (ST), bağ dokusu (siyah ok), spermatozoid I (mavi ok), spermatozoid II (kesikli ok), damar (kırmızı ok), Sertoli hücresi (beyaz ok), germ hücre serisi (GH) ve spermatit (sarı ok).

Resim 4 (C,D): 14 gün süreyle leptin verilip 45. günde testisleri çıkarılan deneklerde seminfer tübül (ST), bağ dokusu (siyah ok), spermatogonyum (pembe ok), spermatozoid I (mavi ok), spermatozoid II (kesikli ok), damar (kırmızı ok), Sertoli (beyaz ok), germ hücre serisi (GH), spermatit (sarı ok), mitoz (mor ok) ve seminfer tübüller arasındaki Leydig hücreleri (yeşil ok).

aktivitenin artmasına sağlayan faktörlerin salınmasına neden olur. Bu faktörlerden en önemlisi neuropeptid Y (NPY) olarak bilinen nörotransmitterdir. Bu faktör aracılığı ile leptin salınması, enerjinin ve bazal metabolizmanın artması ile yiyecek alımının ve yağ doku kitlesinin azalması gerçekleşir [37]. Yağ doku kitlesinin azalması diğer endokrin, otokrin ya da parakrin sinyallerin salınması ile yağ dokudan leptin

sentezlenmesinin ve salınmasının azalmasına neden olur. Buradan da anlaşılacağı üzere, leptin salınımında negatif geri bildirim (feed back) söz konusudur. Leptinin beyin aracılığı ile dolaylı olan etkisinin yanında karaciğer, pankreas ve kas dokusu gibi çevresel dokulara direkt yolla da etkisi vardı. Leptinin bu dokulara etkisinde de NPY nörotransmitteri aracılık eder [37-39]. Leptin dokular üzerindeki etkisini hedef

hücrelerde santral sinir sistemi ve diğer pek çok organda bulunan reseptörlerine bağlanarak gerçekleştirir. Ancak leptin ve leptin reseptörü arasındaki ilişki henüz çok net açıklanmamıştır [40,41].

Sıçan, domuz testislerindeki Leydig hücreleri leptin reseptörleri sahiptirler. Fare Leydig ve Sertoli hücrelerinde leptin reseptörü yoktur ancak spermatojenik serideki hücrelerde bulunmaktadır [42,43].

Farelerde yapılan çalışmalarda pubertenin başlama zamanının hemen öncesinde leptin seviyesinin arttığı bildirilmektedir [44]. Bu gözlemler leptin salınımıyla seksüel gelişim arasında bir bağlantının olduğunu göstermektedir. Leptin FSH ve LH salınımını uyararak ovulasyonu artırmaktadır [45-48]. Aynı zamanda overlerde Bcl-2'nin ekspresyonunu artırıp folliküler apoptozisi ve dolayısıyla da atrofiye giden follikül sayısının azalmasına neden olmaktadır. İnsanlarda hem erkeklerde hem de kadınlarda sistemik leptin konsantrasyonu puberte döneminde artmaktadır. Bu artma kadınlarda puberte sonrası da aynen devam etmektedir. Ancak bu salınım erkeklerde puberte sonrası düşmektedir. Leptinin erkeklerde puberte sonrası düşmesi testosteronun leptin salınımına inhibisyonundan kaynaklanmaktadır. Bu inhibisyonunda leptin 8br-cAMP indüklenmiş testosteron üretimini inhibe eder [49,50].

İleri sürülen çalışmalar leptinin pubertenin başlaması için gerekli bir metabolik sinyal olabileceğini düşündürmektedir. Dişi sıçanlarda vajinal açıklık bu sürecin başlangıcının belirlenmesi için güvenilir ve göze çarpan bir dış işareti sağlar [51]. Cheung ve arkadaşları obez olmayan fareleri / 80 libityum ile besleyip ve puberte ile birlikte seksüel gelişimlerini incelediklerinde, bu farelerin hiçbirinde vaginal açıklığın olmadığını aynı zamanda da pubertenin başlamadığını görmüşlerdir. Leptin uygulanan grupta ise pubertenin normal zamanda olaylandığını ve gelişimlerinin normal olduğu görülmüştür [44]. 1996 yılında Barash ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmalarında ob/ob dişi farelerin steril olduğu ve prepubertal dönemden çıkamadıkları ortaya konmuştur. Ob/ob erkek farelerde de fertilité oranı oldukça düşüktür [54]. Bu hayvanlar düşük düzeyde gonadotropin salgılayıcı ve hipogonadaldırlar [39,53]. Seminifer tübülleri çok az sperm içerir ve Leydig hücreleri oldukça atrofiktir [52,54]. Dişi farelerde olduğu gibi erkek farelerde de leptin verilmesi sonucunda fertilitenin düzeldiği, seminifer tübüllerde sperm sayısının arttığı

ve Leydig hücrelerinin normal şekillerine ulaştığı belirlenmiştir. Böylece genetik olarak leptin proteinden yoksun olan farelerde leptin uygulamasının fertilitéyi düzelttiği ileri sürülmüştür [55].

Son yıllarda yapılan çalışmalar da leptin düşük konsantrasyonlarda etkili olduğunu yüksek konsantrasyonlarda verilen leptinin ovulasyonu inhibe ettiği bildirilmektedir. 2009'da Chen ve ark. intraserebroventriküler antileptin antikorunun dişi sıçanlarda puberte başlangıcına etkisini ve serum leptini, LH ve vücut ağırlıkları arasındaki ilişkisini inceledikleri çalışmada periferik leptinin aksine merkez leptinin dişi sıçanlarda pubertede beden kitlesi ve serum LH'ında daha fazla anahtar rol oynadığı sonucuna varmışlardır [51].

Leptin genindeki mutasyonun neden olduğu leptin eksikliği obeziteye, hipogonadizme, pubertede gecikmeye ve bağışıklık sistemi anomalilerine neden olur [56]. İnfertil olup doğumsal leptin eksikliği olan farelere periferik leptin tedavisi uygulanmış ve leptinin gonadotropin salgılayıcı hormon (GnRH) sekresyonunun santral modülasyonunu sağladığını, erkek farelerde FSH, dişi farelerde ise LH seviyelerinin artırdığı kanıtlanmıştır [57]. Bununla birlikte leptin reseptörünün GnRH nöronlarında ifade olup olmadığı tartışmalıdır [58]. Rekombinant leptin verilmesiyle ob/ob dişi farelerinde gonadotropin üretiminin, sekonder seks organlarının ağırlığı ile işlevinin düzeldiği ve bu hayvanların fertil hale geldiği gözlemlenmiştir [54].

Bu çalışmada testis gelişimi açısından leptin uygulanan gruplarla kontrol grupları arasında belirgin farklılık izlenmedi. Ancak seminifer tübüller her iki grup ayrıntılı olarak incelendiğinde çok az farklılıkların olduğu gözlemlendi. 15 günlük kontrol grubunda Leydig ve spermatogonyumlar dışında germ hücre tipleri tam olarak ayırt edilemezken 15 günlük deney gruplarında Leydig hücrelerinin izlenmeye başladığı ve seminifer tübül duvarında spermatogonyumların yanısıra spermatozoidlerin varlığı dikkati çekti. 25 günlük deney ve kontrol grupları gelişim birbirlerine benzer şekildeydi. Bizim çalışmamızda en anlamlı değişiklik 35 günlük ve 45 günlük deney gruplarında gözlemlendi. 35 günlük kontrol grubunda seminifer tübül duvarında spermatogonyumlar, spermatozoid I ve II'ler bulunurken deney gruplarında erken tipte spermatozoidlerin geliştiği izlendi. Kırk beş günlük deney gruplarında kontrol grubundan farklı olarak geç tipte spermatozoidlere ve lümeninde çok az sayıda da olsa olgun spermatozoidlere rastlandı.

Bizim çalışmamızda leptinin yapısal olarak testislerin erken gelişmesinde çok önemli katkısı bulunamadı. Bulgular ekzojen uygulanan leptinin, sıçanların maksimum düzeyde leptin salgıladıkları dönem ile örtüşmesi nedeniyle, adipoz dokulardaki leptin salınımının negatif feedback yoluyla engellenmiş olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca gelişim süresince testosteron yapım basamaklarında leptinin baskılayıcı etkisinin de rol oynayabileceği diğer bir neden olabilir. Sonuç olarak pubertal testis gelişimine belirgin etkisi bulunamayan leptinin puberteyi normal dönemden önceye çekebileceği düşünülmektedir.

Çıkar ilişkisi: Yazarlar çıkar ilişkilerinin olmadığını beyan etmiştir.

Kaynaklar

1. Hoggard N, Hunter L, Lea RG, Trayhurn P, Mercer JG. Ontogeny of the expression of leptin and its receptor in the murine fetus and placenta. *Br J Nutr* 2000;83:317-326.
2. Houseknecht KL, Baile CA, Matteri RL, Spurlock ME. The biology of leptin: a review. *J Anim Sci* 1998;76:1405-1420.
3. Nelson DL, Cox MM. *Lehningers Principles of Biochemistry*. Third Edition. Worth Publishers New York, pp 2000;910-918.
4. Thomas L, Wallace JM, Aitken RP, Mercer JG, Trayhurn P. Circulating leptin during ovine pregnancy in relation to maternal nutrition, body composition and pregnancy outcome. *J Endocrinol* 2001;169:465-476.
5. Ehrhardt RA, Slepatis RM, Bell AW, Boisclair YR. Maternal leptin is elevated during pregnancy in sheep. *Dom Anim Endocrinol* 2001;21:85-96.
6. Gavrilova O, Barr V, Marcus-Samuels B, Reitman M. Hyperleptinemia of pregnancy associated with the appearance of a circulating form of the leptin receptor. *J Biol Chem* 1997;272:30546-30551.
7. Kadokawa H. Effects of exogenous estradiol and progesterone on plasma concentrations of leptin in ewes in non-breeding season. *J Repro Develop* 2007;53:45-50.
8. Kirel B, Doğrusal N. Yeni bir hormon: Leptin. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi* 1998;7:421.
9. Christos S, Mantzoros MD. The role of Leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med* 1999;130:671.
10. Weigle DS. Leptin and other secretory products of adipocytes modulate multiple physiological functions. *Ann. Endocrinol Paris* 1997;58:132-136.
11. Houseknecht KL, Baile CA, Matteri RL, Spurlock ME: The biology of leptin: a review. *J. Anim Sci* 1998;76:405-420.
12. Haynes WG, Morgan DA, Walsh SA, Sivitz WI, Mark AL. Cardiovascular consequences of obesity role of leptin. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1998;25:65-69.
13. Haynes WG, Sivitz WI, Morgan DA, Walsh SA, Mark AL. Sympathetic and cardiorenal actions of leptin. *Hypertension* 1997;30:619-623.
14. Wauters M, Mertens I, Rankinen T, Chagnon M, Bouchard C, Van Gaal L. Leptin receptor gene polymorphisms are associated with insulin in obese women with impaired glucose tolerance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86:3227-3232.
15. Rohner-Jeanrenaud E, Jeanrenaud B. Central nervous system and body weight regulation. *Ann. Endocrinol Paris* 1997;58:137-142.
16. Remesar X, Rafecas I, Fernandez-Lopez JA, Alemany M. Is leptin an insulin counter-regulatory hormone? *FEBS Lett.* 1997;402:9-11.
17. Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC. Wasting illness as a disorder of body weight regulation. *Proc. Nutr. Soc.* 1997;56:785-191.
18. Magnia P, Vektor R, Pagano C, Calcagno A, Martini L, Motta M. Control of the expression of human neuropeptide Y by leptin: in vitro studies. *Peptides* 2001;22:415-420.
19. Wolf G. Neuropeptides responding to leptin. *Nutr Rev* 1997;55:85-88.
20. Castagna L, De Gregorio T, Auegra A, Buemi M, Corsonello A, Bonanzinga S. Leptin: adipocyte hormone. *Recenti. Prog. Med.* 1998;89:200-207.
21. Trayhurn P, Hoggard N, Mercer JG, Rayner DV. Hormonal and neuroendocrine regulation of energy balance—the role of leptin. *Arch. Ernähr* 1998;51:177-185.
22. Zemel MB. Agouti/melanocortin interactions with leptin pathways in obesity. *Nutr Rev* 1998;56:271-274.
23. Castracane VD, Kraemer RR, Franken MA, Kraemer GR, Gimpel T. Serum leptin concentration in women: effect of age, obesity, and estrogen administration. *Fertil. Steril.* 1998;70:472-477.
24. Roemmich JN, Rogol AD. Role of leptin during childhood growth and development. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1999;28:749.
25. Garcia Mayor RV, Andrade MA, Rios M, Lage M, Riequez C, Casanueva FF. Serum leptin levels in normal children: relationship to age, gender, body mass index, pituitary-gonadal hormones, and pubertal stage. *J. Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:2849-2855.
26. Blum WF, Englaro P, Hanitsch S, Juul A, Hertel NT. Plasma Leptin levels in healthy children and adolescents: dependence on body mass index, body fat mass, gender, pubertal stage and testosterone. *J. Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:2904-2910.
27. Carlsson B, Ankarberg C, Rosbmerg S, Norjavaara E, Albertsson-Wikland K, Carlsson LM. Serum leptin concentrations in relation to pubertal development. *Arch Dis Child* 1997;77:396-400.
28. Palment MR, Radovick S, Boepple PA. The impact of reversible gonadal sex steroid suppression on serum leptin concentrations in children with central precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1091-1096.

29. Tena-Sempere M, Barreiro ML. Leptin in male reproduction: the testis paradigm. *Molekuler and Cellular Endo* 2002;188:9-13.
30. Mounzih K, Lu R, Chehab FF. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. *Endocrinology* 1997;138:1190-1193.
31. Gonzalez LC, Pinilla L, Tena-Sempere M, Aguilar E. Leptin (116-130) stimulates prolactin and LH secretion in fasted adult male rats. *Neuroendocrinology* 1999;70:213-220.
32. Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD. A leptin missense mutation is associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nature Gen* 1998;18:213-215.
33. Wauters M, Considine RV, Van Gaal GF. Human Leptin from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *Eur J Endocrinol* 2000;143:293-311.
34. Ahima RS, Saper CB, Flier JS, Elmquist JK. Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 2000;21:263-307.
35. Dyer CJ, Simmons JM, Matteri RL, Keisler DH. Leptin receptor mRNA is expressed in embryonic anterior pituitary and adipose tissues and is differentially expressed in hypothalamic regions of well-fed and feed-restricted ewes. *Domest Anim Endocrinol* 1997;14:119-128.
36. Wauters M, Considine RV, Van Gaal GF. Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *Eur J Endocrinol* 2000;143:293-311.
37. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor. *OB-R. Cell* 1995;83:1263-1271.
38. Cohen B, Novick D, Rubinstein M. Modulation of insulin activities by leptin. *Science (Wash DC)* 1996;274:1185-1188.
39. Swerdloff RS, Peterson M, Vera A, Batt RA, Hever D, Bray GA. The hypothalamic-pituitary axis in genetically obese (ob/ob) mice: response to katecholamine-releasing hormone. *Endocrinology* 1978;103:542-547.
40. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature (Land)* 1994;372:425-432.
41. Tena-Sempere M, Mana PR, Zhong FP et al. Molecular mechanism of leptin receptor messenger ribonucleic acid expression. *J. Endocrinol* 2001;170:413-423.
42. Hoggard N, Mercer JG, Rayner DU, Moar K, Trayhurn P, Williams LM. Localization of leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by RT-PCR and in situ hybridization. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;232:383-387.
43. Caprio M, Isidori AM, Carto AR, Moretti C, Dufau ML, Fabbini A. Expression of functional leptin receptors in rodent key target cells. *Endocrinology* 1999;140:4939-4947.
44. Cheung CC, Thornton JE, Kuijper JL, Weigle DS, Clifton DK, Steiner RA. Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology* 1997;38:855-858.
45. Ahima RS, Dushay J, Flier SN, Prabakaran D, Flier JS. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest* 1997;99:391-395.
46. Caprio M, Fabbini E, Isidori AM, Aversa A, Fabbri A. Leptin in reproduction. *Trends Endocrinol Metab* 2001;12:65-72.
47. Luque RM, Kineman RD, Tena-Sempere M. Regulation of hypothalamic expression of Kiss-1 and GPR54 genes by metabolic factors: analyses using mouse models and a cell line. *Endocrinology* 2007;148:4601-4611.
48. Wabitsch M, Blum WF, Muehe R, Braun M, Hube F, Rascher W, Heinze E, Teller W, Hauner H. Contribution of androgens to the gender difference in leptin production in obese children and adolescents. *J Clin Invest* 1997;100:808-813.
49. Tena-Sempere M, Pinilla L, Gonzalez LC, Dieguez C, Casanueva FF, Aguilar E. Leptin inhibits testosterone secretion from adult rat testis in vitro. *J Endocrinol* 1999;161:211-218.
50. Chen R, Mick GJ, Xu R, Zheng D, Fan Y, Lin X, McCormick KL. Effect of central anti-leptin antibody on the onset of female rat puberty. *Int J Pediatr Endocrinol* 2009;2009:194807.
51. Chehab FF, Mounzih K, Lu R, Lim ME. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science (Wash DC)* 1997;275:88-90.
52. Lane PW, Dickie MM. Fertile obese male mice. Relative sterility in obese males corrected by dietary restriction. *J Hered* 1954;45:56-58.
53. Barash IA, Cheung CC, Weigle DS et al. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 1996;137:3144-3147.
54. Mounzih K, Lu R, Chehab FF. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. *Endocrinology* 1997;138:1190-1193.
55. Murray PG, Read A, Banerjee I, Whatmore AJ, Pritchard LE, Davies RA, Brennan J, White A, Ross RJ, Clayton PE. Reduced appetite and body mass index with delayed puberty in a mother and son: association with a rare novel sequence variant in the leptin gene. *Eur J Endocrinol* 2011;164:521-527.
56. Hamann A, Matthaei S. Regulation of energy balance by leptin. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1996;104:293-300.
57. Donato J Jr, Cravo RM, Frazão R, Elias CF. Hypothalamic sites of leptin action linking metabolism and reproduction. *Neuroendocrinology* 2011;93:9-18.